



INTISARI SAINS MEDIS

Published by Intisari Sains Medis

## Efektifitas daun salam dalam mengurangi cemaran mikroba penyebab busuk telur itik



CrossMark

Yulidia Iriani<sup>1\*</sup>, Yan Ramona<sup>2,3</sup>, Ni Putu Adriani Astiti<sup>2</sup>

### ABSTRACT

**Background:** Pathogenic bacteria on eggshells or egg contents will be very dangerous for the health of humans who consume them. Chemicals should not be an option for preservatives because they will cause side effects. In this study, we explored the possibility of using bay leaf extract (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp) to control the growth of polluting bacteria in salted duck eggs so that the shelf life can be extended. The purpose of the study was to determine the potential of the active compounds contained in bay leaves in reducing the total plate count/microbial contamination in salted duck eggs.

**Methods:** Extraction of bay leaf powder was carried out by the infusion method. The activity test of bay leaf decoction (ARDS) was carried out using the in vitro diffusion well method on Mueller Hinton media. Identification of active compounds was carried out using the GCMS technique.

**Results:** ARDS crude extract at a concentration of 5% (v/v) could significantly reduce ALT and inhibit

the in vitro growth of *Proteus mirabilis* bacteria at a concentration of 10% (w/v), with an inhibition zone diameter of 19.53 mm, with the minimum value inhibitory concentration (MIC) 0.7%. The results of the GCMS analysis of ARDS showed that the ten peaks produced, possibly synergized, and had antimicrobial activity. These compounds are 2-Pentanone-4-Hydroxy-4 Methyl (CAS) Diacetone Alcohol; Ethanol, 2-(Ethoxythoxy) (CAS); 1,2,3 Propanetriol (CAS) Glycerol; Citronella (2,6-Octadien-1-ol, 3,7-Dimethyl, (CAS); Beta Citronellol 6-Octen-1-ol, 3,7 Dimethyl- (CAS); Trans Geraniol; Dodecanoic Acid, Methyl Ester (CAS) Methyl Laurate; Tetradecanoic Acid, Methyl Ester (CAS) Methyl Myristate; 1-Tetradecanol (CAS) Alfol 14 and Hexadecanoic Acid Methyl Ester (CAS) Methyl Palmitate.

**Conclusion:** Leaf decoction can inhibit the growth of *Proteus mirabilis* in vitro, and the addition of ARDS with a concentration of 5% (v/v) can significantly reduce the value of bacterial contamination in salted duck eggs.

**Keywords:** bay leaf decoction water, GCMS, salted eggs, total plate numbers.

**Cite This Article:** Iriani, Y., Ramona, Y., Astiti, N.P.A. 2022. Efektifitas daun salam dalam mengurangi cemaran mikroba penyebab busuk telur itik. *Intisari Sains Medis* 13(2): 352-361. DOI: 10.15562/ism.v13i2.1321

### ABSTRAK

**Latar Belakang:** Bakteri patogen pada kulit telur atau isi telur akan sangat membahayakan kesehatan manusia yang mengkonsumsinya. Bahan kimia seharusnya tidak menjadi pilihan untuk pengawet, karena akan menimbulkan efek samping. Pada penelitian ini dieksplorasi, kemungkinan dipakainya ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp) untuk mengontrol pertumbuhan bakteri pencemar pada telur itik yang diasinkan, sehingga masa simpannya dapat diperpanjang. Tujuan penelitian untuk mengetahui potensi senyawa aktif yang terdapat pada daun salam dalam menurunkan angka lempeng total/cemaran mikroba pada telur itik yang diasinkan.

**Metode:** Ekstraksi serbuk daun salam dilakukan dengan metode infusa. Uji aktifitas air rebusan daun salam (ARDS) dilakukan dengan metode sumur difusi secara in vitro pada media Mueller Hinton. Identifikasi

senyawa aktif dilakukan dengan teknik GCMS.

**Hasil:** Ekstrak kasar ARDS pada konsentrasi 5% (v/v) secara nyata dapat menurunkan ALT dan menghambat pertumbuhan in vitro bakteri *Proteus mirabilis* pada konsentrasi 10% (b/v), dengan diameter zona hambat sebesar 19,53 mm, nilai minimum inhibitory concentration (MIC) 0,7%. Hasil analisis GCMS terhadap ARDS menunjukkan bahwa sepuluh puncak yang dihasilkan, kemungkinan bersinergi dan mempunyai aktifitas sebagai antimikroba. Senyawa-senyawa tersebut adalah 2-Pentanone-4-Hydroxy-4 Methyl (CAS) Diacetone Alcohol; Ethanol, 2-(Ethoxythoxy) (CAS); 1,2,3 Propanetriol (CAS) Glycerol; Citronella (2,6-Octadien-1-ol, 3,7-Dimethyl, (CAS); Beta Citronellol 6-Octen-1-ol, 3,7 Dimethyl-(CAS); Trans Geraniol; Dodecanoic Acid, Methyl Ester(CAS) Methyl Laurate; Tetradecanoic Acid, Methyl Ester (CAS)

<sup>1</sup>Dosen Program Studi Teknologi Laboratorium Medik, Universitas Bali Internasional, Bali, Indonesia;

<sup>2</sup>Dosen Program Magister Biologi, Universitas Udayana, Bali, Indonesia;

<sup>3</sup>UPT Laboratorium Terpadu Biosain dan Bioteknologi, Universitas Udayana, Bali, Indonesia;

\*Korespondensi:

Yulidia Iriani;

Dosen Program Studi Teknologi Laboratorium Medik, Universitas Bali Internasional, Bali, Indonesia;

[jjulidia@gmail.com](mailto:jjulidia@gmail.com)

Diterima: 11-03-2022

Disetujui: 28-06-2022

Diterbitkan: 17-07-2022

Methyl Myristate; 1-Tetradecanol (Cas) Alfol 14 dan Hexadecanoic Acid Methyl Ester CAS) Methyl Palmitate.

**Simpulan:** Air rebusan daun dapat menghambat pertumbuhan *Proteus mirabilis* secara *in vitro* dan

penambahan ARDS dengan konsentrasi 5% (v/v) secara signifikan dapat menurunkan nilai cemaran bakteri (angka lempeng total) pada telur itik yang diasinkan.

**Kata kunci:** air rebusan daun salam, angka lempeng total, GCMS, telur asin.

**Sitasi Artikel ini:** Iriani, Y., Ramona, Y., Astiti, N.P.A. 2022. Efektifitas daun salam dalam mengurangi cemaran mikroba penyebab busuk telur itik. *Intisari Sains Medis* 13(2): 352-361. DOI: 10.15562/ism.v13i2.1321

## PENDAHULUAN

Keberadaan bakteri patogen pada kulit telur atau isi telur akan sangat membahayakan kesehatan manusia yang mengkonsumsinya. Itik di Indonesia masih dipelihara secara tradisional dengan menggembalakan di area persawahan. Induk itik umumnya bertelur dilokasi yang basah atau berair, sehingga mempercepat proses penetrasi bakteri ke bagian dalam telur. Faktor lingkungan juga akan mempercepat laju pertumbuhan bakteri pencemar. Terdapat beberapa cara yang diterapkan untuk meminimalkan pencemaran pada kulit telur, antara lain menambahkan pasir didasar kandang, pencucian telur, pengeringan dan penyimpanan pada suhu rendah. Semua metode yang diterapkan tersebut belum dapat secara signifikan memperpanjang masa simpan telur sebelum dipasarkan. Salah satu jenis bakteri pencemar penyebab penyakit diantaranya adalah *Salmonella sp.* yang dapat menyebabkan salmonellosis sedangkan bakteri lain seperti *E. coli* dan *Staphylococcus spp.* juga sering ditemukan sebagai bakteri kontaminan pada telur itik, bakteri tersebut juga bersifat resisten terhadap beberapa antibiotika.<sup>1</sup> Secara umum kisaran cemaran bakteri *E.coli*, *Staphylococcus sp.* dan *Salmonella sp* pada kulit telur itik antara 75-82% sementara itu pada bagian dalam telur yang tercemar oleh bakteri tersebut berkisar antara 18-25% dari sampel yang diteliti.<sup>1</sup> Organisme enterik lainnya seperti *Proteus sp* tersebar luas di lingkungan juga ditemukan di saluran pencernaan manusia atau hewan.<sup>2,3</sup> *Proteus sp.* termasuk dalam kelompok *Enterobacteriaceae* yang merupakan bakteri berbentuk batang gram negatif dan dapat menyebabkan infeksi pada saluran kemih manusia. Amare dkk. juga melaporkan kejadian infeksi kantung

kuning telur oleh bakteri *Proteus mirabilis* terdapat pada 66 sampel dari 290 sampel ayam betina postmortem yang diteliti.<sup>4</sup>

