

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi adalah semua obyek yang menjadi sasaran dalam penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun petai cina (*Leucaena leucocephala* (Lam) De Wit.) yang masih segar dari Desa Grogolan, Kecamatan Karanggede, Boyolali, Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun petai cina (*Leucaena leucocephala* (Lam) De Wit.) yang masih segar, 3 sampai 4 tangkai dari pucuk dan dikumpulkan pada bulan Januari 2019. Daun petai cina diperoleh dari Desa Grogolan, Kecamatan Karanggede, Boyolali, Jawa Tengah.

B. Variasi Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama yang pertama pada penelitian ini adalah daun petai cina (*Leucaena leucocephala* (Lam) De Wit.).

Variabel utama yang kedua pada penelitian ini adalah aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol daun petai cina (*Leucaena leucocephala* (Lam) De Wit.) terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama dapat diklasifikasikan menjadi beberapa variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung dan variabel terkendali. Variabel bebas adalah variabel yang direncanakan untuk diteliti dan berpengaruh terhadap variabel tergantung. Dalam penelitian ini, variabel bebasnya adalah konsentrasi ekstrak dan fraksi daun petai cina.

Variabel tergantung merupakan faktor yang diamati dan diukur untuk menentukan efek dari varabel bebas. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah zona hambat.

Variabel terkendali adalah bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, kualitas pelarut, suhu, sterilisasi, kondisi laboratorium, metode dan media penelitian.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun petai cina (*Leucaena leucocephala* (Lam) De Wit.) yang diambil secara acak dari Desa Grogolan, Kecamatan Karanggede, Boyolali, Jawa Tengah.

Kedua, ekstrak etanol daun petai cina adalah hasil ekstraksi yang diperoleh dari daun petai cina yang diekstraksi dengan maserasi menggunakan pelarut etanol 70%.

Ketiga, fraksi n-heksan diperoleh dari ekstrak etanol daun petai cina yang difraksinasi dengan pelarut n-heksan dan air, kemudian filtrat n-heksan dipekatkan dengan *rotary evaporator*.

Keempat, fraksi etil asetat diperoleh dari residu n-heksan yang difraksinasi dengan pelarut etil asetat, kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator*.

Kelima, fraksi air adalah residu dari hasil fraksinasi pelarut etil asetat dan air, kemudian dipekatkan.

Keenam, bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

Ketujuh, konsentrasi ekstrak dan fraksi daun petai cina pada uji metode difusi adalah 20%, 30% dan 40%. Konsentrasi ekstrak dan fraksi daun petai cina pada uji metode dilusi adalah konsentrasi teraktif pada metode difusi dan dibuat variasi konsentrasi.

Kedelapan, zona hambat berupa daerah bening yang menunjukkan aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol dan fraksi daun petai cina berbagai konsentrasi dengan metode difusi.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

1.1. Bahan sampel. Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun petai cina (*Leucaena leucocephala* (Lam) De Wit.) yang diperoleh dari Desa Grogolan, Kecamatan Karanggede, Boyolali, Jawa Tengah.

1.2. Bakteri uji. Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

1.3. Media. Media yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri dalam penelitian ini adalah *Brain Heart Infusion* (BHI), *Pseudomonas Selektif Agar* (PSA), *Muller Hinton Agar* (MHA), *Kligler's Iron Agar* (KIA), *Lysine Iron Agar* (LIA), *Sulfide Indo Motilitas* (SIM) dan sitrat.

1.4. Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan adalah etanol 70%, n-heksan, etil asetat, air, aquadest, DMSO 5%, Mc Farland 0,5, FeCl₃, HCl 2N, serbuk magnesium, amil alkohol, pereaksi Dragendorff, pereaksi Wagner, CHCl₃, pereaksi Lieberman-Burchard, kristal ungu, iodium, aseton, safranin, reagen erlich A, reagen erlich B.

2. Alat

Alat yang digunakan dalam melakukan penelitian ini adalah oven Mermet, alat penyebuk, *moisture balance*, timbangan analitik Ohaus, *rotary evaporator* IKA®, ayakan no. 40, gelas ukur, batang pengaduk, waterbath, beaker glass, kertas saring, corong kaca, tabung reaksi, corong pisah, botol maserasi, penjepit tabung reaksi.

Alat uji aktivitas antibakteri yang digunakan adalah *autoclave*, inkubator, inkas, jarum ose, tabung reaksi, oven, lampu spiritus, kapas lidi steril, kertas cakram, beaker glass, pipet ukur, pinset dan cawan petri.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Determinasi tanaman daun petai cina (*Leucaena leucocephala* (Lam) De Wit.) bertujuan untuk mengetahui kebenaran sampel daun petai cina dengan cara

mencocokkan ciri morfologi tanaman daun petai cina terhadap pustaka dan dibuktikan di Laboratorium Universitas Setia Budi.

