

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Karakteristik Daun Namnam (*Cynometra cauliflora*).

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun namnam yang diambil dari petani di daerah Purworejo. Bagian yang digunakan adalah bagian daun yang berwarna hijau dan masih segar dengan ciri-ciri tulang daun kelihatan dengan jelas, batangnya dapat dipatahkan dengan mudah dan daunnya utuh. Daun namnam yang digunakan memiliki panjang sekitar 5-7 cm. Daun namnam memiliki tekstur dengan daging daun dan mengkilap pada permukaannya. Daun namnam yang digunakan dipilih dari pohon yang berusia 5 tahun yang bertujuan untuk menyeragamkan kandungan yang ada pada daun. Daun namnam yang digunakan dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Daun namnam segar (Dokumentasi pribadi, 2016)
Keterangan : daun namnam segar memiliki warna hijau

B. Pengeringan Daun Namnam (*Cynometra cauliflora*).

Sebelum proses ekstraksi, daun namnam yang masih segar melalui beberapa tahapan. Tahapan pertama yang diperlukan sebelum ekstraksi dilakukan adalah sortasi kering yaitu memilih daun yang masih bagus dari daun yang telah busuk ataupun layu dan dari kotoran-kotoran yang ada.

Sortasi ini penting untuk dilakukan untuk mengeliminasi adanya bahan pengotor yang ikut serta dalam proses ekstraksi, sehingga menurunkan mutu dan kualitas ekstrak (Prasetyo dan Inorih, 2013).

Tahap kedua adalah pencucian dengan air mengalir yang bertujuan untuk menghilangkan kotoran-kotoran yang terdapat pada daun. Setelah dilakukan proses pencucian, daun dikeringanginkan sampai tidak ada sisa air pada daun yang bertujuan untuk menghindari kadar air yang tidak merata pada daun sehingga daun kering tidak merata pada proses berikutnya (Prasetyo dan Inorih, 2013).

Tahap ketiga adalah daun dikeringkan dengan menggunakan oven sampai kadar air yang terdapat pada daun kurang dari 10 % yang diukur dengan menggunakan *moisture balancing*. Kadar air dikurangi hingga 10 % bertujuan untuk menghentikan reaksi enzimatik yang akan menyebabkan penurunan mutu atau merusakkan pada daun. Air yang masih tersisa dalam daun pada kadar lebih dari 10 % dapat merupakan media pertumbuhan kapang dan jasad renik lainnya. Enzim tertentu dalam sel, masih dapat bekerja, menguraikan senyawa aktif sesaat setelah sel mati dan selama bahan simplisia tersebut masih mengandung kadar air (Prasetyo dan Inorih, 2013).

Pengeringan pada penelitian ini menggunakan oven pada suhu 50 °C selama 24 jam. Penggunaan oven bertujuan untuk mengurangi kerusakan yang mungkin terjadi pada kandungan kimia dalam daun karena panas yang tidak stabil. Menurut Harborne (1987), pengeringan tumbuhan harusnya

dilakukan secepatnya setelah daun diambil, tanpa menggunakan suhu tinggi (di bawah 60 °C) karena suhu yang tinggi dapat mengubah dan merusak kandungan fitokimia dalam bahan.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, pengukuran kadar air dilakukan setelah 24 jam dengan mengambil 1 gram sampel dan diukur kadar air menggunakan *moisture balancing*. Berdasarkan pengukuran dengan *moisture balancing*, nilai kadar air yang ada pada daun setelah dilakukan pengeringan 24 jam adalah 8,97 %. Nilai kadar air yang ditunjukkan telah memenuhi syarat pengeringan dengan nilai kurang dari 10 % (Prasetyo dan Inorih, 2013)

C. Ekstrak Etil Asetat Daun Nannam (*Cynometra cauliflora*)

Tahap ekstraksi ini dilakukan setelah melalui proses pengeringan dan kadar air pada daun di bawah 10 % yang bertujuan untuk menjaga mutu dan mencegah terjadinya kerusakan pada daun. Sebelum dilakukannya ekstraksi, daun yang telah kering dihaluskan dengan penghalus bahan. Alat penghalus bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah *mealer machine*. Daun dihaluskan sampai menjadi bubuk lalu ukuran disamakan dengan menggunakan ayakan 90 mesh yang bertujuan untuk menyeragamkan ukuran serbuk dan mempercepat proses ekstraksi dengan meningkatkan luas permukaan dari bahan dan membantu proses penetrasi pelarut ke dalam sel tumbuhan sehingga mempercepat pelarutan komponen bioaktif dan meningkatkan rendemen ekstraksi (Ketaren, 1985).

Daun lalu dimaserasi dengan menggunakan pelarut etil asetat. Sebanyak 100 gram serbuk yang telah diayak dimaserasi dengan pelarut etil asetat sebanyak 500 ml (Hidayati, 2015). Pemilihan pelarut disesuaikan dengan polaritas senyawa yang diinginkan. Kelarutan senyawa dalam pelarut tergantung pada sifat polaritas senyawa dan pelarut tersebut. Bahan-bahan dari senyawa kimia akan mudah larut dalam bahan pelarut yang sama polaritasnya dengan bahan yang akan dilarutkan (Harborne, 1996). Pemilihan pelarut yang akan digunakan harus memperhatikan beberapa aspek antara lain selektivitas, kemampuan mengekstrak, toksisitas, kemudahan untuk diuapkan dan harga pelarut (Harborne, 1996)

Etil asetat digunakan sebagai pelarut karena memiliki kemampuan mengekstrak senyawa yang diinginkan paling baik (Hidayati, 2015). Senyawa yang akan diekstrak bersifat non-polar dan polar. Etil asetat merupakan pelarut yang memiliki sifat semi polar sehingga merupakan pelarut yang dapat melarutkan senyawa yang ada pada bahan. Selain itu, etil asetat merupakan pelarut yang memiliki tingkat toksisitas yang rendah dibandingkan pelarut dengan kandungan klorin (Fieser dan Fieser, 1967). Etil asetat memiliki titik didih yang rendah yaitu 77 °C sehingga pelarut mudah menguap. Etil asetat merupakan pelarut yang memenuhi aspek yang harus diperhatikan dalam memilih pelarut.

Daun selanjutnya direndam menggunakan pelarut selama 5 hari di dalam *incubator shaker*. Penggunaan *incubator shaker* bertujuan agar serbuk terendam dengan sempurna dengan pelarut sehingga senyawa

metabolit dapat terekstrak dengan baik. Setelah 3 hari, bahan disaring sehingga diperoleh filtrat berwarna hijau pekat. Kemudian bahan dimaserasi kembali menggunakan pelarut sebanyak 500 ml sampai 2 hari dan bahan difiltrasi kembali sehingga diperoleh filtrat I dan filtrat II (Aziz dkk., 2013). Filtrat hasil maserasi dapat dilihat pada Gambar 10.



Filtrat berwarna hijau kehitaman

Gambar 10 Filtrat hasil maserasi daun namnam (Dokumentasi pribadi, 2016)
Keterangan : Filtrat hasil maserasi daun namnam berwarna hijau kehitaman

Filtrat yang telah diperoleh selanjutnya dievaporasi dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 77 °C dengan kecepatan 150 rpm. Proses evaporasi ini dilakukan hingga menghasilkan cairan pekat daun namnam. Selanjutnya, cairan tersebut dipekatkan kembali dengan menggunakan *waterbath* untuk menyempurnakan penguapan. Hasil dari evaporasi dan penguapan dengan *waterbath* adalah ekstrak kental (pasta) yang berwarna hijau pekat dengan berat total 0,706 gram. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Handoko (2013) mengenai aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun sala pada terhadap *Staphylococcus epidermis*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Klebsiella pneumoniae* serta bioautografinya menghasilkan berat ekstrak 6,5 gram dengan berat serbuk 100 gram. Hal ini menunjukkan ekstrak yang dihasilkan dari proses

ekstraksi daun namnam belum maksimal sehingga hasil ekstrak yang ada lebih sedikit. Hasil ekstrak yang lebih sedikit dapat disebabkan oleh jenis pelarut yang digunakan berbeda dan metode ekstraksi yang digunakan berbeda.

D. Rendemen Ekstrak Etil Asetat Daun Namnam

Nilai rendemen dari ekstrak asetat daun namnam dapat dicari untuk mengetahui keefektifan proses ekstraksi yang dilakukan (Suprianto, 2008).

Nilai rendemen ekstrak yang didapatkan dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Nilai Rendemen Ekstrak Etil Asetat Daun Namnam (*Cynometra cauliflora*)

Pengulangan	Berat (g)			Rendemen Ekstrak (%)
	Awal	Akhir	Ekstrak	
I	36,360	37.702	1,342	6,71
II	30,956	31,742	0,786	3,93
III	34,627	35.529	0,902	4,51
IV	66,394	67,378	0,984	4,92
V	63,886	64,592	0,706	3,53
Rata-rata Rendemen Ekstrak				4,72 %

Berdasarkan percobaan yang dilakukan, rata-rata rendemen ekstrak yang diperoleh dengan pelarut etil asetat dan lama maserasi 5 hari adalah 4,72 %. Hasil yang didapatkan tersebut dapat dikatakan rendah. Hasil rendemen tersebut didapatkan dari 5 pengulangan dengan berat akhir ekstrak berturut-turut adalah 1,342 gram, 0,786 gram, 0,902 gram, 0,984

gram dan 0,706 gram. Rendemen ekstrak yang dihasilkan berturut-turut adalah 6,71 %, 3,93 %, 4,51 %, 4,92 % dan 3,52 %.

E. Fitokimia Ekstrak Etil Asetat Daun Namnam (*Cynometra cauliflora*)

Ekstrak yang telah diperoleh selanjutnya diuji kandungan metabolit sekundernya secara kualitatif. Pengujian ini bertujuan untuk mengetahui ada atau tidaknya suatu senyawa pada ekstrak tersebut. Pengujian metabolit sekunder pada bahan meliputi pengujian flavonoid, alkaloid, tanin, saponin dan triterpenoid atau steroid. Hasil pengujian senyawa kimia ekstrak etil asetat daun namnam dapat dilihat pada Tabel 4.

