

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Penyiapan Bahan Tanaman

1. Determinasi tanaman petai cina (*Leucaena leucocephala* (Lam) De Wit.)

Tujuan dilakukan determinasi tanaman adalah untuk menetapkan kebenaran tanaman yang berkaitan dengan ciri-ciri morfologi tanaman petai cina terhadap kepustakaan dan dibuktikan di Laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta.

Berdasarkan hasil determinasi dapat dipastikan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman daun petai cina (*Leucaena leucocephala* (Lam) De Wit.). Hasil determinasi dapat dilihat pada Lampiran 1.

2. Pengambilan bahan dan pembuatan serbuk

Daun petai cina yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Desa Grogolan, Kecamatan Karanggede, Boyolali, Jawa Tengah pada bulan Januari 2019. Daun petai cina yang masih segar dan bewarna hijau disortir dan dicuci dengan air mengalir hingga bersih kemudian ditiriskan. Daun petai cina dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50°C. Pengeringan ini bertujuan untuk mengurangi kandungan air pada tanaman dan menghentikan reaksi enzimatik yang dapat terjadi pada tanaman, selain itu kadar air yang terlalu tinggi dapat menjadi media sebagai pertumbuhan mikroorganisme yang dapat menyebabkan pembusukan pada tanaman. Perhitungan rendemen bobot kering terhadap bobot basah daun petai cina dapat dilihat pada Tabel 1 dan Lampiran 8.

Tabel 1. Rendemen pengeringan daun petai cina

Bobot basah (kg)	Bobot kering (kg)	Rendemen (%)
6,87	2,20	32,02

Daun petai cina yang sudah kering, diserbuk menggunakan blender untuk memperluas permukaan partikel yang kontak dengan pelarut penyari. Serbuk daun

petai cina kemudian diayak dengan pengayak nomor 40, agar mendapat hasil serbuk yang ukurannya seragam.

3. Pembuatan ekstrak etanol daun petai cina

Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu metode maserasi. Metode maserasi merupakan metode penyarian sederhana serta cepat dilakukan. Metode ini bertujuan untuk penyarian yang mengandung zat aktif yang larut dalam larutan penyari, menghindari kerusakan zat aktif akibat pemanasan. Pelarut etanol dipilih karena memiliki nilai toksisitas yang lebih rendah jika dibandingkan pelarut organik lainnya dan tahan lama serta mudah diperoleh kembali (mudah menguap) dibandingkan pelarut non organik (Puspawati *et al.* 2013). Rendemen ekstrak dapat dilihat pada Tabel 2 dan Lampiran 8.

Tabel 2. Rendemen ekstrak daun petai cina

Berat serbuk kering (g)	Berat ekstrak (g)	Rendemen (%)
800	148,69	18,59

4. Penetapan susut pengeringan serbuk daun petai cina

Penetapan susut pengeringan serbuk daun petai cina dilakukan dengan alat *moisture balance* yang bertujuan untuk memberikan batasan maksimal besarnya senyawa yang hilang pada proses pengeringan. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun petai cina dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun petai cina

Bobot awal (g)	Susut pengeringan (%)
20,0	7,80
20,0	8,00
20,0	8,30
Rata-rata \pm SD	8,03 \pm 0,25

Penetapan susut pengeringan berhubungan dengan senyawa volatil dan air yang hilang. Penetapan susut pengeringan menggunakan alat *moisture balance* diatur secara otomatis pada suhu 105°C, ditunggu sampai alat berbunyi yang berarti bobot serbuk sudah konstan. Hasil rata-rata penetapan susut pengeringan serbuk daun petai cina yang didapat yaitu 8,03%.

5. Penetapan kadar air serbuk dan ekstrak daun petai cina

Penetapan kadar air serbuk dan ekstrak daun petai cina menggunakan cara destilasi dengan alat *Sterling-Bidwell*. Cairan pembawa yang digunakan adalah toluen karena toluen memiliki titik didih tinggi dan berat jenis lebih rendah dari pada air dan tidak bercampur dengan air sehingga memudahkan dalam penetapan kadar air. Kandungan air pada suatu bahan yang terlalu tinggi dapat membuat bahan tidak tahan terhadap penyimpanan dalam jangka waktu yang lama karena memungkinkan kerusakan bahan akibat jamur. Kadar air memenuhi syarat jika tidak lebih dari 10%. Hasil kadar air serbuk dan ekstrak daun petai cina dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil penetapan kadar air serbuk dan ekstrak daun petai cina

Bahan	Kadar air (%)
Serbuk daun petai cina	$7,33 \pm 1,53$
Ekstrak daun petai cina	$10,7 \pm 1,15$

Hasil penetapan kadar air rata-rata serbuk daun petai cina yaitu 7,33% dan kadar air ekstrak daun petai cina yaitu 10,7%. Kadar air serbuk memenuhi persyaratan sedangkan kadar air ekstrak tidak memenuhi persyaratan karena lebih dari 10%. Perhitungan penetapan kadar air serbuk dan ekstrak daun petai cina dapat dilihat pada Lampiran 8.

6. Penetapan bobot jenis ekstrak daun petai cina

Penentuan bobot jenis ekstrak daun petai cina dilakukan dengan menggunakan alat piknometer. Ekstrak yang digunakan adalah ekstrak yang telah diencerkan, yaitu 1% menggunakan etanol 70% sebagai pelarut. Penentuan bobot jenis ini bertujuan untuk memberikan gambaran kandungan kimia yang terlarut pada suatu ekstrak berdasarkan bobot jenisnya.