2. Pengambilan bahan dan pembuatan serbuk daun petai cina

Bahan/sampel daun petai cina diambil secara acak dengan memilih daun segar yang tidak terlalu tua dan tidak terlalu muda, diambil dari Desa Grogolan, Kecamatan Karanggede, Boyolali, Jawa Tengah. Daun petai cina dipetik kemudian dipisahkan dari tangkai dan rantingnya. Daun petai cina dibersihkan dari kotoran dengan cara dicuci di air mengalir. Daun petai cina ditiriskan dan dikeringkan dengan oven. Setelah kering, daun petai cina diserbuk dengan mesin penggiling dan diayak dengan pengayak no 60.

3. Pembuatan ekstrak etanol 70%

Serbuk daun petai cina diekstraksi dengan metode maserasi. Maserasi dengan pelarut etanol 70% (1:10). Sebanyak 800 gram simplisia dimasukkan ke dalam bejana kemudian ditambah 8 L (10 bagian) pelarut. Direndam selama 6 jam pertama sambil sekali-kali diaduk, kemudian didiamkan selama 18 jam, disaring dan ampasnya dimerasasi kembali dengan pelarut sebanyak setengah kali jumlah volume pelarut pada penyarian pertama (4 L). Maserat dikumpulkan kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C dengan putaran 75 rpm hingga didapat ekstrak kental (Depkes RI 2013). Persen rendemen diperoleh dari penimbangan hasil dari ekstrak kemudian dibagi berat serbuk daun petai cina dan dikalikan 100%.

4. Penetapan susut pengeringan serbuk daun petai cina

Penetapan susut pengeringan dilakukan pada serbuk daun petai cina dengan alat *moisture balance*. Suhu diatur 105°C dan waktu pengeringan secara manual hingga kering. Neraca timbang dimasukkan dengan posisi 0,00 kemudian sampel serbuk daun petai cina dimasukkan sebanyak 2 gram. Alat ditunggu hingga berbunyi sebagai tanda jika hasil analisa telah selesai.

5. Penetapan kadar air serbuk dan ekstrak daun petai cina

Penetapan kadar air dilakukan pada serbuk dan ekstrak daun petai cina dengan metode azeotropi (detilasi toluena). Toluena jenuh air disiapkan dengan

cara 200 ml toluen dikocok dengan 20 ml air, dibiarkan memisah dan lapisan air dibuang. 20 gram sampel dimasukkan ke dalam labu kering kemudian toluena dimasukkan ke dalam labu. Alat dan isi tabung penerima dihubungkan kemudian toluena dituangkan melalui puncak pendingin. Labu dipanaskan perlahan-lahan selama 15 menit dan jika toluena mendidih, disuling dengan kecepatan kurang lebih 2 tetes per detik sampai sebagian besar air tersulung. Kecepatan penyulingan dinaikkan hingga lebih kurang 4 tetes per detik. Jika air dan toluena memisah sempurna, dibaca volume air dan dihitung persentasenya (Depkes RI 1995).

6. Penetapan bobot jenis ekstrak daun petai cina.

Piknometer bersih, kering dan telah dikalibrasi dengan ditetapkan bobot piknometer dan bobot air yang baru dididihkan, pada suhu 25°C. Sampel dimasukkan ke dalam piknometer, kelebihan sampel dibuang dan ditimbang. Bobot piknometer kosong dikurangi dari bobot piknometer yang telah diisi. Bobot jenis sampel adalah hasil bagi bobot sampel dengan bobot air dalam piknometer (Depkes RI 1995).

7. Identifikasi kandungan senyawa kimia

Identifikasi kandungan kimia bertujuan untuk mengetahui kebenaran kandungan kimia yang terdapat pada daun petai cina.

7.1. Identifikasi flavonoid. Serbuk dan ekstrak daun petai cina ditimbang sebanyak 0,5 gram dilarutkan dengan 25 ml air panas kemudian ditambahkan sedikit HCL kocok kuat dan dibiarkan memisah. Serbuk magnesium dan amil alkohol ditambahkan secara berturut-turut dengan prosedur yang sama. Terbentuknya warna dalam larutan amil alkohol menunjukkan adanya senyawa flavonoid (Mustapa 2014).

7.2. Identifikasi alkaloid. Ditimbang 500 mg serbuk dan ekstrak daun petai cina, ditambahkan 1 ml asam klorida 2 N dan 9 ml air, dipanaskan di atas tangas air selama 2 menit, didinginkan dan disaring. 3 tetes filtrat dipindahkan pada kaca arloji kemudian tambahkan Bouchardat LP dan Mayer LP. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan berwarna coklat sampai hitam dengan

Bouchardat dan endapan menggumpal berwarna putih atau kuning dengan Mayer LP (Depkes RI 1989).

7.3. Identifikasi saponin. 500 mg serbuk dan ekstrak daun petai cina dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 10 ml air panas, didinginkan dan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Hasil positif jika terbentuk buih selama 10 menit setinggi 1 cm sampai 10 cm dan tidak hilang dengan penambahan 1 tetes asam klorida 2 N (Depkes RI 1989).