Pemakaian bahan kimia beracun untuk mengontrol pertumbuhan mikroba pembusuk pada telur seharusnya tidak menjadi pilihan untuk memperpanjang masa simpan telur, karena akan menimbulkan efek samping. Pengendalian jumlah/total pencemar pada permukaan kulit telur sebaiknya menggunakan bahan-bahan alam karena efek sampingnya sangat kecil.<sup>5</sup> Berdasarkan pada uraian diatas, maka pada penelitian ini dieksplorasi, kemungkinan dipakainya ekstrak daun salam (*Syzygium polyanthum (Wight) Walp*) untuk mengontrol pertumbuhan bakteri pencemar pada telur itik yang diasinkan, sehingga masa simpannya dapat diperpanjang. Tanaman salam (*Syzygium polyanthum (Wight) Walp*) merupakan tanaman yang daunnya banyak digunakan dalam berbagai olahan khas Indonesia sebagai penambah aroma dan citarasa. Daun salam merupakan bahan alami yang mempunyai kemampuan sebagai antimikroba karena mengandung senyawa aktif, seperti flavonoid, alkaloid, tanin, saponin dan minyak atsiri.<sup>6</sup> Perendaman dengan infusa daun salam dengan konsentrasi 0,5%, 5%, dan 10% dapat menurunkan total bakteri pada daging ayam.<sup>7</sup> Malik dkk. membuktikan ekstrak etanol daun salam dengan konsentrasi 30% dapat dipergunakan sebagai anti diare.<sup>8</sup> Pada penelitian ini, pemakaian air rebusan daun salam (ARDS) difokuskan untuk mengontrol cemaran mikroba/ angka lempeng total dan pertumbuhan bakteri *Proteus mirabilis* yang ditemukan pada saat uji pendahuluan sebagai salah satu bakteri pencemar telur itik. Senyawa aktif pada daun salam yang diperoleh pada penelitian ini akan dielusidasi dengan teknik *gas chromatography mass*

*spectrometry* (GCMS).

## BAHAN DAN METODE

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini adalah timbangan analitik (*Ohouse*), *autoclav*, inkubator, peralatan gelas *pyrex* steril seperti (*erlenmayer*, *beaker glass*, *petridis*, gelas ukur), batang pengaduk, ose, pipet otomatis (*Soccorex*), mikroskop, jangka sorong, *Densicheck (McFarlan)*, *Vitech 2 Compact*, dan GC-MS (QP2010S SHIMADSU). Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah gram kasar, akuades steril, pewarna gram, MH agar, MC agar, nutrient agar dan telur itik sebanyak 36 butir telur itik dengan rerata berat 60-80 gram, kulit bersih dan tidak retak/pecah. Air rebusan daun salam (ARDS) dibuat dengan cara merendam 1000 gram serbuk daun salam dengan air yg sudah mendidih sebesar 1.000 ml selama 10 menit dengan api sedang selanjutnya inkubasi selama 48 jam dan saring menggunakan saringan teh selanjutnya disaring menggunakan kertas *whatsmanno* 41 dengan ukuran pori 20-25  $\mu$ m. Pengasinan dilakukan dengan cara perendaman menggunakan larutan garam jenuh (36,5%) yang ditambahkan pada air rebusan daun salam konsentrasi bertingkat (v/v) 0,5%, 1,0%, 1,5%, 2,0%, 2,5%, 3,0%, 3,5%, 4,0%, 4,5%, dan 5,0% dengan perbandingan 1:1. Metode yang digunakan dalam penelitian adalah *true experiment* dengan desain rancangan acak lengkap (RAL) dilakukan *secara in vitro* yang terdiri dari 12 kelompok. Kontrol negatif dilakukan pada telur itik segar yang berumur tiga hari tanpa perlakuan yang diinkubasi pada suhu kamar selama 10 hari sedangkan kontrol positif dilakukan pada telur itik segar yang berumur tiga hari yang direndam pada larutan garam jenuh (36,5%) selama 10 hari. Kelompok

perlakuan ARDS dilakukan perendaman pada telur itik segar yang berumur tiga hari pada larutan garam jenuh yang ditambahkan ARDS dengan konsentrasi bertingkat (v/v%) perbandingan volume 1:1 kemudian diinkubasi 10 hari pada suhu kamar. Variabel yang diukur dalam penelitian ini adalah aktifitas dan LC<sub>50</sub> ARDS dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Proteus mirabilis* secara *in vitro* dan nilai cemaran mikroba/ ALT pada telur itik yang diasinkan. Data yang diperoleh dari pengujian nilai cemaran diuji statistik menggunakan ANOVA (p ≤ 0,05) dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan (UJBD). Persentase penurunan angka lempeng total relatif terhadap kontrol negatif setiap perlakuan (yang selanjutnya disebut potensi) dihitung setelah diinkubasi selama 10 hari, menggunakan rumus berikut:

$$\% \text{ Potensi} = \frac{X_t - X_a}{X_t} \times 100\%$$

Keterangan:

X<sub>t</sub> : ALT Kelompok Kontrol negatif.

X<sub>a</sub> : ALT Kelompok Perlakuan (K. positif (larutan garam jenuh, dan larutan garam jenuh + ARDS)

**HASIL PENELITIAN**

**Karakteristik telur segar dan telur asin**

Rerata berat dan warna atau karakteristik telur tersebut ditampilkan pada Tabel 1 dan Gambar 1.

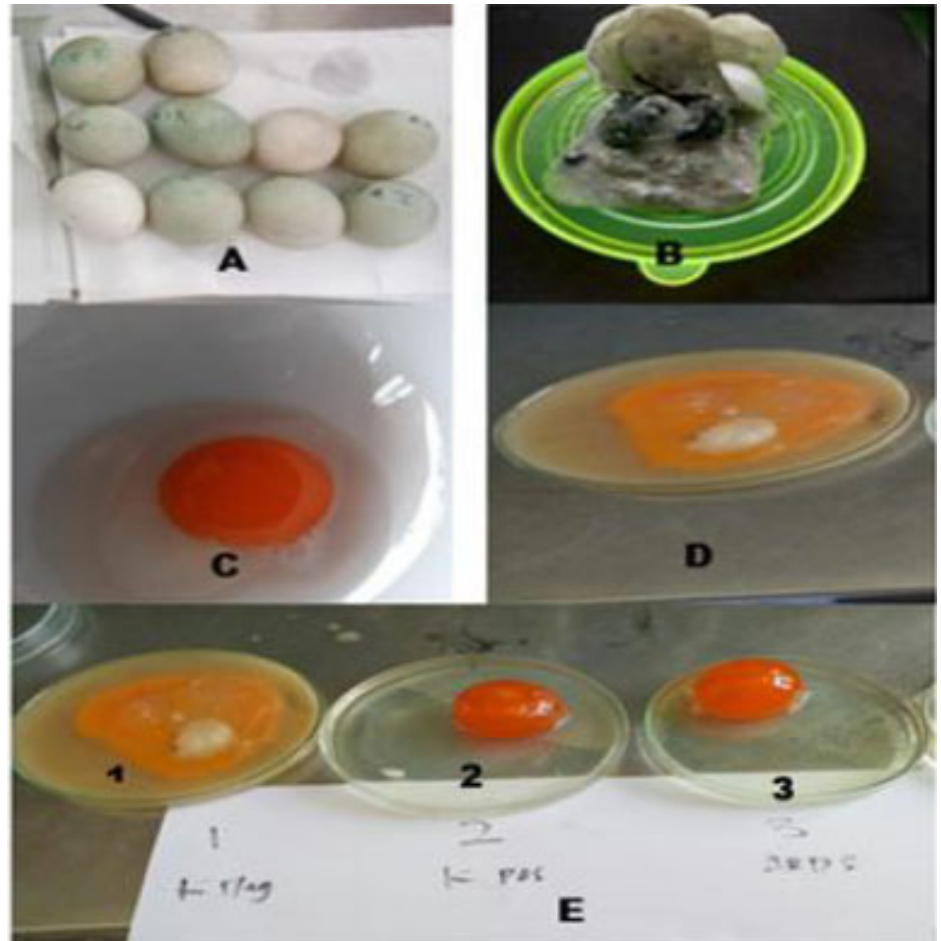
**Identifikasi bakteri penyebab busuk telur**