Hasil pengujian senyawa kimia dari ekstrak etil asetat daun namnam menunjukkan adanya alkaloid dengan ditunjukkan hasil endapan coklat, merah dan putih pada saat ditambahkan pereaksi Wagner, Dragendorff dan Meyer. Hasil positif alkaloid pada uji Wagner ditandai dengan terbentuknya endapan coklat sampai kuning. Diperkirakan endapan tersebut adalah kalium alkaloid (McMurry dan Fay, 2000). Pada pembuatan pereaksi Wagner, iodin bereaksi dengan ion I^- dari kalium iodide menghasilkan ion I_3^- yang berwarna coklat. Pada uji Wagner, ion logam K^+ akan membentuk ikatan kovalen koordinat dengan nitrogen pada alkaloid membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap. Reaksi yang terjadi pada uji Wagner ditunjukkan pada Gambar 11.

Tabel 4. Hasil Pengujian Senyawa Kimia Ekstrak Etil Asetat Daun Namnam (*Cynometra cauliflora*)

Metabolit Sekunder	Hasil Akhir Setelah Pengujian	Hasil
Alkaloid (Meyer, Wagner dan Dragendorff)	Meyer : terbentuk endapan putih Wagner : terbentuk endapan coklat Dragendorff : terbentuk endapan merah	+
Saponin	Terbentuk buih	-
Flavonoid	Terbentuk warna kuning	+
Tanin	Terbentuk warna biru kehitaman	+
Steroid	Terbentuk warna hijau	+
Triterpenoid	Terbentuk warna merah	-

Keterangan : + = menunjukkan adanya senyawa tersebut
- = menunjukkan tidak adanya senyawa tersebut

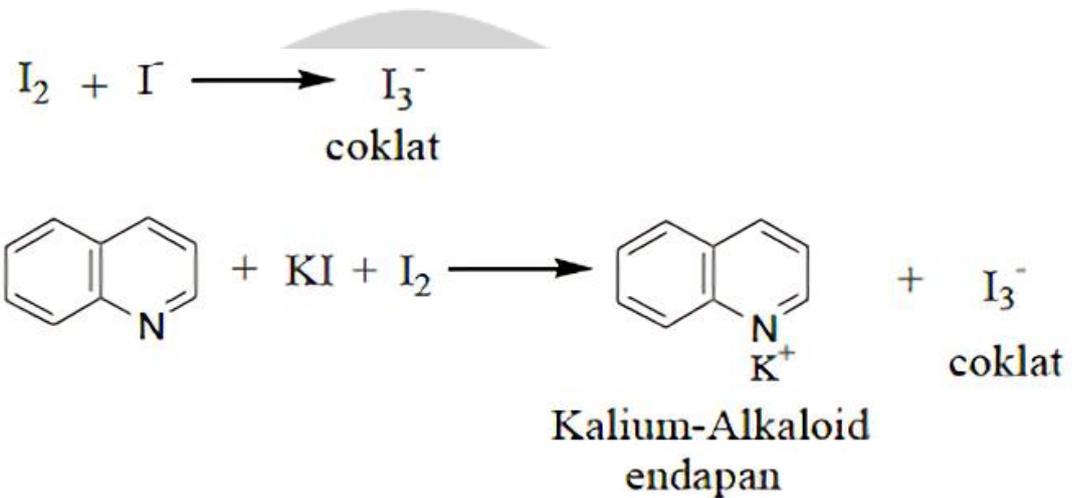
Hasil positif alkaloid pada uji Dragendorff juga ditandai dengan terbentuknya endapan coklat muda sampai kuning. Endapan tersebut adalah kalium alkaloid (McMurry dan Fay, 2000). Pada pembuatan pereaksi Dragendorff, bismut nitrat dilarutkan dalam HCl agar tidak terjadi reaksi hidrolisis karena garam-garam bismut mudah terhidrolisis membentuk ion bismutil (BiO^+), agar ion Bi^{3+} tetap berada dalam larutan, maka larutan itu ditambah asam sehingga kesetimbangan akan bergeser ke arah kiri (Fessenden dan Fessenden, 1986). Selanjutnya ion Bi^{3+} dari bismut nitrat bereaksi dengan kalium iodida membentuk endapan hitam Bismut(III) iodida yang kemudian melarut dalam kalium iodida berlebih membentuk kalium tetraiodobismutat (Svehla, 1990). Pada uji alkaloid dengan pereaksi Dragendorff, nitrogen digunakan untuk membentuk ikatan kovalen

koordinat dengan K^+ yang merupakan ion logam. Reaksi pada uji Dragendorff ditunjukkan pada Gambar 12.

Hasil positif alkaloid pada uji Mayer ditandai dengan terbentuknya endapan putih. Diperkirakan endapan tersebut adalah kompleks kalium-alkaloid (McMurry dan Fay, 2004). Pada pembuatan pereaksi Mayer, larutan merkuri(II) klorida ditambah kalium iodida akan bereaksi membentuk endapan merah merkuri(II) iodida. Jika kalium iodida yang ditambahkan berlebih maka akan terbentuk kalium tetraiodomerkurat(II) (Svehla, 1990). Alkaloid mengandung atom nitrogen yang mempunyai pasangan elektron bebas sehingga dapat digunakan untuk membentuk ikatan kovalen koordinat dengan ion logam (McMurry dan Fay, 2004). Pada uji alkaloid dengan pereaksi Mayer, diperkirakan nitrogen pada alkaloid akan bereaksi dengan ion logam K^+ dari kalium tetraiodomerkurat(II) membentuk kompleks kalium alkaloid yang mengendap (McMurry dan Fay, 2004). Reaksi yang terjadi pada uji Mayer ditunjukkan pada Gambar 13.

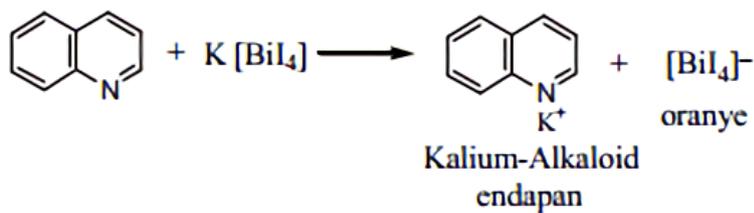
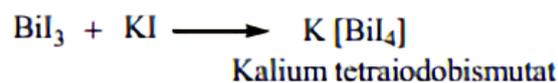
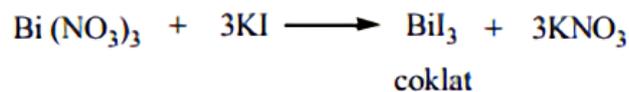
Apabila dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan oleh Sukendar dan Amelia (2013), hasil analisis senyawa alkaloid pada ekstrak etanol daun namnam menunjukkan hasil positif juga. Selain itu, penelitian yang dilakukan oleh Hidayati (2015), hasil analisis senyawa alkaloid pada ekstrak etil asetat daun namnam menunjukkan hasil positif juga. Berdasarkan perbandingan tersebut, daun namnam mengandung senyawa

alkaloid. Hasil pengujian senyawa alkaloid ekstrak etil asetat daun namnam dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 11. Reaksi Uji Wagner (Sumber : McMurry dan Fay, 2004)

Keterangan : Nitrogen yang terkandung pada alkaloid akan bereaksi dengan pereaksi Wagner yang membentuk endapan kalium alkaloid yang berwarna coklat.

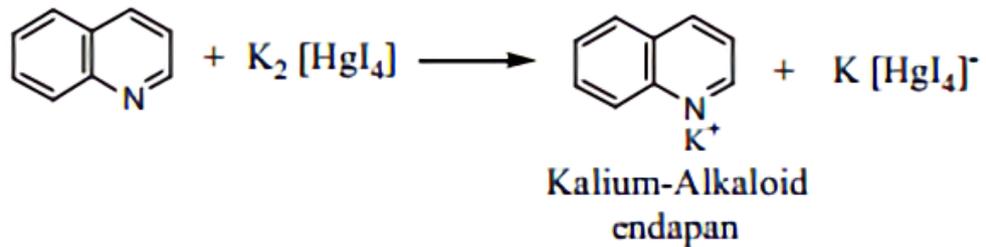


Gambar 12. Reaksi Uji Dragendorff (Sumber : Miroslav, 1971).

Keterangan : Nitrogen dari alkaloid akan bereaksi dengan kalium tetraiodobismutat yang membentuk endapan kalium alkaloid yang berwarna merah.

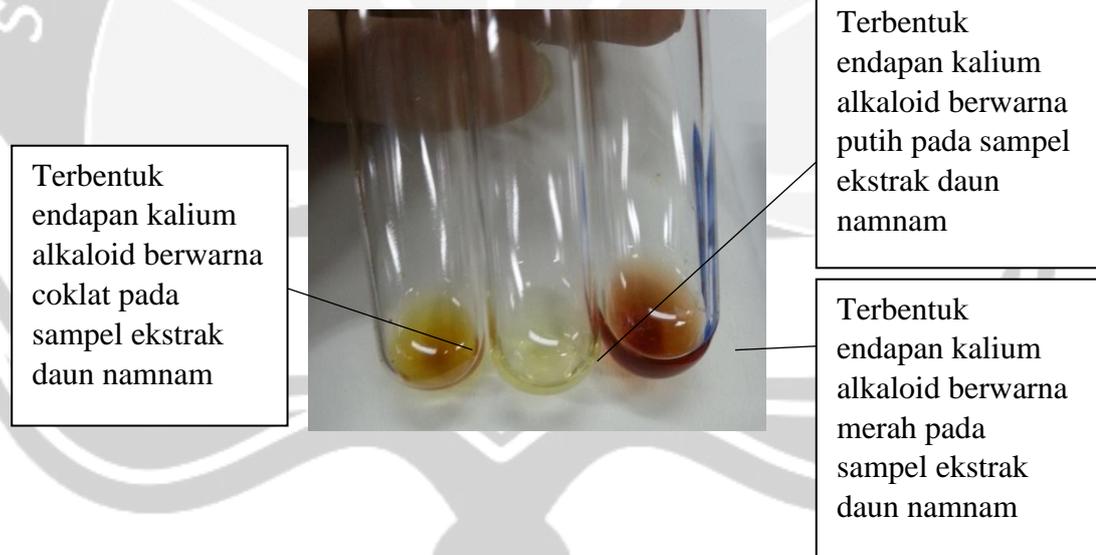


Kalium tetraiodomerkurat(II)



Gambar 13. Reaksi Uji Meyer (Sumber : McMurry dan Fay, 2004)

Keterangan : Nitrogen pada alkaloid akan bereaksi dengan kalium tetraiodomerkurat (II) yang membentuk kompleks endapan kalium alkaloid yang berwarna putih

