



**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN ANTIBAKTERI EKSTRAK BIJI
LAMTORO (*Leucaena leucocephala*)**

SKRIPSI

oleh :

**SHELVY KHADIJAH USMAN
NIM 121710101032**

**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2016**



**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN ANTIBAKTERI EKSTRAK BIJI
LAMTORO (*Leucaena leucocephala*)**

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Teknologi Hasil Pertanian (S1) dan mencapai gelar Sarjana Teknologi Pertanian

oleh :

**SHELVY KHADIJAH USMAN
121710101032**

**JURUSAN TEKNOLOGI HASIL PERTANIAN
FAKULTAS TEKNOLOGI PERTANIAN
UNIVERSITAS JEMBER
2016**

PERSEMBAHAN

Saya persembahkan skripsi ini untuk :

1. Allah SWT, puji syukur atas rahmatNya yang telah memudahkan segala urusan, semoga hamba mendapat rahmat dan ampunanMu dan berilah petunjuk supaya hamba selalu berada pada jalanMu;
2. Nabi Muhammad SAW, yang telah membimbing umat manusia menjadi khalifah di bumi serta menjadi teladan untuk mencapai kebahagiaan dunia dan akhirat kelak;
3. Orangtua tercinta, umik Ifa dan abi Farid terima kasih atas kasih sayang, cinta dan do'anya serta semangat yang luar biasa;
4. Adik kesayangan, Maghfirah serta seluruh keluarga besar yang telah memberi warna kehidupan;
5. Seluruh kerabat, teman satu angkatan FTP 2012, teman finalis duta kampus Universitas Jember yang selalu memberikan bantuan dan semangat;
6. Almamater Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

MOTTO

“Barang siapa yang menempuh suatu jalan untuk menuntut ilmu, Allah akan memudahkan baginya jalan ke surga”.

-HR. Muslim-

“ ... *Sesungguhnya sesudah kesulitan itu adalah kemudahan, sesungguhnya kamu telah selesai (dari suatu urusan), kerjakanlah dengan sungguh sungguh (urusan) yang lain dan hanya kepada Tuhanlah hendaknya kamu berharap*”
(QS Al-Insyirah 94;6-8)

“Keyakinan bahwa Allah lah yang memiliki segalanya yang membuat seseorang menjadi *the winner*”

-ust Yusuf Mansur-

“don't forget nuntut ilmu seriously, qiyaamullail, 'n shalah every fivetimes in masjid. Don't jauh-jauh from Allah SWT and Qur'an.”

-Ust Yusuf Mansur-

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Shelvy Khadijah Usman

NIM : 121710101032

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “**Aktivitas Aktioksidan dan Antibakteri Ekstrak Biji Lamtoro (*Leucaena leucocephala*)**” Adalah benar-benar hasil karya saya sendiri, kecuali dalam kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan dalam institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta mendapatkan sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, November 2016

Shelvy Khadijah Usman

NIM 121710101032

SKRIPSI

**AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DAN ANTIBAKTERI EKSTRAK BIJI
LAMTORO (*Leucaena leucocephala*)**

oleh :

Shelvy Khadijah Usman

NIM 121710101032

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : Dr. Ir. Sony Suwasono, M. App. Sc.

Dosen Pembimbing Anggota : Ir. Wiwik Siti Windrati, MP

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “**Aktivitas Antioksidan dan Antibakteri Ekstrak Biji Lamtoro (*Leucaena leucocephala*)**” karya Shelvy Khadijah Usman 121710101032 telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember pada:

Hari/tanggal : Kamis, 6 Oktober 2016

Tempat : Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember

Dosen Pembimbing Utama

Dosen Pembimbing Anggota,

Dr. Ir. Sony Suwasono, M.App.Sc
NIP. 196411091989021002

Ir. Wiwik Siti Windrati, M.P.
NIP. 195311211979032002

Tim
Penguji:

Ketua

Anggota

Ir. Mukhammad Fauzi, M.Si.
NIP. 196307011989031004

Ir. Yhulia Praptiningsih S, M.S.
NIP. 195306261980022001

Mengesahkan
Dekan Fakultas Teknologi Pertanian

Dr. Yuli Witono, S.TP, M.P.
NIP. 196912121998021001

SUMMARY

Antioxidant and Antibacterial activity of leadtree (*Leucaena leucocephala*) bean extract; Shelvy Khadijah Usman; 121710101032; 2016; 57 pages; Department of Agricultural Product Technology, Faculty of Agricultural Technology, University of Jember.

Leadtree is an underutilized vegetable that is found in almost all regions in Indonesia. Lamtoro is a wild plant. Leadtree bean is a traditional medicine for the treatment of stomach diseases. Leadtree bean contains isoflavones sulfate, steroid glycosides and alkaloids. Flavonoids and alkaloids that are expected to inhibit the growth of pathogenic bacteria gram positive and gram negative.

Extraction of bioactive compounds in Leadtree bean using a suitable solvent. Active compounds in leadtree bean are polar compounds that can be extracted using a polar solvent. The used of ethanol as solvent of bioactive compounds in food is highly recommended because ethanol is food grade. In a different context, the used of ethanol in food is reduced along with public awareness of halal food consumption. This study was conducted to determine the ratio of water and ethanol is most effective to extract flavonoids in leadtree bean and used for natural antibacterial.

This research was conducted in four stages. The first stage is a preliminary research to determine the extraction method. The second stage is making leadtree bean extract powder. The third stage is extract powder characterization includes color analysis, total polyphenols (Folin-Ciocalteu) and antioxidant activity (DPPH scavenging activity). The fourth stage is analysis of antibacterial activity in well diffusion method and the determination of minimum inhibitory concentration.

The results showed leadtree bean extracts powder that have appropriate criteria is the use of 50% ethanol as a solvent with a total of 220,46 polyphenols mgGAE / ml. Antioxidant activity equivalen with trolox concentration, the most

high is fraction number seven 64mg TE/100g. Probit curve *Bacillus subtilis* leadtree bean extracts showed IC_{50} of 5,32 mg / ml and the MIC of 27,36 mg / ml while the probit curve of *Escherichia coli* leadtree bean extracts showed IC_{50} of 5,73 mg / ml and the MIC at 28,65 mg / ml.



RINGKASAN

Aktivitas Antioksidan dan Antibakteri Ekstrak Biji Lamtoro (*Leucaena leucocephala*); Shelvy Khadijah Usman; 121710101032; 2016; 63 halaman; Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

Lamtoro (*Leucaena leucocephala*) merupakan tanaman liar yang banyak ditemukan hampir di seluruh Indonesia. Buah lamtoro mengandung 15-30 biji yang terletak melintang dalam polongan. Secara empiris, biji lamtoro sering digunakan sebagai obat tradisional, salah satunya untuk mengobati cacangan dan menyembuhkan luka. Biji lamtoro mengandung beberapa komponen aktif yaitu alkaloid, saponin, flavanoid, mimosine, dan tanin. Biji lamtoro memiliki potensi sebagai senyawa antioksidan dan antibakteri alami. Saat ini banyak perhatian terhadap senyawa antioksidan dan antibakteri alami. Penggunaan senyawa antioksidan dan antibakteri alami lebih disarankan daripada penggunaan senyawa antioksidan dan antibakteri sintetik karena dapat menimbulkan efek samping.

Berdasarkan penelitian sebelumnya, biji lamtoro yang diekstrak menggunakan etanol dan air mengandung senyawa flavonoid. Etanol dan air merupakan pelarut polar sehingga flavonoid yang juga bersifat semi polar hingga polar akan larut di dalam etanol dan air. Untuk mendapatkan senyawa flavonoid yang optimal dalam biji lamtoro harus menggunakan konsentrasi pelarut yang sesuai.

Penelitian ini dilakukan dalam empat tahapan, yaitu penelitian pendahuluan untuk menentukan metode ekstraksi, pembuatan bubuk ekstrak biji lamtoro, karakterisasi bubuk ekstrak dengan uji total polifenol (*Follin-Ciocalteau*) serta fraksinasi menggunakan kromatografi kolom, analisis aktivitas antioksidan (*DPPH scavenging activity*), dan analisis aktivitas antibakteri menggunakan metode dilusi cair serta penentuan konsentrasi hambat minimum.

Hasil penelitian menunjukkan bubuk ekstrak biji lamtoro yang memiliki kriteria sesuai adalah pada penggunaan etanol 50% sebagai pelarut dengan total

polifenol sebesar 220,46 mgGAE/ml. Pengujian aktivitas antibakteri metode dilusi cair pada bakteri gram (+) yaitu *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus aureus* menghasilkan hambatan pada fraksi nomor 15 dan pada bakteri gram (-) yaitu *Eschericia coli* dan *Salmonella thypimurrium* menghasilkan hambatan pada fraksi nomor 7. Kurva probit *Bacillus subtilis* dengan ekstrak biji lamtoro menghasilkan IC₅₀ sebesar 5,32 mg/ml dan KHM sebesar 27,36 mg/ml sedangkan pada Kurva probit *Eschericia coli* dengan ekstrak biji lamtoro menghasilkan IC₅₀ sebesar 5,73 mg/ml dan KHM sebesar 28,65 mg/ml.