7.4. Identifikasi tanin. Sebanyak 500 mg serbuk dan ekstrak daun petai cina ditambahkan 10 ml air panas kemudian dididihkan selama 15 menit dan disaring. Filtrat yang diperoleh ditambah 5 ml pereaksi FeCl_3 . Perubahan warna biru kehitaman atau hijau kehitaman menunjukkan adanya kandungan tanin (Robinson 1995).

7.5. Identifikasi triterpenoid/steroid. Sebanyak 1 gram serbuk dan ekstrak daun petai cina ditambahkan 10 ml kloroform. Larutan diambil 5 ml dan dimasukkan ke tabung reaksi. Selanjutnya ditambahkan pereaksi Lieberman Burchard. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah keunguan (Depkes RI 1987).

8. Fraksinasi dari ekstrak etanol daun petai cina

Ekstrak etanol 70% daun petai cina sebanyak 20 gram yang telah disuspensikan dengan air difraksinasi dengan pelarut n-heksan 75 ml dalam corong pisah, fraksi yang ada di atas (fraksi n-heksan) dipisahkan dengan fraksi yang bagian bawah (fraksi air). Fraksinasi dilakukan dengan penambahan n-heksan sebanyak 3 kali. Fraksi n-heksan yang didapat kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator*.

Hasil sisa fraksinasi dengan n-heksan difraksinasi kembali dengan 75 ml pelarut etil asetat dalam corong pisah. Filtrat yang di atas (fraksi etil asetat) dipisahkan dengan fraksi yang di bawah (fraksi air). Fraksinasi dilakukan dengan penambahan etil asetat sebanyak 3 kali. Fraksi etil asetat yang didapat kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator*.

Filtrat sisa fraksinasi dengan etil asetat adalah fraksi air. Filtrat yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan *waterbath* 30-100°C sampai kental.

9. Sterilisasi

Inkas disterilkan dengan formaldehid cair. Media agar yang akan digunakan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Alat-alat dari gelas disterilkan dengan oven pada suhu 160-170°C selama 1 jam atau lebih, sedangkan alat-alat seperti jarum ose disterilisasi dengan pemanasan api langsung (Brooks *et al.* 2013).

10. Pembuatan suspensi bakteri uji

Pembuatan suspensi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 diambil satu ose dari biakan murni kemudian diinokulasi ke dalam tabung reaksi yang berisi 5 ml medium *Brain Heart Infusion* (BHI) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kekeruhan suspensi bakteri disesuaikan dengan standart *Mc Farland* 0,5 ekuivalen dengan konsentrasi $1,5 \times 10^8$ CFU/ml.

11. Identifikasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

11.1. Identifikasi morfologi pada media *Pseudomonas Selective Agar* (PSA). Bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 diinokulasi dengan cara digores pada plat PSA, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Bakteri ini membentuk koloni bulat halus dengan membentuk pigmen berwarna kehijauan (Brooks *et al.* 2013).

11.2. Identifikasi bakteri dengan pewarnaan Gram. *Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri Gram-negatif berbentuk batang. Pewarnaan Gram untuk meyakinkan bahwa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 merupakan bakteri Gram negatif. Pewarnaan Gram dimulai dengan dibuat ulasan biakan bakteri di atas objek glass dan difiksasi. Ulasan bakteri ditetesi larutan Gram A (kristal ungu) sebagai warna dasar dan dibiarkan selama 1 menit, dicuci dengan aquadest mengalir, kemudian ditetesi larutan Gram B (iodium), semua bakteri akan berwarna biru dan dibiarkan selama 1 menit. Dicuci kembali dengan aquadest mengalir lalu ditambahkan larutan Gram C (aseton) selama kira-kira 45 detik, bakteri Gram negatif akan kehilangan warna biru karena luntur sedangkan bakteri Gram positif akan tetap berwana biru. Langkah akhir, tambahkan larutan Gram D (safranin) selama 1 menit, dicuci dengan aquadest mengalir dan

dikeringkan menggunakan tissu yang ditempelkan disisi ulasan dan didiamkan hingga kering. Bakteri Gram negatif akan berwarna merah (Cornelissen 2015).

11.3. Identifikasi bakteri dengan uji biokimia. Identifikasi secara biokimia dilakukan untuk membuktikan kebenaran biakan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 berdasarkan sifat fisiologinya.

11.3.1. Media Kliger's Iron Agar (KIA). Biakan bakteri diinokulasikan pada media KIA dengan cara ditusuk dan digores kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Tujuan identifikasi dengan media KIA untuk mengetahui terbentuknya asam hasil fermentasi karbohidrat (glukosa dan laktosa) dan sulfida dalam media yang menyebabkan warna merah media menjadi kuning serta terbentuk endapan hitam (Harti 2015). *Pseudomonas aeruginosa* tidak dapat memfermentasi laktosa sehingga tidak terbentuk asam yang dapat menyebabkan warna media berubah menjadi kuning (Brooks *et al.* 2010). Hasil positif *Pseudomonas aeruginosa* adalah K/KS⁻. Bagian lereng berwarna merah ditulis K, bagian dasar berwarna merah ditulis K, dan sulfida negatif yaitu tidak terbentuk endapan hitam ditulis S⁻.