Pada uji pendahuluan bakteri penyebab busuk telur teridentifikasi sebagai *Proteus mirabilis* setelah dilakukan uji dengan *Vitech 2 Compact*. Hasil yang didapat mengarah pada identitas bakteri penyebab

**Tabel 1. Rerata berat telur itik.**

Warna Telur	N	Rerata Berat Telur*	
		Perlakuan	
		Sebelum	Sesudah
Putih	26		
Kebiruan	7	67,24 ± 4,12 <sup>a</sup>	70,45 ± 3,53 <sup>b</sup>
Kehijauan	3		

\*Nilai-nilai pada Tabel 1 ± SD merupakan rata-rata dari 36 butir Nilai pada tabel yang diikuti oleh huruf yang berbeda menunjukkan hasil yang berbeda nyata secara statistik setelah dilakukan uji t berpasangan p ≤ 0,05



**Gambar 1.** Kondisi bagian luar (A) dan dalam telur asin (E). (B) telur yang diinokulasi dengan *Proteus mirabilis*), (C) telur segar (3 hari), dan (D) telur segar (10 hari).

**Tabel 2. Deskripsi morfologi makroskopis dan mikroskopis koloni bakteri *Proteus mirabilis*.**

Media	Bentuk	Tepi	Diameter Koloni	Sifat	Hemolisis	Pewarnaan Gram
<i>Mac Conkey</i>	Bulat cembung	Tak rata	< 2-3 mm	Menjalar	Positif	Gram Negatif
<i>Blood agar</i>	Bulat cembung	Rata	< 1-2 mm	Menjalar	Negatif	dan sel berbentuk batang
<i>Nutrient agar</i>	Bulat cembung	Tak rata	< 2-3 mm	Menjalar	Negatif	



**Tabel 3.** Hasil reaksi biokimia bakteri *Proteus mirabilis* pada Vitech 2 Compact.

APPA	-	AGLTp	-	BXYL	-	SAC	-	SUCT	+	CMT	+/-
ADO	-	dGLU	+	BAlap	-	dTAG	-	NAGA	-	BGUR	-
PyrA	-	GGT	+	ProA	-	dTRE	+	AGAL	-	O129R	+
IARAL	-	OFF	-	LIP	-	CIT	+/-	PHOS	+	GGAA	-
dCEL	-	BGlu	-	PLE	-	MNT	-	GlyA	-	IMLTa	-
BGAL	-	dMAL	-	TyrA	-	5KG	-	ODC	+	ELLM	-
H2S	+	dMAN	-	URE	+	ILATk	+/-	LDC	-	ILATa	-
BNAG	-	dMNE	-	dSOR	-	AGLU	-	IHISa	-		

**Tabel 4.** Karakteristik dan hasil uji fitokimia ARDS.

Nama	Warna	Bentuk dan Tekstur	Aroma	Uji Fitokimia				
				Alkaloid (Meyer)	Flavanoid (Wilstatte)	Tanin (FeCl <sub>3</sub> )	Saponin (KOH,HCl)	Minyak atsiri (Lieberman – Burchard)
ARDS	Hijau kecoklatan	Encer berminyak	Khas	Positif	Positif	Positif	Positif	Positif

busuk telur yaitu *Proteus mirabilis* dan ditunjukkan pada Tabel 2, Tabel 3, dan Gambar 2.

#### Uji fitokimia air rebusan daun salam

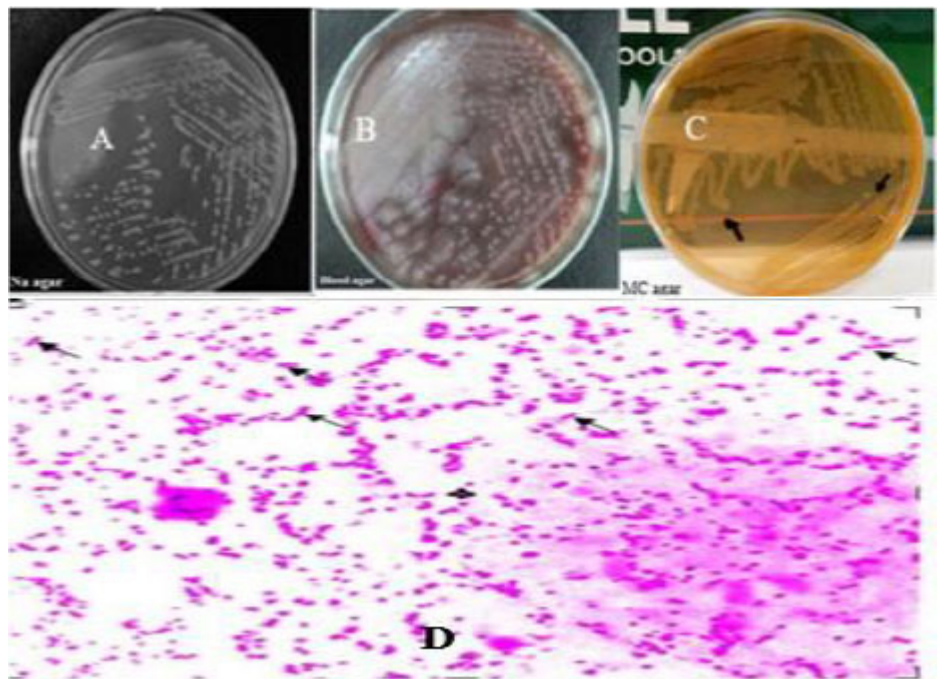
Hasil pemeriksaan fitokimia air rebusan daun salam (ARDS) dapat dilihat pada Tabel 4.

#### Uji Aktifitas dan Nilai MIC Ekstrak Air Rebusan Daun Salam Terhadap Bakteri *Proteus mirabilis*

Uji aktifitas daya hambat ARDS terhadap bakteri *Proteus mirabilis* menggunakan MH agar dilakukan pengulangan tiga kali dan didapatkan zona hambat  $19,53 \pm 0,50$  mm dapat dilihat pada Gambar 3. Uji MIC (*Minimal Inhibitor Concentration*) dari ARDS terhadap bakteri *Proteus mirabilis* (Tabel 5).

#### Bioassay hasil partisi dan fraksinasi

Partisi terhadap ARDS dilakukan dengan menggunakan corong pemisah yang berisi campuran tiga macam pelarut yaitu n-Heksan, etil asetat, dan etanol Fraksinasi yang dilakukan dengan kromatografi kolom menggunakan pelarut yang tingkat kepolarannya bergradien dari non polar sampai polar menunjukkan nilai Rf dan zona hambat yang bervariasi terhadap bakteri uji *Bioassay* hasil partisi dan fraksinasi menghambat pertumbuhan bakteri *Proteus mirabilis* pada MH agar data dapat dilihat pada Tabel 5 dan Tabel 6.



**Gambar 2.** Bentuk koloni *Proteus mirabilis* pada media Nutrient agar (A), blood agar (B), MC agar (C), dan hasil pewarnaan gram (batang gram negatif) yang ditunjuk dengan tanda panah (D).

#### Analisis senyawa aktif dengan GCMS

Identifikasi senyawa aktif pada fraksi dengan kode AF3 (ARDS) yang menggunakan alat GCMS–QP2010 Ultra Shimadzu (*Japan*) hasil ditunjukkan pada Tabel 8 dan kromatogram Gambar 4 dibawah ini.