PRAKATA

Rasa syukur kehadiran Allah SWT yang tak pernah lupa melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya yang luar biasa besar, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Aktivitas Antioksidan dan Antibakteri Ekstrak Biji Lamtoro (*Leucaena leucocephala*)” dengan baik. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) di Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari dukungan serta bantuan dari berbagai pihak. Oleh karenanya penulis menyampaikan rasa terima kasih yang teramat dalam kepada:

1. Dr. Yuli Witono, S.TP, M.P., selaku Dekan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember;
2. Ir. Giyarto, M.Sc., selaku Ketua Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember;
3. Dr. Ir. Sony Suwasono, M.App.Sc. selaku dosen pembimbing utama yang telah meluangkan waktu, pikiran dan perhatian dalam membimbing penelitian skripsi ini;
4. Ir. Wiwik Siti Windrati, M.P., selaku dosen pembimbing anggota yang telah memberikan arahan dan perbaikan dalam penyusunan skripsi ini;
5. Prof. Toshifumi Sakaguchi, selaku dosen pembimbing selama program *student exchange* di Prefectural University of Hiroshima
6. Ir. Mukhammad Fauzi, M.Si. dan Ir. Yhulia Praptiningsih S, M.S., selaku tim penguji yang telah memberikan kritik, saran, serta bimbingan yang membangun dalam perbaikan penulisan skripsi ini;
7. Umik Ifa, Abi Farid dan Adikku Fira terima kasih atas segala doa, kasih sayang, semangat dan motivasi yang tak terhingga dan sangat luar biasa;

8. Rizki, Victoria, Nozomi, Natsuki, Umakosi, Cinami, Mai, Seina, Yura, dan Sayaka terima kasih untuk semangat dan segala bantuannya pada saat penelitian hingga skripsi ini selesai;
9. Teman-teman THP A 2012 (CAZPER) terima kasih atas segala doa, semangat, bantuan dan motivasinya;
10. Teman-teman Himagihasta dan UK PSM Symphony Choir terima kasih atas cerita, segala doa, semangat, dan kasih sayang;
11. Keluarga, dan sahabat-sahabat THP dan TEP 2012 yang telah berbagi kisah, suka duka, dan pengalaman selama masa perkuliahan;
12. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu yang telah memberikan dukungan serta membantu pelaksanaan penelitian skripsi ataupun dalam penulisan skripsi sehingga dapat terselesaikan dengan baik.

Penulis sadar bahwa skripsi ini jauh dari kata sempurna dan memiliki banyak kesalahan. Penulis berharap kritik dan saran yang membangun dari pembaca demi sempurnanya tulisan ini. Semoga skripsi ini dapat menambah pengetahuan bagi pembaca.

Jember , November 2016

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN PERSEMBAHAN	ii
HALAMAN MOTTO	iii
HALAMAN PERNYATAAN	iv
HALAMAN PEMBIMBING	v
HALAMAN PENGESAHAN	vi
SUMMARY	vii
RINGKASAN	ix
PRAKATA	xi
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Biji Lamtoro (<i>Lucaena leucocephala</i>)	4
2.2 Ekstraksi	6
2.3 Fraksinasi	8
2.4 Bakteri Patogen	9
2.4.1 <i>Bacillus subtilis</i>	9
2.4.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	10
2.4.3 <i>Salmonella thypimurrium</i>	10
2.4.4 <i>Eschericia coli</i>	10

2.5 Antioksidan	11
2.6 Antibakteri	12
2.7 Metode Pengujian Antibakteri	13
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	14
3.1 Tempat dan Waktu Penelitian.....	14
3.2 Bahan dan Alat Penelitian	14
3.2.1 Bahan Penelitian	14
3.2.2 Alat Penelitian.....	14
3.3 Pelaksanaan Penelitian.....	15
3.3.1 Rancangan Penelitian.....	15
3.3.2 Prosedur Pengamatan.....	18
3.4 Analisis Data.....	23
BAB 4. PEMBAHASAN.....	24
4.1 Pemilihan Metode Ekstraksi.....	24
4.2 Total Polifenol CEL.....	26
4.3 Analisis LC-MS (<i>Liquid Chromatography-Mass Spectra</i>).....	27
4.4 Aktivitas Antioksidan Fraksi Ekstrak Biji Lamtoro.....	28
4.5 Aktivitas Antibakteri Ekstrak Biji Lamtoro.....	29
BAB 5. PENUTUP.....	39
5.1 Kesimpulan.....	39
5.2 Saran	39
DAFTAR PUSTAKA.....	40

DAFTAR TABEL

	Halaman
3.1 Cara pembuatan suspensi mikroba.....	20

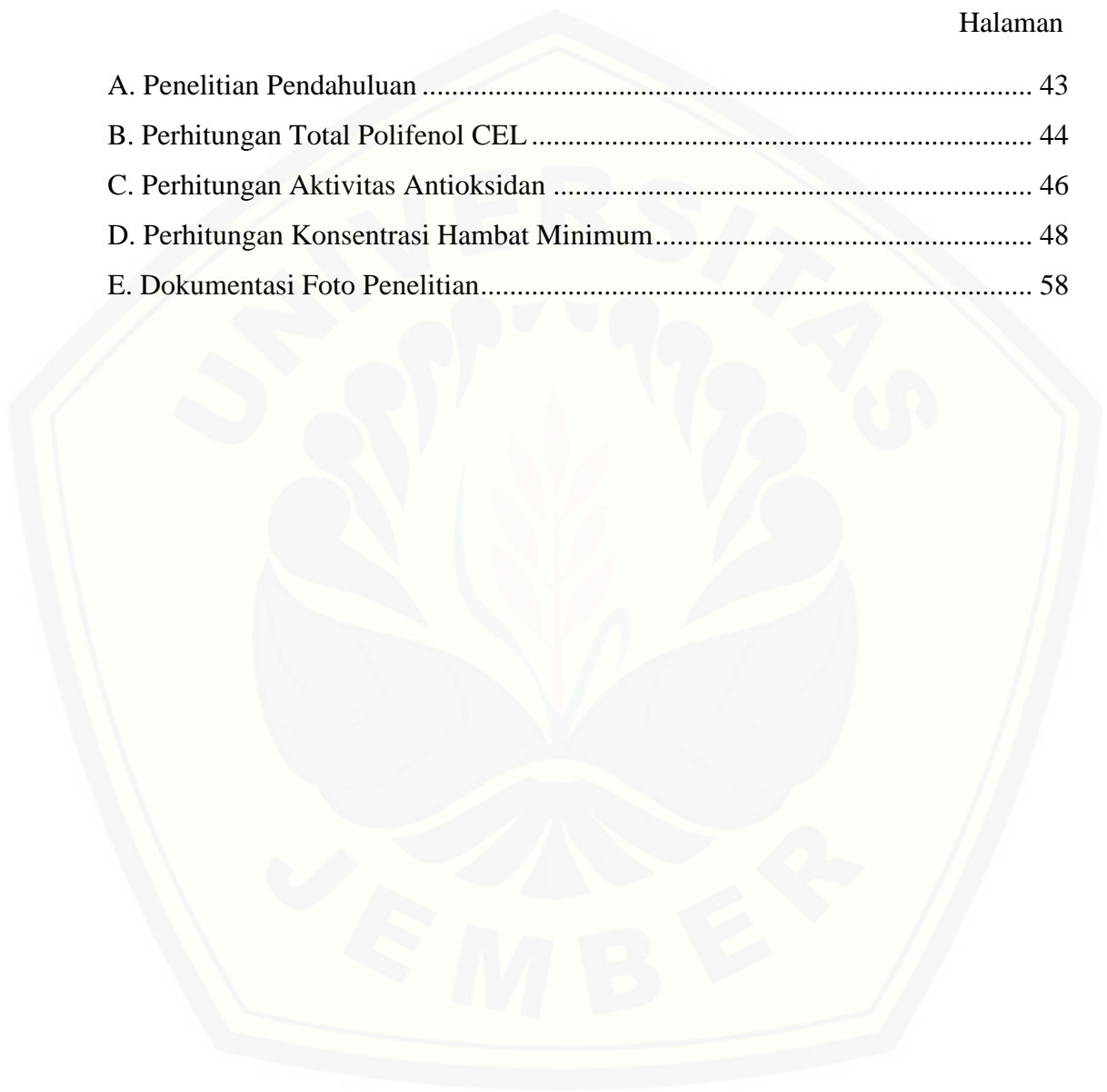


DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Tanaman Lamtoro	5
3.1 Pembuatan bubuk ekstrak biji lamtoro.....	15
3.2 Pembuatan dan karakterisasi CEL	16
3.3 Fraksinasi CEL.....	17
3.4 Uji KHM dan IC50	22
4.1 Total Polifenol CEL pada suhu berbeda	25
4.2 Total Polifenol CEL	26
4.3 MS- <i>Chromatography</i>	27
4.4 MS- <i>Spectrum</i>	28
4.5 Aktivitas Antioksidan Fraksi CEL.....	29
4.6 Kurva Reguler Penghambatan <i>Bacillus subtilis</i>	30
4.7 Kurva Logaritmik Penghambatan <i>Bacillus subtilis</i>	31
4.8 Kurva Probit Penghambatan <i>Bacillus subtilis</i>	32
4.9 Kurva Reguler Penghambatan <i>Eschericia coli</i>	33
4.10 Kurva Logaritmik Penghambatan <i>Eschericia coli</i>	34
4.11 Kurva Probit Penghambatan <i>Eschericia coli</i>	35
4.12 Kurva Penghambatan pertumbuhan Bakteri Patogen	36
4.13 Penghambatan Bakteri Patogen Pada Berbagai Fraksi	37

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Penelitian Pendahuluan	43
B. Perhitungan Total Polifenol CEL	44
C. Perhitungan Aktivitas Antioksidan	46
D. Perhitungan Konsentrasi Hambat Minimum.....	48
E. Dokumentasi Foto Penelitian.....	58



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Lamtoro (*Leucaena leucocephala*) merupakan tanaman liar yang banyak ditemukan hampir di seluruh Indonesia. Tanaman ini juga merupakan tanaman perdu yang digunakan sebagai peneduh tanaman kopi dan kakao. Lamtoro terdiri atas daun kecil yang rapat pada setiap cabangnya dan juga memiliki buah. Buah lamtoro mengandung biji yang terletak melintang dalam polongan. Biji lamtoro mirip dengan petai, namun berukuran lebih kecil dan berpenampang lebih kecil. Biji lamtoro saat ini dimanfaatkan sebagai pelengkap sayuran oleh masyarakat di Indonesia. Menurut Hariana (2008), biji lamtoro memiliki rasa sedikit pahit dan netral sehingga minat konsumsi masyarakat sampai saat ini masih rendah. Secara empiris, biji lamtoro sering digunakan sebagai obat tradisional, salah satunya untuk mengobati cacingan dan menyembuhkan luka (Putra, 2015).