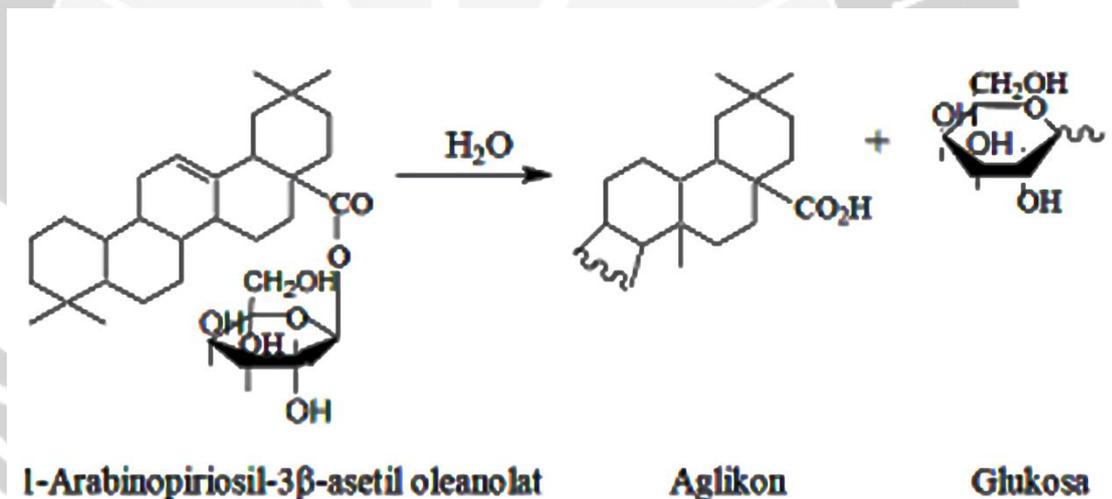


Gambar 14. Hasil uji alkaloid ekstrak etil asetat daun namnam (Dokumentasi pribadi, 2016)

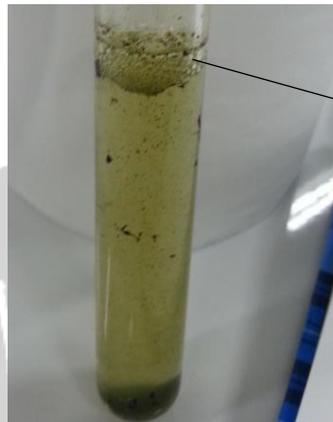
Keterangan : Terdapat endapan setelah ditambahkan pereaksi Meyer, Wagner dan Dragendorff

Pengujian saponin ekstrak etil asetat daun namnam menunjukkan adanya senyawa saponin yang dapat dilihat dari hasil terbentuknya busa.

Karakteristik senyawa saponin adalah terkait kemampuannya untuk menghasilkan busa atau buih ketika ekstrak direaksikan dengan air dan dikocok (Fessenden dan Fessenden, 1986). Karakteristik tersebut dimiliki saponin karena saponin memiliki gugus hidrofil dan hidrofob yang dapat bertindak sebagai *surface agent* dalam pembentukan buih. Buih tersebut terbentuk karena saponin memiliki gugus polar dan non-polar (Stevens dkk., 1993). Reaksi hidrolisis saponin dalam air dapat dilihat pada Gambar 10. Hasil pengujian saponin ekstrak daun namnam dapat dilihat pada gambar 11.



Gambar 15. Reaksi Hidrolisis saponin dalam air (Sumber : Miroslav, 1971)

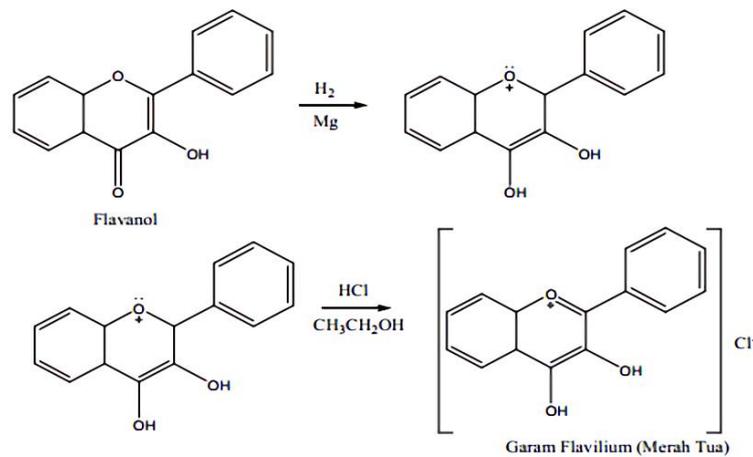


Terbentuk
busa pada
sampel

Gambar 16. Hasil uji saponin ekstrak etil asetat daun namnam
(Dokumentasi pribadi, 2016)

Keterangan : Terbentuk busa setelah dilakukan pengocokkan

Pengujian flavonoid ekstrak etil asetat daun namnam membuktikan bahwa dalam sampel yang diuji positif mengandung metabolit sekunder golongan flavonoid. Hal ini ditunjukkan oleh perubahan warna sampel menjadi merah tua. Penambahan HCl dalam uji kualitatif flavonoid berguna sebagai penghidrolisis flavonoid menjadi aglikonnya, yaitu dengan menghidrolisis O-glikosil (Miroslav, 1971). Glikosil akan tergantikan oleh H^+ dari asam, karena sifatnya yang elektrofilik glikosida berupa gula yang biasa dijumpai yaitu glukosa, galaktosa dan ramnosa. Serbuk Mg menghasilkan senyawa kompleks yang berwarna merah atau jingga (Stevens dkk.,1993). Reaksi yang terjadi dapat dilihat pada Gambar 12.



Gambar 17. Reaksi Uji Flavonoid (Sumber : Miroslav, 1971)

Keterangan : Senyawa flavonoid akan berikatan dengan amil alkohol, serbuk Mg dan larutan HCl membentuk garam flavium yang berwarna merah, kuning atau jingga.

Berdasarkan pengujian yang dilakukan, senyawa flavonoid terbukti ada pada daun namnam. Hal tersebut didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Hidayati (2015) yang mendeteksi adanya senyawa flavonoid pada ekstrak etil asetat daun namnam secara kualitatif. Hasil uji flavonoid dapat dilihat pada gambar 13.

Pengujian steroid atau triterpenoid ekstrak etil asetat daun namnam menunjukkan adanya senyawa steroid pada sampel. Hasil akhir setelah pengujian yang menunjukkan adanya steroid adalah dengan terbentuknya warna hijau (Harborne, 1987). Warna hijau yang muncul merupakan kemampuan steroid yang ada pada ekstrak bila direaksikan dengan H_2SO_4 pekat dalam pelarut asam asetat anhidrat (pereaksi Lieberman Burchard) (Sangi, dkk, 2008). Reaksinya dapat dilihat pada Gambar 14. Keberadaan senyawa steroid pada daun namnam diperkuat dengan penelitian Hidayati (2015) yang menunjukkan steroid terdapat pada daun namnam ketika

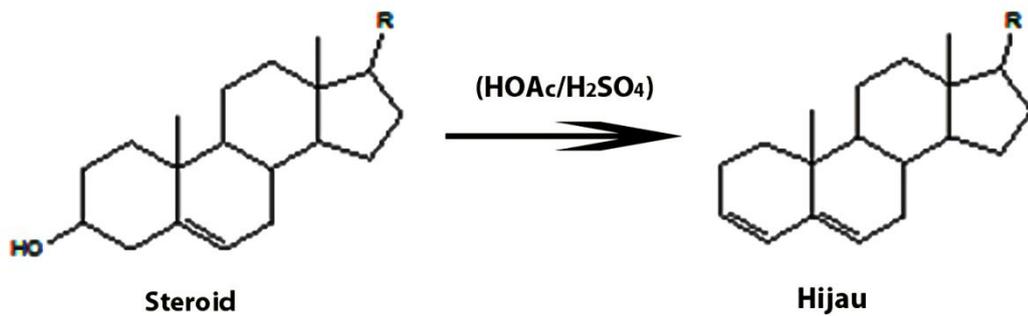
dilakukan pengujian secara kualitatif. Hasil pengujian steroid terhadap ekstrak etil asetat daun namnam dapat dilihat pada Gambar 15.



Terbentuk
warna merah
pada sampel

Gambar 18. Hasil uji senyawa flavonoid pada ekstrak etil asetat daun namnam (Dokumentasi Pribadi, 2016)

Keterangan : Terbentuknya warna merah pada akhir reaksi menunjukkan adanya senyawa flavonoid



Gambar 19. Reaksi Uji Steroid (Sumber : Harborne, 1987)

Keterangan : Senyawa steroid yang terkandung dalam sampel akan bereaksi dengan asam sulfat pekat membentuk warna hijau.



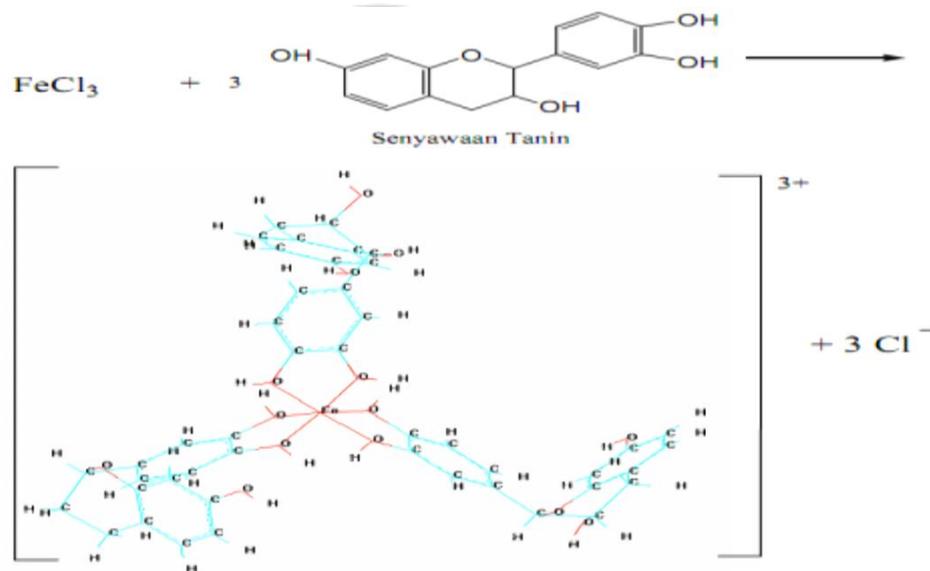
Terbentuk
warna hijau
kehitaman
pada sampel

Gambar 20. Hasil Uji Senyawa Steroid pada ekstrak etil asetat daun namnam
(Dokumentasi pribadi, 2016).