Tabel 5. Penetapan bobot jenis ekstrak 1%

No.	Bobot jenis	Rata-rata
1	0,8456	$0,8456 \pm 0,000$
2	0,8456	
3	0,8455	

Hasil penetapan bobot jenis rata-rata ekstrak daun petai cina yaitu 0,8456. Perhitungan penetapan bobot jenis ekstrak daun petai cina dapat dilihat pada Lampiran 8.

7. Identifikasi kandungan senyawa kimia serbuk dan ekstrak daun petai cina

Serbuk dan ekstrak etanol daun petai cina yang diperoleh diidentifikasi kandungan kimia yang terkandung di dalamnya. Uji kualitatif menggunakan reaksi kimia untuk mengetahui kandungan flavonoid, alkaloid, saponin, tanin, dan steroid/triterpenoid. Hasil identifikasi kandungan kimia daun petai cina dapat dilihat pada pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia serbuk dan ekstrak daun petai cina

Senyawa	Prosedur	Hasil			Ket	
		Serbuk	Ekstrak	Pustaka (Depkes 1993)	Serbuk	Ekstrak
Flavonoid	Pereaksi Shianidin	Kuning pada lapisan amil alkohol	Jingga pada lapisan amil alkohol	Merah jingga atau kuning jingga pada lapisan amil alkohol	(+)	(+)
Alkaloid	Pereaksi Wagner	Endapan coklat	Endapan coklat	Terbentuk endapan coklat	(+)	(+)
	Pereaksi Dragendorff	Endapan jingga	Endapan jingga	Terbentuk endapan jingga	(+)	(+)
Saponin		Terbentuk buih 4 cm	Terbentuk buih 4,2 cm	Adanya buih yang stabil 1-10 cm	(+)	(+)
Tanin	Pereaksi FeCl ₃	Warna hijau kehitaman	Warna hijau kehitaman	Warna larutan akan berubah menjadi biru atau hijau kehitaman	(+)	(+)
Triterpenoid/steroid	Pereaksi Lieberman-Bouchard	Warna hijau	Warna merah keunguan	Terbentuk warna hijau dan warna merah keunguan	(+)	(+)

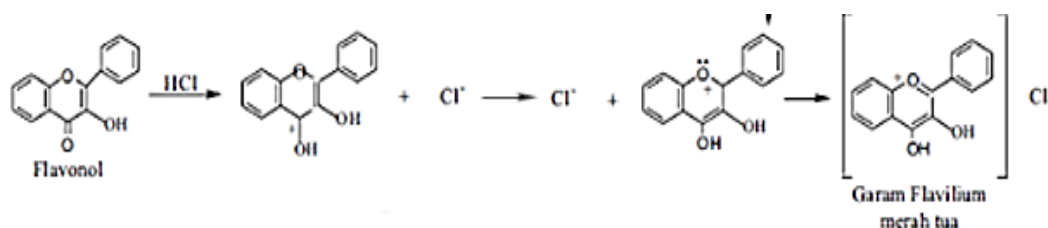
Keterangan :

(+) : positif mengandung senyawa

(-) : negatif mengandung senyawa

Berdasarkan hasil identifikasi kualitatif terhadap serbuk dan ekstrak daun petai cina pada Tabel 6, dapat diketahui bahwa ekstrak daun petai cina positif mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, saponin, tanin dan triterpenoid. Berdasarkan penelitian terdahulu menyatakan bahwa ekstrak daun petai cina mengandung alkaloid, saponin, flavonoid, tanin dan steroid (Suparno *et al.* 2018). Gambar hasil identifikasi senyawa kimia ekstrak daun petai cina secara kualitatif dapat dilihat pada Lampiran 3.

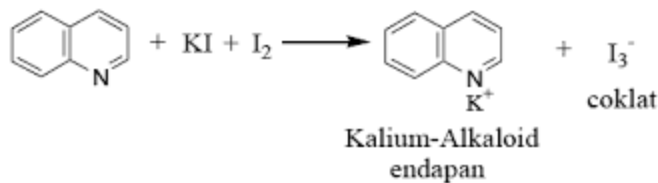
Uji flavonoid dengan menggunakan serbuk magnesium dan HCL pekat yang berfungsi untuk menghidrolisis flavonoid menjadi aglikonnya. Reaksi yang dapat terjadi antara logam Mg dan HCl pekat pada pengujian flavonoid adalah reduksi inti bensopiron yang terdapat pada struktur flavonoid sehingga terjadi perubahan warna menjadi berwarna merah tua karena adanya endapan garam favillium karena terjadi reduksi dengan magnesium dan asamklorida dengan gugus OH (Ritna *et al.* 2016; Ayu *et al.* 2018). Hasil positif flavonoid terbentuk warna kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Robinson 1995). Serbuk dan ekstrak daun petai cina positif mengandung flavonoid, hal ini ditunjukkan dengan adanya warna jingga pada lapisan amil alkohol pada serbuk dan warna kuning pada lapisan amil alkohol ekstrak daun petai cina.



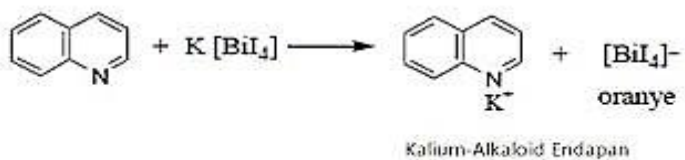
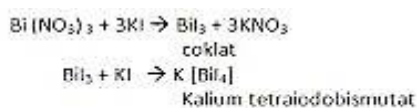
Gambar 1. Reaksi flavonoid dengan pereaksi shianidin.