Biji lamtoro mengandung beberapa komponen aktif yaitu alkaloid, saponin, flavanoid, mimosine, dan tanin. (Wijayakusuma, 2004 & Hidayat *et al.*, 2015). Senyawa flavonoid termasuk dalam metabolit sekunder dari tanaman yang mempunyai aktivitas antioksidan dan aktivitas biologi yang dapat berperan langsung sebagai antibiotika. Saat ini banyak perhatian terhadap senyawa antioksidan dan antibakteri alami. Penggunaan senyawa antioksidan dan antibakteri alami lebih disarankan daripada penggunaan senyawa antioksidan dan antibakteri sintetik karena dapat menimbulkan efek samping salah satunya menyebabkan resistensi terhadap bakteri (Refdanita, 2004). Senyawa antioksidan dan antibakteri yang berasal dari tanaman tidak bersifat karsinogenik dan dapat mengurangi biaya produksi apabila dibandingkan dengan senyawa antioksidan dan antibakteri yang sintetik. Biji lamtoro memiliki potensi sebagai antioksidan dan antibakteri alami. Oleh karena itu perlu dilakukan ekstraksi komponen aktif dalam biji lamtoro.

Setiap tanaman memiliki karakteristik unik, sehingga setiap tanaman membutuhkan kondisi ekstraksi yang berbeda untuk mendapatkan komponen aktif

dengan maksimal. Berdasarkan penelitian Sulistiyowati (2007) biji lamtoro yang diekstrak menggunakan etanol dan air mengandung senyawa flavonoid. Etanol dan air merupakan pelarut polar sehingga flavonoid yang juga bersifat semi polar hingga polar akan larut di dalam etanol dan air. Etanol memiliki kepolaran yang lebih rendah dibandingkan dengan air. Etanol dan air yang dicampurkan pada berbagai macam konsentrasi akan memiliki kepolaran yang berbeda. Untuk mendapatkan senyawa flavonoid dalam biji lamtoro harus menggunakan konsentrasi pelarut yang sesuai sehingga memiliki nilai kepolaran mirip. Penggunaan konsentrasi pelarut yang berbeda menunjukkan perbedaan yang jelas terhadap hasil ekstraksi (Soehendro *et al.*, 2015). Pada penelitian ini akan divariasi perbandingan antara pelarut etanol dan air sehingga dapat diketahui konsentrasi yang optimal dalam ekstraksi komponen flavonoid dalam biji lamtoro. Komponen flavonoid dari hasil ekstraksi biji lamtoro akan di analisis dengan LC-MS dan selanjutnya di fraksinasi serta diuji aktivitas antioksidan dan antibakterinya sehingga dapat diketahui berapa besar penghambatan terhadap radikal bebas dan bakteri patogen gram positif maupun gram negatif.

1.2 Perumusan Masalah

Biji lamtoro merupakan tanaman yang banyak ditemukan di Indonesia namun minat konsumsi terhadap sayuran ini masih sangat rendah. Biji lamtoro mengandung beberapa komponen senyawa aktif yang dapat dimanfaatkan sebagai antioksidan dan antibakteri alami, salah satu senyawanya yaitu flavanoid yang mempunyai aktivitas biologi langsung sebagai antibiotika dengan mekanisme kerja menghancurkan sel dinding bakteri (Manoi, 2009). Untuk mendapatkan senyawa flavonoid dalam biji lamtoro harus menggunakan konsentrasi pelarut yang sesuai. Etanol dan air yang dicampurkan pada berbagai macam konsentrasi akan memiliki kepolaran yang berbeda. Pada penelitian ini akan divariasi perbandingan antara pelarut etanol dan air sehingga dapat diketahui konsentrasi yang optimal dalam ekstraksi komponen flavonoid dalam biji lamtoro. Komponen flavonoid dari hasil ekstraksi biji lamtoro akan di analisis dengan LCMS dan selanjutnya di fraksinasi serta diuji aktivitas antioksidan dan antibakterinya

sehingga dapat diketahui berapa besar penghambatan terhadap radikal bebas dan konsentrasi daya hambat minimum dari bakteri patogen gram positif maupun gram negatif.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

- a. Mengetahui konsentrasi pelarut yang tepat untuk mengekstrakk senyawa bioaktif ekstrak biji lamtoro,
- b. Mengetahui aktivitas antioksidan ekstrak biji lamtoro,
- c. Mengetahui konsentrasi minimum ekstrak biji lamtoro untuk penghambatan bakteri, dan
- d. Mengetahui senyawa aktif yang terdapat dalam biji lamtoro.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah memberikan informasi manfaat biji lamtoro sebagai sumber antioksidan dan antibakteri alami.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Biji Lamtoro (*Lucaena leucocephala*)

Lamtoro atau petai cina (*Lucaena leucocephala*) merupakan tanaman liar yang banyak ditemukan hampir di seluruh Indonesia (Soeryoko, 2011). Lamtoro ditanam sebagai peneduh tanaman kopi, penghasil kayu bakar, serta sumber pakan ternak yang lekas tumbuh. Lamtoro merupakan sejenis perdu dari suku *Fabaceae* (*Leguminosae*, polong-polongan), yang kerap digunakan dalam penghijauan lahan atau pencegahan erosi.

Menurut Loh KY (2008) berikut klasifikasi secara umum dari tumbuhan lamtoro.

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Fabales
Family	: Fabaceae
Genus	: Lucaena
Spesies	: <i>Lucaena leucocephala</i>

Lamtoro memiliki batang pohon keras dan berukuran besar. Daunnya majemuk terurai dalam tangkai berbilang ganda. Bunganya berjambul warna putih dan buahnya mirip dengan buah petai (*Parkia speciosa*) tetapi ukurannya jauh lebih kecil dan berpenampang lebih tipis. Buah lamtoro termasuk buah polong yang dalam polongnya berisi biji-biji kecil dengan jumlah cukup banyak. Buah polong berbentuk pita lurus, pipih dan tipis dengan sekat-sekat diantara biji (Putra, 2015). Buah lamtoro mengandung 15-30 biji yang terletak melintang dalam polongan, dalam wikipedia disebutkan biji lamtoro berbentuk bulat telur dengan warna hijau yang berukuran 6–10 mm × 3-4,5 mm (**Gambar 2.1**).



Gambar 2.1 Tanaman Lamtoro (Dokumentasi Pribadi)

Biji lamtoro saat ini dimanfaatkan sebagai pelengkap sayuran oleh masyarakat di Indonesia. Menurut Hariana (2008), biji lamtoro memiliki rasa sedikit pahit dan netral. Secara empiris, biji lamtoro sering digunakan sebagai obat tradisional. Efek farmakologis Lamtoro diantaranya adalah menyembuhkan luka luar, abses paru, meluruhkan urine (diuretik), melancarkan darah, dan anti anti-inflamasi. Pada penelitian lain biji lamtoro mengatakan bahwa biji lamtoro mengandung galaktomanan dan lektin glukomanan yang merupakan suatu glikosida (Putra, 2015). Kandungan senyawa aktif biji lamtoro yaitu alkaloid, saponin, flavanoid, mimosine, dan tanin. (Wijayakusuma, 2004 & Hidayat *et al.*, 2015). Senyawa flavonoid termasuk dalam metabolit sekunder dari tanaman yang mempunyai aktivitas biologi yang dapat berperan langsung sebagai antibiotika dengan mekanisme kerja menghancurkan sel dinding bakteri (Manoi, 2009). Salah satu senyawa flavonoid pada biji lamtoro adalah isoflavon. Isoflavonoid adalah senyawa flavonoid yang merupakan salah satu komponen penyusun fitoestrogen. Senyawa ini terdistribusi secara luas pada berbagai bagian tanaman, seperti bagian akar, batang, daun maupun buah. Sebagai metabolit sekunder isoflavon banyak terdapat pada tanaman-tanaman khususnya dari golongan Leguminoceae. Isoflavon juga ditemukan pada berbagai tanaman yang banyak dikonsumsi manusia, termasuk biji-bijian dan padi-padian (Winarsi, 2005).