Keterangan : Terbentuk warna hijau pekat/ kehitaman pada ekstrak yang menandakan adanya senyawa steroid

Pengujian tanin ekstrak etil asetat daun namnam menunjukkan adanya senyawa tanin dengan menghasilkan warna hijau kehitaman. Warna hijau kehitaman yang terbentuk merupakan hasil reaksi dari tanin dengan garam ferri (Stevens dkk.,1993). Pengujian ini menggunakan akuades dan larutan FeCl_3 untuk melarutkan senyawa tanin sedangkan larutan FeCl_3 berperan sebagai penyedia atom pusat bagi tanin. Larutan FeCl_3 akan bersubstitusi dengan gugus hidroksil tanin sehingga membentuk suatu kompleks stabil dengan FeCl_3 sebagai atom pusat dan tanin sebagai ligannya. Kompleks tersebut akan membentuk warna biru atau hijau atau kehitaman dan sekaligus menandai hasil positif tanin tersebut (Stevens dkk.,1993). Reaksi antara tanin dan FeCl_3 membentuk kompleks warna yang dapat dilihat pada Gambar 16. Keberadaan tanin pada daun namnam juga diperkuat dengan penelitian yang dilakukan oleh Aziz dkk (2013) yang menunjukkan adanya senyawa tanin pada ekstrak daun namnam setelah

dilakukan pengujian kualitatif. Hasil pengujian tanin terhadap ekstrak etil asetat daun namnam dapat dilihat pada Gambar 17.



Gambar 21. Reaksi Uji antara Tanin dan FeCl_3 (Sumber: Stevens dkk.,1993)
Keterangan : Senyawa tanin berikatan kovalen dengan FeCl_3 membentuk kompleks stabil yang ditunjukkan dengan perubahan warna menjadi hijau kehitaman atau biru



Terbentuk warna hijau kehitaman pada sampel

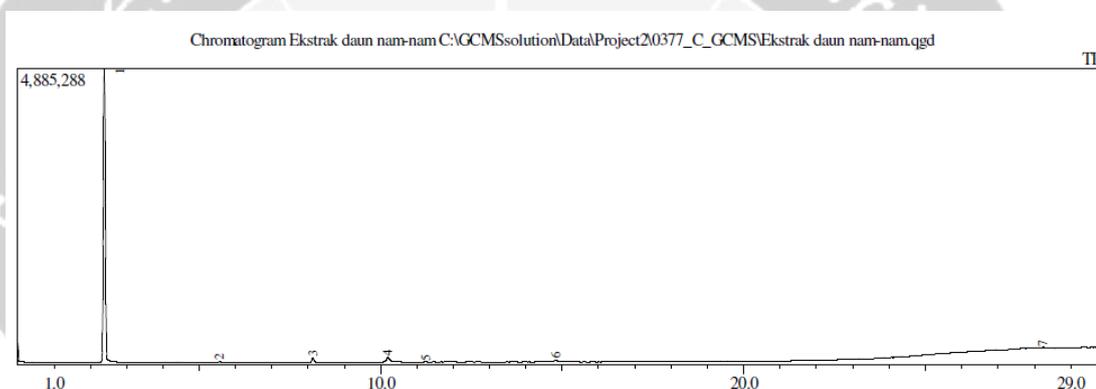
Gambar 22. Hasil Uji senyawa tanin pada ekstrak etil asetat daun namnam (Dokumentasi Pribadi, 2016)

Keterangan : Terbentuk warna hijau kehitaman yang menunjukkan adanya senyawa tanin

F. Skrinning Senyawa Daun Namnam Menggunakan GCMS

Metode GCMS merupakan gabungan dari dua instrumen alat yaitu spektrofotometri massa dan kromatografi gas. Senyawa isolat dianalisis

terlebih dahulu menggunakan kromatografi gas yang selanjutnya setiap komponen dianalisis menggunakan spektrofotometri massa. Hasil analisis menggunakan kromatografi gas dapat dilihat dengan kromatogram yang terbentuk. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, ekstrak etil asetat daun namnam yang telah dianalisis menggunakan kromatografi gas terlihat ada 7 puncak yang menunjukkan senyawa yang terdeteksi oleh kromatografi gas. Gambar hasil kromatografi gas dapat dilihat pada Gambar 18.



Gambar 23. Hasil Kromatogram Ekstrak Etil Asetat Daun Namnam (Dokumentasi Pribadi, 2016)

Keterangan :Terdapat 7 puncak yang terlihat pada kromatogram

Hasil kromatogram pada Gambar 18 menunjukkan adanya senyawa tertentu pada ekstrak daun namnam kemudian analisis dilanjutkan pada tahap spektrofotometri massa. Senyawa-senyawa yang ada pada analisis GCMS dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil analisis senyawa ekstrak etil asetat daun namnam dengan GCMS

Puncak	Waktu Retensi	Senyawa	Rumus molekul	Massa Molekul	Luas Area (%)
1	2,389	Etil Asetat	$C_4 H_8 O_2$	88	94,47
2	5,574	Benzena	$C_6H_4Cl_2$	146	0,25

3	8,133	Naftalena	$C_{10}H_8$	128	1,55
4	10,201	Eugenol	$C_{10}H_{12}O_2$	164	2,48
5	11,237	Caryophyllena	$C_{15}H_{24}$	204	0,17
6	14,816	Santalol	$C_{15}H_{24}O$	220	0,80
7	28,240	Vitamin E Asetat	$C_{35}H_{52}O_3$	592	0,29

Berdasarkan Tabel 5, dapat dilihat bahwa senyawa yang menunjukkan nilai kemelimpahan dengan luas area yang paling besar adalah etil asetat dengan waktu retensi 2,389, eugenol dengan waktu retensi 10,201, naftalena dengan waktu retensi 8,133 dan santalol dengan waktu retensi 14,816.

Senyawa eugenol yang terdapat pada sampel memiliki kemampuan antibakteri, antijamur dan antiinflamasi. Eugenol merupakan golongan fenol yang dalam konsentrasi tinggi akan mengkoagulasi protein dalam sel, sedangkan dalam konsentrasi rendah, mengakibatkan bocornya isi sitoplasma karena terjadinya lisis (Pelczar, 1988). Mekanisme bocornya isi sitoplasma karena kandungan eugenol yang dapat berinteraksi dengan membran luar sel bakteri terutama komponen fosfolipida yang membentuk pori pada membran luar sel bakteri. Interaksi antara fosfolipida dan eugenol menyebabkan perubahan struktur fosfolipida yang menyebabkan molekul yang berukuran lebih besar dapat keluar dari membran sel atau sifat permeabel membran mengalami perubahan menyebabkan kebocoran isi sitoplasma seperti protein dan asam nukleat (Leboffe dan Pierce, 2012).

Membran sitoplasma mempertahankan bahan-bahan tertentu di dalam sel serta mengatur aliran keluar-masuk bahan lain. Kerusakan pada membran akan mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan sel atau matinya sel (Pelczar, 1988). Mekanisme senyawa fenol sebagai zat antibakteri di antaranya adalah meracuni protoplasma, merusak dan menembus dinding sel yang menyebabkan kebocoran sel, serta mengendapkan protein sel bakteri pada konsentrasi tinggi, sedangkan pada konsentrasi rendah, menghambat sintesis enzim yang esensial. Senyawa fenol mampu memutuskan ikatan silang peptidoglikan dalam upayanya menerobos dinding sel (Brannen dan Davidson, 1993).

Setelah menerobos dinding sel, senyawa fenol dapat menyebabkan kebocoran nutrisi sel dengan merusak ikatan hidrofobik komponen penyusun membran sel seperti protein dan fosfolipid serta larutnya komponen-komponen yang berikatan secara hidrofobik yang berakibat meningkatnya permeabilitas membran. Terjadinya kerusakan pada membran sel berakibat terhambatnya aktivitas dan biosintesis enzim-enzim spesifik yang diperlukan dalam reaksi metabolisme (Brannen dan Davidson, 1993).

Senyawa eugenol terdapat pada daun sirih dan daun salam. Kandungan eugenol pada daun sirih sekitar 20% dan pada daun salam sekitar 9% (Stevens dkk., 1993). Jika dibandingkan dengan kadar eugenol yang terdapat pada daun namnam, kadar eugenol pada kedua daun lebih

besar. Kadar eugenol yang ada pada daun namnam berdasarkan hasil uji GCMS adalah sekitar 2,48%.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Hidayati (2015) senyawa yang terdapat pada ekstrak etil asetat daun namnam adalah *n-hexadecanoic acid*, *9-octadecanoic acid* dan *benzo [b] cyclopropa[1m] fluorenone*. Perbedaan senyawa yang ada dapat dikarenakan metode sebelum analisis GCMS yang dilakukan. Pada penelitian Hidayati (2015) digunakan metode pemisahan dengan menggunakan Kromatografi Kolom Vakum terlebih dahulu sebelum dianalisis dengan menggunakan GCMS. Pemisahan tersebut memungkinkan senyawa yang paling kecil juga dapat terdeteksi sedangkan pada penelitian yang dilakukan, pemisahan hanya dilakukan dengan membran filter.

G. Uji Kemurnian Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus epidermidis*.

Pengujian kemurnian bakteri dilakukan agar didapatkan isolat bakteri murni baik *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Uji kemurnian bakteri pada penelitian ini meliputi pengamatan morfologi koloni pada medium agar petri, pengecatan Gram, uji motilitas, uji katalase dan uji biokimia yaitu uji fermentasi karbohidrat menggunakan medium glukosa, sukrosa dan laktosa (Cappucino dan Sherman, 2011).

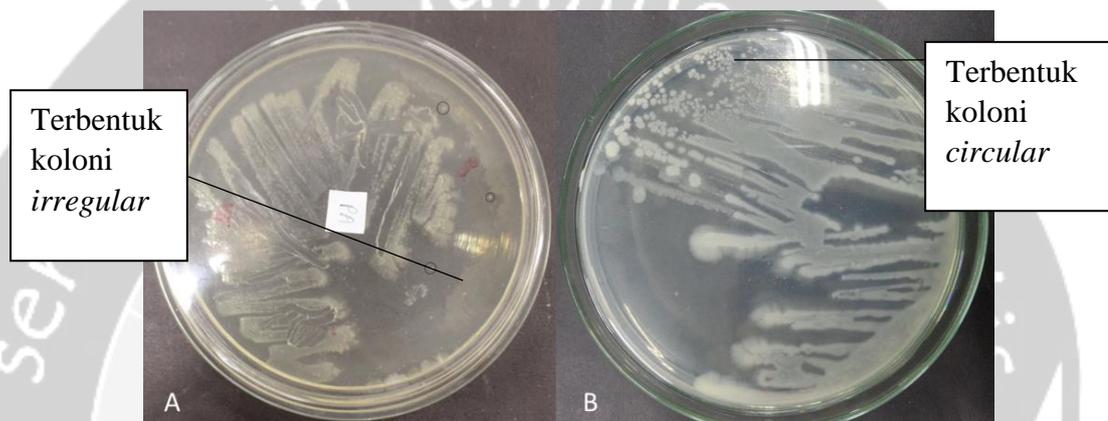
Pengujian morfologi koloni bakteri bertujuan untuk mengetahui karakteristik mikroorganisme dalam bentuk koloni sehingga dapat membantu mengidentifikasi mikroorganisme tersebut. Cara yang digunakan

dalam pengujian morfologi koloni bakteri pada agar petri ini adalah dengan metode *streak plate*. Parameter yang diamati pada koloni bakteri yang tumbuh adalah warna, bentuk, tepian dan kenaikan koloni (Cappucino dan Sherman, 2011).