#### Penentuan potensi dan LC<sub>50</sub> ARDS terhadap cemaran bakteri (angka lempeng total) telur itik yang diasinkan

Angka lempeng total diperoleh dari telur asin yang diperlakukan dengan ARDS pada konsentrasi bervariasi dan diinkubasi selama 10 hari dan untuk mengetahui

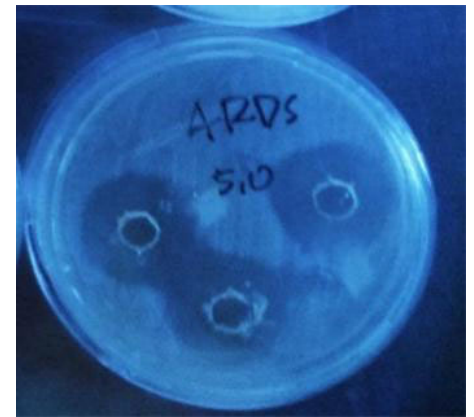
batas aman toksisitas senyawa aktif yang terdapat pada ARDS maka dilakukan penentuan nilai  $LC_{50}$  terhadap cemaran bakteri pada telur yang diasinkan, hasil ditunjukkan pada Tabel 9 dan Gambar 5 dibawah ini.

## PEMBAHASAN

Pengasinan merupakan salah satu metoda pengawetan makanan yang dilakukan dengan tujuan memperpanjang umur (*lifespan*) produk makanan seperti telur, ikan, daging, dan buah-buahan. Teknik pembuatan telur asin yang dilakukan oleh Tharukliling dan Fanani.<sup>9</sup> Lukito dkk. menggunakan metoda perendaman dalam larutan garam dan membalut telurnya dengan campuran abu serta garam, menghasilkan produk telur asin dengan kualitas yang tidak berbeda nyata secara visual.<sup>10</sup> Pada penelitian ini telur itik diasinkan menggunakan larutan garam jenuh (36,5 %) yang ditambahkan ekstrak air rebusan serbuk daun salam (ARDS) masing-masing dengan konsentrasi (v/v) 0,5%, 1,0%, 1,5%, 2,0%, 2,5%, 3,0%, 3,5%, 4,0%, 4,5%, dan 5,0% yang diinkubasi selama 10 hari. Setelah pengasinan terjadi peningkatan secara signifikan ( $p \leq 0,05$ ) massa telur asin mentah sebesar 4,8% (Tabel 1). Fenomena ini menunjukkan masuknya larutan garam (NaCl) menembus kulit telur sehingga mengakibatkan terjadinya peristiwa osmosis dari bagian dalam telur ke lingkungan hipertonis dengan laju yang lebih tinggi daripada peristiwa osmosis air dari luar menuju bagian dalam telur. Proses ini mengakibatkan terjadinya perubahan karakteristik bagian dalam telur antara lain bagian kuning telur (*yolk*) menjadi padat menyerupai bola bekal yang diikuti oleh penurunan konsisten putih telur, hal ini diakibatkan oleh pergerakan air dari bagian *yolk* menuju putih telur melewati pembatas kedua bagian tersebut (Gambar 1E (nomor 2 dan 3). Terjadinya pengerasan kuning telur diikuti eksudasi minyak dan penurunan pH dari bagian putih telur, hal ini dilaporkan juga pada penelitian Engelen dkk. dan Luo W dkk.<sup>11,12</sup> Menurut Lai dkk. dan Ganesan dkk. tekstur berminyak pada telur asin ini disebabkan melekatnya lipoprotein dari kuning telur pada NaCl dalam bentuk *low density lipoprotein* (LDL).<sup>13,14</sup>

Telur merupakan bahan makanan yang mengandung protein tinggi, berbagai jenis mikroba dapat tumbuh pada telur sehingga menyebabkan terjadinya pembusukan. Pada penelitian ini *Proteus mirabilis* yang teridentifikasi berasal dari isolat telur busuk. Berdasarkan pada analisis menggunakan Vitech 2 Compact yang dibaca dengan software *Advanced Experts System* (AES) dan data disajikan pada Tabel 2 dan Tabel 3 yang diperkuat dengan Gambar 2. Spesies bakteri penyebab busuk telur teridentifikasi sebagai *Proteus mirabilis*, bakteri ini merupakan kelompok gram negatif yang berbentuk batang, bersifat motil karena mempunyai flagela pada seluruh permukaan selnya. Pengamatan ini sejalan dengan yang dideskripsikan oleh Chelsie dkk. dalam kajian pustaka tentang akibat infeksi *Proteus mirabilis* pada saluran kemih manusia.<sup>15</sup> Amare dkk. melaporkan *Proteus mirabilis* sebagai penyebab rusaknya kantong kuning telur dan mengakibatkan *rotten black* pada telur.<sup>4</sup> Untuk menguatkan bahwa *Proteus mirabilis* merupakan salah satu bakteri

penyebab busuk pada telur, maka pada penelitian ini dilakukan uji postulat Koch dengan cara menginokulasi isolat *Proteus mirabilis* pada telur yang masih segar. Hasil yang didapat membuktikan bahwa bakteri ini dapat menyebabkan busuk hitam pada *yolk* (Gambar 1B) juga menghasilkan campuran gas berbau



**Gambar 3.** Zona hambat aktifitas ARDS 10% (b/v) terhadap bakteri *Proteus mirabilis* pada MH agar.

**Tabel 5.** Diameter Zona Hambat ARDS Terhadap Bakteri *Proteus Mirabilis* pada MH agar secara *In Vitro*.

No	Konsentrasi % (v/v)	Rata-rata Zona Hambat (mm)*
		ARDS
1	0,0	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
2	0,1	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
3	0,3	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
4	0,4	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
5	0,5	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
6	0,6	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
7	0,7	5,96 ± 0,06 <sup>b</sup>
8	0,8	6,87 ± 0,23 <sup>c</sup>
9	0,9	8,07 ± 0,21 <sup>d</sup>
10	1,0	9,50 ± 0,50 <sup>e</sup>
11	1,5	11,13 ± 0,32 <sup>f</sup>
12	2,0	11,97 ± 0,58 <sup>g</sup>
13	2,5	12,73 ± 0,21 <sup>h</sup>
14	3,0	13,43 ± 0,38 <sup>i</sup>
15	3,5	14,33 ± 0,31 <sup>j</sup>
16	4,0	15,47 ± 0,42 <sup>k</sup>
17	4,5	16,43 ± 0,21 <sup>l</sup>
18	5,0	18,27 ± 0,55 <sup>m</sup>

\*Nilai-nilai pada Tabel 5 ± SD merupakan rata-rata dari tiga kali ulangan. Nilai-nilai yang diikuti huruf yang sama menunjukkan hasil-hasil yang berbeda nyata berdasarkan uji jarak berganda Duncan pada  $p \leq 0,05$ , setelah dilakukan uji sidik ragam (ANOVA).

belerang dan ammonia (bau khas telur yang mengalami pembusukan).

Pada penelitian dilakukan eksplorasi tanaman salam untuk menghambat pertumbuhan mikroba pencemar khususnya bakteri penyebab busuk telur itik yang diasinkan. Hasil pemeriksaan fitokimia yang diperoleh dalam penelitian ini (Tabel 4) menunjukkan bahwa ARDS mengandung beberapa senyawa aktif yang berpotensi sebagai penghambat pertumbuhan mikroba yang menyebabkan busuk telur dan juga sebagai antioksidan.