2.2 Ekstraksi

Ekstraksi menggunakan pelarut cair atau gas yang melarutkan benda cair, padat, atau gas yang menghasilkan sebuah larutan melalui suatu proses pemisahan suatu zat berdasarkan perbedaan kelarutannya. Berdasarkan pada hukum distribusi atau partisi dapat diketahui bahwa zat-zat tertentu lebih mudah larut dalam pelarut-pelarut tertentu yang dipengaruhi oleh konsentrasi iod, konstanta dielektrik, dan kepolaran. Pelarut merupakan cairan yang mampu melarutkan zat lain yang umumnya berbentuk padatan tanpa mengalami perubahan kimia. Dalam bentuk cairan dan padatan, tiap molekul saling terikat akibat adanya gaya tarik menarik antar molekul, gaya tarik menarik tersebut akan mempengaruhi pembentukan larutan. Apabila terdapat zat terlarut dalam suatu pelarut, maka partikel zat terlarut tersebut akan menyebar ke seluruh pelarut. Hal ini menyebabkan bentuk zat terlarut menyesuaikan dengan bentuk pelarutnya (Setiono, 1985).

Larutan terbentuk dari campuran zat-zat yang homogen, dimana pelarut memiliki komponen dengan jumlah yang lebih banyak daripada zat terlarut. Kemudahan partikel zat terlarut menggantikan molekul pelarut bergantung pada kekuatan relatif dari interaksi antara pelarut-pelarut, interaksi antara zat terlarut-zat terlarut, dan interaksi antara pelarut-zat terlarut. Jika tarik menarik zat terlarut-pelarut lebih kuat daripada tarik menarik pelarut-pelarut dan tarik menarik zat terlarut-terlarut, maka proses pelarutan akan berlangsung, proses ini disebut reaksi eksoterm. Jika interaksi zat terlarut-pelarut lebih lemah daripada interaksi pelarut-pelarut dan interaksi zat-zat terlarut maka proses ini disebut reaksi endoterm (Setiono, 1985).

Biasanya pelarut yang digunakan untuk melarutkan suatu zat adalah air. Ada beberapa hal yang memungkinkan pelarut selain air digunakan seperti melarutkan basa kuat dalam air yang akan membuat basa kuat bereaksi dengan air memproduksi OH^- . Pelarut organik merupakan pelarut yang umumnya mengandung atom karbon dalam molekulnya. Dalam pelarut organik, zat terlarut didasarkan pada kemampuan koordinasi dan konstanta dielektriknya. Pelarut

organik dapat bersifat polar dan non-polar bergantung pada gugus kepolaran yang dimilikinya. Pada proses kelarutan dalam pelarut organik, biasanya reaksi yang terjadi berjalan lambat sehingga perlu energi yang didapat dengan cara pemanasan untuk mengoptimalkan kondisi kelarutan. Larutan yang dihasilkan bukan merupakan konduktor elektrik. Contoh pelarut organik adalah alkohol, eter, ester, etil asetat, keton, dan sebagainya (Agoes,2007).

Pelarut dengan nilai permitivitas statis relatif (ϵ_r) lebih besar dari 15 (seperti kutub atau polarisasi) dapat dibagi menjadi protik dan aprotik. Pelarut protik melarutkan anion dengan kuat (larutan bermuatan negatif) melalui ikatan hidrogen. Air termasuk pelarut protik polar. Dalam reaksi kimia penggunaan polar protik pelarut mendukung mekanisme reaksi S_N1 . Reaksi S_N1 adalah sebuah reaksi substitusi dalam kimia organik. S_N1 adalah singkatan dari substitusi nukleofili dan "1" memiliki arti bahwa tahap penetapan laju reaksi ini adalah reaksi molekul tunggal. Reaksi ini melibatkan sebuah zat antara karbokation dan umumnya terjadi pada reaksi alkil halida sekunder ataupun tersier, atau dalam keadaan asam yang kuat, alkohol sekunder dan tersier.

Metode dasar dari ekstraksi adalah maserasi dan perkolasi. Biasanya metode ekstraksi dipilih berdasarkan beberapa faktor seperti sifat dari bahan dan daya penyesuaian dengan tiap macam metode ekstraksi dan kepentingan dalam memperoleh ekstrak yang sempurna atau mendekati sempurna. Sifat dari bahan merupakan faktor utama yang harus dipertimbangkan dalam memilih metode ekstraksi. Maserasi merupakan metode sederhana yang paling banyak digunakan. Cara ini sesuai, baik untuk skala kecil maupun skala industri (Agoes,2007). metode maserasi dapat menghindari rusaknya senyawa-senyawa yang bersifat termolabil. Berikut beberapa faktor yang mempengaruhi ekstraksi (maserasi) :

- a. Jenis pelarut mempengaruhi senyawa yang tersari, jumlah solut yang terekstrak dan kecepatan ekstraksi. Dalam dunia farmasi dan produk bahan obat alam, pelarut etanol, air dan campuran keduanya lebih sering dipilih karena dapat diterima oleh konsumen.
- b. Perbandingan simplisia-pelarut, jika rasio pelarut-bahan baku besar maka akan memperbesar pula jumlah senyawa yang terlarut. Akibatnya laju ekstraksi akan

- semakin meningkat. Akan tetapi semakin banyak pelarut, proses ekstraksi juga semakin mahal. digunakan maka proses hilirnya akan semakin mahal.
- c. Kenaikan temperatur akan meningkatkan jumlah zat terlarut ke dalam pelarut. Temperatur pada proses ekstraksi memang terbatas hingga suhu titik didih pelarut yang digunakan.
 - d. Interaksi antara konstituen pelarut dan struktur bahan, pengadukan pada zat pelarut adalah penting karena akan menaikkan proses difusi, sehingga menaikkan perpindahan material dari permukaan partikel ke zat pelarut.
 - e. Lipofilisitas (dalam hal menggunakan pelarut campur)
 - f. Ukuran partikel mempengaruhi laju ekstraksi dalam beberapa hal. Semakin kecil ukurannya, semakin besar luas permukaan antara padat dan cair; sehingga laju perpindahannya menjadi semakin besar. Dengan kata lain, jarak untuk berdifusi yang dialami oleh zat terlarut dalam padatan adalah kecil. Laju ekstraksi meningkat apabila ukuran partikel bahan baku semakin kecil. Dalam arti lain, rendemen ekstrak akan semakin besar bila ukuran partikel semakin kecil.

2.3 Fraksinasi

Fraksinasi adalah suatu proses pemisahan senyawa-senyawa berdasarkan tingkat kepolaran. Proses pemisahan fraksinasi pada kuantitas tertentu dari campuran (padat, cair, terlarut, suspensi atau isotop) dibagi dalam beberapa jumlah kecil (fraksi) komposisi perubahan menurut kelandaian. Jumlah dan senyawa yang dapat dipisahkan menjadi fraksi berbeda-beda tergantung pada jenis tumbuhan. Dalam melakukan fraksinasi digunakan dua metode yaitu dengan menggunakan corong pisah dan kromatografi kolom.

Kromatografi kolom yang digunakan yaitu Toyopearl HW-40 yang merupakan resin adalah polimer metakrilat terhidroksilasi. Kromatografi biasanya digunakan untuk penghilangan garam yang tinggi dan pertukaran penyangga. Kromatografi ini juga dapat menghilangkan surfaktan seperti Triton X100 dari larutan protein. Hal ini sering digunakan untuk biomolekul yang lebih kecil dengan batas hingga 10.000 Da. Kromatografi dikemas dalam 20% (v/v) etanol.

Kromatografi juga dapat memisahkan RNA dari protein, oligosakarida dengan derajat polimerisasi, dan mengisolasi agglutinin dengan mempertahankan titer hemaglutinasi tinggi (Tosoh, 2016).

2.4 Bakteri Patogen

Bakteri merupakan uniseluler, pada umumnya tidak berklorofil, ada beberapa yang fotosintetik dan produksi aseksualnya secara pembelahan dan bakteri mempunyai ukuran sel kecil dimana setiap selnya hanya dapat dilihat dengan bantuan mikroskop. Bakteri pada umumnya mempunyai ukuran sel 0,5-1,0 μm kali 2,0-5,0 μm , dan terdiri dari tiga bentuk dasar yaitu bentuk bulat atau kokus, bentuk batang atau *Bacillus*, bentuk spiral. (Dwidjoseputro,1985).

Berdasarkan pewarnaan gram, bakteri dapat dibedakan menjadi dua golongan yaitu bakteri gram positif dan gram negatif. Bakteri gram positif yang umum dikenal adalah *Bacillus* dan *Staphylococcus*. Sedangkan bakteri gram negatif yang umum dikenal adalah *Eschericia coli* dan *Salmonella*. Kedua golongan tersebut mempunyai dinding sel yang berbeda-beda susunan kimianya. Dinding sel bakteri gram negatif lebih rumit susunannya daripada bakteri gram positif.

2.4.1 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis memerlukan suhu optimal dalam pertumbuhannya yakni antara 28 – 38°C. Apabila bakteri tersebut diisolasi dari seorang penderita, suhu optimal yang diperlukan adalah 37 C, pH optimum pertumbuhannya adalah 7,4. Bakteri *Bacillus subtilis* terdapat pada hidung, mulut, tenggorokan, pori-pori, permukaan kulit, kelenjar keringat dan saluran usus. Infeksi *Bacillus subtilis* dapat berupa jerawat, bisul dan luka (Jawetz *et al.*, 2001). *Bacillus subtilis* dapat menyebabkan kerusakan pada makanan kaleng yang juga dapat mengakibatkan gastroenteritis pada manusia yang mengkonsumsinya. Oleh sebab itu makanan yang disimpan dalam waktu lama perlu dilakukan pengawetan agar tidak membahayakan konsumen (Pratiwi, 2008).