Pengujian alkaloid pada serbuk dan ekstrak daun petai cina menggunakan reagen Wagner dan Dragendorff. Prinsip dari metode ini adalah reaksi pengendapan yang terjadi karena adanya penggantian ligan. Atom nitrogen yang mempunyai pasangan elektron bebas pada alkaloid dapat mengganti ion iodo dalam berbagai pereaksi. Pereaksi Wagner mengandung iodo dan kalium iodida akan membentuk endapan coklat. Sedangkan pereaksi Dragendorff mengandung bismut nitrat dan kalium iodida dalam larutan asam asetat glasial [kalium tetraiodobirmutat (III)] akan membentuk endapan berwarna jingga (Sangi *et al.*

2008). Serbuk dan ekstrak daun petai cina positif mengandung alkaloid karena membentuk endapan warna dengan seluruh pereaksi yang digunakan.



(a)



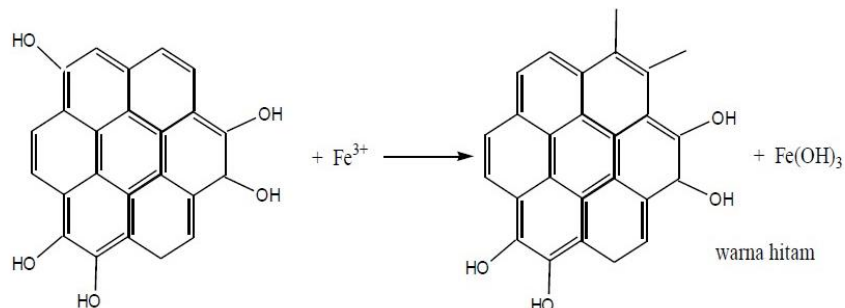
(b)

Gambar 2. Reaksi alkaloid dengan (a). Pereaksi Wagner dan (b). Pereaksi Dragendorff.

Pengujian saponin dilakukan dengan uji buih. Saponin memiliki glikosil yang berfungsi sebagai gugus polar dan gugus steroid dan triterpenoid sebagai gugus nonpolar. Senyawa yang memiliki gugus polar dan nonpolar bersifat aktif permukaan sehingga saat dikocok dengan air, saponin dapat membentuk misel. Pada struktur misel gugus polar menghadap keluar karena mengikat air (hidrofil) sedangkan gugus nonpolar menghadap ke dalam karena takut dengan air (hidrofob). Keadaan inilah yang tampak seperti buih, karena itu dalam analisis ini dilihat kemampuan sampel dalam membentuk buih/busa (Sangi *et al.* 2008). Serbuk dan ekstrak daun petai cina positif mengandung saponin karena membentuk buih dan buih tidak hilang setelah penambahan HCl.

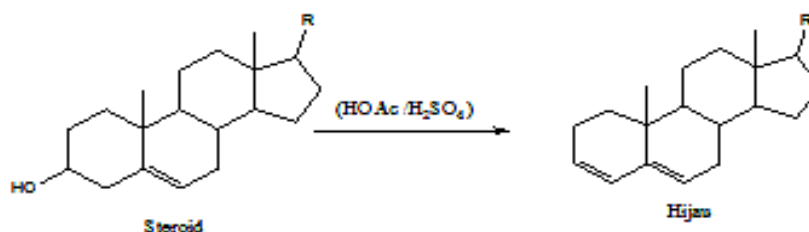
Tanin dibagi menjadi dua golongan dan memberikan reaksi warna yang berbeda terhadap FeCl_3 . Tanin terhidrolisis akan menghasilkan warna biru kehitaman dan tanin terkondensasi akan menghasilkan warna hijau kehitaman. FeCl_3 akan bereaksi dengan salah satu gugus hidroksil yang ada pada senyawa tanin. Hasil reaksi itulah yang akhirnya menimbulkan warna (A'yun *et al.* 2015).

Hasil uji serbuk dan ekstrak daun petai cina menghasilkan warna hijau kehitaman yang menunjukkan positif mengandung tanin terkondensasi (tanin katekol).



Gambar 3. Reaksi tanin dengan FeCl_3 .

Pengujian ini menggunakan reagen Lieberman Bouchardat. Analisis ini didasarkan pada kemampuan senyawa triterpenoid membentuk warna H_2SO_4 pekat dalam pelarut anhidrida asam asetat. Hasil positif triterpenoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah keunguan dan warna hijau untuk steroid (Sangi *et al.* 2008). Pada serbuk daun petai cina didapatkan hasil berwarna hijau menandakan jika serbuk mengandung steroid, sedangkan pada ekstrak daun petai cina membentuk cincin merah keunguan yang menunjukkan ekstrak mengandung triterpenoid.



Gambar 4. Reaksi triterpen dengan Lieberman Burchard.

8. Fraksinasi dari ekstrak etanol daun petai cina

Fraksinasi adalah cara untuk memisahkan golongan utama kandungan yang satu dari golongan utama yang lain berdasarkan kepolarannya. Jumlah dan jenis senyawanya yang telah dipisahkan akan menjadi fraksi yang berbeda. Senyawa nonpolar akan terekstraksi dalam pelarut n-heksan, senyawa semipolar akan terekstraksi dalam pelarut etil asetat dan senyawa polar akan terekstraksi dalam

pelarut air. Rendemen fraksi n-heksan, etil asetat, dan air dapat dilihat pada Tabel 7 dibawah ini.