Tumbuhan salam merupakan tanaman endemi yang tersebar luas di Indonesia, daunnya sering dimanfaatkan sebagai rempah daun dalam berbagai macam masakan tradisional oleh penduduknya. Penambahan bahan rempah dilakukan dengan tujuan untuk menambah aroma pada telur yang sedang diasinkan. Kandungan senyawa aktif yang terkandung dalam rempah-rempahan (bumbu) tersebut telah banyak dilaporkan memberi efek menekan pertumbuhan mikroba

dalam bahan makanan.<sup>16</sup> Senyawa fenol dalam tubuh manusia memegang peran penting dalam mengkelat ion logam, mengendapkan protein, dan sebagai antioksidan potensial. Peran dari senyawa fenol sebagai antioksidan diulas secara mendalam oleh Formagio dkk. dan Asif dkk, serta juga dilaporkan pada penelitian Rebaya dkk.<sup>6,17,18</sup> Pada studi yang dilakukan oleh Astiti dkk. (2019) melaporkan bahwa tanin didapat dari isolasi daun belimbing merupakan kelompok senyawa fenol, mempunyai aktifitas sebagai antioksidan yang dapat menetralkan kehadiran radikal bebas dalam tubuh.<sup>19</sup>

Serbuk daun salam yang direbus dengan air sampai mendidih terbukti menghambat

pertumbuhan *Proteus mirabilis* secara *in vitro*. Perlakuan ARDS dengan konsentrasi 10% (b/v) secara nyata memberikan zona hambat dengan diameter zona hambat berturut-turut sebesar  $19,5 \pm 0,50$  mm dapat dilihat pada Gambar 3. Nilai MIC menunjukkan tingkat toksisitas suatu senyawa terhadap mikroba pada uji.<sup>20,21</sup> Semakin kecil konsentrasi ekstrak yang menghasilkan nilai MIC, semakin tinggi tingkat toksisitas senyawa aktif terhadap mikroba uji. Pada penelitian ini nilai MIC (*minimal inhibitory concentration*) yang didapat pada konsentrasi 0,7% (v/v) dengan zona hambat  $5,96 \pm 0,06$  mm (Tabel 5). Sementara itu nilai MIC pada ARDS pada penelitian ini didapatkan

**Tabel 6.** Zona hambat hasil partisi ARDS terhadap bakteri *Proteus mirabilis* pada MH agar.

Pelarut	Diameter Zona Hambat (mm)*	
	ARDS	
n Heksan	$0,00 \pm 0,00^a$	
Ethyl asetat	$0,00 \pm 0,00^a$	
Ethanol	$14,33 \pm 4,04^b$	

**Tabel 7.** Nilai RF dan zona hambat hasil fraksinasi ARDS terhadap bakteri *Proteus mirabilis* pada MH agar.

Bahan	No Botol	Fraksi	Rerata Nilai Rf	Zona Hambat (mm)
ARDS	55,56,69,71,74,80,	AF.1	$0,94 \pm 0,00$	0
	83,84,97	AF.2	$0,76 \pm 0,05$	0
	98,99,110,111,112,113,124	AF.3	$0,55 \pm 0,02$	$12,6 \pm 1,67$
	125,127,130	AF.4	$0,86 \pm 0,03$	0

**Tabel 8.** Senyawa aktif ARDS yang terdeteksi GCMS.

Puncak	Waktu Retensi (menit)	Rumus Molekul	Berat Molekul	% Area	Profil senyawa berdasarkan data base MS	Gol Senyawa
Puncak 1	3,801	$C_6H_{12}O_6$	116	20.20	2-Pentanone4-Hydroxi-4 Methyl (CAS) Diacetone Alkohol	Minyak Atsiri
Puncak 2	6,855	$C_6H_{14}O_3$	134	34.47	Ethanol, 2-(Ethoxythoxy) (CAS)	Alkohol
Puncak 3	7,046	$C_3H_8O_3$	92	9.87	.1,2,3 Propanetriol Cas) Glycerol	Fenol Asam Lemak
Puncak 4	8,211	$C_{10}H_{18}O$	154	10.21	Citronella (2,6-Octadien-1-Ol, 3,7-Dimethyl-, (CAS)	Minyak Atsiri
Puncak 5	8,908	$C_{10}H_{20}O$	156	3.05	Beta Citronellol 6-Octen-1-Ol, 3,7-Dimethyl-, (CAS)	Minyak Atsiri
Puncak 6	9,498	$C_{10}H_{18}O$	154	11.31	Trans Geraniol	Minyak Atsiri
Puncak 7	11,605	$C_{13}H_{26}O_2$	214	5.11	Dodecanoic Acid, Methyl Ester(CAS) Methyl Laurate	Asam Lemak
Puncak 8	14,148	$C_{15}H_{30}O_2$	242	2.06	Tetradecanoic Acid, Methyl Ester (CAS) Methyl Myristate	Asam Lemak
Puncak 9	17,279	$C_{14}H_{30}O$	214	1.89	1-Tetradecanol (Cas) Alfol 14	Fenol Asm Lemak
Puncak 10	17,914	$C_{17}H_{34}O_2$	270	1.83	Hexadecanoic Acid Methyl Ester CAS) Methyl Palmitate	Asam Lemak



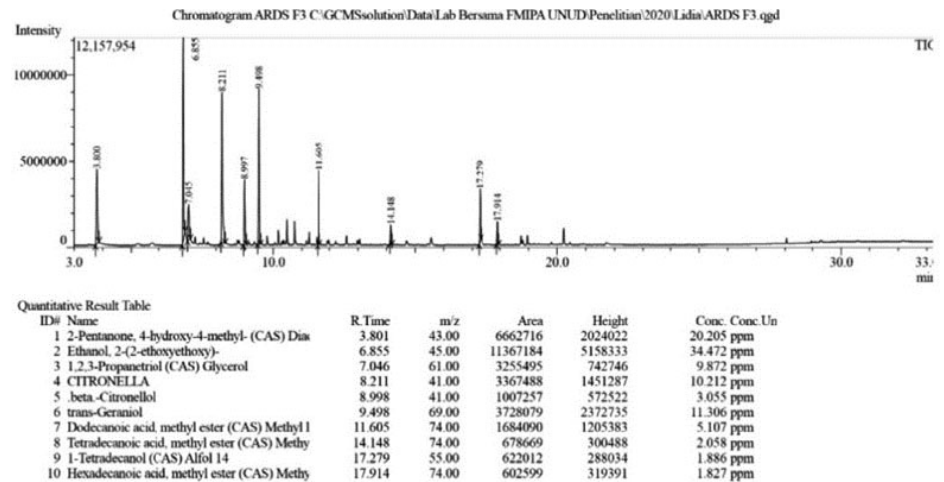
pada konsentrasi relatif lebih tinggi dari yang dilaporkan oleh Susilawati dkk. yaitu sebesar 0,5% dengan zona hambat  $10,33 \pm 0,58$  mm.<sup>22</sup>

Partisi dari *crude extract* ARDS juga menunjukkan aktifitas yang konsisten terhadap pertumbuhan *Proteus mirabilis* (Tabel 6) menunjukkan bahwa diameter zona hambat dari partisi ARDS dalam pelarut etanol lebih besar daripada hasil partisi pada pelarut n-Heksan, ethyl asetat. Hal menarik terjadi pada partisi dalam pelarut ethyl acetate dan n-Hexan dimana ARDS tidak menunjukkan aktifitas hambatan terhadap pertumbuhan *Proteus mirabilis*. Tingginya aktifitas antimikroba pada perlakuan pelarut etanol mendapatkan nilai MIC yang lebih besar dibandingkan perlakuan pelarut etil asetat dan n-Heksan, karena sifat kepolarannya sehingga senyawa aktif bersifat polar yang terdapat pada rendemen ARDS. Fenomena ini berkaitan saat dilakukan ekstraksi karena terjadi proses hidrolisis yang menyebabkan perubahan fisiko-kimia berakibat pembesaran protoplasma, sehingga terjadi pelarutan makromolekul senyawa aktif yang terdapat pada jaringan simplisia. Peristiwa ini juga dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti suhu, pH, waktu, ukuran partikel simplisia, jenis, dan jumlah pelarut.<sup>23,24</sup> Hal ini juga dilaporkan oleh Prasetyowati dkk. dan Ari dkk.<sup>25,26</sup> Studi lainnya yang dilakukan oleh Restya dkk. melaporkan bahwa interaksi antara jenis pelarut dan rasio bahan (simplisia) berpengaruh pada senyawa aktif yang terkandung didalam rendemen hasil ekstraksi.<sup>27</sup>