2.4.2 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus merupakan bakteri gram positif yang bersifat aerob atau anaerob fakultatif dan tahan hidup dalam lingkungan yang mengandung garam dengan konsentrasi tinggi, misalnya NaCl 10%. *Staphylococcus* berbentuk bulat atau kokus dengan diameter 0,4-1,2 mikro meter. Hasil pewarnaan yang berasal dari perbenihan padat akan memperlihatkan susunan bakteri yang bergerombol seperti buah anggur (Wulandari, 2014).

Staphylococcus aureus memerlukan suhu optimal dalam pertumbuhannya yakni antara 28 – 38°C. Apabila bakteri tersebut diisolasi dari seorang penderita, suhu optimal yang diperlukan adalah 37 C, pH optimum pertumbuhannya adalah 7,4. Bakteri *Staphylococcus aureus* terdapat pada hidung, mulut, tenggorokan, pori-pori, permukaan kulit, kelenjar keringat dan saluran usus. Infeksi *Staphylococcus aureus* dapat berupa jerawat, bisul dan luka (Jawetz *et al.*, 2001).

2.4.3 *Salmonella thypimurrium*

Salmonella thypimurrium merupakan bakteri batang gram negatif dan tidak membentuk spora, serta memiliki kapsul. Bakteri ini juga bersifat fakultatif, dan sering disebut sebagai facultative intra-cellular parasites. Dinding selnya terdiri atas murein, lipoprotein, fosfolipid, protein, dan lipopolisakarida (LPS) dan tersusun sebagai lapisan-lapisan (Dzen, 2003). *Salmonella typhi* termasuk bakteri yang non motil atau tidak dapat bergerak, tetapi dapat mendekarboksilasi ornitin, dan tidak memproduksi (Wulandari, 2014)

Ukuran panjangnya bervariasi, dan sebagian besar memiliki peritrichous flagellasehingga bersifat motil. *Salmonella thypi* membentuk asam dan gas dari glukosa dan mannososa. Organisme ini juga menghasilkan gas H₂S, namun hanya sedikit. Bakteri ini tahan hidup dalam air yang membeku untuk waktu yang lama (Brooks *et al.*, 2005).

2.4.4 *Eschericia coli*

Eschericia coli merupakan bakteri batang gram negatif dan tidak membentuk spora, serta memiliki kapsul. Bakteri ini juga bersifat fakultatif, dan sering disebut sebagai facultative intra-cellular parasites. Dinding selnya terdiri

atas murein, lipoprotein, fosfolipid, protein, dan lipopolisakarida (LPS) dan tersusun sebagai lapisan-lapisan (Dzen, 2003).

Struktur sel *Escherichia coli* dikelilingi oleh membran sel, terdiri dari sitoplasma yang mengandung nukleoprotein. Membran sel *Escherichia coli* ditutupi oleh dinding sel berlapis kapsul. Flagela dan pili *Escherichia coli* menjulur dari permukaan sel (Tizard 2004). Tiga struktur antigen utama permukaan yang digunakan untuk membedakan serotipe golongan *Escherichia coli* adalah dinding sel, kapsul dan flagela. Dinding sel *Escherichia coli* berupa lipopolisakarida yang bersifat pirogen dan menghasilkan endotoksin serta diklasifikasikan sebagai antigen O. Kapsul *Escherichia coli* berupa polisakarida yang dapat melindungi membran luar dari fagositik dan sistem komplemen, diklasifikasikan sebagai antigen K. Flagela *Escherichia coli* terdiri dari protein yang bersifat antigenik dan dikenal sebagai antigen H. Faktor virulensi *Escherichia coli* juga disebabkan oleh enterotoksin, hemolisin, kolisin, 6 siderophor, dan molekul pengikat besi (aerobaktin dan entrobaktin) (Quinn et al. 2002).

Bakteri *Escherichia coli* dapat membentuk koloni pada saluran pencernaan manusia maupun hewan dalam beberapa jam setelah kelahiran. Faktor predisposisi pembentukan koloni ini adalah mikroflora dalam tubuh masih sedikit, rendahnya kekebalan tubuh, faktor stres, pakan, dan infeksi agen patogen lain. Kebanyakan *Escherichia coli* memiliki virulensi yang rendah dan bersifat oportunistik (Songer & Post, 2005).

2.5 Antioksidan

Antioksidan dalam pengertian kimia adalah senyawa pemberi elektron (electron donors) dan secara biologis antioksidan merupakan senyawa yang mampu mengatasi dampak negatif oksidan dalam tubuh seperti kerusakan elemen vital sel tubuh (Kanisus, 2007). Keseimbangan antara oksidan dan antioksidan sangat penting karena berkaitan dengan kerja fungsi sistem imunitas tubuh, terutama untuk menjaga integritas dan berfungsinya membran lipid, protein sel, dan asam nukleat, serta mengontrol transduksi signal dan ekspresi gen dalam sel imun. Produksi antioksidan di dalam tubuh manusia terjadi secara alami untuk

mengimbangi produksi radikal bebas. Antioksidan tersebut kemudian berfungsi sebagai sistem pertahanan terhadap radikal bebas, namun peningkatan produksi radikal bebas yang terbentuk akibat faktor stress, radiasi UV, polusi udara dan lingkungan mengakibatkan sistem pertahanan tersebut kurang memadai, sehingga diperlukan tambahan antioksidan dari luar. Antioksidan di luar tubuh dapat diperoleh dalam bentuk sintesis dan alami. Antioksidan sintetis seperti *buthylatedhydroxytoluene* (BHT), *buthylated hidroksianisol* (BHA) dan *tert-butylhydroquinone* (TBHQ) secara efektif dapat menghambat oksidasi. Namun, penggunaan antioksidan sintetis dibatasi oleh aturan pemerintah karena, jika penggunaannya melebihi batas justru dapat menyebabkan racun dalam tubuh dan bersifat karsinogenik, sehingga dibutuhkan antioksidan alami yang aman. Salah satu sumber potensial antioksidan alami adalah tanaman karena mengandung senyawa flavonoid, klorofil dan tanin (Lie Jin, 2012). Antioksidan ini menghambat pembentukan senyawa oksigen reaktif dengan cara pengelatan metal, atau dirusak pembentukannya. Prinsip kerja sistem antioksidan non enzimatis yaitu dengan cara memotong reaksi oksidasi berantai dari radikal bebas atau dengan menangkap radikal tersebut, sehingga radikal bebas tidak akan bereaksi dengan komponen seluler.

2.6 Antibakteri

Menurut Aulia (2008), antibakteri adalah obat atau senyawa kimia yang digunakan untuk memusnahkan bakteri, khususnya bakteri yang bersifat merugikan manusia. Beberapa istilah yang digunakan untuk menjelaskan proses pembasmian bakteri yaitu germisid, bakterisid, bakteristatik, antiseptik, desinfektan. Mekanisme kerja obat antimikroba tidak sepenuhnya dimengerti. Namun mekanisme aksi ini dapat dikelompokkan dalam empat hal utama yaitu penghambatan terhadap sintesis dinding sel, penghambatan terhadap fungsi membran sel, penghambatan terhadap sintesis protein, penghambatan terhadap sintesis asam nukleat.

Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri yaitu dengan membentuk kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut dengan dinding mikroba.

Kemungkinan lain adalah flavonoid berperan secara langsung dengan mengganggu fungsi sel mikroorganisme dan penghambatan siklus sel mikroba (Ambarwati, 2007). Mekanisme penghambatan mikroorganisme oleh senyawa antimikroba dapat disebabkan oleh beberapa faktor, antara lain gangguan pada senyawa penyusun dinding sel, peningkatan permeabilitas membran sel yang dapat menyebabkan kehilangan komponen penyusun sel, menginaktivasi enzim, dan destruksi atau kerusakan fungsi material genetik. Kemampuan senyawa antimikroba untuk menghambat aktivitas pertumbuhan mikroba dalam sistem pangan dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya temperatur, pH (keasaman), ketersediaan oksigen, dan interaksi/sinergi antara beberapa faktor tersebut (Maulita Cut Nuria *et al.*, 2009).

Menurut Simorangkir *et al.* (2013), berdasarkan mekanisme kerjanya antibiotik dibagi menjadi beberapa kelompok yaitu menghambat proses sintesis dinding sel. Tekanan osmotik dalam sel mikroba lebih tinggi dari pada di luar sel, sehingga kerusakan dinding sel mikroba akan menyebabkan terjadinya lisis yang merupakan dasar dari efek bakterisidal terhadap mikroba yang peka. Bakterisidal membunuh mikroba hanya 95% sedangkan antibakteri yang bersifat bakteriostatik dapat membunuh mikroba hingga 99% bahkan hingga tidak ada koloni yang terlihat (Ngajow *et al.*, 2013).

2.7 Metode Pengujian Antibakteri

Metode ini mengukur MIC (*minimum inhibitory concentration* atau kadar hambat minimum, KHM) dan MBC (*minimum bactericidal concentration* atau kadar bunuh minimum, KBM). Cara yang dilakukan adalah dengan membuat seri pengenceran agen antimikroba pada medium cair yang ditambahkan dengan mikroba uji. Larutan uji agen antimikroba pada kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan mikroba uji ditetapkan sebagai KHM. Larutan yang ditetapkan sebagai KHM tersebut selanjutnya dikultur ulang pada media cair tanpa penambahan mikroba uji ataupun agen antimikroba dan diinkubasi selama 18-24 jam. Media cair yang tetap terlihat jernih setelah inkubasi ditetapkan sebagai KBM (Pratiwi, 2008).