11.3.2. Media Lysin Iron Agar (LIA). Biakan bakteri diinokulasikan pada media LIA dengan cara ditusuk dan digores kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Tujuan identifikasi dengan media LIA untuk mengetahui adanya deaminasi lisin dan sulfida. Jika mikroorganisme mereduksi natrium tiosulfat dalam media maka terbentuk H₂S yang bereaksi dengan ion Fe²⁺ membentuk FeS (endapan hitam). Bakteri yang dapat melakukan deaminasi lisin menghasilkan asam amino kaproat akan membentuk warna merah coklat sedangkan bakteri yang dapat melakukan dekarboksilasi lisin menghasilkan *cadaverin* (pentametilene diamine) yang bersifat basa, adanya indikator *Bromo Cresol Purple* pH 5,2-6,8 akan terbentuk warna ungu pada media (Harti 2015). Hasil positif *Pseudomonas aeruginosa* adalah K/KS⁻. Bagian lereng berwarna ungu ditulis K, bagian dasar berwarna ungu ditulis K dan sulfida negatif ditandai dengan tidak terbentuknya endapan ditulis S⁻.

11.3.3. Media Sulfida Indol Motility (SIM). Biakan bakteri diinokulasikan pada media SIM dengan cara ditusuk kemudian diinkubasi pada suhu 37°C

selama 24 jam. Tujuan identifikasi dengan media SIM untuk mengetahui terbentuknya sulfida, indol dan motilitas. Sulfida ditunjukkan dengan adanya warna hitam. Pengujian indol dengan penambahan 5 tetes reagen Erlich A dan 5 tetes Erlich B yang mengandung indikator paradimetilaminobenzaldehid akan terbentuk cincin merah, dan motilitas ditunjukkan dengan pertumbuhan koloni yang merata di media (Harti 2015). Hasil positif *Pseudomonas aeruginosa* adalah sulfida (-) yaitu tidak ada endapan hitam, indol (+) yaitu terbentuknya cincin merah, dan motilitas (+) yaitu terbentuk pertumbuhan koloni pada bekas tusukan.

11.3.4. Media Sitrat. Biakan bakteri diinokulasikan pada media sitrat dengan cara ditusuk dan digores kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Tujuan identifikasi dengan media sitrat untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan natrium sitrat sebagai sumber karbon tunggal, maka akan terbentuk NaHCO₃ dan NH₃ yang bersifat basa. Dalam media sitrat mengandung indikator *Bromo Thymol Blue* dengan pH 6,0-7,6 sehingga dalam suasana basa media akan berubah yang semula warna hijau menjadi biru (Harti 2015). Hasil positif *Pseudomonas aeruginosa* adalah (+) yaitu media berwarna biru.

12. Pengujian aktivitas antibakteri

12.1. Metode difusi. Pengujian antibakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta. Metode difusi dilakukan dengan kapas lidi steril dicelupkan ke dalam suspensi yang telah dibuat kemudian ditiriskan dan diinokulasi secara perataan pada plat *Muller Hinton Agar* (MHA), didiamkan selama 10 menit agar biakan dapat berdifusi ke dalam media. Ekstrak dan fraksi dilarutkan dengan pelarut DMSO 5% dan dibuat konsentrasi 20%, 30% dan 40%. Konsentrasi 20% dibuat dengan cara ditimbang 40 mg ekstrak atau fraksi, kemudian dilarutkan dengan DMSO 5% sampai 2 ml. Konsentrasi 30% dibuat dengan cara ditimbang 60 mg ekstrak atau fraksi kemudian dilarutkan dengan DMSO 5% sampai 2 ml. Konsentrasi 40% dibuat dengan cara ditimbang 80 mg ekstrak atau fraksi kemudian dilarutkan dengan DMSO 5% sampai 2 ml. Selanjutnya, cakram direndam dalam larutan DMSO 5%, sebagai kontrol negatif dan larutan uji yaitu ekstrak dan ketiga fraksi. Ciprofloksasin digunakan sebagai kontrol positif. Media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan diamati.

Aktivitas antibakteri dibuktikan dengan terbentuknya zona hambat dan dilakukan pengukuran diameter zona hambat di sekitar cakram.