Tabel 7. Rendemen fraksi n-heksan, etil asetat dan air dari ekstrak etanol 70% daun petai cina

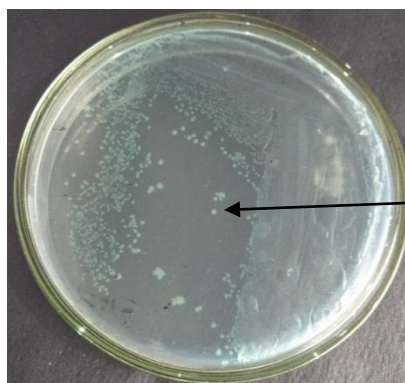
Bobot ekstrak (g)	Fraksi	Bobot fraksi (g)	Rendemen (%)
60,0	<i>n</i> -heksan	10,652	17,75
60,0	Etil asetat	5,075	8,46
60,0	Air	36,499	60,83

Berdasarkan Tabel 7 hasil fraksinasi dari fraksi n-heksan diperoleh rendemen sebesar 17,75%. Rendemen fraksi etil asetat diperoleh sebesar 8,46% dan rendemen fraksi air diperoleh sebesar 60,83%. Perhitungan rendemen fraksi dari ekstrak daun petai cina dapat dilihat pada Lampiran 8.

B. Identifikasi Bakteri

1. Identifikasi morfologi pada media *Pseudomonas Selective Agar* (PSA)

Identifikasi bakteri uji *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dilakukan dengan cara biakan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 diinokulasikan secara gores pada media selektif *Pseudomonas Selective Agar* (PSA) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Penampakan koloni yang terbentuk yaitu bulat halus dengan membentuk pigmen berwarna kehijauan. Hasil pengujian ditunjukkan dengan penampakan koloni bulat halus dan terbentuk pigmen berwarna biru kehijauan. Hasil identifikasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 secara inokulasi pada media PSA dapat dilihat pada Gambar 6.

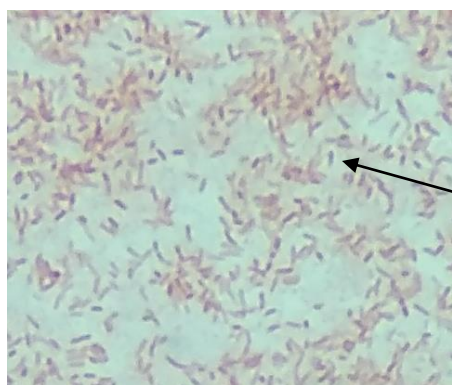


Koloni tunggal
berbentuk bulat
dengan pigmen
berwarna kehijauan.

Gambar 5. Hasil identifikasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 secara goresan pada media *Pseudomonas Selective Agar* (PSA).

2. Identifikasi bakteri secara pewarnaan Gram

Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 setelah dilakukan pewarnaan Gram, dilakukan pengamatan di bawah mikroskop. Hasil yang diperoleh bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 merupakan bakteri Gram negatif dengan warna merah dan berbentuk batang. Pewarnaan Gram tergantung pada kemampuan bakteri tertentu untuk mempertahankan kompleks kristal violet dan iodium setelah dicuci singkat dengan aseton. Bakteri Gram negatif tidak mempertahankan kompleks kristal violet dan iodium sehingga warna ungu hilang setelah dicuci dengan aseton kemudian safranin memberikan warna merah pada bakteri Gram negatif (Brooks *et al.* 2013). Hasil identifikasi pewarnaan Gram bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dapat dilihat pada Gambar 11.



Bakteri Gram negatif berwarna merah dan berbentuk batang.

Gambar 6. Hasil identifikasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 secara pewarnaan Gram.

3. Identifikasi bakteri dengan uji biokimia

Hasil identifikasi dengan uji biokimia pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dapat dilihat pada Tabel 8 dan Lampiran 4.

Tabel 8. Hasil identifikasi *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dengan uji biokimia

Pengujian	Hasil	Interpretasi	Pustaka
KIA	Merah/merah, tidak ada endapan hitam	K/K S-	K/K S-
LIA	Ungu/ungu, tidak ada endapan hitam	K/K S-	K/K S-
SIM	Tidak ada endapan, tidak terbentuk indol, terdapat motilitas	(- - +)	(- - +)
Sitrat	Biru	(+)	(+)

Keterangan :

KIA : *Kligler's Iron Agar*

LIA : *Lysin Iron Agar*

SIM : *Sulfida Indol Motility*

Pengujian *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 pada media KIA menunjukkan hasil K/K S- yaitu bagian lereng dan dasar media berwarna merah karena *Pseudomonas aeruginosa* tidak dapat memfermentasi laktosa pada bagian lereng dan glukosa pada bagian dasar media sehingga tidak terbentuk asam yang ditandai dengan perubahan warna media menjadi kuning karena adanya indikator *Phenol Red* pH $7,4 \pm 0,2$ (Brooks *et al.* 2010). Sulfida negatif dengan tidak adanya warna hitam pada media yang dikarenakan bakteri tidak mereduksi natrium tiosulfat sehingga tidak terbentuk hidrogen sulfida yang akan bereaksi dengan ferro sulfat membentuk endapan hitam (Harti 2015).