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Kimia dan Biokimia Hasil Pertanian, Laboratorium Manajemen Agroindustri, Laboratorium Mikrobiologi Pangan dan Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember dan Laboratorium Mikrobiologi Prefectural University of Hiroshima. Waktu penelitian pada bulan Januari - Juli 2016.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan adalah biji lamtoro segar dan tua (warna masih tetap hijau) dari sekitar Kabupaten Jember, Aquades, DPPH, follin, trolox, asam galat, buffer asam sitrat, Na_2CO_3 , NB (*Nutrient Broth*), NA (*Nutrient Agar*), media 702 (*hipolypeptone, yeast extract, MgSO₄.7H₂O*), TSA, LB, TOYOPEARL® HW-40S, etanol 96%, etanol teknis 98%, DMSO 2%, larutan garam fisiologis 0,85%, kultur bakteri *E.coli*, *Bacillus subtilis* diperoleh dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi Pangan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Jember, kultur bakteri *Salmonella thypi*, *E.coli* JM109, *Bacillus subtilis* IFO13719, dan *Staphylococcus aureus* diperoleh dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi Prefectural University of Hiroshima.

3.2.2 Alat Penelitian

Alat yang digunakan adalah peralatan gelas, *Shaker waterbath* (Memmert D-91126, Jerman), *rotary evaporator* (Butchi, German), oven vacuum (Lab-line Instruments), penangas air (Medline MS300HS, German), spektrofotometer (Thermo Scientific Genesys 10S UV-VIS, China) pipet mikro (Biohit 12636255, Jerman), *blue tip*, *yellow tip*, bunsen, vortex (Medline VM-3000-MD, German), cawan petri, *magnetic stirrer* (Medline MS300HS, German), *laminar air flow* (Crumair, Spanyol), inkubator (Heraeus Inst B6200, Jerman), *colony counter*

(Stuart Scientific), autoklaf (Hirayama HL 36, Jepang), neraca analitik (Ohaus, USA) dan ose.

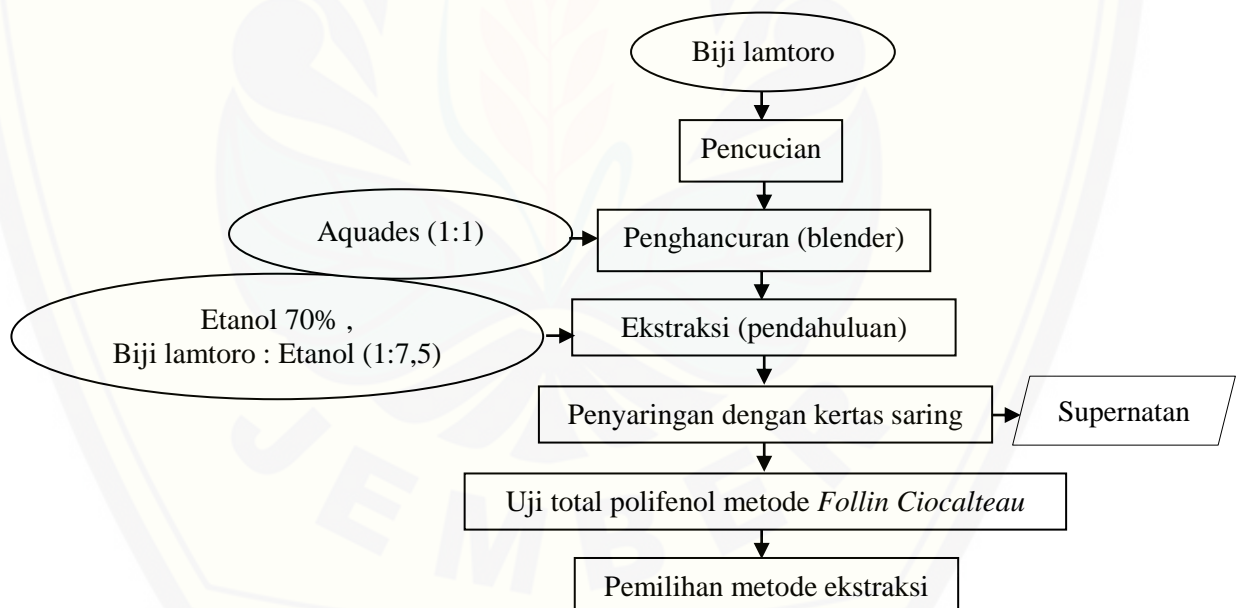
3.3 Pelaksanaan Penelitian

3.3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang terdiri dari empat tahap yaitu:

a. Tahap Pertama

Penelitian tahap pertama adalah penelitian pendahuluan untuk mengetahui kondisi ekstraksi yang optimal untuk mendapatkan komponen aktif yang ada pada biji lamtoro. Pemilihan kondisi ekstraksi berdasarkan parameter suhu dan pengaruh agitasi pada saat ekstraksi. Secara umum prosedur penelitian pendahuluan dapat dilihat pada **Gambar 3.1**



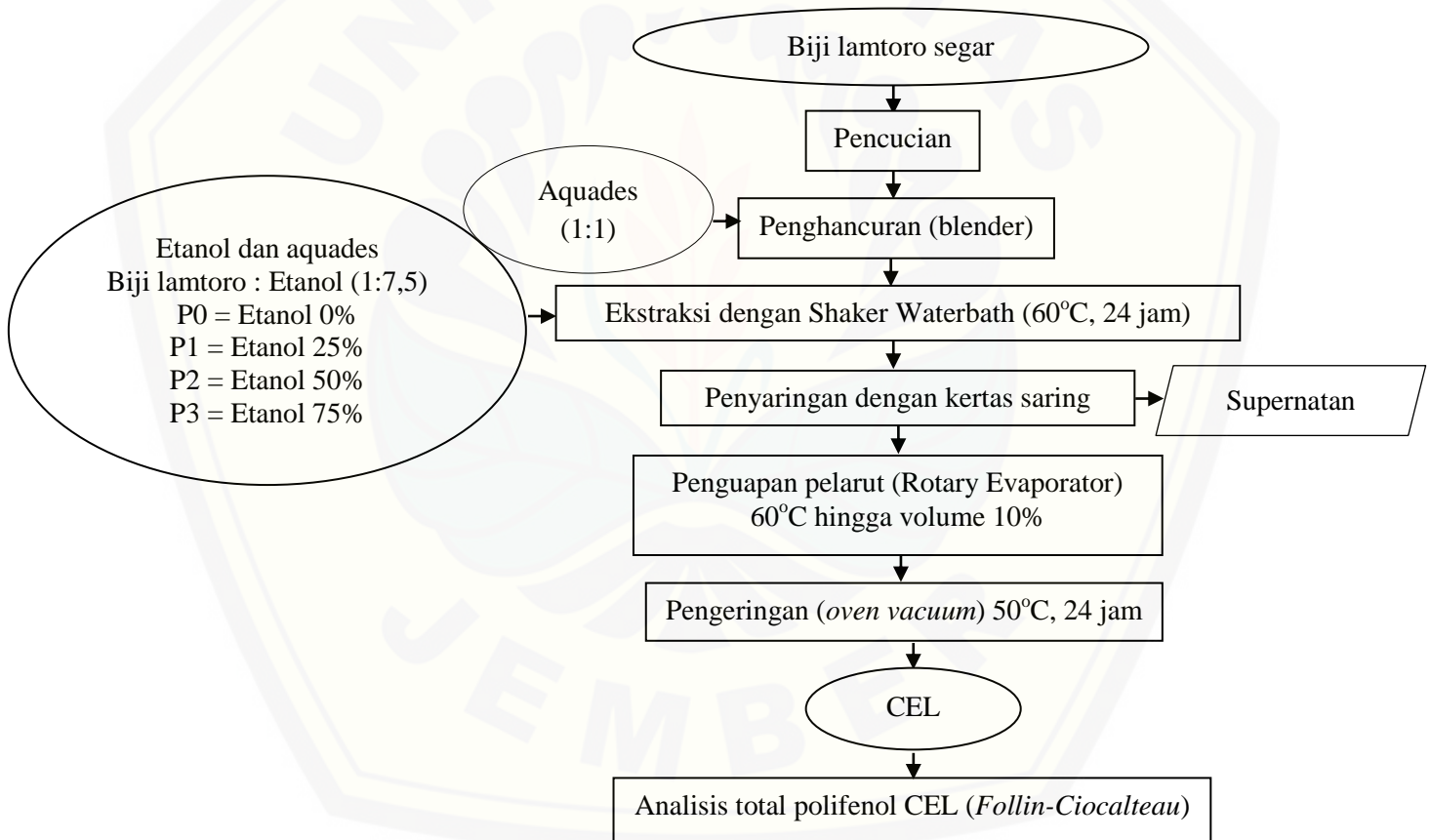
Gambar 3.1 Pembuatan bubuk ekstrak biji lamtoro