Setelah bakteri uji *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa* diinokulasi dan diinkubasi, koloni yang terbentuk dapat dicatat dan dibandingkan dengan data yang terdapat pada *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Hasil pengujian yang diperoleh berdasarkan uji kemurnian yang telah dilakukan, dapat dilihat pada Tabel 6 dan Tabel 7. Hasil pengujian morfologi koloni pada *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa* sesuai dengan data yang tertera pada buku *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa koloni *Staphylococcus epidermidis* adalah berwarna putih, bulat dan bertepi halus hasil tersebut sesuai dengan pernyataan Breed dkk (1957) yang menunjukkan bahwa koloni *Staphylococcus epidermidis* berwarna putih hingga kuning, *circular*, *smooth* dan tepinya *entire*. Selain itu, hasil pengamatan koloni *Pseudomonas aeruginosa* yaitu berbentuk *irregular*, permukaan halus, dan berwarna putih, hasil tersebut sesuai dengan pernyataan Breed dkk (1957) yaitu *Pseudomonas aeruginosa* memiliki bentuk koloni *irregular*. Hasil pengujian morfologi koloni bakteri dapat dilihat pada Gambar 19.

Pengecatan Gram merupakan teknik pengecatan bakteri menggunakan beberapa macam larutan atau zat pewarna untuk mewarnai

sel. Tujuan pengujian ini adalah untuk membedakan jenis bakteri Gram positif dan Gram negatif (Yusman, 2006). Pengecatan Gram membutuhkan beberapa jenis larutan zat warna yaitu larutan *Hucker's Crystal Violet*, larutan mordan *Lugol's Iodine*, larutan alkohol dan larutan safranin (Cappuccino dan Sherman, 2011).



Gambar 24, Hasil Uji Morfologi Koloni (a) *Pseudomonas aeruginosa* (b) *Staphylococcus epidermidis*
 Keterangan : (a) Koloni berbentuk *irregular*, permukaan halus dan berwarna putih, (b) koloni berbentuk *circular*, *smooth*, putih dan tepinya *entire*.

Berdasarkan pengujian yang dilakukan, *Staphylococcus epidermidis* merupakan bakteri Gram positif dan *Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri Gram negatif. Hasil ini dapat dilihat dari warna akhir yang terlihat pada bakteri bakteri setelah diberikan beberapa larutan pewarna yaitu berwarna ungu/biru dan berwarna merah. Hasil ini sesuai dengan pernyataan Breed dkk (1957) yang menyatakan bahwa *Staphylococcus epidermidis* merupakan bakteri Gram positif dan *Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri Gram negatif. Hasil pengujian pengecatan Gram *S. epidermidis* dan *P. aeruginosa* dapat dilihat pada Gambar 20.

Tabel 6. Hasil Uji Kemurnian *Staphylococcus epidermidis*

Parameter Uji Kemurnian Bakteri	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
	Hasil Penelitian	Menurut Breed dkk (1957)
Morfologi koloni	Putih, bulat dan tepi halus	Putih keruh hingga kuning, circular, smooth, tepinya entire
Pengecatan Gram	Gram positif	Gram positif
Uji Motilitas	Non-motil	Non-motil
Uji Katalase	Positif	Positif
Fermentasi Karbohidrat : • Laktosa • Glukosa • Sukrosa	+ + +	+ + +

Keterangan : + = dapat memfermentasikan karbohidrat

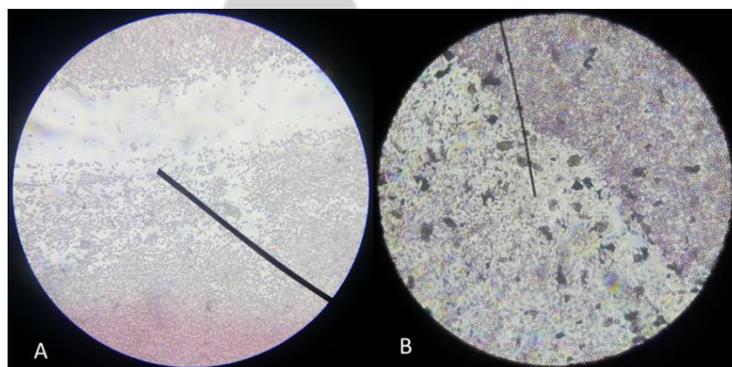
Tabel 7. Hasil Uji Kemurnian *Pseudomonas aeruginosa*

Parameter Uji Kemurnian Bakteri	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	Hasil Penelitian	Menurut Breed dkk (1957)
Morfologi koloni	Irregular, berwarna putih	Irregular
Pengecatan Gram	Gram negatif	Gram negative
Uji Motilitas	Motil	Motil
Uji Katalase	Positif	Positif
Fermentasi Karbohidrat : • Laktosa • Glukosa • Sukrosa	- - -	- - -

Keterangan : + = dapat memfermentasikan karbohidrat
- = tidak dapat memfermentasi karbohidrat

Pengujian motilitas atau pergerakan bakteri dapat dilakukan dengan menginokulasikan bakteri uji dengan menusukkan jarum enten ke dalam medium agar tegak. Hasil inokulasi diinkubasi dan dilihat bentuknya koloni di daerah tusukan, parameter yang diamati adalah adanya koloni yang terbentuk atau tidak, jika terdapat koloni yang menyebar ke dalam agar membuktikan bahwa bakteri uji bersifat motil dan bila tidak menyebar bakteri bersifat non-motil (Cappuccino dan Sherman, 2011). Berdasarkan pengamatan terhadap *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa* menunjukkan hasil yang sesuai dengan Breed dkk (1957) yaitu *Staphylococcus epidermidis* bersifat non motil dan *Pseudomonas aeruginosa* bersifat motil.

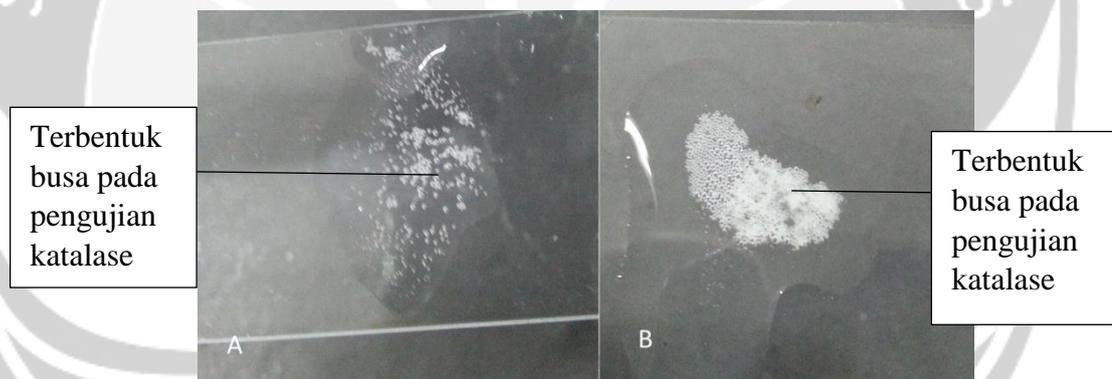
Pengujian katalase digunakan untuk mengetahui adanya enzim katalase pada isolat bakteri. Katalase adalah enzim yang dapat mengkatalisasi penguraian hydrogen peroksida menjadi air dan O₂. Hidrogen peroksida bersifat toksik pada sel karena senyawa ini dapat menginaktivasi enzim dalam sel. Uji ini penting untuk mengetahui sifat bakteri terhadap kebutuhan akan oksigen (Lay, 1994).



Gambar 25. Hasil pengujian pengecatan Gram bakteri (a) *Pseudomonas aeruginosa* (b) *Staphylococcus epidermidis*

Keterangan : Sel bakteri yang berwarna merah menunjukkan golongan bakteri Gram negatif. Sel bakteri yang berwarna biru menunjukkan golongan bakteri Gram positif.

Penentuan adanya enzim katalase dilakukan dengan menggunakan larutan hidrogen peroksida pada isolat bakteri. Isolat bakteri yang mengandung enzim katalase akan membentuk gelembung di sekitar koloni. Berdasarkan pengujian yang dilakukan, *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa* bersifat katalase positif. Hasil ini sesuai dengan pernyataan yang dikemukakan oleh Breed dkk (1957) bahwa kedua bakteri uji tersebut bersifat katalase positif. Hasil pengujian katalase bakteri *S. epidermidis* dan *P. aeruginosa* dapat dilihat pada Gambar 21.



Gambar 26. Hasil pengujian katalase (a) *Pseudomonas aeruginosa* (b) *Staphylococcus epidermidis*

Keterangan : terdapat busa yang menandakan positif adanya enzim katalase

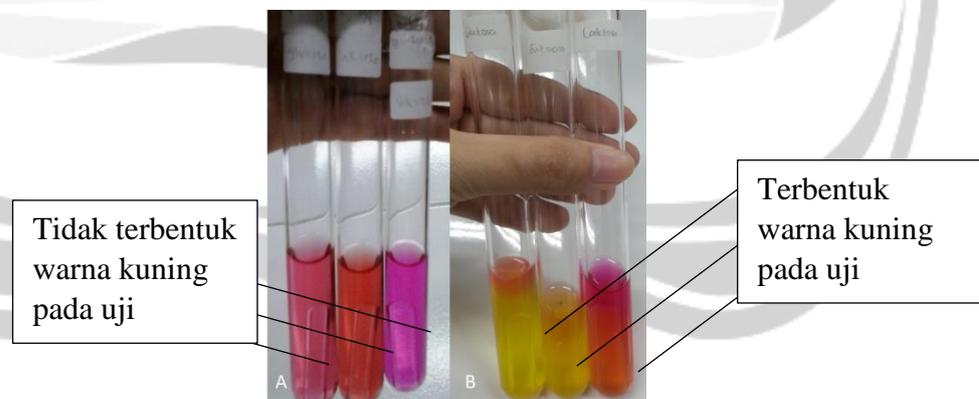
Pengujian fermentasi karbohidrat dilakukan untuk melihat kemampuan mikroorganisme dalam memfermentasi sumber energi yang berbeda-beda karena mikroorganisme menggunakan karbohidrat yang berbeda tergantung pada jenis enzim yang dimiliki. Sebagian mikroorganisme menggunakan glukosa sebagai bahan fermentasi secara

anaerobik namun sebagian mikroorganisme lainnya menggunakannya secara aerobik (Cappuccino dan Sherman, 2011).