Pengujian *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 pada media LIA menunjukkan hasil K/K S- yaitu bagian lereng dan dasar media berwarna ungu karena bakteri ini dapat melakukan dekarboksilasi lisin menghasilkan *cadaverin* (pentamethylene diamine) yang bersifat basa, adanya indikator *Bromo Cresol Purple* pH $6,7 \pm 0,2$ menyebabkan warna ungu pada media. Sulfida negatif karena bakteri tidak mereduksi natrium tiosulfat sehingga tidak terbentuk hidrogen sulfida yang akan bereaksi dengan logam besi pada ferri amonium sitrat membentuk endapan hitam (Harti 2015).

Pengujian pada media SIM menunjukkan hasil (- - +) yaitu *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 tidak dapat mereduksi thiosulfat sehingga tidak menghasilkan hidrogen sulfida yang akan bereaksi dengan logam besi membentuk ferro sulfat (endapan hitam). Indol negatif karena *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 tidak menghasilkan enzim tryphanase yang memecah tryptophan menjadi indol dan asam piruvat yang akan bereaksi dengan reagen erlich membentuk cincin merah. Motilitas positif yang berarti ada pergerakan bakteri di permukaan dan bekas tusukan pada media (Harti 2015).

Pengujian pada media sitrat menunjukkan hasil positif yaitu warna media yang berubah dari hijau menjadi biru karena *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 menggunakan natrium sitrat sebagai sumber karbon tunggal maka akan terbentuk NaHCO_3 dan NH_3 yang bersifat basa, adanya indikator *Bromo Thymol Blue* pH $7,0 \pm 0,2$ menyebabkan media berubah menjadi biru (Harti 2015).

C. Uji Aktivitas Antibakteri

1. Pengujian aktivitas antibakteri secara difusi

Tujuan uji difusi adalah untuk mengetahui daya hambat ekstrak dan fraksi daun petai cina terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Hasil dari pengujian aktivitas antibakteri secara difusi dari ekstrak etanol 70%, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air dari daun petai cina untuk mengetahui fraksi teraktif.

Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi dari daun petai cina terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 dengan konsentrasi larutan masing-masing 40%, 30% dan 20%. Pembanding yang digunakan adalah ciprofloksasin 5 µg sebagai kontrol positif dan DMSO 5% sebagai kontrol negatif. Pembuatan suspensi bakteri disesuaikan dengan larutan standar *Mc Farland* 0,5. Masa inkubasi pengujian selama 24 jam pada suhu 37°C, zona hambat yang terbentuk diukur dalam satuan mm. Daerah yang tidak ditumbuhi bakteri disekitar cakram (*disk*) menandakan bahwa kandungan kimia yang terkandung pada ekstrak dan fraksi dari daun petai cina memiliki daya hambat terhadap bakteri uji.

Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi dari daun petai cina dengan menggunakan pelarut DMSO 5% terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 menunjukkan adanya daya hambat, hal ini dibuktikan dengan adanya daerah jernih di sekitar cakram yang tidak ditumbuhi bakteri. Hasil uji aktivitas antibakteri secara difusi dapat dilihat pada Tabel 9.

Tabel 9 merupakan hasil perhitungan zona hambat dari ekstrak dan fraksi daun petai cina terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Dari Tabel 9 dapat dilihat bahwa diameter hambat yang paling besar adalah fraksi etil asetat pada konsentrasi 40% dengan rata-rata diameter sebesar 13,47 mm, sedangkan diameter hambat yang terkecil adalah fraksi air pada konsentrasi 20% dengan rata-rata diameter sebesar 6,60 mm. Dari data tersebut menunjukkan jika semakin besar konsentrasi fraksi maka zona hambat yang terbentuk juga semakin besar, sehingga kemampuan aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa*

ATCC 27853 semakin baik. Gambar hasil pengujian aktivitas antibakteri secara difusi dapat dilihat pada Lampiran 5.

Tabel 9. Hasil pengujian aktivitas antibakteri secara difusi

Sediaan uji	Konsentrasi (% b/v)	Diameter zona hambat (mm)			
		Replikasi			Rata-rata \pm SD
		I	II	III	
Ekstrak	40	11,75	11,80	9,75	11,10 \pm 1,17
	30	9,25	9,25	9,15	9,22 \pm 0,06
	20	8,80	8,55	8,60	8,65 \pm 0,13
n-heksan	40	9,85	9,35	9,7	9,63 \pm 0,26
	30	8,55	8,45	8,3	8,43 \pm 0,13
	20	8,25	8,40	8,35	8,33 \pm 0,08
Etil asetat	40	12,35	13,95	14,10	13,47 \pm 0,97
	30	12,15	10,45	12,55	11,72 \pm 1,12
	20	11,65	11,55	9,30	10,83 \pm 1,33
Air	40	7,50	7,40	7,40	7,43 \pm 0,06
	30	7,15	7,21	7,10	7,15 \pm 0,06
	20	6,90	6,50	6,40	6,60 \pm 0,26
Ciprofloksasin	5 μ g	22,90	22,60	22,80	22,77 \pm 0,15
DMSO	5%	0,00	0,00	0,00	0,00 \pm 0,00

Hasil diameter hambat yang diperoleh pada fraksi etil asetat pada konsentrasi 40% dengan diameter rata-rata sebesar 13,47 mm termasuk dalam kategori kuat. Berdasarkan zona hambat, kekuatan antibakteri dibagi menjadi 4 kelompok yaitu bila zona hambat >20 mm berarti sangat kuat, zona hambat berukuran 10-20 mm termasuk kuat, untuk kategori sedang berukuran 5-10 mm dan yang lemah zona hambat <5 mm (Kumesan *et al.* 2013).