12.2. Metode dilusi. Metode dilusi digunakan untuk mengetahui KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) dan KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum) dari ekstrak dan fraksi daun petai cina teraktif. Metode dilusi menggunakan 12 tabung steril. Konsentrasi larutan stok yang dibuat adalah 40% yang diencerkan dengan pelarut DMSO 5% kemudian dibuat seri pengenceran. Konsentrasi seri pengenceran yaitu 40%; 20%; 10%; 5%; 2,5%; 1,25%; 0,625%; 0,3125%; 0,15625% dan 0,078%. Tabung kontrol negatif hanya berisi ekstrak atau fraksi teraktif dan kontrol positif adalah bakteri tanpa ekstrak atau fraksi. Sebanyak 1 ml media BHI dimasukkan ke tiap tabung kecuali tabung kontrol (-), kontrol (+) dan tabung 1. Sebanyak 2 ml larutan stok yang akan diuji dimasukkan ke dalam tabung kontrol (-), kemudian sebanyak 1 ml larutan stok dimasukkan ke dalam tabung 1 dan 2. Dari tabung 2 dipipet 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung 3 kemudian dari tabung 3 dipipet 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung 4 begitu seterusnya sampai tabung 10 kemudian dibuang. Masing-masing tabung ditambah 1 ml biakan bakteri. Seluruh tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, lalu diamati kekeruhannya sehingga didapat nilai KHM. Nilai KBM ditentukan dengan cara tabung media yang jernih diinokulasikan secara goresan pada media PSA (*Pseudomonas Selective Agar*) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. KBM ditunjukkan oleh konsentrasi terendah pada media selektif PSA yang tidak menunjukkan koloni bakteri yang tumbuh.

13. Identifikasi senyawa fraksi teraktif menggunakan KLT

Identifikasi secara KLT dilakukan untuk mengetahui isi kandungan senyawa kimia yang terdapat pada ekstrak dan fraksi teraktif daun petai cina. Campuran yang akan dipisahkan berupa larutan, ditotolkan pada pelat berupa bercak. Setelah pelat ditotolkan, ditaruh dalam bejana tertutup rapat dengan fase gerak. Pemisahan yang terjadi diidentifikasi di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm ditandai dengan ada atau tidaknya fluoresensi. Fase diam yang digunakan adalah silika gel GF₂₅₄, sedangkan fase gerak dan penampak noda yang digunakan sebagai berikut:

13.1. Identifikasi flavonoid. Fase gerak yang digunakan n-butanol : asam asetat : air (4:1:5) dengan pereaksi semprot sitroborat. Bila dengan UV 254 memberikan peredaman, UV 366 berfluoresensi biru, kuning atau ungu gelap (Depkes RI 1987).

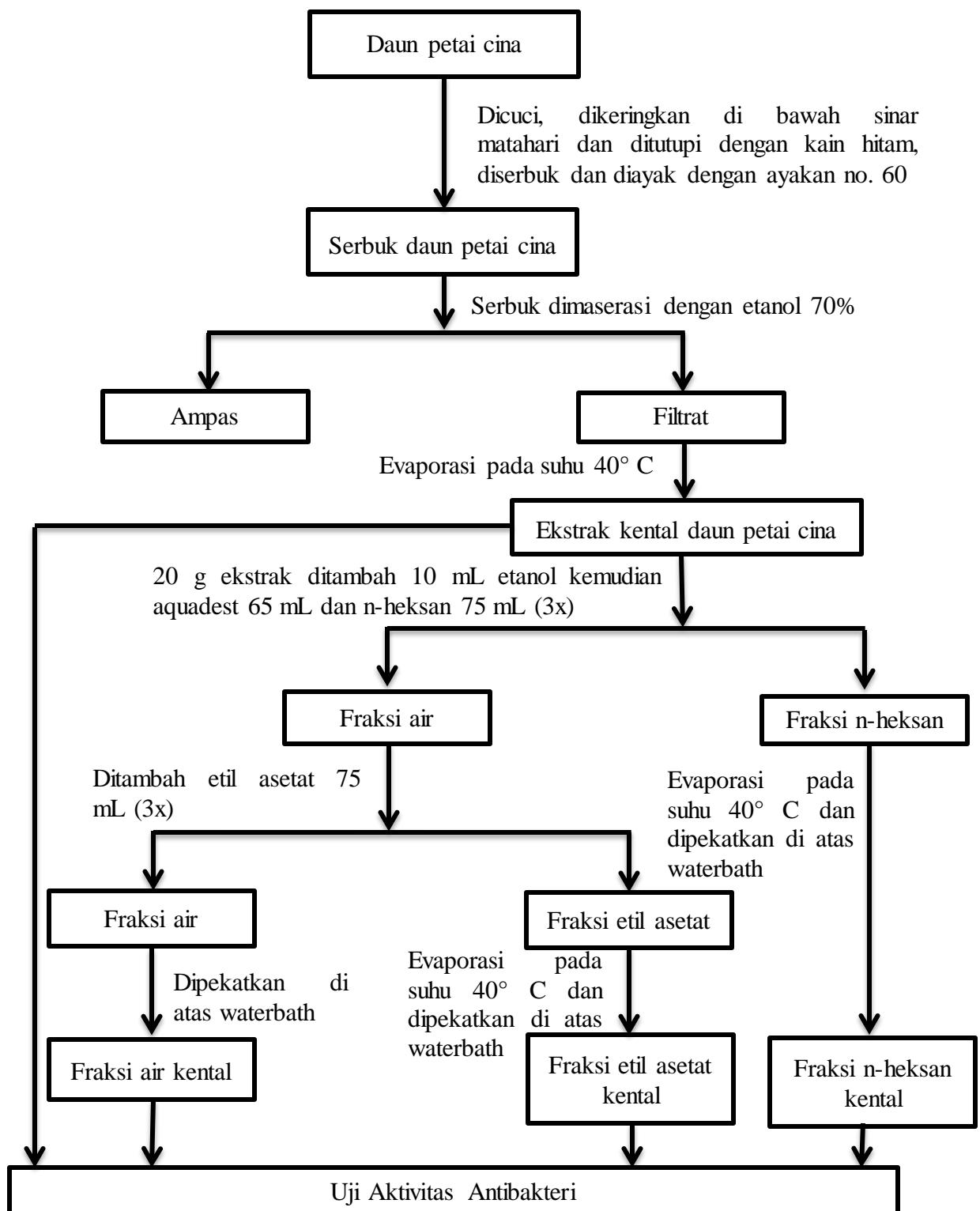
13.2. Identifikasi alkaloid. Fase gerak yang digunakan kloroform : metanol (15:1) dengan pereaksi semprot Dragendorff. Jika timbul warna coklat atau jingga setelah penyemprotan menunjukkan adanya alkaloid. Bila tanpa pereaksi kimia, alkaloid akan berfluoresensi biru, biru-hijau atau ungu di bawah sinar UV 254 nm (Khan *et al.* 2013).