Fermentasi karbohidrat oleh mikroorganisme menghasilkan asam organik yang biasanya diikuti dengan pembentukan hidrogen dan karbondioksida. Pengujian fermentasi karbohidrat ini dilakukan dengan menginokulasikan bakteri uji ke dalam medium yang terdiri dari nutrisi cair sebagai bahan yang mendukung pertumbuhan bakteri, karbohidrat spesifik seperti laktosa, glukosa dan sukrosa untuk melihat kemampuan bakteri uji dalam melakukan metabolisme karbohidrat yang berbeda dan indikator pH yaitu *phenol red* yang berwarna merah pada pH netral dan akan berubah warna menjadi kuning bila pH berubah menjadi basa. Pada tabung medium ditambahkan tabung Durham yang berfungsi menangkap gas yang terbentuk selama fermentasi (Cappuccino dan Sherman, 2011).

Berdasarkan pengujian yang telah dilakukan *Staphylococcus epidermidis* mampu memfermentasi glukosa, sukrosa dan laktosa sedangkan *Pseudomonas aeruginosa* tidak mampu memfermentasi glukosa, sukrosa dan laktosa. Hal ini disebabkan karena bakteri *S. epidermidis* merupakan bakteri yang memiliki kemampuan memfermentasi karbohidrat sedangkan bakteri *P. aeruginosa* tidak memiliki kemampuan memfermentasi karbohidrat namun dapat mengoksidasi glukosa (Jawetz dkk., 2006). Hasil positif tersebut dapat dilihat dari adanya perubahan warna merah menjadi kuning karena terbentuknya asam hasil dari fermentasi karbohidrat. Hal ini disebabkan medium *phenol red broth* yang merupakan

medium basa berwarna merah, setelah dimasukkan gula sebagai sumber karbon dan bakteri yang dapat memfermentasikan karbohidrat maka bakteri tersebut akan menghasilkan asam organik dan perlahan menurunkan pH menjadi asam. Ketika keadaan berubah menjadi asam maka warna larutan yang awalnya merah berubah menjadi kuning (Leboffe dan Pierce, 2012). Hasil tersebut sesuai dengan pernyataan yang dikemukakan oleh Breed dkk (1957) yang menyatakan bahwa *S. epidermidis* dapat memfermentasikan karbohidrat seperti glukosa, sukrosa dan laktosa serta *P. aeruginosa* tidak dapat memfermentasi karbohidrat karena tidak memiliki enzim seperti sukrose dan beta-galaktosidase yang berfungsi memfermentasi karbohidrat seperti sukrosa dan laktosa. Hasil pengujian fermentasi karbohidrat pada *S. epidermidis* dan *P. aeruginosa* dapat dilihat pada Gambar 22.



Gambar 27. Hasil Uji Fermentasi Karbohidrat (a) *Pseudomonas aeruginosa* (b) *Staphylococcus epidermidis*

Keterangan : terbentuknya warna kuning menandakan terjadinya fermentasi karbohidrat

H. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Daun Namnam

Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat daun namnam terhadap *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa* menggunakan metode *paper disk*. Pengujian ini bertujuan untuk melihat kemampuan ekstrak etil asetat daun namnam dalam menghambat bakteri tersebut yang dilihat dari zona bening yang terbentuk. Hasil pengujian ekstrak etil asetat daun namnam terhadap *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa* dapat dilihat pada Gambar 23 dan Gambar 24.

Hasil zona hambat yang dihasilkan oleh beberapa konsentrasi ekstrak etil asetat daun namnam, kontrol negatif berupa pelarut DMSO dan kontrol positif berupa kloramfenikol ada kedua bakteri selanjutnya dilakukan analisis variasi ANOVA menggunakan SPSS 23.0, dengan tingkat kepercayaan 95 %. Berdasarkan hasil analisis variasi, diketahui perlakuan pada *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa* memiliki beda nyata yang terlihat dari nilai sigma yang tercantum pada Tabel 10 di Lampiran 2 sebesar 0,00 atau lebih kecil dari kesalahan yang boleh terjadi (α) = 0,05.

Setelah diketahui adanya beda nyata yang dihasilkan dari variasi analisis data, kemudian dilanjutkan dengan *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) untuk melihat variasi yang memberikan pengaruh terbaik. Berdasarkan hasil Duncan yang diperoleh (Tabel 11 dan Tabel 12 di Lampiran 3 dan Lampiran 4) diketahui bahwa kontrol positif berupa

kloramfenikol memberikan pengaruh terbaik atau zona penghambatan terbaik (Tabel 8).

Berdasarkan hasil yang didapatkan pada Tabel 8 , dapat dilihat bahwa daya penghambatan ekstrak daun namnam dengan konsentrasi 80 % adalah yang terbaik dengan rata-rata luas zona hambat pada kedua bakteri tersebut adalah 1,23 cm². Daya penghambatan ekstrak daun namnam dengan konsentrasi 60 % memiliki rata-rata luas zona hambat yaitu 0,99 cm², konsentrasi 40 % memiliki rata-rata luas zona hambat 0,89 cm² dan konsentrasi 20 % memiliki rata-rata luas zona hambat yaitu 0,71 cm². Kontrol negatif berupa pelarut DMSO tidak memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan kedua bakteri uji karena tidak adanya zona bening yang terbentuk di sekitar *paper disk*, selain itu kontrol positif berupa kloramfenikol memiliki rata-rata luas zona hambat paling besar yaitu 2,45 cm². Perbandingan antara luas zona hambat variasi konsentrasi dan kontrol positif menunjukkan konsentrasi 80 % memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri yang paling baik.

Berdasarkan Tabel 8, kita dapat melihat rata-rata luas zona hambat pada *Staphylococcus epidermidis* adalah sebesar 1,70 cm², lebih besar dibandingkan dengan rata-rata luas zona hambat pada *Pseudomonas aeruginosa* sebesar 1,02 cm². Dari hasil tersebut dapat dilihat bahwa ekstrak etil asetat daun namnam lebih efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus epidermidis*. Hal tersebut terjadi karena adanya perbedaan dinding sel bakteri (Jawetz dkk., 2006).

Tabel 8. Luas zona hambat (cm²) aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat daun namnam dengan variasi konsentrasi, kontrol negatif dan kontrol positif terhadap *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa*

Perlakuan	Luas Zona Hambat (cm ²)		Rata-Rata
	<i>S. epidermidis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	
Kontrol negatif (DMSO)	0 ^a	0 ^a	0 ^A
Konsentrasi 20%	0,84 ^b	0,58 ^b	0,71 ^B
Konsentrasi 40%	0,94 ^{bc}	0,84 ^c	0,89 ^C
Konsentrasi 60%	1,00 ^c	0,98 ^{cd}	0,99 ^C
Konsentrasi 80%	1,30 ^d	1,16 ^d	1,23 ^D
Kontrol positif (Kloramfenikol)	2,34 ^e	2,56 ^e	2,45 ^E
Rata-Rata	1,70 ^x	1,02 ^y	1,045 ^Z

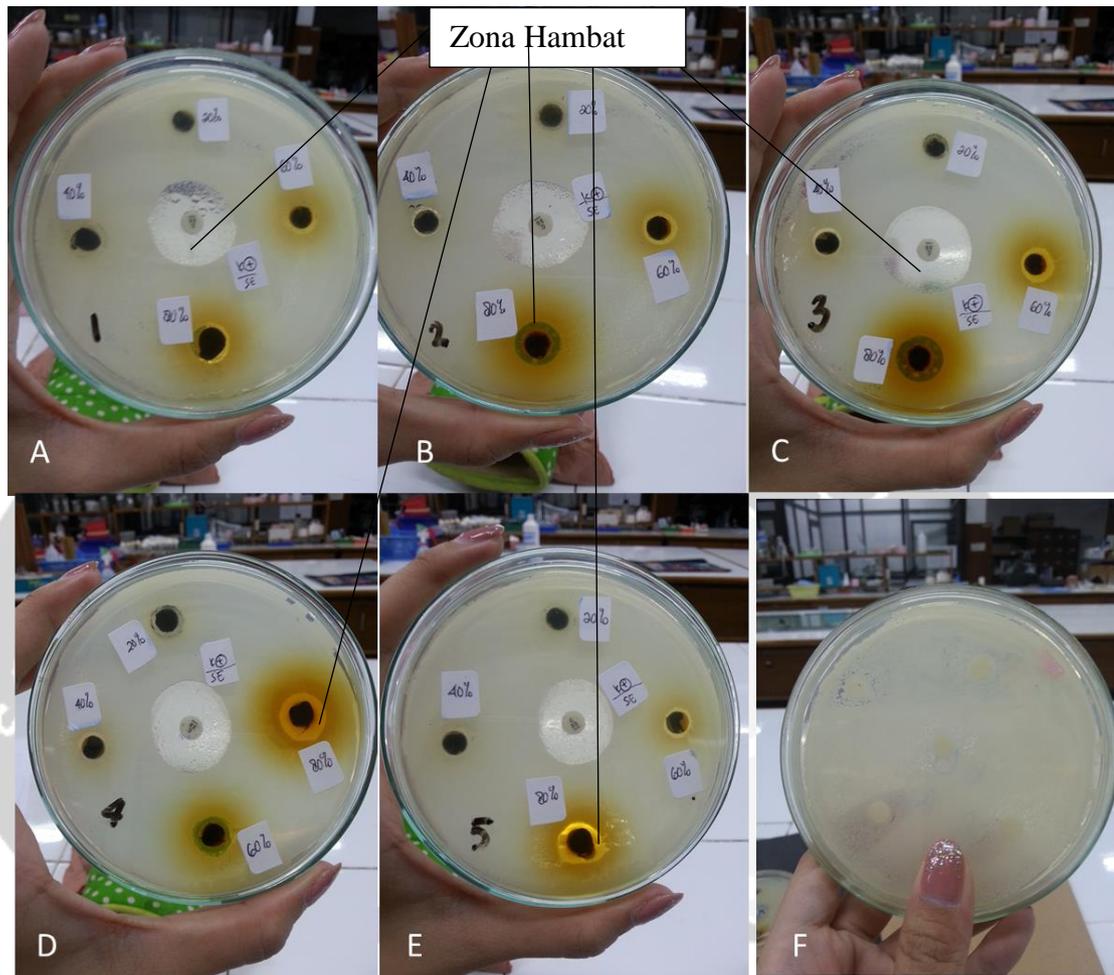
Menurut Jawetz dkk (2006), perbedaan struktur dinding sel pada bakteri menentukan ikatan, penetrasi, dan aktivitas senyawa antibakteri. Bakteri Gram positif pada dinding selnya memiliki lebih banyak peptidoglikan dan polisakarida (asam teikoat) serta sedikit lipid dibandingkan dengan bakteri Gram negatif. Polisakarida pada dinding sel Gram positif merupakan polimer yang polar dan berfungsi sebagai transport ion positif, sehingga dinding sel bakteri bersifat polar, komponen membran plasma terdiri dari sekitar 30% atau lebih berat sel (Dewi, 2010).