Kontrol negatif berfungsi untuk mengetahui apakah pelarut memiliki potensi menghambat atau membunuh bakteri. Kontrol negatif yang digunakan adalah DMSO 5% yang tidak memiliki sifat antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 karena tidak terbentuk zona hambat disekitar cakram. Ciprofloksasin digunakan sebagai kontrol positif, dipilih untuk pengujian daya antibakteri karena merupakan salah satu terapi antibiotik yang digunakan untuk

infeksi *Pseudomonas aeruginosa*. Target utama dari mekanisme kerja ciprofloksasin yaitu menghambat kerja DNA girase bakteri.

Analisa data dari hasil pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi secara statistik Analisis of Varian (ANOVA) *two way*. ANOVA *two way* digunakan untuk membandingkan sampel tiap konsentrasi. Data yang dianalisis yaitu ekstrak etanol, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air dari daun petai cina. Kontrol positif dan kontrol negatif diikuti sertakan dalam analisis ANOVA *two way*. Data yang dihasilkan digunakan untuk membandingkan hubungan antara ekstrak etanol, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, fraksi air, kontrol positif dan kontrol negatif untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan yang signifikan.

Hasil uji *Kolmogoros-Smirnov* diperoleh signifikan $0,143 > 0,05$ maka H_0 diterima, data tersebut terdistribusi normal sehingga dapat dilanjutkan uji ANOVA. Hasil uji *Levene's Test* tabel diameter hambat diperoleh $F = 9,043$ dengan probabilitas $0,000 < 0,05$ yang berarti dari tiap sampel uji terdapat perbedaan nyata dalam menghambat *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Tabel *Homogeneous Subsets* bertujuan untuk mencari kelompok mana saja yang memiliki perbedaan rata-rata yang tidak berbeda signifikan. Tabel *Homogeneous Subsets* terbagi dalam 5 subset, semakin kekanan semakin besar diameter hambatnya. Diameter hambat diketahui dari subset 1-5 mempunyai perbedaan yang signifikan dalam penghambatan aktivitas antibakteri. Sampel yang berada dalam satu subset tidak mempunyai perbedaan yang signifikan dalam menghambat aktivitas bakteri. Fraksi teraktif adalah etil asetat meskipun tidak dalam satu subset dengan kontrol positif. Tabel *Homogeneous Subsets* dapat dilihat pada Lampiran 12.

2. Pengujian aktivitas antibakteri secara dilusi

Pengujian aktivitas antibakteri dari fraksi teraktif dilakukan dengan metode dilusi untuk menentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Fraksi etil asetat sebagai fraksi teraktif dilakukan pengujian secara dilusi dengan dibuat konsentrasi 40%, 20%, 10%, 5%, 2,5%, 1,25%, 0,625%, 0,3125%, 0,156% dan 0,078%.

Keuntungan dan kerugian metode dilusi memungkinkan penentuan kualitatif dan kuantitatif dilakukan bersama-sama. KHM dapat membantu dalam penentuan tingkat resistensi dan dapat menjadi petunjuk penggunaan antimikroba. Kerugian metode ini tidak efisien karena pengerjaannya rumit, memerlukan banyak alat dan bahan serta memerlukan ketelitian dalam proses pengerjaannya termasuk persiapan konsentrasi antimikroba yang bervariasi (Sennang *et al.* 2010).

Aktivitas antibakteri dapat diketahui dari kekeruhan masing-masing tabung uji yang kemudian digoreskan dalam media *Pseudomonas Selective Agar* (PSA). Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dapat ditentukan dari konsentrasi terendah larutan uji yang terlihat jernih, akan tetapi hal ini sulit diamati karena larutan berwarna gelap dan kepekatan tinggi, sehingga KHM tidak dapat ditentukan. KBM ditentukan dengan menggores masing-masing tabung larutan uji pada media PSA, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil KBM dapat dilihat pada Tabel 10.

Tabel 10. Hasil KBM pengujian aktivitas antibakteri secara dilusi

Konsentrasi % b/v	Fraksi etil asetat		
	Replikasi		
	I	II	III
K (-)	-	-	-
40	-	-	-
20	-	-	-
10	+	+	+
5	+	+	+
2,5	+	+	+
1,25	+	+	+
0,625	+	+	+
0,3125	+	+	+
0,156	+	+	+
0,078	+	+	+
K (+)	+	+	+

Keterangan:

(-) : tidak ada pertumbuhan bakteri

(+) : ada pertumbuhan bakteri

K (-) : kontrol negatif berisi fraksi etil asetat

K (+) : kontrol positif berisi suspensi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Pengujian aktivitas antibakteri fraksi teraktif yaitu fraksi etil asetat dari ekstrak etanol daun petai cina terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 seperti pada Tabel 10 menunjukkan bahwa dari uji dilusi yang dilakukan didapat bahwa Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) sebesar 20%. KBM diketahui dengan cara menginokulasikan sediaan dari tabung uji secara gores pada media PSA dalam cawan petri. KBM ditentukan dengan tidak adanya pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 pada media PSA. Replikasi I, II dan III dari fraksi etil asetat daun petai cina dengan konsentrasi 40% dan 20% diperoleh hasil tidak terdapat pertumbuhan bakteri. Gambar hasil pengujian aktivitas antibakteri secara dilusi dapat dilihat pada Lampiran 6.