Penelitian pendahuluan dilakukan untuk mengetahui kondisi suhu yang optimal dan pengaruh agitasi dalam ekstraksi. Sampel diberikan perlakuan ekstraksi pada suhu ruang dan suhu 60°C, selanjutnya sampel di maserasi dengan

agitasi dan tanpa agitasi. Hasil penelitian pendahuluan akan digunakan pada prosedur ekstraksi dalam penelitian utama.

b. Tahap Kedua

Penelitian tahap kedua adalah pembuatan bubuk ekstrak biji lamtoro atau *Crude Extract Powder of Leadree bean* (CEL) dan karakterisasi yang meliputi total polifenol. Prosedur ekstraksi menyesuaikan kondisi dari hasil penelitian tahap pertama yang dilanjutkan dengan karakterisasi CEL yang dapat dilihat pada **Gambar 3.2**



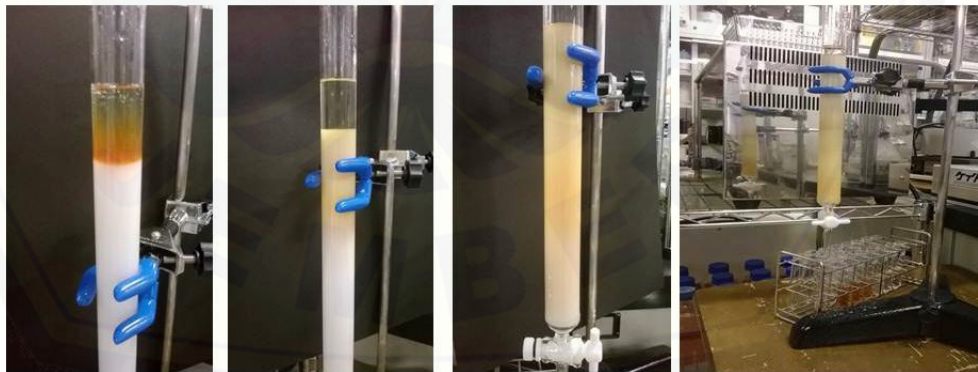
Gambar 3.2 Pembuatan dan karakterisasi Crude Extract Powder of Leadree bean (CEL)

c. Tahap Ketiga

Pada tahap ketiga dilakukan analisis sampel yang memiliki total polifenol paling tinggi menggunakan LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectra*). Preparasi sampel yaitu dengan cara melarutkan dalam etanol 96% dengan konsentrasi 1000 ppm, selanjutnya sampel di injeksi sebanyak 5 μ l pada alat Shimadzu LC-MS 2020 dengan kondisi fase gerak gradient pada menit ke 0 *mobile phase* B 0%, pada menit ke-60 *mobile phase* B 100%. Column yang digunakan ada dua, pada column 1 yaitu Shim-Pack GVP-ODS (5Lx2,0), column 2 yaitu Shim-Pack VP-ODS (250Lx4,6). *Mobile phase* A yaitu water formic acid 0,1%, *mobile phase* B yaitu acetonitrile. Kecepatan alir sampel sebesar 0,3ml/menit pada suhu 30°C. Data yang dihasilkan berupa scan berat molekul setiap zat yang terkandung di dalam sampel.

d. Tahap Keempat

Penelitian tahap keempat adalah fraksinasi CEL menggunakan *liquid chromatography* HW-40S yang merupakan polimer metakrilat terhidroksilasi dengan metode *flask chromatography*. Berikut ini merupakan gambar dari proses fraksinasi.



Gambar 3.3 Fraksinasi CEL

Preparasi *liquid chromatography* yaitu menyiapkan larutan etanol teknis 20%, selanjutnya sebanyak 1/3 bagian dari tabung diisi dengan etanol 20%, selanjutnya ditambahkan *liquid chromatography* hingga 2/3

bagian, tunggu semalam hingga *liquid chromatography* siap digunakan. Preparasi sampel yaitu menyiapkan sampel CEL perlakuan P2 sebanyak 0,5 gram dilarutkan dalam 5ml aquades, selanjutnya diambil 3,5ml untuk satu kali ulangan. Selanjutnya dimasukkan dalam *flask chromatography* secara perlahan menggunakan pipet tetes melalui bagian dinding tabung supaya tidak merusak struktur *chromatography* dan dibawah tabung *flask* disiapkan tabung reaksi untuk menampung hasil fraksinasi. Setiap tabung reaksi berisi 4ml cairan hasil fraksinasi. Secara berkala juga ditambahkan etanol 20% setelah penambahan sampel hingga tabung *flask* tidak berwarna maka fraksinasi dihentikan.

e. Tahap Kelima

Penelitian tahap kelima adalah uji aktivitas antioksidan dan uji penghambatan pertumbuhan bakteri dengan metode dilusi agar dan dilusi cair dari CEL terhadap pertumbuhan bakteri *Salmonella thypi*, *E.coli*, *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus aureus*. Pada pengujian penghambatan bakteri dilakukan peremajaan bakteri dan pembuatan media terlebih dahulu yang merupakan tahapan persiapan pada uji penghambatan pertumbuhan bakteri.

3.3.2 Prosedur Pengamatan

a. Total Polifenol (Metode *Follin-ciocalteau*)

Pembuatan kurva standar untuk perhitungan polifenol dibuat dengan cara menggunakan larutan asam galat konsentrasi. Pembuatan asam galat pada konsentrasi (0; 125; 250; 500; 1000; 2000; 4000; 8000) μ M, lalu diambil 0,04ml dalam 8 tabung reaksi berbeda dan masing-masing ditambahkan 0,8 ml *reagen Follin Ciocalteu* yang telah diencerkan 10 kali pada masing-masing tabung reaksi. Kemudian divortex dan didiamkan selama 5 menit. Selanjutnya ditambahkan 0,8 ml larutan Na_2CO_3 7% dan 0,72 ml aquades (total volume 4 ml). Kemudian tabung reaksi yang berisi larutan kurva standar tersebut ditutup dengan aluminium foil dan didiamkan ditempat gelap selama 60 menit, kemudian dilakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 765 nm.

Analisis total polifenol ditentukan secara spektrofotometri menggunakan metode *Follin-Ciocalteau* (Singelton dan Rossi, 1965). Pada penelitian ini sampel yang diuji berbentuk serbuk dan cair. Pada sampel serbuk sebanyak 0,02 gram sampel dilarutkan dalam 10 ml aquades lalu di *vortex*. Sebanyak 0,04 ml sampel ditambah 0,8 ml *reagen Follin-Ciocalteau* yang telah diencerkan 10 kali dan biarkan 5 menit, selanjutnya tambahkan 0,8ml larutan Na_2CO_3 7% lalu divortex dan diamkan selama 60 menit dengan cara ditutup semua lapisan tabung reaksi menggunakan aluminium foil. Selanjutnya dilakukan pengukuran absorbansi pada panjang gelombang 765 nm.

Analisis kandungan total polifenol pada sampel dihitung berdasarkan kurva standar asam galat yang diperoleh. Nilai absorbansi (y) dimasukkan pada persamaan kurva standard asam galat, sehingga diperoleh nilai (x) yang kemudian dikali faktor pengenceran dan konversi berat molekul asam galat.

b. Aktivitas Antioksidan (Metode DPPH (1,1-diphenyl-1-2-Picrylhidroksil))

DPPH adalah salah satu senyawa radikal bebas yang memiliki nitrogen tidak stabil dengan absorbansi maksimal pada panjang gelombang 524 nm dan berwarna biru gelap. Prinsip kerja sistem antioksidan yaitu dengan cara memotong reaksi oksidasi berantai dari radikal bebas atau dengan menangkap radikal tersebut, sehingga radikal bebas tidak akan bereaksi dengan komponen seluler. Uji aktivitas antioksidan metode DPPH dengan Trolox sebagai standar yang digunakan untuk mengukur kapasitas antioksidan secara *in vitro*. Pada pengujian antioksidan dilakukan tahapan persiapan yaitu menggunakan sampel perlakuan dengan polifenol paling tinggi yang telah dilakukan fraksinasi. Selanjutnya hasil dari fraksinasi dilakukan *freeze drying* hingga kering, ditimbang sebanyak 0,4 gram dan dilarutkan dalam 800 μl aquades. Selanjutnya, sebanyak 200 μl ditambah 300 μl citrid asam penyangga (pH 6) , dan EtOH 100 % 200 μl dalam tabung eppendrof. Selanjutnya ditambahkan 200 μl larutan etanol DPPH 0,1mM dan diinkubasi 5 menit pada suhu kamar. Absorbansi

campuran diukur pada 524nm menggunakan UV – VIS *Spectrophotometer* . Pembuatan kurva menggunakan standar Trolox yang dibuat pada rentang konsentrasi (0; 10; 20; 30; 40; 50) μmol . Nilai absorbansi sampel fraksinasi yang diuji aktivitas antioksidannya dihitung dengan menggunakan persamaan dari kurva standar trolox, sehingga hasil uji aktivitas antioksidan dinyatakan sebagai mgTE (*trolox equivalent*). Uji ini dilakukan duplo untuk standar dan sampel.