13.3. Identifikasi tanin. Fase gerak yang digunakan toluena : etil asetat : asam format : metanol (3:3:0,8:0,2) dengan pereaksi semprot FeCl_3 . Jika timbul warna biru atau hijau kehitaman setelah penyemprotan menunjukkan adanya tanin. Di bawah sinar UV 254 nm berwarna hijau gelap sedangkan pada UV 366 nm berwarna ungu kemerahuan (Meena *et al.* 2016).

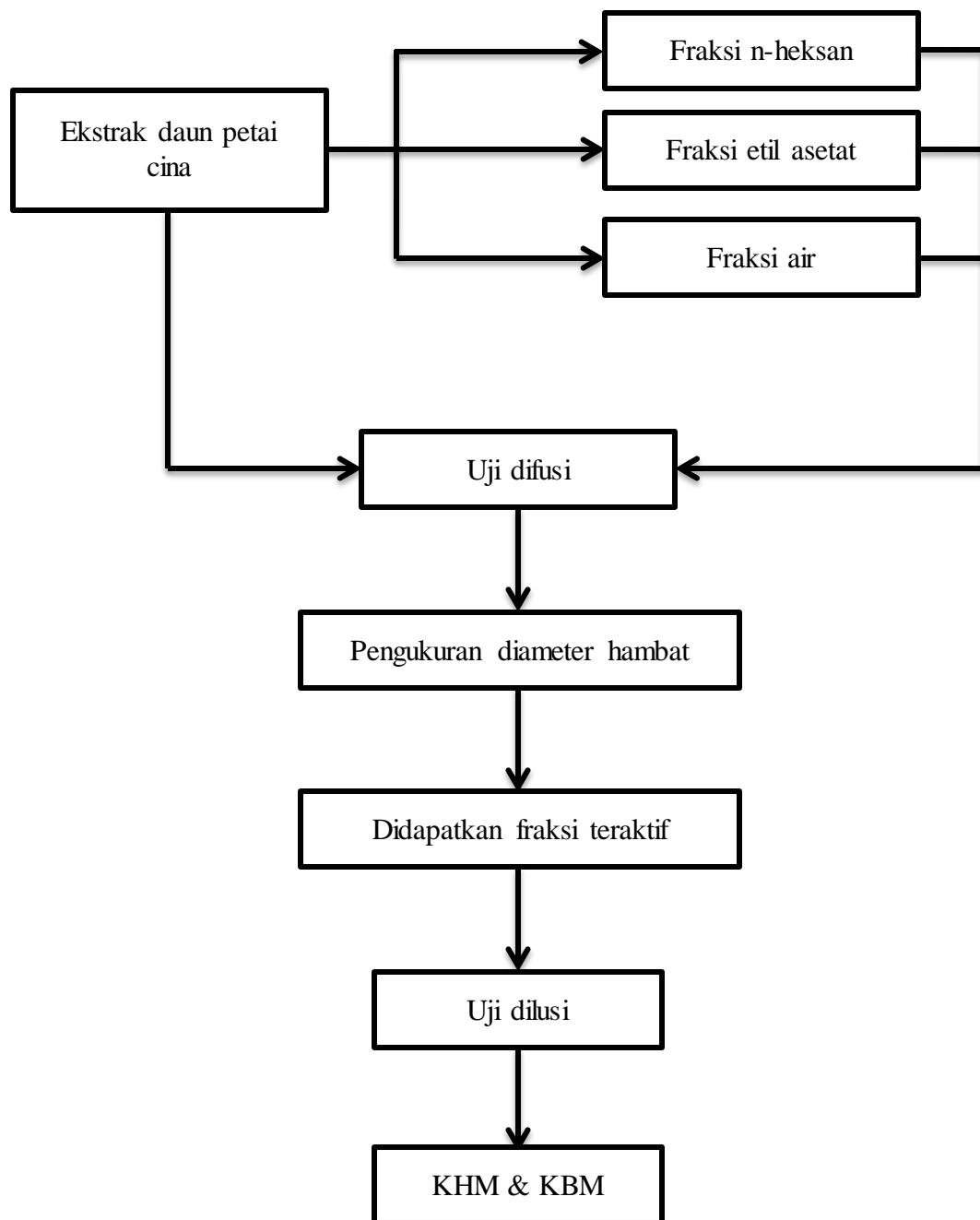
13.4. Identifikasi triterpenoid. Fase gerak yang digunakan kloroform:metanol (10:1) dengan pereaksi semprot anisaldehid asam sulfat. Terpenoid ditunjukkan dengan warna bercak yang berubah menjadi ungu, biru, merah, abu-abu atau hijau setelah disemprot anisaldehid asam sulfat (Harborne 1987; Irianti *et al.* 2011).