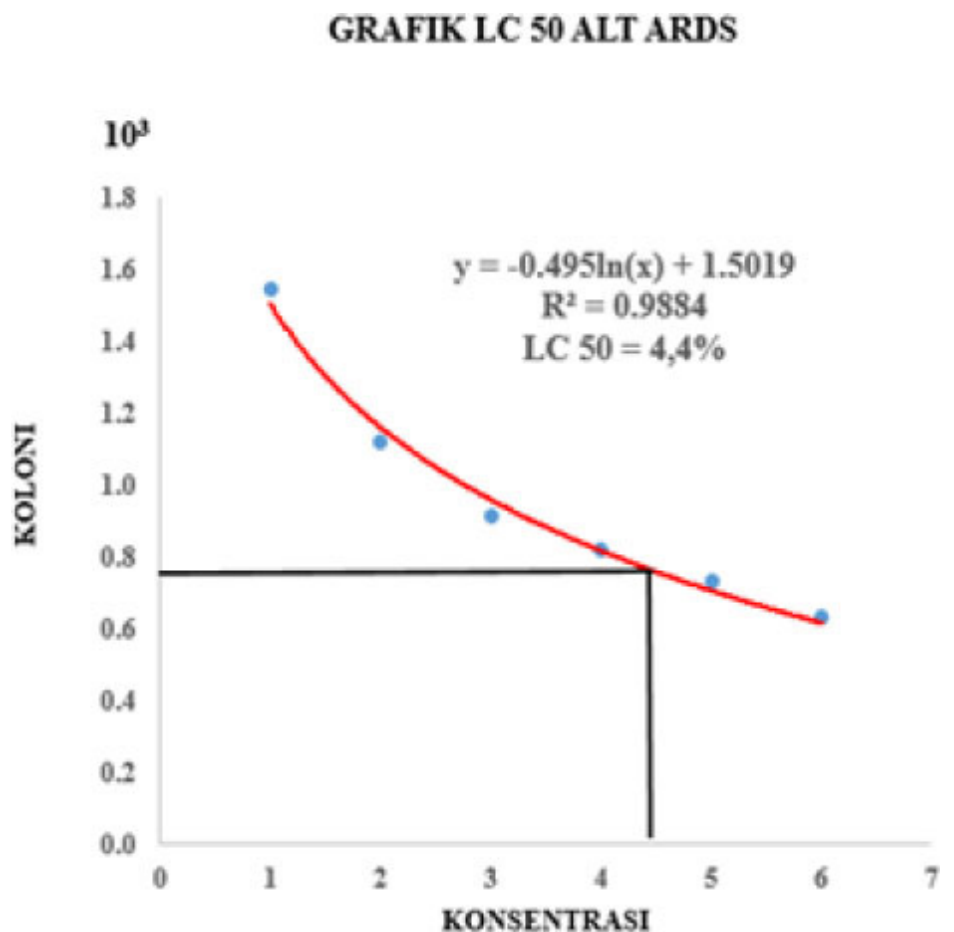
Fraaksinasi merupakan proses memisahkan senyawa yang ada dalam ekstrak kasar berdasarkan tingkat kepolaran senyawa aktif, sehingga senyawa-senyawa dengan polaritas sama akan mengumpul dan terpisah satu sama lain. Dengan menggunakan metoda ini dihasilkan senyawa-senyawa dengan nilai Rf yang bervariasi seperti ditunjukkan pada Tabel 7. Fraksi-fraksi dengan nilai Rf sama dikomposit dan dilakukan *bioassay*. Terdapat satu fraksi ARDS dengan nilai Rf sebesar  $0,55 \pm 0,02$  yang menghambat pertumbuhan *Proteus mirabilis* dengan zona hambatan sebesar  $12,6 \pm 1,67$  mm dan nilai Rf  $0,55 \pm 0,02$  yang menunjukkan aktifitas antimikroba. Nilai Rf umumnya

dipakai untuk prediksi awal tingkat kesamaan senyawa yang terkandung dalam ekstrak kasar simplisia. Nilai Rf merupakan perbandingan jarak tempuh substansi dengan jarak tempuh pelarut saat dipakai dalam metoda pemisahan.<sup>28</sup> Secara tegas hal ini bermakna bahwa

senyawa dengan BM tinggi akan bergerak lebih lambat dalam plat kromatografi lapis tipis (KLT).<sup>29</sup> Prinsip kerja KLT dalam pemisahan senyawa-senyawa dalam suatu campuran dengan menggunakan metoda ini diulas secara mendalam oleh Cai dkk.<sup>30</sup>



Gambar 4. Kromatogram senyawa aktif ARDS pada GCMS.



Gambar 5. Grafik hubungan konsentrasi ARDS dengan angka lempeng total (ALT).

Fraksi dengan nilai Rf yang menghasilkan zona hambat terbesar (Tabel 7) dianalisis dengan teknik GCMS untuk menentukan senyawa aktif yang mungkin terkandung dalam ARDS. Hasil analisis GCMS dari ARDS yang ditunjukkan pada Tabel 8 dan Gambar 4 mengandung senyawa-senyawa yang dapat dikelompokkan menjadi golongan senyawa fenol, asam lemak, dan minyak atsiri. Senyawa dominan yang muncul pada ARDS adalah *Ethanol*, *2-(ethoxythoxy)* (CAS) dengan persentase relatif luas area sebesar 34.47%. Senyawa lain yang relatif besar persentase luas puncaknya adalah *2-Pentanone-4-hydroxi-4 methyl* (CAS) *Diacetone alcohol* dengan persentase luas area sebesar 20,2%. Fenomena menarik yang teramati pada data yang ditunjukkan pada Tabel 8 adalah teridentifikasi golongan minyak atsiri pada ARDS. Senyawa pada puncak ke-4, 5, dan 6 pada kromatogram GCMS ARDS yaitu *Citronella* (*2,6-Octadien-1-Ol, 3,7-Dimethyl-*, (CAS), *Beta Citronellol 6-Octen-1-Ol, 3,7-Dimethyl-* (CAS) dan *Trans Geraniol* ditemukan juga oleh Mulyani dkk. pada komponen penyusun minyak atsiri daun dan kulit jeruk limau yang mampu menghambat aktifitas pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* terjadi pada konsentrasi hambat minimal berturut-turut 0,04% dan 12,75%.<sup>31</sup> Hal ini juga didukung penelitian yang dilakukan oleh Rahmawati dkk. mengekstraksi bahan alam dari tumbuhan *Geranium homeanum* Turez dan melaporkan *Citronella* dan *Geraniol* mempunyai aktifitas sebagai anti mikroba.<sup>16</sup> Nilai MIC pada ekstrak *Geranium homeanum* Turez terjadi pada konsentrasi 15 mg/ml mampu menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* dengan zona hambat 2 mm sedangkan nilai MIC yang mampu menghambat pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* terjadi pada konsentrasi 20 mg/ml diperoleh zona hambat 3 mm.<sup>16</sup> Pada penelitian ini nilai MIC ARDS dapat dilihat pada Tabel 5, mekanisme kerja minyak atsiri sebagai antibakteri yaitu dengan cara merusak struktur dinding sel mengakibatkan kerja transport aktif dan kekuatan proton di dalam membran sitoplasma bakteri terganggu.

Elaborasi dua senyawa yang dominan

**Tabel 9.** Persentase potensi ARDS terhadap penurunan nilai angka lempeng total (ALT) telur itik yang diasinkan.

Kelompok Perlakuan	ALT (X 10 <sup>3</sup> cfu/g)	Persentase Potensi (%) <sup>*</sup>
K.Negatif	1,541 ± 0,003	0,00 ± 0,00 <sup>a</sup>
K.Positif	1,099 ± 0,000	28,8 ± 0,21 <sup>d</sup>
0,5 %	1,323 ± 0,003	14,3 ± 0,25 <sup>b</sup>
1,0 %	1,118 ± 0,003	27,6 ± 0,46 <sup>c</sup>
1,5 %	0,995 ± 0,003	39,0 ± 0,00 <sup>e</sup>
2,0 %	0,912 ± 0,005	40,9 ± 0,38 <sup>f</sup>
2,5 %	0,834 ± 0,001	45,9 ± 0,29 <sup>g</sup>
3,0 %	0,822 ± 0,002	46,7 ± 0,17 <sup>h</sup>
3,5 %	0,756 ± 0,003	51,0 ± 0,00 <sup>i</sup>
4,0 %	0,731 ± 0,008	52,6 ± 0,60 <sup>j</sup>
4,5 %	0,668 ± 0,001	56,7 ± 0,20 <sup>k</sup>
5,0 %	0,632 ± 0,002	59,7 ± 0,31 <sup>l</sup>

\*Nilai-nilai pada Tabel 8 ± SD merupakan rata-rata dari tiga kali ulangan. Nilai-nilai yang diikuti huruf yang berbeda menunjukkan hasil-hasil yang berbeda nyata berdasarkan uji jarak berganda Duncan pada  $p \leq 0.05$ , setelah dilakukan uji sidik ragam (Anova).