Bakteri Gram negatif lebih banyak mengandung lipid, sedikit peptidoglikan, membran luar berupa bilayer berfungsi sebagai pertahanan selektif senyawa-senyawa yang keluar atau masuk sel dan menyebabkan efek toksik. Membran luar mengandung fosfolipid, lipopolisakarida dan

lipoprotein yang jumlah sangat banyak. Membran luar ini yang akan berfungsi sebagai pelindung dari racun di lingkungan dan lisis peptidoglikan dinding sel (Yusman, 2006).

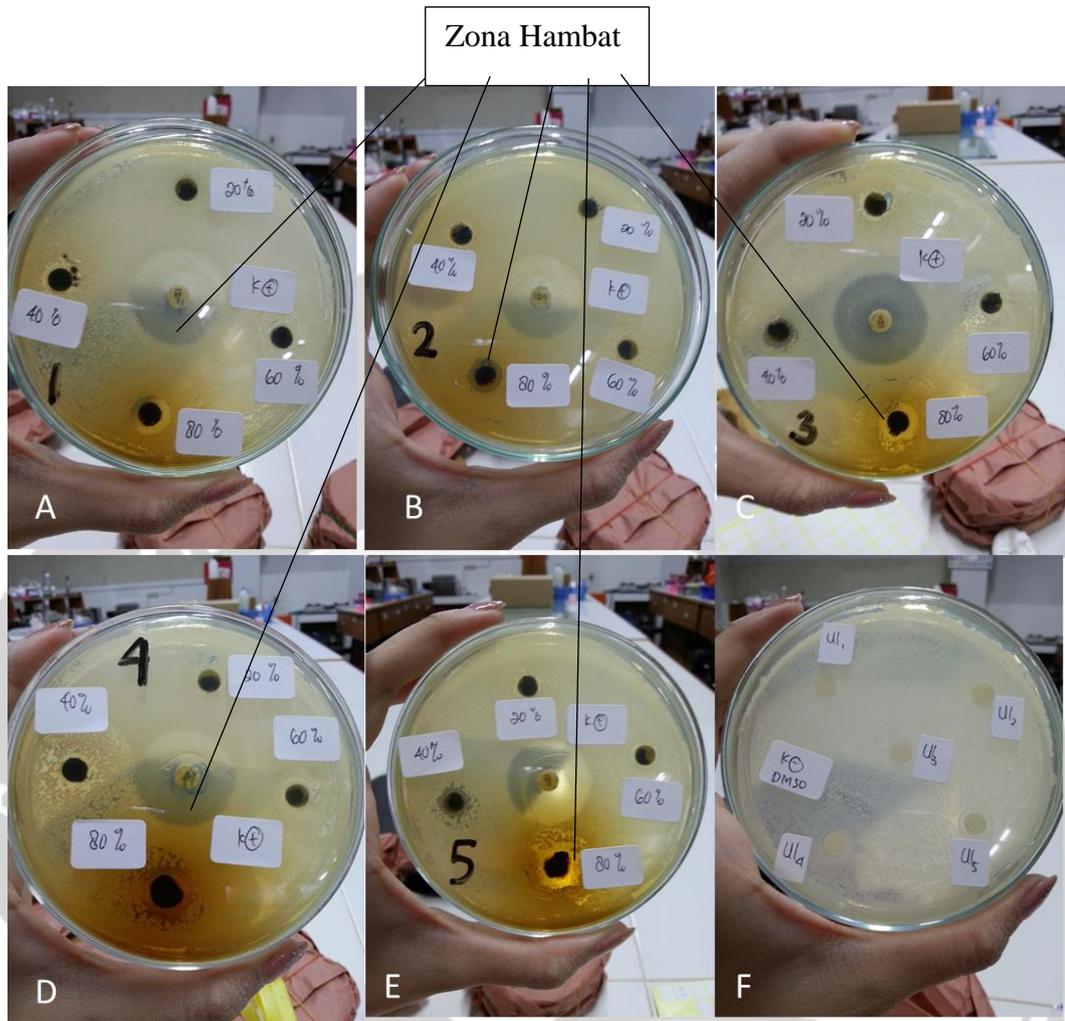
Perbedaan sel bakteri Gram negatif lebih kompleks dibandingkan dengan Gram positif. Perbedaan utama adalah adanya lapisan membran luar yang menyelimuti peptidoglikan. Kehadiran membran ini menyebabkan dinding sel bakteri Gram negatif kaya akan lipid sehingga bakteri golongan Gram negatif lebih tahan terhadap kondisi hipertonis dibandingkan dengan bakteri Gram positif (Yusman, 2009).

Kandungan kimia dari daun namnam antara lain alkaloid, tanin, saponin, dan flavonoid (Aziz dkk., 2013). Tanin memiliki aktivitas antibakteri dengan cara mengerutkan dinding atau membran sel sehingga mengganggu permeabilitas sel dan mengakibatkan pertumbuhannya terhambat atau bahkan mati (Ajizah, 2004). Saponin akan merusak membran sitoplasma dan membunuh sel (Assani, 1994). Flavonoid akan menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas dinding bakteri sebagai hasil interaksi antara flavonoid dengan DNA bakteri (Sabir, 2005).



Gambar 28. Zona Hambat ekstrak etil asetat daun namnam konsentrasi 20, 40, 60, 80%, kontrol positif dan kontrol negatif terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis* (a) ulangan pertama (b) ulangan kedua (c) ulangan ketiga (d) ulangan keempat (e) ulangan kelima (f) kontrol negatif (Dokumentasi pribadi, 2016).

Keterangan : kontrol positif menunjukkan adanya zona hambatan di sekitar *paper disk* pada kelima ulangan. Kontrol negatif berupa pelarut DMSO menunjukkan tidak adanya zona hambatan di sekitar *paper disk* dan kontrol positif serta variasi konsentrasi menunjukkan adanya zona hambatan di sekitar *paper disk*.



Gambar 29. Zona Hambat ekstrak etil asetat daun namnam konsentrasi 20, 40, 60, 80%, kontrol positif dan kontrol negatif terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* (a) ulangan pertama (b) ulangan kedua (c) ulangan ketiga (d) ulangan keempat (e) ulangan kelima (f) kontrol negatif (Dokumentasi pribadi, 2016).

Keterangan : kontrol positif menunjukkan adanya zona hambat di sekitar *paper disk* pada kelima ulangan. Kontrol negatif berupa pelarut DMSO menunjukkan tidak adanya zona hambat di sekitar *paper disk* dan kontrol positif serta variasi konsentrasi menunjukkan adanya zona hambat di sekitar *paper disk*.

Berdasarkan luas zona hambat yang telah diketahui dari penelitian yang telah dilakukan kemampuan penghambatan *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa* dapat ditentukan dengan membandingkan antara luas zona hambat dan klasifikasi kemampuan

penghambatan menurut Suprianto (2008). Berdasarkan dan klasifikasi kemampuan penghambatan menurut Suprianto (2008), kemampuan penghambatan ekstrak etil asetat daun namnam terhadap kedua jenis bakteri adalah kuat karena rata-rata luas zona hambat yang dihasilkan berada pada kisaran 0,785 – 3,14.

I. Konsentrasi Hambat Minimum Ekstrak Etil Asetat Daun Namnam (*Cynometra cauliflora*)

Konsentrasi hambat minimum (KHM) merupakan konsentrasi terendah dari senyawa antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan mikrobia uji (Cappuccino dan Sherman, 2011). Berdasarkan pengujian yang dilakukan, konsentrasi hambat minimum yang dapat dilihat aktivitas antibakteri, baik *P. aeruginosa* dan *S. epidermidis* adalah 60 %. Hasil ini merupakan hasil yang besar sehingga diperlukan pengujian lebih lanjut untuk mengetahui konsentrasi hambat minimum yang tepat. Pengujian ini menggunakan konsentrasi diantara 20 hingga 100 % kisaran yang dimungkinkan sebagai konsentrasi hambat minimum untuk kedua jenis bakteri tersebut.

Ekstrak etil asetat daun namnam yang diperoleh dianggap memiliki konsentrasi 100 % sehingga diperlukan penambahan pelarut untuk mendapatkan variasi konsentrasi yang diinginkan. Selanjutnya ekstrak ditambahkan ke dalam medium yang telah berisi bakteri uji dan diinkubasi. Hasil positif dari uji ini dilihat dari kejernihan pada sampel yang menandakan tidak adanya pertumbuhan bakteri (Pratiwi, 2008). Namun

berdasarkan percobaan sampel sulit untuk dilihat tingkat kejernihannya. Oleh karena itu, dilakukan tindakan lebih lanjut dengan metode *Total Plate Count* (TPC) untuk mengetahui konsentrasi hambat minimumnya (Tristiyanto, 2009).

Prinsip dari metode TPC adalah jika sel mikrobial yang masih hidup ditumbuhkan pada medium agar, maka sel mikrobial yang masih hidup tersebut akan berkembang biak dan membentuk koloni yang dapat dilihat langsung dengan mata telanjang (Rahayu, 2011). Metode ini merupakan metode yang paling sensitif untuk menghitung jumlah mikrobial karena hanya sel yang masih hidup yang akan dihitung (Rahayu, 2011).