E. Analisis Hasil

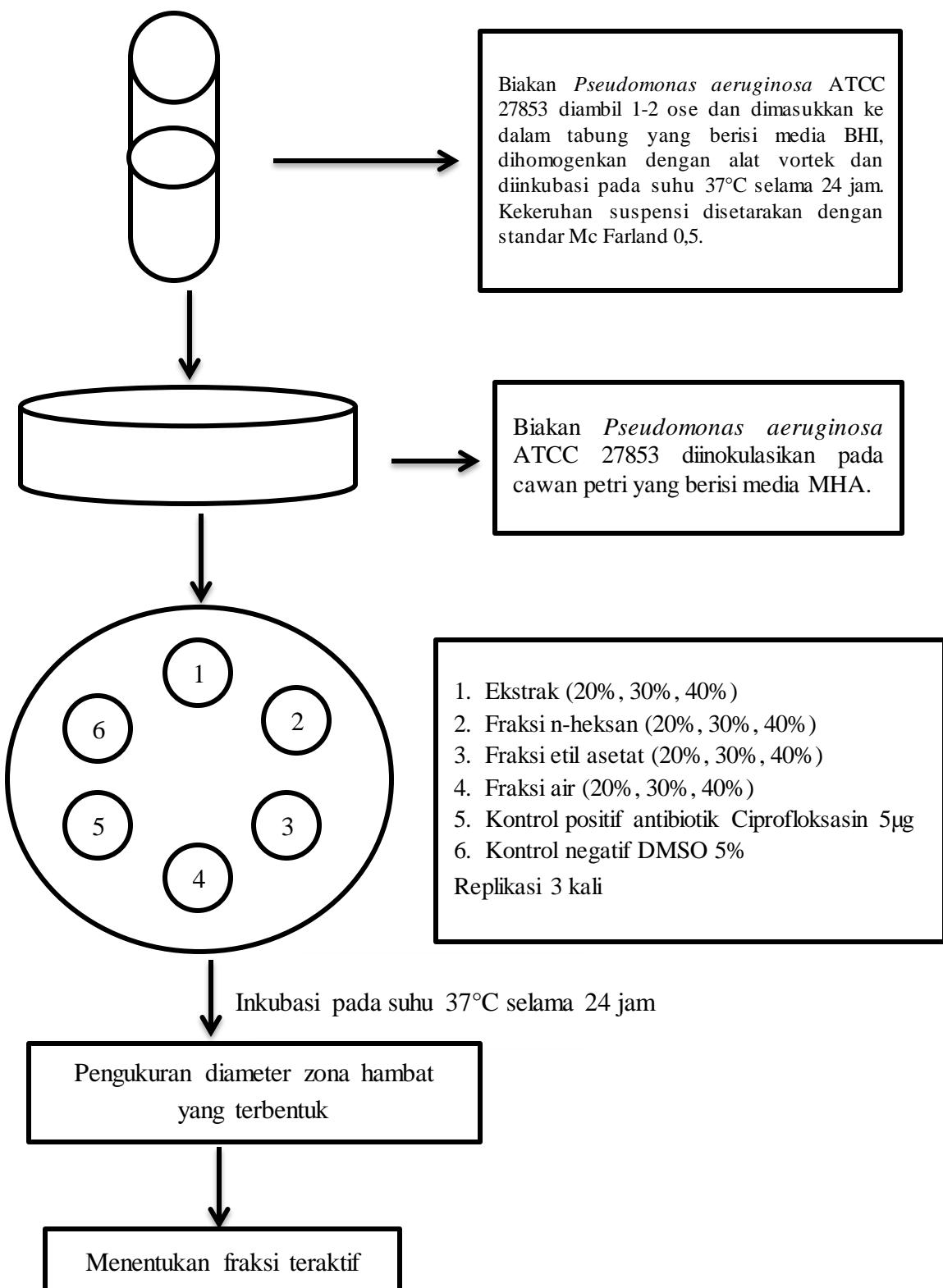
Analisis hasil dilakukan menggunakan uji statistik *Two Way ANOVA* (*Analisis of Varian*) dengan menggunakan software SPSS 17 terhadap ekstrak dan fraksi daun petai cina.