Daun petai cina dapat digunakan sebagai antibakteri karena mengandung metabolit sekunder seperti flavonoid, alkaloid, tanin dan triterpenoid. Penelitian sebelumnya menyatakan jika ekstrak etil asetat daun petai cina memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Mycobacterium tuberculosis* dengan nilai MIC sebesar 12,5 µg/ml (Satyadev 2015). Menurut Suryana *et al.* (2017) ekstrak etanol daun petai cina memiliki nilai KBM sebesar 250 µg/ml terhadap *Staphylococcus epidermidis*. Hasil penelitian menunjukkan jika KBM terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 yang merupakan bakteri Gram negatif jauh lebih besar dari penelitian sebelumnya yang menggunakan bakteri Gram positif yaitu *Staphylococcus epidermidis*. Hal ini terjadi karena struktur dinding sel yang berbeda. Struktur dinding sel bakteri Gram negatif lebih kompleks dibandingkan bakteri Gram positif. Bakteri Gram negatif memiliki 3 lapisan dinding sel yaitu lipopolisakarida, peptidoglikan dan membran plasma. Dinding sel bakteri Gram negatif mengandung lipopolisakarida yang tidak dimiliki oleh bakteri Gram positif yang bertanggung jawab atas aktivitas endotoksin spesifik. Lipopolisakarida yang terkandung pada membran luar ini juga menghalangi jalannya molekul yang lebih besar sehingga antibiotik dengan molekul besar sulit menembus dinding sel bakteri dan menyebabkan resistensi (Brooks 2013).

Faktor lain yang dapat mempengaruhi aktivitas antibakteri fraksi etil asetat daun petai cina yaitu saat pembuatan variasi konsentrasi pada uji dilusi. Tabung pada uji dilusi berisi 1 mL larutan fraksi dan 1 mL suspensi bakteri. Perbandingan

tersebut dapat mempengaruhi konsentrasi fraksi sehingga lebih encer daripada konsentrasi yang diinginkan. Menurut CLSI (2017) perbandingan larutan suspensi bakteri dan antimikroba untuk uji dilusi cair adalah 1:10. Selain itu warna media saat uji difusi menjadi hijau disebabkan adanya kemungkinan sisa gliserin yang terkandung pada alat yang tidak dicuci dengan bersih. Kandungan gliserin ini juga dapat menjadi faktor yang mempengaruhi aktivitas ekstrak dan fraksi dari daun petai cina terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

D. Identifikasi Senyawa Fraksi Teraktif menggunakan KLT

1. Identifikasi flavonoid

Hasil identifikasi flavonoid menggunakan fase diam silika gel GF254 dan fase gerak n-butanol:asam asetat:air (4:1:5) dengan pereaksi semprot sitroborat. Standar baku yang digunakan sebagai pembanding yaitu kuersetin. Bercak yang terjadi diamati pada sinar UV 254 nm dan UV 366 nm.

Tabel 11. Hasil identifikasi flavonoid ekstrak dan fraksi teraktif daun petai cina secara KLT

Identifikasi	Penampakan bercak			Pereaksi Semprot Sitroborat	Ket.
	Rf	UV 254	UV 366		
Kuersetin		Peredaman	Kuning kehijauan	Kuning	
Ekstrak	0,82	Peredaman	Biru kehitaman	Kuning	Positif
	0,74	Peredaman	Biru kehitaman	Kuning	Positif
Fraksi	0,8	Peredaman	Biru kehitaman	Kuning	Positif
	0,74	Peredaman	Biru kehitaman	Kuning	Positif
	0,68	Peredaman	Biru kehitaman	Kuning	Positif

Tabel 11 menunjukkan bahwa hasil identifikasi senyawa flavonoid pada UV 254 menunjukkan adanya peredaman dan setelah disemprot dengan pereaksi sitroborat menunjukkan bercak berwarna kuning yang mudah memudar. Berdasarkan hasil identifikasi golongan senyawa flavonoid ekstrak dan fraksi daun petai cina dinyatakan positif karena terdapat kesesuaian hasil pengamatan yaitu terbentuknya warna kuning yang memudar. Menurut Mohammed *et al.* (2015) flavonoid yang terkandung pada daun peta cina diidentifikasi sebagai kuersetin yang memiliki aktivitas terhadap beberapa bakteri yaitu *Bacillus cereus*,

Staphylococcus aureus dan *Escherichia coli* (Mohammed *et al.* 2015). Menurut Satyadev (2015), ekstrak etil asetat daun petai cina mengandung senyawa flavonoid dan tanin yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Mycobacterium tuberculosis* dengan nilai MIC sebesar 12,5 µg/ml. Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri yaitu menyebabkan kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri dan mengganggu proses komunikasi sel-sel dalam mengendalikan produksi faktor virulensi serta menghambat pembentukan biofilm (Sari *et al.* 2017; Paczkowski 2017). Gambar KLT dapat dilihat pada Lampiran 11.

2. Identifikasi alkaloid

Hasil identifikasi alkaloid menggunakan fase diam silika gel GF254 dan fase gerak kloroform:metanol (15:1) dengan pereaksi semprot dragendorff. Bercak yang terjadi diamati pada sinar UV 254 nm dan UV 366 nm.

Tabel 12. Hasil identifikasi alkaloid ekstrak dan fraksi teraktif daun petai cina secara KLT

Identifikasi	Penampakan bercak			Pereaksi Semprot Dragendorff	Ket.
	Rf	UV 254	UV 366		
Ekstrak	0,5	Peredaman	Ungu	Kuning	Negatif
	0,46	Peredaman	Ungu	Biru	Negatif
	0,38	Peredaman	Ungu	Coklat	Positif
Fraksi	0,48	Peredaman	Ungu	Kuning	Negatif
	0,3	Peredaman	Ungu	Kuning	Negatif

Tabel 12 menunjukkan bahwa hasil identifikasi senyawa alkaloid pada UV 254 nm mengalami peredaman dan UV 366 nm berfluoresensi ungu padam, kemudian setelah disemprot dengan pereaksi Dragendorff terbentuk warna coklat pada ekstrak. Berdasarkan hasil identifikasi KLT golongan senyawa alkaloid pada ekstrak dinyatakan positif sedangkan pada fraksi dinyatakan negatif karena tidak terbentuk warna coklat/jingga. Daun petai cina dilaporkan mengandung alkaloid mimosin yang dapat menghambat replikasi DNA pada jamur (Suparno *et al.* 2018). Alkaloid dapat menghambat DNA esterase dan RNA polimerase serta menghambat respirasi sel dan berperan dalam interkalasi DNA (Ajizah 2004). Gambar KLT dapat dilihat pada Lampiran 11.

3. Identifikasi tanin

Hasil identifikasi tanin menggunakan fase diam silika gel GF254 dan fase gerak toluen:etil asetat:asam format:metanol (3:3:0,8:0,2). Standar baku yang digunakan sebagai pembanding yaitu asam galat. Bercak yang terjadi diamati pada sinar UV 254 nm dan UV 366 nm.

Tabel 13. Hasil identifikasi tanin ekstrak dan fraksi teraktif daun petai cina secara KLT

Identifikasi	Penampakan bercak				Ket.
	Rf	UV 254	UV 366	Pereaksi Semprot FeCl ₃	
Asam galat	0,52	Peredaman	Biru	Biru kehitaman	
Ekstrak	0,84	Peredaman	Ungu	Biru kehitaman	Positif
	0,64	Peredaman	Ungu	Biru kehitaman	Positif
Fraksi	0,84	Peredaman	Biru	Biru kehitaman	Positif
	0,64	Peredaman	Biru	Biru kehitaman	Positif

Tabel 13 menunjukkan bahwa hasil identifikasi senyawa tanin pada UV 254 nm menunjukkan adanya peredaman dan UV 366 nm menunjukkan adanya fluoresensi ungu, kemudian setelah disemprot dengan pereaksi FeCl₃, ekstrak dan fraksi menunjukkan bercak berwarna biru kehitaman. Berdasarkan hasil identifikasi golongan senyawa tanin ekstrak dan fraksi daun petai cina dinyatakan positif karena terdapat kesesuaian hasil pengamatan yaitu terbentuknya warna biru kehitaman. Menurut Zarin *et al.* (2016) daun petai cina mengandung tanin yang dapat menghambat beberapa bakteri seperti *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus aureus* dengan nilai MIC 12,5 mg/ml. Mekanisme tanin sebagai antibakteri dengan cara mengendapkan protein dan menghambat enzim *reverse-transcriptase* dan DNA topoisomerase, sehingga tidak terbentuk sel bakteri (Suparno *et al.* 2018). Gambar KLT dapat dilihat pada Lampiran 11.

4. Identifikasi triterpenoid

Hasil identifikasi triterpenoid menggunakan fase diam silika gel GF254 dan fase gerak kloroform:metanol (10:1). Bercak yang terjadi diamati pada sinar UV 254 nm dan UV 366 nm.

Tabel 14. Hasil identifikasi triterpenoid ekstrak dan fraksi dari daun petai cina

Identifikasi	Penampakan bercak				Ket.
	Rf	UV 254	UV 366	Pereaksi Semprot Anisaldehyd-asam sulfat	
Ekstrak	0,9	Peredaman	Merah keunguan	Merah keunguan	Positif
Fraksi	0,9	Peredaman	Merah keunguan	Merah keunguan	Positif

Tabel 14 menunjukkan bahwa hasil identifikasi senyawa triterpenoid pada sinar tampak tidak terdapat bercak, UV 254 nm menunjukkan adanya peredaman dan UV 366 nm menunjukkan adanya fluoresensi merah keunguan, kemudian setelah disemprot dengan pereaksi anisaldehyd-asam sulfat, ekstrak dan fraksi menunjukkan adanya bercak. Penggunaan pereaksi semprot anisaldehyd asam sulfat untuk mengetahui adanya senyawa terpenoid dan bercak setelah disemprot akan menjadi berwarna ungu, biru, merah, abu-abu atau hijau. Anisaldehyd dapat memperpanjang sistem kromofor pada senyawa terpenoid (Irianti *et al.* 2011). Berdasarkan hasil identifikasi golongan senyawa triterpenoid ekstrak dan fraksi daun petai cina dinyatakan positif. Terpenoid dapat menghambat pertumbuhan dan mengganggu proses terbentuknya membran dan dinding sel yang menyebabkan pembentukan dinding sel tidak sempurna sehingga sel mikroba dapat lisis (Ajizah 2004). Sartinah *et al.* (2010) menyatakan bahwa daun petai cina mengandung senyawa golongan terpenoid yaitu lupeol. Lupeol dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri pada *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Eschericia coli* ATCC 25922 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. Lupeol memiliki kemampuan untuk menghambat topoisomerase II sehingga menghambat supercoil DNA saat replikasi (Gallo & Sarachine 2009).