K.Negatif : Tanpa perlakuan inkubasi dalam suhu kamar inkubasi 10 hari

K.Positif: Larutan garam jenuh konsentrasi 36,5% inkubasi 10 hari

pada ARDS juga terdeteksi pada ekstrak *orange Sargassum fillipendula*, Mikroalga *Tetraselmis Chuii*, *Sea buckthorn berry*, *blackcurrant berry* dan batang *Schleichera oleosa*.<sup>22,32-34</sup> Senyawa-senyawa yang terdapat pada Tabel 8 termasuk golongan senyawa fenol, minyak atsiri, dan asam lemak yang bersinergis menghambat pertumbuhan bakteri *Proteus mirabilis* data dapat dilihat pada Tabel 5 dan Gambar 3. Sementara itu Susilawati dkk. juga melaporkan pada ekstrak batang *Schleichera oleosa* didapatkan dua senyawa aktif yang sama dengan penelitian penulis (Tabel 8) yaitu *Hexadecanoic Acid Methyl Ester* (CAS), *Methyl Palmitate* dan *Dodecanoic Acid, Methyl Ester*(CAS) *Methyl Laurate* yang dapat menghambat pertumbuhan *E.coli* (O157).<sup>22</sup> Hal ini juga dibuktikan oleh Ria dkk. dimana penambahan air rebusan daun salam dengan konsentrasi 20% meningkatkan kadar total fenol sebesar 0,064% pada telur asin.<sup>35</sup> Kandungan fenol diperkirakan mempunyai hubungan sinergisme dengan karoten dalam meningkatkan antioksidan dan antimikroba pada telur. ARDS yang ditambahkan pada proses pengasinan telur pada penelitian penulis mengandung

beberapa senyawa yang bersinergi memiliki daya antibakteri (Tabel 2). Terdapatnya sifat antibakteri pada daun salam maka bisa dipastikan ketahanan daya simpan dari telur asin yang proses pembuatannya pada larutan garam jenuh ditambahkan ARDS akan lebih lama, bila dibandingkan dengan telur asin yang proses pembuatannya tidak ditambahkan ARDS.

Potensi ARDS dalam menurunkan total cemaran bakteri yang terdapat pada sampel telur asin mentah juga dilakukan dalam penelitian ini, dan hasilnya ditunjukkan pada Tabel 9. Perlakuan dengan konsentrasi yang meningkat terbukti dapat menekan pertumbuhan atau populasi bakteri total pada sampel telur asin sampai 59,7% ± 0,31% pada ARDS, relatif terhadap kontrol negatif (Tabel 9). Hasil tersebut berbeda nyata secara statistik berdasarkan uji jarak berganda Duncan, setelah dilakukan uji ANOVA ( $p \leq 0,05$ ). Nilai rujukan angka lempeng total (ALT) untuk produk tradisional telur yang diawetkan dengan cara pengasinan, dibasakan, dan dikalengkan yaitu negatif (nol)/ 25 gram untuk *Salmonella sp*, *Staphylococcus aureus* < 1 x 10<sup>4</sup>/gram.<sup>36</sup>



Tampak pada Tabel 9 terjadi peningkatan jumlah kematian bakteri total pada sampel yang sejalan dengan peningkatan konsentrasi ARDS, secara statistik perbedaan tersebut signifikan ( $p \leq 0,05$ ). Nilai rujukan toksisitas dikategorikan supertoksik  $< 5$  mg/L, amat toksik 5-50 mg/L, sangat toksik 50-500 mg/L, toksik sedang 0,5-5 g/L, toksik ringan 5-15 g/L, dan tidak toksik  $> 15$  g/L.<sup>37</sup> Pada penelitian ini toksisitas ( $LC_{50}$ ) ARDS didapatkan pada konsentrasi (v/v) 4,4 % (Gambar 5). Hal ini berkaitan dengan senyawa yang terdapat dalam (Tabel 8). Hasil penelitian juga menunjukkan terjadi penurunan nilai angka lempeng total (ALT) masih dalam batas rentang nilai rujukan yang ditetapkan SNI. Senyawa aktif yang terkandung didalam ARDS bersifat toksik sehingga dapat meningkatkan persentase potensi dalam menurunkan nilai angka lempeng total. Berdasarkan uraian diatas hasil ini menunjukkan bahwa daun salam dalam bentuk air rebusan dapat dipergunakan sebagai bahan pengawet suplemen alami untuk memperpanjang masa simpan telur asin dengan konsentrasi yang lebih sedikit diatas nilai  $LC_{50}$ . Secara keseluruhan hasil penelitian ini secara nyata ARDS sangat potensial untuk dikembangkan menjadi bahan aktif yang digunakan untuk memperpanjang masa simpan dan menurunkan cemaran telur itik yang diasinkan.

## SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat ditarik beberapa kesimpulan diantaranya air rebusan daun salam dengan konsentrasi 10% (b/v) dapat menghambat pertumbuhan *Proteus mirabilis* secara *in vitro* sebesar 19,33 mm, nilai minimal concentration (MIC) dalam menghambat pertumbuhan bakteri secara *invitro* sebesar 0,7% (v/v), terdapat 8 senyawa aktif yang bersinergis sebagai indikator/prekursor antibakteri, dan penambahan ARDS dengan konsentrasi 5% (v/v) secara signifikan dapat menurunkan nilai cemaran bakteri (angka lempeng total) pada telur itik yang diasinkan.

## ETIKA PENELITIAN

Penelitian telah memenuhi kaidah etik dalam publikasi penelitian.

## KONFLIK KEPENTINGAN

Tidak terdapat konflik kepentingan dalam penulisan laporan penelitian ini.

## PENDANAAN

Penelitian ini dilakukan tanpa hibah, sponsor, atau sumber pendanaan lainnya.

## KONTRIBUSI PENULIS

Seluruh penulis memiliki kontribusi yang sama dalam penulisan laporan hasil penelitian ini baik dari tahap penyusunan proposal, pencarian data, analisis data, hingga interpretasi data penelitian, dan penyajian laporan akhir.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Ema FA, Arif M, Islam MA, and Khatun MM. Isolation and identification of duck egg-borne bacteria and their antibiogram profile. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*. 2018;5(2). doi:10.5455/javar.2018.e253.
2. De Reu, Koen, Lieve Herman, and Mieke Uyttendaele. Bacteriological contamination and infection of shell eggs in the production chain. 2006. p1-250.
3. Hamilton AL, Kamm MA, Ng SC, Morrison M. *Proteus* spp. as Putative Gastrointestinal Pathogens. *Clin Microbiol Rev*. 2018;31(3):e00085-17. doi:10.1128/CMR.00085-17.
4. Amare A, Amin AM, Shiferaw A, Nazir S, and Negussie H. *Yolk Sac Infection (Omphalitis)* in Kombolcha Poultry Farm, Ethiopia. *American-Eurasian Journal of Scientific Research*. 2013;8(1). p10-14. doi:10.5829/idosi.aejr.2013.8.1.65108.
5. Thohari I. *Teknologi Pengawetan dan Pengolahan Telur*. Malang: Penerbit UB Press. 2018.
6. Asif M. Chemistry and antioxidant activity of plants containing some phenolic compounds. *Chemistry International*. 2015. p35-52.
7. Kusumaningrum A, Widiyaningrum P, dan Mubarak I. Penurunan total bakteri daging ayam dengan perlakuan perendaman infusa daun salam. *Jurnal MIPA*. 2013;36(1). p14-19.
8. Malik A and Ahmad AR. Antidiarrheal activity of etanol extract of bay leaves (*Syzygium polyanthum* [wight.] Walp. *International Research journal of pharmacy*. 2013;4(4). p106-108. doi:10.7897/2230-8407.04418.
9. Tharukliling S and Fanani Z. Effect of use different eggs with different techniques of salted eggs on the level of consumer preference. *Journal Of Development Research*. 2018;2(1). p15-20. doi:10.28926/jdr.v2i1.45.
10. Lukito GA, Suwarastuti A, dan Hintono A. Pengaruh berbagai metode pengasinan terhadap kadar NaCl, kekenyalan, dan tingkat kesukaan konsumen pada telur puyuh asin. *Animal Agriculture Journal*. 2012;1(1). p829-838.