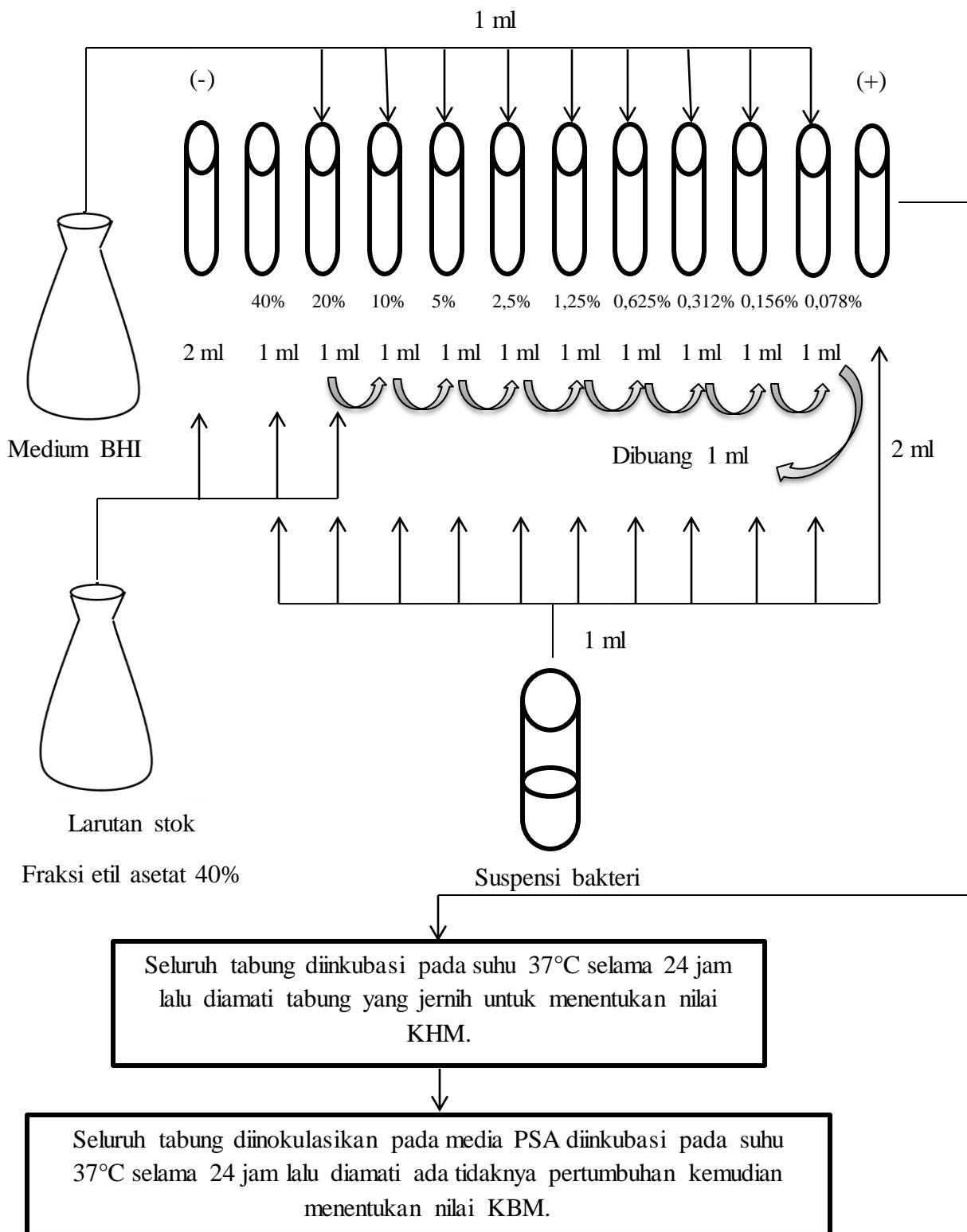
Gambar 1. Skema pembuatan ekstrak etanol dan fraksinasi daun petai cina.



Gambar 2. Skema uji aktivitas antibakteri.



Gambar 3. Skema pengujian aktivitas daun petai cina terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 secara difusi.



Gambar 4. Skema pengujian aktivitas daun petai cina terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 secara dilusi.