Pengujian menggunakan metode TPC dilakukan dengan mengambil campuran ekstrak dan bakteri, kemudian disebar di atas petri yang telah berisi agar. Setelah itu, cawan petri diinkubasi dan selanjutnya dilihat ada tidaknya pertumbuhan dari bakteri uji tersebut (Suprianto, 2008).

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat diketahui bahwa *S. epidermidis* dan *P. aeruginosa* memiliki KHM yang berbeda karena dilihat dari sifat kedua jenis bakteri uji yang berbeda. *S. epidermidis* merupakan bakteri Gram positif sedangkan *P. aeruginosa* merupakan bakteri Gram negatif yang memiliki tingkat kepekaan terhadap senyawa antibakteri yang berbeda (Jawetz dkk, 2006). Hasil pengujian KHM dan kedua bakteri tersebut dapat dilihat pada Tabel 9 dan Tabel 10 serta Gambar 25 dan Gambar 26.

Berdasarkan pengujian yang dilakukan diperoleh hasil yaitu KHM untuk *Staphylococcus epidermidis* adalah 60% dan untuk *Pseudomonas aeruginosa* adalah 80%. Hal ini berarti kisaran 60 hingga 80 % dapat menghambat pertumbuhan *S. epidermidis* dan *P. aeruginosa*. Apabila dilihat dari hasil tersebut, dapat diketahui bahwa ekstrak daun namnam memiliki kemampuan penghambatan yang lebih baik terhadap *Staphylococcus epidermidis* dibandingkan dengan *Pseudomonas aeruginosa* karena dengan konsentrasi ekstrak 60 % dapat menghambat pertumbuhan bakteri sedangkan pada *Pseudomonas aeruginosa* tidak menghambat. Penghambatan pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* baru terlihat pada konsentrasi 80 %.

Tabel 9. Konsentrasi Hambat Minimum *Staphylococcus epidermidis*

Konsentrasi (%)	Pertumbuhan Bakteri
100	-
80	-
60	-
40	+
20	+

Keterangan : + = terdapat pertumbuhan bakteri

- = tidak terdapat pertumbuhan bakteri

Berdasarkan hasil pengujian KHM terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif, terlihat bahwa ekstrak daun namnam memiliki potensi antibakteri lebih efektif terhadap bakteri Gram positif dibandingkan dengan bakteri Gram negatif. Hal ini disebabkan karena perbedaan struktur dinding sel pada bakteri Gram positif dan negatif. Dinding sel pada bakteri Gram

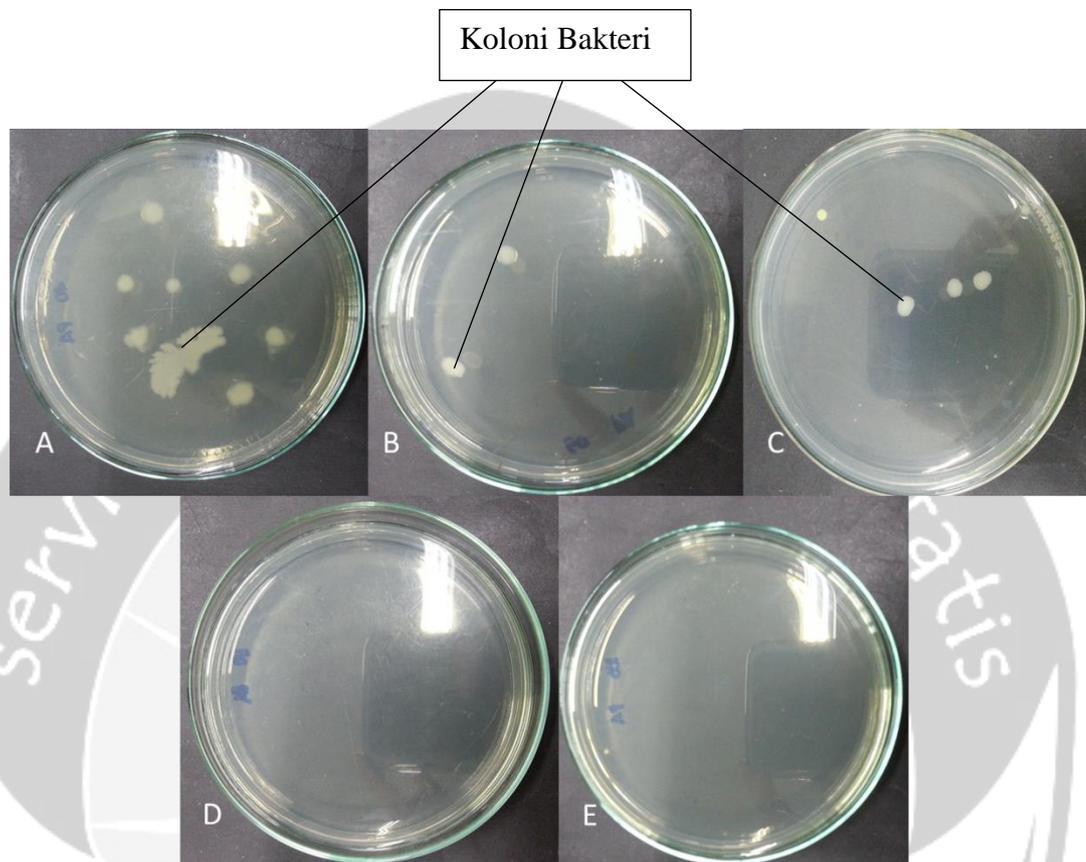
negative lebih kompleks dibandingkan dengan dinding sel pada bakteri Gram positif. Bakteri Gram positif memiliki susunan dinding sel yang terdiri dari peptidoglikan, polisakarida (asam teikoat) dan sedikit lipid sedangkan bakteri Gram negatif lebih banyak mengandung lipid dan sedikit peptidoglikan (Jawetz dkk., 2006 ; Dewi, 2010 ; Yusman, 2006).

Tabel 10. Konsentrasi Hambat Minimum *Pseudomonas aeruginosa*

Konsentrasi (%)	Pertumbuhan Bakteri
100	-
80	-
60	+
40	+
20	+

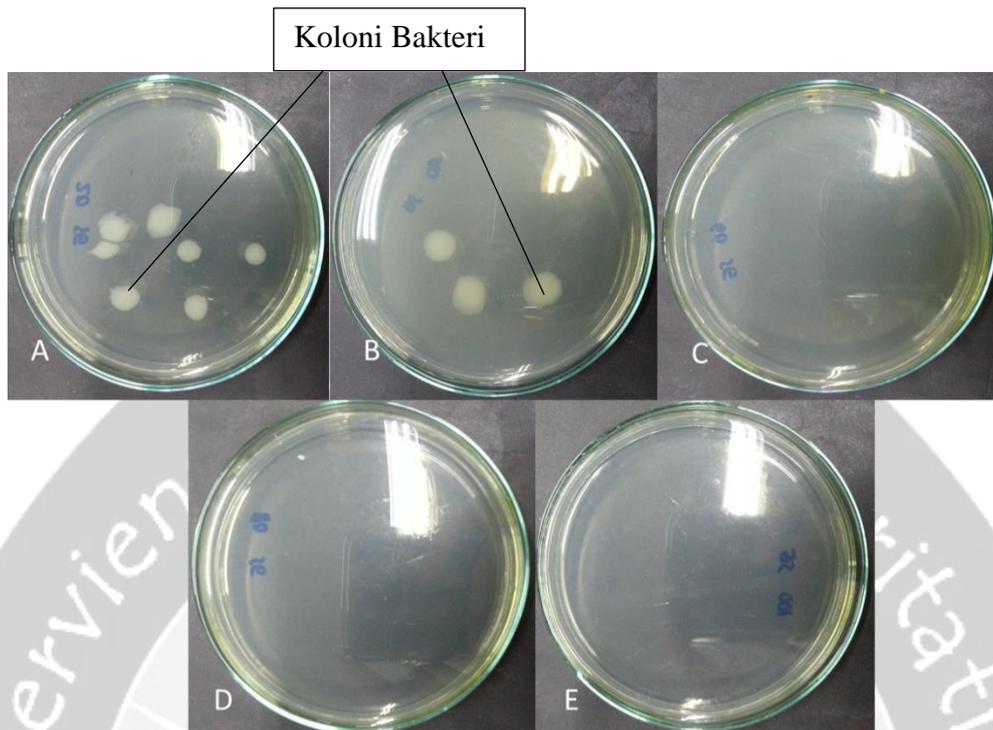
Keterangan : + = terdapat pertumbuhan bakteri
- = tidak terdapat pertumbuhan bakteri

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Hayati (2015), konsentrasi hambat minimum ekstrak etil asetat daun namnam terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Shigella flexneri* adalah 4 %. Apabila dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan, terdapat perbedaan yang besar antara konsentrasi hambat minimum. Perbedaan hasil yang didapatkan ini disebabkan perbedaan metode ekstraksi, metode pengujian KHM dan bakteri uji yang digunakan. Apabila dilihat dari ketiga perbedaan tersebut, faktor yang paling berpengaruh terhadap perbedaan hasil yang didapatkan adalah metode pengujian KHM.



Gambar 25. Hasil pengujian TPC ekstrak etil asetat daun namnam terhadap *P. aeruginosa* dengan beberapa konsentrasi (a) 20, (b) 40, (c) 60, (d) 80, (e) 100 %
(Dokumentasi Pribadi, 2016).

Keterangan : Terdapat koloni *P. aeruginosa* yang tumbuh pada konsentrasi 20, 40 dan 60 % sedangkan pada konsentrasi 80 dan 100 % tidak terdapat koloni *P. aeruginosa* yang tumbuh.



Gambar 26. Hasil pengujian TPC ekstrak etil asetat daun namnam terhadap *S. epidermidis* dengan beberapa konsentrasi (a) 20%, (b) 40%, (c) 60%, (d) 80%, (e) 100% (Dokumentasi Pribadi, 2016).

Keterangan : Terdapat koloni *S. epidermidis* yang tumbuh pada konsentrasi 20, 40% sedangkan pada konsentrasi 60, 80 dan 100% tidak terdapat koloni *S. epidermidis* yang tumbuh.

Pada penelitian Hidayati (2015) metode pengujian KHM menggunakan metode *paper disk* dengan mengukur zona hambat yang terbentuk. Selain hal tersebut, ekstrak daun namnam yang digunakan adalah crude ekstrak yang telah dimurnikan dengan proses pemisahan dengan Kromatografi Lapis Tipis dan Kromatografi Kolom Vakum. *Crude* ekstrak yang digunakan untuk pengujian KHM adalah salah satu dari fraksi yang diduga memiliki aktivitas antibakteri paling besar.