11. Engelen A. The effect of marinating time in salted egg production using wet method. *Agroindustri Halal*. 2017;3(2). p133 - 141. doi:10.30997/jah.v3i2.
12. Luo W, Xue H, Xiong C, Li J, Tu Y, Zhao Y. Effects of temperature on quality of preserved eggs during storage. *Poult Sci*. 2020 Jun;99(6):3144-3157. doi: 10.1016/j.psj.2020.01.020.
13. Lai KM, Chi SP, Ko WC. Changes in yolk states of duck egg during long-term brining. *J Agric Food Chem*. 1999 Feb;47(2):733-6. doi: 10.1021/jf980486r.
14. Ganesan P, Kaewmanee T, Benjakul S, Baharin BS. Comparative Study on the Nutritional Value of Pidan and Salted Duck Egg. *Korean J Food Sci Anim Resour*. 2014;34(1):1-6. doi: 10.5851/kosfa.2014.34.1.1.
15. Armbruster CE, Mobley HLT, Pearson MM. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* Infection. *EcoSal Plus*. 2018 Feb;8(1):10.1128/ecosalplus.ESP-0009-2017. doi: 10.1128/ecosalplus.ESP-0009-2017.
16. Rahmawati F, Bintang M, and Artika IM. Antibacterial activity and phytochemical analysis of *Geranium homeanum* Turez leaves. *Current Biochemistry*. 2017;4(1).
17. Formagio AS, Volobuff CR, Santiago M, Cardoso CA, Vieira Mdo C, Valdevina Pereira Z. Evaluation of Antioxidant Activity, Total Flavonoids, Tannins and Phenolic Compounds in Psychotria Leaf Extracts. *Antioxidants (Basel)*. 2014 Nov 10;3(4):745-57. doi: 10.3390/antiox3040745.
18. Rebaya A, Belghith, SI, Baghdikian B, Leddet VM, et al. Total Phenolic, Total Flavonoid, Tannin Content, and Antioxidant Capacity of *Halimium halimifolium* (Cistaceae). *J App Pharm Sci*. 2015;1(1). p052-057. DOI: 10.7324/JAPS.2015.50110.
19. Astiti ANP. *Bahan Alam Tumbuhan Sebagai Sumber Antioksidan*. Udayana University Press. 2019.
20. Banso A and Adeyemo SO. Evaluation of antibacterial properties of tannins isolated from *dichrostachys cinerea*. *Afr J Biotechnol*. 2007;6(15). p1785-1787. doi:10.5897/AJB2007.000-2262.
21. Nitiema LW, Savadogo A, Simpore J, Dianou D, and Traore AS. *In vitro* Antimicrobial Activity of Some Phenolic Compounds (Coumarin and Quercetin) Against Gastroenteritis Bacterial Strains. *International Journal of Microbiological Research*. 2012;3(3). p183-187. doi:10.5829/idosi.ijmr.2012.3.3.6414.
22. Susilawati NM, Ramona Y, and Parwata IMO. The effect of bark crude extract concentrations of *Schleichera oleosa* (Lour) Oken on the *in vitro* growth of *E. coli*. *Jurnal Metamorfosa*. 2016;3(2). p96-102.
23. Voight R. *Teknologi Farmasi edisi 3*. Gadjah Mada University Press: Yogyakarta. 1995. p1-987.
24. Kliemann E, Simas KND, Amante ER, Prudencio ES, Teofilo RE, Ferreira MMC, and Amboni RDMC. 2009. Optimisation of Pectin Acid Extraction from Passion Fruit Peel (*Passiflora edulis flavicarpa*) Using Response Surface Methodology. *International Journal of*

- Food Science and Technology. 2009;44. p476-483.
25. Prasetyowati RP dan Tera F. Pengambilan Minyak Biji Alpukat (*Persea Americana* Mill.) Dengan Metode Ekstraksi. *Jurnal Teknik Kimia*. 2010;17(2). p16-24.
  26. Ari DS, Dwi A, Gita GP, dan Yosephin BG. Polaritas Pelarut Sebagai Pertimbangan Dalam Pemilihan Pelarut Untuk Ekstraksi Minyak Bekatul Dari Bekatul Varietas Ketan (*Oriza Sativa* Glatinosa). *Simposium Nasional RAPI XI FT UMS*. 2012. p8-14.
  27. Restya N, Wahyunanto AN, dan Rini Y. Kajian pH dan Rasio Bahan Baku dengan Cairan Pengekstrak pada Proses Ekstraksi Pektin dari Buah Pepaya (*Carica papaya* L.). *Jurnal Bioproses Komoditas Tropis*. 2015;3(1). p26-31.
  28. Kowalska T, Kaczmarek K, and Prus W. Theory and Mechanism of Thin-Layer Chromatography. *Handbook of Thin-Layer Chromatography* 3<sup>rd</sup> Edition. 2003. p87-80.
  29. Reich E and Blatter A. *Handbook of Thin-Layer Chromatography*. 3rd Edition. Marcel Dekker Inc: New York. 2003. p24-626.
  30. Cai L. Thin Layer Chromatography. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*. 2016.
  31. Mulyani S, Susilowati, and Hutabarat MM. Antibacterial activity and GC-MS analysis of the Citrus amblycarpa (Hassk) Ochse essential oil. *Majalah Farmasi Indonesia*. 2009;20(3). p127 – 132.
  32. Puupponen-Pimiä R, Nohynek L, Meier C, Kähkönen M, Heinonen M, Hopia A, Oksman-Caldentey KM. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *J Appl Microbiol*. 2001 Apr;90(4):494-507. doi: 10.1046/j.1365-2672.2001.01271.x.
  33. Khotimah K, Darius, and Sasmito BB. Uji aktivitas senyawa aktif alga coklat (*Sargassum fillipendulla*) sebagai antioksidan pada minyak ikan lemuru (*Sardinella longiceps*). *THPi Student Journal*. 2013;1(1). p10-20.
  34. Maligan JM, Heni A, dan Elok Z. Produksi Dan Identifikasi Senyawa Antimikroba Dari Mikroalga *Tetraselmis Chuii* Dengan Metode Uae (Kajian Jenis Pelarut Dan Jumlah Siklus Ekstraksi). *Jurnal Teknologi Pertanian*. 2016;17(3). p203-213.
  35. Ria M, Imam T, dan Lilik ER. Pengaruh Daun Salam (*Syzygium Polyanthum*) Terhadap Protein Kuning Telur, Total Fenol Dan Flavonoid Pada Telur Asin. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Hasil Ternak*. 2016;11(2). p23-27.
  36. SNI. Batas Cemaran Maksimum Cemaran Mikroba Dalam Pangan. Badan Standarisasi Nasional ICS 67.220.20. Jakarta. 2009. (Available from: [URL:http://ed0c.site/13586-snt-39262006-telur-konsumsi-pdf-free.html](http://ed0c.site/13586-snt-39262006-telur-konsumsi-pdf-free.html)).
  37. Rahayu M dan Solihat MF. *Buku Bahan Ajar Toksikologi Teknik Laboratorium Medis*. Edisi 1(1):7. Pusat Pendidikan Sumber Daya Manusia BPPSDM Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2018.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution