

JURNAL SKRIPSI

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK DAUN KOL BANDA
(*Pisonia alba* Span) TERHADAP *Pseudomonas aeruginosa* DAN
Staphylococcus aureus DENGAN VARIASI PENGEKSTRAK**

Disusun oleh:
Ancilla Christina Hardjana
NPM: 120801239



**UNIVERSITAS ATMA JAYA YOGYAKARTA
FAKULTAS TEKNOBIOLOGI
PROGRAM STUDI BIOLOGI
YOGYAKARTA
2016**

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK DAUN KOL BANDA
(*Pisonia alba*Span) TERHADAP *Pseudomonas aeruginosa* DAN *Staphylococcus aureus*
DENGAN VARIASI PENGEKSTRAK**

**ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF KOL BANDA (*Pisonia alba*Span)
LEAVEEXTRACTSAGAINST *Pseudomonas aeruginosa* AND *Staphylococcus*
aureus WITHSOLVENT VARIATIONS**

Ancilla Christina Hardjana¹, B. Boy Rahardjo Sidharta², L. M. Ekawati Purwijantiningsih³
Fakultas Teknobiologi Universitas Atma Jaya Yogyakarta
Jalan Babarsari no. 44, Yogyakarta 55281
ancilla.ch_lala@yahoo.com

ABSTRAK

Daun kol banda mengandung metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, steroid, glikosida, minyak atsiri, dan senyawa aktif lainnya sehingga memiliki efek farmakologis dan salah satunya yaitu sebagai antibakteri. Penelitian ini menguji aktivitas antibakteri ekstrak daun kol banda terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus aureus* dengan variasi pengekstrak antara lain pelarut etanol 80%, etil asetat, dan campuran etanol 80% dan etil asetat. Ekstraksi menggunakan metode maserasi selama lima hari. Rendemen ekstrak paling tinggi diperoleh sebesar 10,422% untuk ekstrak etanol. Hasil uji fitokimia menunjukkan bahwa terdapat senyawa alkaloid, tanin, saponin, dan steroid pada ekstrak etanol dan campuran etanol dan etil asetat, sedangkan ekstrak etil asetat mengandung alkaloid, saponin, dan steroid. Aktivitas antibakteri diujikan menggunakan metode sumuran dengan konsentrasi ekstrak 200 mg/ml. Ekstrak daun kol banda mampu menghambat pertumbuhan kedua jenis bakteri. Ekstrak campuran etanol dan etil asetat memiliki aktivitas antibakteri paling besar dengan luas zona hambat sebesar 0,694 cm² terhadap *P. aeruginosa* dan 1,174 cm² terhadap *S. aureus*. Hasil tersebut berbeda nyata dengan luas zona hambat yang dihasilkan oleh ekstrak etil asetat pada taraf kepercayaan 95%. Konsentrasi hambat minimum ekstrak campuran etanol dan etil asetat daun kol banda yaitu 25 mg/ml terhadap pertumbuhan *P. aeruginosa* dan 12,5 mg/ml terhadap pertumbuhan *S. aureus*. Ekstrak campuran etanol dan etil asetat daun kol banda mengandung alkaloid sebesar 1,65% (b/b) yang diujikan menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis dengan standar kuinin pada panjang gelombang 470 nm.

Kata kunci: kol banda, ekstrak daun, antibakteri, etanol dan etil asetat, alkaloid

ABSTRACT

Kol banda leaves contain secondary metabolites such as alkaloids, flavonoids, tannins, saponins, steroids, glycosides, essential oils, and other active compounds that have pharmacological effects. This study examined the antibacterial activity of kol banda leaves extract against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* with solvent variations include ethanol 80%, ethyl acetate, and mixture of ethanol 80% and ethyl acetate. Extraction using maceration method was done for five days. The highest yield extract was 10.422% for ethanol extract. Phytochemical test results indicate that there were alkaloids, tannins, saponins, and steroids in ethanol and mixture of ethanol and ethyl acetate extract, while ethyl acetate extract contains alkaloids, saponins, and steroids. Antibacterial activity was tested using well diffusion method with 200 mg/ml extract concentration. Kol banda leaves

extract were able to inhibit the growth both of bacteria tested. Mixture of ethanol and ethyl acetate extract showed the highest antibacterial activity with inhibition zone area 0,694 cm² against *P. aeruginosa* and 1,174 cm² against *S. aureus*. The results were significantly different from inhibition zone area that produced by ethyl acetate extract at 95% confidence level. Minimum inhibitory concentration of mixture of ethanol and ethyl acetate kol banda leaves were 25 mg/ml against *P. aeruginosa* and 12,5 mg/ml against *S. aureus* growth. Mixture of ethanol and ethyl acetate kol banda leave extracts contained alkaloids 1,65% (w/w) that were measured using UV-Vis spectrophotometry method with quinine as standard at 470 nm wavelength.

Keywords: kol banda, leaves extract, antibacterial, ethanol and ethyl acetate, alkaloids

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara beriklim tropis yang terkenal akan kekayaan alamnya dengan berbagai macam flora yang dapat ditemui dan tentunya memiliki beberapa manfaat, salah satunya yaitu sebagai tanaman obat. Saat ini bahan alam telah banyak dimanfaatkan baik sebagai obat maupun tujuan lain atau yang dikenal dengan istilah *back to nature* (Ningsih dkk., 2014). Tanaman obat mampu mensintesis dan mengakumulasi beberapa metabolit sekunder yang memiliki efek terapeutik, salah satunya yaitu sebagai antibakteri (Ramproshad dkk., 2012). Senyawa antibakteri diperlukan untuk menanggulangi penyakit infeksi yang semakin meningkat akibat semakin mudahnya tingkat persebaran bakteri seperti *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus aureus* (Nurfadilah, 2013).

Kol banda merupakan salah satu tanaman yang tersebar luas di Indonesia bahkan di luar Indonesia. Tanaman ini sering menjadi daya tarik masyarakat karena keindahan daunnya yang lebar dan berwarna kuning kehijauan serta tumbuh merumpun (Suhono dan Tim LIPI, 2010 dan Saritha dkk., 2014). Daun kol banda mengandung senyawa aktif seperti alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, polifenol, glikosida, dan steroid yang memberikan efek farmakologis antara lain antioksidan, analgesik, antiinflamasi, antikarsinogenik, diuretik, antidiabetik, antibakteri, dan antifungi (Departemen Kesehatan dan Kesejahteraan Sosial RI, 2001, Jayakumari dkk., 2014, dan Saritha dkk., 2014). Namun, pemanfaatan tanaman kol banda hingga saat ini masih sebatas sebagai perindang dan penyejuk lingkungan serta sebagai bahan dalam proses pengolahan pangan, sedangkan pemanfaatan sebagai obat tradisional masih sangat jarang.

Salah satu manfaat daun kol banda yaitu sebagai antibakteri akibat adanya kandungan senyawa aktif di dalamnya. Senyawa aktif tersebut dapat dilarutkan melalui proses ekstraksi yang merupakan proses penyarian zat-zat aktif untuk menarik komponen

kimia yang terkandung dalam bahan baku obat (Harborne, 1987). Proses ekstraksi ini menggunakan pelarut yang memiliki polaritas sama dengan senyawa yang akan diambil sesuai dengan prinsip *like dissolves like* (Sudarmadji dkk., 1989). Namun, senyawa aktif khusus sebagai antibakteri dalam kandungan daun kol banda belum diketahui sehingga sifat polaritas senyawa belum dapat ditentukan. Oleh karena itu, perlu digunakan variasi pelarut yang memiliki polaritas berbeda untuk menentukan sifat polaritas senyawa tersebut seperti etanol sebagai pelarut polar dan etil asetat sebagai pelarut semipolar serta campuran etanol dan etil asetat.

METODE PENELITIAN

Penelitian eksperimental ini dilaksanakan di Laboratorium Teknobil-Industri, Teknobil-Pangan, Produksi, dan Biomolekuler Fakultas Teknobiologi Universitas Atma Jaya Yogyakarta mulai bulan Februari 2016 sampai Oktober 2016. Uji kuantitatif alkaloid ekstrak campuran etanol dan etil asetat daun kol banda dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok dengan perlakuan tiga variasi pelarut dan lima kali pengulangan pada setiap perlakuan yang diujikan pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus aureus*. Kontrol positif menggunakan kloramfenikol dan kontrol negatif menggunakan DMSO.

Daun kol banda berwarna hijau atau hijau kekuningan urutan ketiga sampai kelima dari pucuk tangkai daun diambil dengan 2-3 cm sisa tangkai daun, kemudian dibersihkan menggunakan kain lembab dan dikeringanginkan. Daun dirajang menjadi bagian yang lebih kecil, lalu dikeringkan menggunakan oven pada suhu 50°C dan dilakukan uji kadar air menggunakan *moisture balancing*. Daun yang telah kering dihaluskan menggunakan *mealer machine* dan diayak menggunakan ayakan mesh 77 (Matheos dkk., 2014, Winangsih dkk., 2013, Salamah dan Widayari, 2015, Yulianti dkk., 2014 dengan modifikasi).

Serbuk daun kol banda sebanyak 50 gram direndam dengan pelarut etanol 80%, etil asetat, dan campuran etanol 80% dan etil asetat (1:1) masing-masing 250 ml (perbandingan 1:5). Ekstraksi dilakukan selama 5 hari menggunakan *shaking incubator*. Larutan disaring untuk dilakukan remaserasi pada hari ketiga, kemudian filtrat hari ketiga dan kelima digabungkan. Masing-masing filtrat diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 78°C untuk pelarut etanol serta 77°C untuk pelarut etil asetat dan campuran etanol dan etil asetat, selanjutnya proses penguapan disempurnakan menggunakan *waterbath* pada suhu

yang sama hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental dihitung beratnya untuk menentukan nilai rendemen ekstrak, kemudian ditutup dengan *plastic wrap* dan aluminium foil dan disimpan di kulkas (Matheos dkk., 2014, Smallwood, 1996, dan Yuliyani, 2015 dengan modifikasi).

Identifikasi fitokimia ekstrak daun kol banda antara lain uji alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, dan triterpenoid atau steroid. Uji alkaloid dengan cara penambahan kloroform dan amoniak, kemudianditambah H₂SO₄ pada fraksi kloroform dan direaksikan dengan pereaksi Dragendorff, Meyer, dan Wagner (Ayoola dkk., 2008). Uji flavonoid dengan penambahan amoniak dan H₂SO₄ lalu dihomogenisasi (Edeoga dkk., 2005). Uji tanin dengan penambahan akuades dan FeCl₃(Zohra dkk., 2012), uji saponin dengan penambahan akuades, kemudian dikocok (Matheos dkk., 2014), dan uji triterpenoid atau steroid dengan penambahan pereaksi *Lieberman Burchard* yang terdiri dari asetat anhidrat dan H₂SO₄(Sangi dkk., 2012). Uji kuantitatif alkaloid menggunakan metode spektrofotometri UV-Vis dengan standar kuinin pada panjang gelombang 470 nm (Shamsa dkk., 2008).

Uji kemurnian bakteri untuk mengidentifikasi bakteri uji meliputi pengamatan morfologi koloni pada medium agar petri secara *streak plate* dan agar tegak, pengamatan morfologi sel dengan pengecatan Gram, uji sifat biokimia yang terdiri dari uji katalase, fermentasi karbohidrat, dan reduksi nitrat. Bakteri uji yang telah murni diperbanyak dengan cara diinokulasikan ke medium agar miring secara *streak*. Bakteri juga diinokulasikan ke medium cair untuk kultur bakteri guna uji antibakteri dan uji konsentrasi hambat minimum (KHM)(Cappuccino dan Sherman, 2011).

Uji antibakteri menggunakan metode sumuran dengan cara biakan bakteri uji diinokulasikan pada medium NA petri sebanyak 100 µl secara *spread plate*, lalu medium dibuat 4 sumuran menggunakan perforator nomor 3. Tiga jenis ekstrak dalam DMSO steril (1:100) serta DMSO ditambahkan pada tiap sumuran yang berbeda sebanyak ±50 µl dan kertas cakram kloramfenikol diletakkan di medium, kemudian medium diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-20 jam. Ada atau tidaknya zona bening yang terbentuk di sekeliling sumuran dan kertas cakram diamati, kemudian diukur (Jayakumari dkk., 2014 dan Handayani dkk., 2012). Luas zona hambat dihitung dengan rumus:

$$L = 3,14 \times \left[\left(\frac{d_2}{2} \right)^2 - \left(\frac{d_1}{2} \right)^2 \right]$$

Keterangan:

d₂ = rata-rata jumlah diameter terpanjang dan terpendek

d₁ = diameter sumuran (0,6 cm)

Enam gelas timbang diisi ekstrak dengan konsentrasi 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 mg/ml dan dua gelas timbang diisi kloramfenikol (100 mg/ml) serta DMSO. Tabung reaksi diisi 1 ml medium NB dan ditambah 100 µl ekstrak, kloramfenikol, dan DMSO, kemudian dihomogenisasi. Biakan bakteri (setara dengan Mc Farland 0,5) sebanyak 10 µl diinokulasikan ke tiap tabung reaksi dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-20 jam. Medium yang telah diinkubasi diambil sebanyak 100 µl, selanjutnya diinokulasikan pada medium NA secara *spread plate* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-20 jam. Ada atau tidaknya koloni bakteri yang tumbuh diamati dan jumlah yang tumbuh dihitung (Wiegand dkk., 2008, Jayakumari dkk., 2014, dan Andrews, 2006).

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan ANAVA dengan tingkat kepercayaan sebesar 95%. Apabila hasil ANAVA menunjukkan hasil yang beda nyata, analisis dilanjutkan dengan *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) untuk mengetahui beda nyata antarperlakuan. Analisis ANAVA dan DMRT menggunakan program SPSS 18.0.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Daun kol banda memiliki aroma lemah sama seperti aroma daun pada umumnya dan rasa tawar agak sepat yang diperkirakan berasal dari kandungan fitokimia dalam daun seperti alkaloid, saponin, dan tanin yang memberikan rasa pahit dalam tumbuhan (Rohyani dkk., 2015; Martono dan Setiyono, 2014). Daun kol banda dikeringkan selama ±10 jam hingga kadar air daun mencapai kurang dari 10% yang ditandai dengan hancurnya daun jika diremas (Widiyastuti dkk., 2011). Daun kol banda segar yang semula berwarna hijau muda atau hijau kekuningan berubah menjadi hijau tua kehitaman setelah dikeringkan.

Pembuatan serbuk bertujuan untuk mengecilkan ukuran bahan agar luas permukaan bahan yang kontak dengan pelarut menjadi lebih besar sehingga proses ekstraksi menjadi lebih optimal (Diniatik dkk., 2016). Semakin halus serbuk, maka semakin besar pula kemungkinan sel-sel yang pecah dalam proses ekstraksi. Hal ini akan mempermudah bahan pelarut untuk mengikat kandungan kimia dalam bahan, maka dilakukan pengayakan serbuk sebelum diekstrak (Octavia, 2009). Ekstrak kental daun kol banda yang diperoleh berwarna coklat kehijauan dengan aroma khas.

Ekstrak etanol daun kol banda memiliki kenampakan cukup kental dengan nilai rendemen ekstrak 10,422%, ekstrak etil asetat daun kol banda memiliki kenampakan lekat dan mengkilap dengan nilai rendemen ekstrak 4,346%, dan ekstrak campuran etanol dan etil asetat daun kol banda memiliki kenampakan kental dan cukup mengkilap dengan nilai

rendemen ekstrak 8,533%. Ekstrak etanol 80% menghasilkan rendemen ekstrak paling besar, sedangkan ekstrak etil asetat menghasilkan rendemen ekstrak paling rendah. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa metabolit sekunder dalam ekstrak daun kol banda yang bersifat polar lebih banyak daripada yang bersifat semipolar karena pelarut akan mengekstraksi senyawa dengan polaritas yang sama sesuai dengan prinsip ekstraksi yaitu *like dissolves like* (Sudarmadji dkk., 1989).

Etanol 80% merupakan pelarut bersifat polar yang bersifat universal sehingga senyawa yang bersifat semipolar dan nonpolar juga dapat terekstraksi. Pelarut ini juga mengandung air sebanyak 20% sehingga sebagian senyawa metabolit sekunder ekstrak daun kol banda ada yang terekstrak oleh etanol dan ada pula yang terekstrak oleh air. Rendemen ekstrak yang dihasilkan oleh ekstrak etanol tentunya lebih banyak karena selain senyawa metabolit sekunder daun kol banda yang bersifat polar, seperti tanin, flavonoid, dan saponin, pelarut etanol juga dapat mengekstrak senyawa semipolar seperti alkaloid dan nonpolar seperti steroid (Sani dkk., 2014; Febriani dkk., 2015; Simaremare, 2014).

Uji fitokimia ekstrak daun kol banda dilakukan secara kualitatif terhadap senyawa alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, serta triterpenoid dan steroid. Seluruh ekstrak daun kol banda bereaksi positif terhadap reagen Dragendorff yang ditunjukkan dengan terbentuknya endapan warna merah. Reaksi positif terhadap reagen Meyer terjadi pada ekstrak etanol dan campuran etanol dan etil asetat yang ditunjukkan dengan terbentuknya endapan warna putih. Terbentuknya endapan warna coklat pada ekstrak etil asetat dan campuran etanol dan etil asetat merupakan reaksi positif uji alkaloid terhadap reagen Wagner. Hasil uji flavonoid menunjukkan bahwa seluruh ekstrak daun kol banda tidak mengandung senyawa flavonoid yang ditunjukkan dengan tidak terbentuknya warna kuning pada ekstrak dan tidak ada perubahan warna setelah dihomogenisasi karena penggunaan suhu tinggi yaitu 77-78°C saat penguapan pelarut setelah maserasi.

Ekstrak etanol dan campuran etanol dan etil asetat daun kol banda menunjukkan hasil positif adanya kandungan tanin terkondensasi dengan terjadinya perubahan warna menjadi hijau kehitaman pada ekstrak, sedangkan ekstrak etil asetat menunjukkan hasil negatif. Ekstrak etanol, etil asetat, dan campuran etanol dan etil asetat daun kol banda mengandung saponin yang ditunjukkan dengan terbentuknya buih ± 1 cm yang konstan pada permukaan ketiga ekstrak. Ketiga ekstrak daun kol banda mengalami perubahan warna menjadi hijau tua kebiruan setelah ditambah pereaksi *Lieberman Burchard* yang menunjukkan bahwa ketiga ekstrak tersebut mengandung steroid.

Hasil uji kemurnian isolat *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus aureus* dapat dilihat pada Tabel 1. Hasil tersebut telah sesuai dengan teori yang dikemukakan oleh Breed dkk. (1957). Maka, isolat kedua bakteri tersebut benar merupakan biakan murni *P. aeruginosa* dan *S. aureus*.

Tabel 1. Hasil Uji Kemurnian *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus aureus*

Parameter Uji Kemurnian	Hasil Pengujian		
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	
Morfologi koloni	Putih, licin, raised, irregular, undulate	Putih keruh, licin, raised, circular, entire	
Motilitas	Motil	Nonmotil	
Morfologi sel	Batang	Bulat	
Pengecatan Gram	Gram negatif (warna merah keunguan)	Gram positif (warna ungu)	
Katalase	Positif	Positif	
Fermentasi karbohidrat	Glukosa	Negatif	Positif
	Laktosa	Negatif	Positif
	Sukrosa	Negatif	Positif
Reduksi nitrat	Positif	Positif	

Uji aktivitas antibakteri ekstrak daun kol banda terhadap *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus aureus* dilakukan menggunakan metode difusi agar sumuran. Kontrol yang digunakan yaitu kloramfenikol (100 mg/ml) sebagai kontrol positif dan DMSO sebagai kontrol negatif. Uji aktivitas antibakteri ini menggunakan ekstrak daun kol banda sebanyak 200 mg/ml. Hasil analisis uji aktivitas antibakteri ekstrak daun kol banda terhadap *P. aeruginosa* dan *S. aureus* dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Analisis Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Kol Banda Terhadap *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus aureus*

Perlakuan	Luas Zona Hambat Bakteri (cm ²)		Rata-rata
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	
Ekstrak etanol 80%	0,241	0,519	0,38 ^{XY}
Ekstrak etil asetat	0,142	0,420	0,281 ^X
Ekstrak campuran etanol 80% dan etil asetat	0,694	1,174	0,934 ^Y
Kontrol negatif (DMSO)	0	0,02	0,01 ^X
Kontrol positif (kloramfenikol)	0,519	3,803	2,161 ^Z
Rata-rata	0,319 ^A	1,187 ^B	

Keterangan: Angka yang diikuti dengan huruf yang sama menunjukkan tidak beda nyata pada tingkat kepercayaan 95%

Hasil uji aktivitas antibakteri menunjukkan bahwa ekstrak etanol 80%, etil asetat, dan campuran etanol 80% dan etil asetat daun kol banda memiliki aktivitas antibakteri

spektrum luas, sama seperti kontrol positif. Ketiga ekstrak tersebut dan kloramfenikol mampu menghambat pertumbuhan *P. aeruginosa* sebagai bakteri Gram positif dan *S. aureus* sebagai bakteri Gram negatif (Madigan dkk., 2015). Aktivitas antibakteri tersebut sama seperti hasil penelitian Jayakumari dkk. (2014) yang menunjukkan bahwa ekstrak daun kol banda memiliki aktivitas antibakteri spektrum luas karena mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan *Klebsiella pneumoniae*.

Ekstrak campuran etanol dan etil asetat daun kol banda memiliki aktivitas antibakteri paling besar dengan luas zona hambat 0,694 cm² terhadap *P. aeruginosa* dan 1,174 cm² terhadap *S. aureus*, sedangkan ekstrak etil asetat memiliki aktivitas antibakteri paling kecil dengan luas zona hambat 0,142 cm² terhadap *P. aeruginosa* dan 0,420 cm² terhadap *S. aureus*. Hal ini dikarenakan senyawa aktif antibakteri ekstrak daun kol banda yang terlarut dalam pelarut campuran etanol dan etil asetat lebih banyak daripada senyawa antibakteri yang terlarut dalam pelarut etanol dan etil asetat. Hasil uji DMRT menunjukkan bahwa adanya beda nyata aktivitas antibakteri antara ekstrak etil asetat dan ekstrak campuran etanol dan etil asetat daun kol banda. Ekstrak etanol daun kol banda memiliki aktivitas antibakteri lebih besar dibanding ekstrak etil asetat dan lebih kecil dibanding ekstrak campuran etanol dan etil asetat tetapi perbedaan tersebut tidak berbeda nyata (Tabel 2).

Hasil uji DMRT menunjukkan bahwa adanya beda nyata aktivitas antibakteri terhadap *P. aeruginosa* dan *S. aureus*. Ekstrak daun kol banda dan kloramfenikol memiliki aktivitas antibakteri lebih efektif terhadap *S. aureus* dibanding *P. aeruginosa*. Hal ini dikarenakan *S. aureus* memiliki dinding sel yang lebih sederhana, sedangkan *P. aeruginosa* memiliki dinding sel yang lebih kompleks sehingga senyawa metabolit sekunder lebih mudah untuk memecah dinding sel *S. aureus*. Adanya lipopolisakarida pada membran bagian luar *P. aeruginosa* yang merupakan bakteri Gram negatif patogenik juga membantu melindungi bakteri tersebut dari senyawa antibakteri (Campbell dkk., 2003).

Kloramfenikol sebagai kontrol positif memiliki aktivitas antibakteri lebih besar daripada ekstrak daun kol banda dan berbeda nyata. Namun, kloramfenikol memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* lebih besar dibandingkan dengan ekstrak campuran etanol dan etil asetat, tetapi aktivitas antibakteri terhadap *P. aeruginosa* justru lebih kecil. Hal ini dikarenakan bakteri *Pseudomonas* telah resisten terhadap kloramfenikol (Kee dan Hayes, 1994). Menurut Putri dkk. (2014), *P. aeruginosa* memiliki sifat resistensi alami yaitu kurang aktif terhadap kloramfenikol.

Pelarut DMSO sebagai kontrol negatif tidak memiliki aktivitas antibakteri yang ditunjukkan dengan tidak terbentuknya zona bening terhadap *P. aeruginosa*, sedangkan

terbentuknya zona bening terhadap *S. aeruginosa* karena pengaruh suhu panas perforator yang digunakan untuk membuat sumuran setelah dilakukan sterilisasi menggunakan lampu spiritus sehingga dapat menghambat pertumbuhan bakteri di sekitar sumuran. DMSO yang digunakan untuk melarutkan ekstrak tidak menghambat pertumbuhan kedua bakteri uji. Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri ekstrak daun kol banda hanya berasal dari senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak dan pelarut DMSO tidak memberikan pengaruh aktivitas antibakteri.

Adanya perbedaan aktivitas antibakteri ekstrak daun kol banda antara ekstrak etanol, etil asetat, dan campuran etanol dan etil asetat karena pengaruh jumlah kandungan senyawa aktif antibakteri dalam ekstrak dan daya difusi ekstrak sebagai antibakteri ke medium yang berbeda (Purwanto, 2015). Aktivitas antibakteri ekstrak daun kol banda dikarenakan adanya kandungan senyawa fitokimia antara lain alkaloid, tanin, saponin, dan steroid. Tiap senyawa tersebut memiliki mekanisme kerja antibakteri yang berbeda-beda (Nurhasanah dkk., 2014).

Alkaloid memiliki aktivitas antibakteri dengan menghambat esterase, DNA, RNA polimerase, dan respirasi sel bakteri serta berperan dalam interkalasi DNA (Aniszewki, 2007). Mekanisme antibakteri tanin yaitu mengikat protein sehingga pembentukan dinding sel bakteri terhambat dan mengkoagulasi protoplasma bakteri (Juliantina dkk., 2009). Saponin mampu menghambat pertumbuhan bakteri dengan mengganggu tekanan permukaan dinding sel, mengganggu metabolisme, dan melisiskan dinding sel bakteri (Karlina dkk., 2013). Senyawa steroid memiliki aktivitas antibakteri dengan melisiskan liposom pada membran lipid sel bakteri karena adanya sensitivitas membran tersebut terhadap steroid (Madduluri dkk., 2013).

Ekstrak campuran etanol 80% dan etil asetat daun kol banda kemudian dilanjutkan ke uji konsentrasi hambat minimum (KHM) untuk menentukan konsentrasi terendah ekstrak yang dapat menghambat pertumbuhan *P. aeruginosa* dan *S. aureus* yang ditunjukkan dengan tidak adanya koloni bakteri yang tumbuh. Hasil uji KHM ekstrak campuran etanol 80% dan etil asetat daun kol banda dapat dilihat pada Tabel 3. Hasil uji KHM menunjukkan bahwa konsentrasi hambat minimum ekstrak daun kol banda terhadap *P. aeruginosa* yaitu 25 mg/ml, sedangkan terhadap *S. aureus* yaitu 12,5 mg/ml. Kontrol positif menunjukkan adanya aktivitas antibakteri karena tidak adanya koloni bakteri yang tumbuh, sedangkan kontrol negatif menunjukkan tidak adanya aktivitas antibakteri karena adanya koloni bakteri yang tumbuh menyebar dan menutupi lebih dari setengah luas permukaan medium agar petri (*spreader*).

Tabel 3. Hasil Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Ekstrak Campuran Etanol 80% dan Etil Asetat Daun Kol Banda Terhadap *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus aureus*

Perlakuan	Jumlah Koloni Terhitung	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Kontrol positif	0	0
Ekstrak 200 mg/ml	0	0
Ekstrak 100 mg/ml	0	0
Ekstrak 50 mg/ml	0	0
Ekstrak 25 mg/ml	0	0
Ekstrak 12,5 mg/ml	82	0
Ekstrak 6,25 mg/ml	<i>spreader</i>	<i>spreader</i>
Kontrol negatif	<i>spreader</i>	<i>spreader</i>

Perbedaan konsentrasi hambat minimum antara kedua bakteri menunjukkan bahwa adanya perbedaan aktivitas antibakteri terhadap kedua bakteri tersebut. Konsentrasi hambat minimum ekstrak terhadap pertumbuhan *S. aureus* lebih rendah daripada terhadap *P. aeruginosa*. Hal ini menunjukkan bahwa pertumbuhan *S. aureus* lebih dapat dihambat oleh ekstrak daun kol banda daripada *P. aeruginosa*. Hasil ini sesuai dengan uji aktivitas antibakteri yang menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri ekstrak daun kol banda lebih besar terhadap *S. aureus* dibandingkan dengan *P. aeruginosa*. Hasil uji konsentrasi hambat minimum tersebut tidak dapat dibandingkan dengan hasil penelitian sebelumnya karena belum ada penelitian yang menguji konsentrasi hambat minimum ekstrak campuran etanol dan etil asetat daun kol banda.

Uji kuantitatif fitokimia dilakukan pada ekstrak campuran etanol dan etil asetat daun kol banda. Kadar total senyawa fitokimia yang ditentukan dalam ekstrak yaitu alkaloid karena hasil uji kualitatif alkaloid ekstrak menunjukkan positif terhadap pereaksi Dragendorff, Meyer, dan Wagner. Pelarut campuran etanol dan etil asetat juga merupakan campuran pelarut semipolar yaitu etil asetat yang mampu melarutkan alkaloid dan pelarut polar universal yaitu etanol yang mampu melarutkan beberapa senyawa fitokimia termasuk alkaloid. Maka, ekstrak campuran etanol dan etil asetat daun kol banda diperkirakan lebih banyak mengandung senyawa alkaloid dibanding senyawa yang lain.

Hasil uji kuantitatif tersebut menunjukkan bahwa kadar total alkaloid ekstrak campuran etanol dan etil asetat daun kol banda sebesar 1,65% (b/b). Konsentrasi ekstrak yang digunakan dalam uji aktivitas antibakteri yaitu 200 mg/ml, maka kadar alkaloid dalam ekstrak campuran etanol dan etil asetat daun kol banda pada uji aktivitas antibakteri yaitu sebesar 3,3 mg/ml. Kadar total alkaloid ekstrak daun kol banda tergolong rendah karena alkaloid terdapat dalam jumlah besar pada bagian akar, batang, dan biji (Sharief dkk., 2014).

Penggunaan daun berumur sedang yaitu urutan ketiga hingga kelima dari pucuk tangkai juga mempengaruhi jumlah kandungan metabolit sekunder dalam ekstrak daun kol banda. Jumlah metabolit sekunder dalam suatu tumbuhan bervariasi karena dipengaruhi oleh kondisi fisiologi tumbuhan yaitu berumur tua atau muda, jenis dan sifat kimia tumbuhan, serta kondisi lingkungan. Daun tua memiliki ketersediaan metabolit sekunder yang lebih banyak dibanding daun muda karena lebih dari 90% volume sel tumbuhan dewasa berupa vakuola yang berisi berbagai bahan organik dan anorganik (Simbala, 2009 dan Mulyani, 2006). Namun, secara spesifik untuk spesies *Pisonia alba* atau famili Nyctaginaceae belum ada penelitian sebelumnya yang meneliti tentang pengaruh umur daun terhadap jumlah kandungan senyawa metabolit sekunder.

SIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, disimpulkan bahwa: 1) Ekstrak daun kol banda (*Pisonia alba* Span) mampu menghambat pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus aureus*, 2) Pelarut campuran etanol 80% dan etil asetat menghasilkan ekstrak daun kol banda dengan aktivitas antibakteri paling kuat terhadap *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus aureus*, 3) Konsentrasi hambat minimum ekstrak campuran etanol 80% dan etil asetat daun kol banda yaitu 25 mg/ml terhadap pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* dan 12,5 mg/ml terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*.

Saran yang diajukan untuk penelitian selanjutnya terkait dengan penelitian ini antara lain: 1) Penggunaan pelarut yang memiliki titik didih maksimal $\pm 60^{\circ}\text{C}$ seperti metanol, aseton, kloroform, atau dietil eter sehingga suhu yang digunakan saat penguapan pelarut tidak lebih dari 60°C agar tidak merusak kandungan senyawa aktif dalam bahan utama terutama flavonoid, 2) Pengujian kandungan senyawa aktif dalam ekstrak daun kol banda menggunakan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) atau *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS) perlu dilakukan untuk mengetahui senyawa aktif lainnya yang terkandung dalam ekstrak daun kol banda selain yang diujikan dalam uji fitokimia, 3) Adanya penelitian lanjutan tentang aktivitas antibakteri ekstrak daun kol banda menggunakan bahan daun kol banda berumur tua karena metabolit sekunder lebih banyak terakumulasi pada daun tua.

DAFTAR PUSTAKA

- Andrews, J. M. 2006. *Determination of Minimum Inhibitory Concentrations*. Department of Microbiology, City Hospital NHS Trust, Birmingham. Halaman 4-6.
- Aniszewki, T. 2007. *Alkaloid Secrets of Life*. Elsevier, Amsterdam. Halaman 18.
- Ayoola, G. A., Coker, H. A. B., Adesegun, S. A., Bello, A. A. A., Obaweya, K., Ezennia, E. C., dan Atangbayila, T. O. 2008. Phytochemical screening and antioxidant activities of some selected medicinal plants used for malaria therapy in Southwestern Nigeria. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 7(3): 1019-1024.
- Breed, R. S., Murray, E. G. D., dan Smith, N. R. 1957. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Seventh Edition*. The Williams and Wilkins Company, USA. Halaman 99 dan 465.
- Campbell, N. A., Reece, J. B., dan Mitchell, L. G. 2003. *Biologi Edisi Kelima Jilid II*. Erlangga, Jakarta. Halaman 107, 108.
- Cappuccino, J. G. dan Sherman, N. 2011. *Microbiology A Laboratory Manual Ninth Edition*. Pearson Benjamin Cummings, San Francisco.
- Departemen Kesehatan dan Kesejahteraan Sosial RI. 2001. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia (I) Jilid 2*. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Jakarta.
- Diniatik, Suparman, Anggraeni, D., dan Amar, I. 2016. Uji antioksidan ekstrak etanol daun dan kulit batang manggis *Garcinia mangostana* L. *Jurnal Pharmacia* 6(1): 21-30.
- Edeoga, H. O., Okwu, D. E., dan Mbaebie, B. O. 2005. Phytochemical constituents of some Nigerian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology* 4(7): 685-688.
- Febriani, D., Mulyanti, D., dan Rismawati, E. 2015. Karakterisasi simplisia dan ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* Linn). *Prosiding Penelitian Sivitas Akademika Unisba (Kesehatan dan Farmasi)* 2: 475-480.
- Handayani, N., Wartono, M. W., Murti, R. K. 2012. Identifikasi dan uji aktivitas antibakteri fraksi teraktif daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss). *ALCHEMY Jurnal Penelitian Kimia* 8(1): 57-69.
- Harborne, J. B. 1987. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Penerbit ITB, Bandung. Halaman 70.
- Jayakumari, S., Ravichandiran, V., dan Rao, N. 2014. Antimicrobial activity of *Pisonia grandis* R. Br leaf extract and its fraction. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 3(2): 2290-2302.
- Juliantina, F. R., Ayu, D. C. M., dan Nirwani, B. 2009. Manfaat sirih merah (*Piper crocatum*) sebagai agen antibakterial terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif. *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia* 6(2): 23-27.
- Karlina, C. Y., Ibrahim, M., Trimulyono, G. 2013. Aktivitas antibakteri ekstrak herba krokot (*Portulaca oleracea* L.) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *E journal UNESA LenteraBio* 2(1): 87-93.
- Kee, J. L. dan Hayes, E. R. 1994. *Farmakologi Pendekatan Proses Keperawatan*. Buku Kedokteran EGC, Jakarta. Halaman 20, 21, dan 343.

- Madduluri, S., Rao, K. B., dan Sitaram, B. 2013. In vitro evaluation of antibacterial activity of five indigenous plants extract against five bacterial pathogens of human. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 5(4): 679-684.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H., dan Stahl, D. A. 2015. *Brock Biology of Microorganisms Fourteenth Edition*. Pearson Education, Inc., Benjamin Cummings, San Fransisco. Halaman 176 dan 813.
- Martono, B. dan Setiyono, R. T. 2014. Skrining fitokimia enam genotipe teh. *J. TIDP* 1(2): 63-68.
- Matheos, H., Runtuwene, M. R. J., dan Sudewi, S. 2014. Aktivitas antioksidan dari ekstrak daun kayu bulan (*Pisonia alba*). *Pharmacon* 3(3): 235-246.
- Mulyani, S. 2006. *Anatomi Tumbuhan*. Kanisius, Yogyakarta. Halaman 65.
- Ningsih, D. R., Zusfahair, dan Purwati. 2014. Potensi ekstrak daun kamboja (*Plumeria alba* L.) sebagai antibakteri dan identifikasi golongan senyawa bioaktifnya. *Molekul* 9(2): 101-109.
- Nurfadilah. 2013. Uji Bioaktivitas Antibakteri Ekstrak dan Fraksi Lamun dari Kepulauan Spermonde Kota Makasar. *Naskah Skripsi S-1*. Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan Universitas Hasanudin, Makasar.
- Nurhasanah, Harlia, dan Adhitiyawarman. 2014. Uji bioaktivitas ekstrak daun maja (*Crescentia cujete* Linn) sebagai anti rayap. *JKK* 3(3): 43-48.
- Octavia, D. R. 2009. Uji Aktivitas Penangkap Radikal Ekstrak Petroleum Eter, Etil Asetat dan Etanol Daun Binahong (*Anredera corfolia* (Tenore) Steen) Dengan Metode DPPH (2,2-Difenil-1-Pikrihidrasil). *Naskah Skripsi S-1*. Fakultas Farmasi Universitas Muhamadiyah, Surakarta.
- Parwata, I. M. O. A. dan Dewi, P. F. S. 2008. Isolasi dan uji aktivitas antibakteri minyak atsiri dari rimpang lengkuas (*Alpinia galanga* L.). *Jurnal Kimia* 2(2): 100-104.
- Purwanto, S. 2015. Uji aktivitas antibakteri fraksi aktif ekstrak daun senggani (*Melastoma malabathricum* L) terhadap *Escherichia coli*. *Jurnal Keperawatan Sriwijaya* 2(2): 84-92.
- Putri, A. A., Rasyid, R., dan Rahmatini. 2014. Perbedaan sensitivitas kuman *Pseudomonas aeruginosa* penyebab infeksi nosokomial terhadap beberapa antibiotika generik dan paten. *Jurnal Kesehatan Andalas* 3(3): 327-331.
- Ramproshad, S., Afroz, T., Mondal, B., Khan, R., dan Ahmed, S. 2012. Screening of phytochemical and pharmacological activities of leaves of medicinal plant *Plumeria rubra*. *International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry* 2(4): 1001-1007.
- Rohyani, I. S., Aryanti, E., dan Suropto. 2015. Kandungan fitokimia beberapa jenis tumbuhan lokal yang dimanfaatkan sebagai bahan baku obat di Pulau Lombok. *Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas Indonesia* 1(2): 388-391.
- Salamah, N. dan Widayarsi, E. 2015. Aktivitas antioksidan ekstrak metanol daun kelengkeng (*Euphoria longan* (L) Steud.) dengan metode penangkapan radikal 2,2'-difenil-1-pikrilhidrazil. *Jurnal Pharmacia* 5(1): 25-34.

- Salman, S. M., Din, I. U., Lutfullah, G., Shahwar, D. E., Shah, Z., Kamran, A. W., Nawaz, S., dan Ali, S. 2015. Antimicrobial activities, essential element analysis and preliminary phytochemical analysis of ethanolic extract of *Mirabilis jalapa*. *International Journal of Biosciences* 7(4): 186-195.
- Sangi, M. S., Momuat, L. I., dan Kumaunang. 2012. Uji toksisitas dan skrining fitokimia tepung gabah pelepah aren. *Jurnal Ilmiah Sains* 12(2): 127-134.
- Sani, R. N., Nisa, F. C., Andriani, R. D., dan Maligan, J. M. 2014. Analisis rendemen dan skrining fitokimia ekstrak etanol mikroalga laut *Tetraselmis chuii*. *Jurnal Pangan dan Agroindustri* 2(2): 121-126.
- Saritha, B., Karpagam, dan Sumathi. 2014. Studies on antioxidant activity, phenol and flavonoid content of *Pisonia alba* Span. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 7(3): 106-109.
- Shamsa, F., Monsef, H., Ghamooshi, R., dan Verdian-rizi, M. 2008. Spectrophotometric determination of total alkaloids in some Iranian medicinal plants. *Thai J. Pharm. Sci.* 32: 17-20.
- Sharief, N., Srinivasulu, A., dan Rao, U. M. 2014. Estimation of alkaloids and total phenol in roots of *Derris trifoliata* L and evaluation for antibacterial and antioxidant activity. *Indian Journal of Applied Research* 4(5): 1-3.
- Shyaula, S. L., Ngakushi, A. B., Maharjan, B. L., dan Manandhar, M. D. 2012. Estimation of alkaloids and antibacterial activity of *Aconitum spicatum* Bruhl Stapf from Manaslu conservation area. *Nepal Journal of Science and Technology* 13(1): 67-71.
- Simaremare, E. S. 2014. Skrining fitokimia ekstrak etanol daun gatal (*Laportea decumana* (Roxb.) Wedd). *Pharmacy* 11(1): 98-107.
- Simbala, H. 2009. The analysis of alkaloid compounds of some medicinal vegetations as the active materials of phyto-pharmaca. *Pacific Journal* 1(4): 489-494.
- Smallwood, I. M. 1996. *Handbook of Organic Solvent Properties*. John Wiley and Sons Inc., New York. Halaman 65 dan 227.
- Sudarmadji, S., Haryono, B., dan Suhardi. 1989. *Analisis untuk Bahan Makanan dan Pertanian*. Liberty, Yogyakarta. Halaman 171.
- Suhono, B. dan Tim LIPI. 2010. *Ensiklopedia Flora Jilid 3*. PT. Kharisma Ilmu, Jakarta.
- Widiyastuti, Y., Supriyati, N., Kusumadewi, A. P., Widayat, T., Ikayanti, Rahmawati, N., Sudrajat, H., Sugiarto, S., Husnia, N., Mujahid, R., Widodo, H., Haryanti, S., Fauzi, Katno, Subositi, D., Adi, M. B. S. 2011. *Pedoman Umum Panen dan Pascapanen Tanaman Obat*. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional, Jakarta.
- Wiegand, I., Hilpert, K. dan Hancock, R. E. W. 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols* 3(2): 163-175.
- Winangsih, Prihastanti, E., dan Parman, S. 2013. Pengaruh metode pengeringan terhadap kualitas simplisia lempuyang wangi (*Zingiber aromaticum* L.). *Buletin Anatomi dan Fisiologi* XXI(1): 19-25.

- Yulianti, D., Susilo, B., dan Yulianingsih, R. 2014. Pengaruh lama ekstraksi dan konsentrasi pelarut etanol terhadap sifat fisika-kimia ekstrak daun stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni M.) dengan metode microwave assisted extraction (Mae). *Jurnal Bioproses Komoditas Tropis* 2(1): 35-41.
- Yuliyani, M. 2015. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kloroform Limbah Padat Daun Serai Wangi (*Cymbopogon nardus*) Terhadap Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus aureus*. *Naskah Skripsi S-1*. Fakultas Teknobiologi Universitas Atma Jaya Yogyakarta, Yogyakarta.
- Zohra, S. F., Meriem, B., Samira, S., dan Muneer, A. 2012. Phytochemical screening and identification of some compounds from Mallow. *Journal of Natural Product and Plant Resources* 2(4): 512-516.