c. Uji penghambatan CEL terhadap pertumbuhan bakteri *B.subtilis* dan *E.coli*

1) Metode Dilusi Media Agar

Metode dilusi agar dilakukan dengan cara penentuan nilai KHM dan IC50 dari CEL terhadap bakteri yang terdiri dari beberapa tahapan sebagai berikut:

a. Tahap persiapan sampel

Pada tahap persiapan sampel, peralatan dan bahan disterilisasi (kecuali sampel CEL). Selanjutnya pembuatan larutan uji yaitu pembuatan stok larutan ekstrak biji lamtoro dengan cara melarutkan CEL dalam aquades steril dengan konsentrasi 20% atau 2 gram CEL ditera hingga 10 ml. Kemudian larutan uji dibuat dalam berbagai konsentrasi 0 mg/ml; 2 mg/ml; 4 mg/ml; 8 mg/ml; 16 mg/ml; 32 mg/ml. Setelah itu dilakukan penambahan DMSO masing-masing sebanyak 20 μl dan larutan fisiologis berturut-turut adalah 980 μl , 930 μl , 880 μl , 780 μl , 580 μl , dan 180 μl . Pada saat akan dilakukan uji ditambah dengan media NA yang masih hangat dengan perbandingan 1:4. Pembuatan kontrol negatif 0% yaitu hanya menggunakan DMSO 20 μl yang ditambah dengan larutan fisiologis 980 μl dan media NA yang masih hangat. Selain itu disiapkan pula suspensi bakteri sebagai berikut:

Tabel 3.1 Cara Pembuatan Suspensi Mikroba

No.	Jenis Mikroba	Cara Pembuatan
1	<i>Eschericia coli</i>	Sebanyak 1 ose <i>Eschericia coli</i> dari kultur stok agar miring NA diambil menggunakan ose steril kemudian dimasukkan kedalam ependorf steril yang berisi 1 ml media NB dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil inkubasi dibuat seri pengenceran dengan cara mencampurkan 1 ml media NB yang telah diinkubasi dengan 9 ml NaCl 0,85% sampai pengenceran 10 ⁻⁵
2	<i>Bacillus subtilis</i>	Sebanyak 1 ose <i>Bacillus subtilis</i> dari kultur stok agar miring NA diambil menggunakan ose steril kemudian dimasukkan ke dalam ependorf yang berisi 1 ml media NB dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil inkubasi dibuat seri pengenceran dengan cara mencampurkan 1 ml media NB yang telah diinkubasi dengan 9 ml NaCl 0,85% sampai pengenceran 10 ⁻⁵

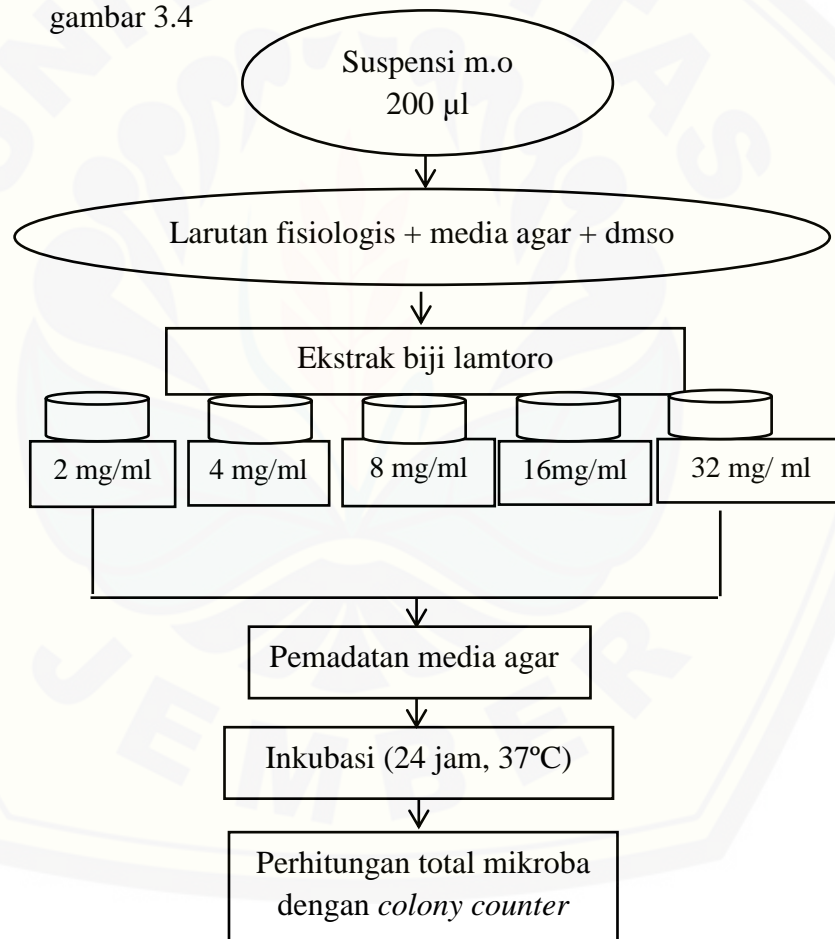
b. Tahap pengujian

Penentuan KHM dan IC50 pada bakteri *Eschericia coli* dan *Bacillus subtilis* dilakukan dengan metode dilusi agar dengan hitung koloni. Masing-masing media NA yang masih hangat ditambahkan sebanyak 3,8ml. Campuran media dan larutan uji yang telah divortex dimasukkan dalam cawan petri yang telah berisi 200µl suspensi mikroba (pengenceran 10⁻⁵) diratakan dan dibiarkan memadat kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

c. Tahap pengamatan

Pengamatan dilakukan dengan menghitung koloni yang tumbuh pada cawan petri. KHM merupakan konsentrasi yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri secara optimal (90%) yaitu hampir tidak ada mikroba dalam cawan petri yang tumbuh, sedangkan IC50 merupakan konsentrasi yang mampu memberikan 50% penghambatan dari total koloni yang terdapat pada kontrol negatif.

Secara umum, pengujian IC50 dan KHM disajikan pada gambar 3.4



Gambar 3.4 Uji KHM dan IC50

2) Metode Dilusi Media Cair

Metode dilusi cair dilakukan dengan cara penentuan nilai OD (*optical density*) secara berkala dari setiap hasil fraksi CEL terhadap suspensi bakteri yang terdiri dari beberapa tahapan sebagai berikut:

i. Tahap persiapan sampel

Pada tahap persiapan sampel, peralatan dan bahan (kecuali sampel) disterilisasi. Selanjutnya pembuatan larutan uji yaitu sampel hasil fraksinasi dari CEL dilakukan *freeze drying* hingga kering dan pada saat akan digunakan ditambahkan sebanyak 800 μ l aquades steril. Selain itu disiapkan pula suspensi bakteri dengan cara menginokulasikan sebanyak 100 μ l dari stok bakteri dalam media cair ke dalam 5ml media baru dan diinkubasi hingga nilai OD₆₆₀ mencapai pada rentangan 0,6-0,8. Selanjutnya digunakan sebagai uji antibakteri, sebanyak 100 μ l suspensi bakteri dimasukkan dalam 5ml media baru dan ditambahkan sampel setiap fraksi sebanyak 200 μ l, lalu di inkubasi (37°C 100 rpm) dan di cek nilai OD₆₆₀ secara berkala setiap satu jam hingga menunjukkan adanya penghambatan bakteri. Pembuatan kontrol negatif 0% yaitu hanya menggunakan aquades 200 μ l. Bakteri dan media yang digunakan yaitu *Salmonella thypimurrium* dan *Staphylococcus aureus* dalam media 702, *Bacillus subtilis* dalam media TSA dan *E.coli* dalam media LB.

ii. Tahap pengujian dan pengamatan

Tahapan pengujian dan pengamatan secara berkala dengan cara mengamati nilai OD₆₆₀ mulai jam ke-0 atau sebelum inkubasi hingga menunjukkan adanya penghambatan bakteri.

3.4 Analisis Data

Data yang telah diperoleh dibahas secara deskriptif disusun dalam tabel dan dimuat dalam bentuk grafik kemudian diinterpretasikan sesuai dengan pengamatan yang ada.

BAB 5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa:

- a. Ekstraksi senyawa bioaktif antibakteri biji lamtoro yang tepat dilakukan menggunakan pelarut etanol konsentrasi 50%.
- b. Aktivitas antioksidan menunjukkan hasil bahwa seluruh fraksi memiliki aktivitas antioksidan. Fraksi nomor 7 merupakan fraksi yang memiliki aktivitas antioksidan tertinggi yaitu sebesar 64mg TE/100 g.
- c. Ekstrak biji lamtoro terbukti berfungsi sebagai antibakteri gram positif dan gram negatif. Konsentrasi penghambatan untuk gram positif lebih besar dibandingkan penghambatan bakteri gram negatif. Fraksi 7 menghambat bakteri gram negatif paling besar, sedangkan fraksi 15 menghambat bakteri gram positif paling besar. Berdasarkan tiga kurva dapat disimpulkan *Bacillus subtilis* dengan CEL menghasilkan IC₅₀ sebesar 6,98 mg/ml dan KHM sebesar 24,3 mg/ml sedangkan pada *Eschericia coli* dengan ekstrak biji lamtoro menghasilkan IC₅₀ sebesar 7,3 mg/ml dan KHM sebesar 25,7 mg/ml.
- d. Hasil analisis LC-MS menunjukkan beberapa komponen yang dominan yaitu mimosine (m/z 199), chrysoeriol (m/z 299), muristerone A (m/z 541), erucamide (m/z 338), dan progoitrin (m/z 388).

5.2 Saran

Hasil penelitian ini dapat dijadikan dasar penelitian berikutnya untuk diaplikasikan pada produk pangan fungsional maupun sebagai pengawet alami. Senyawa bioaktif dari ekstrak biji lamtoro bersifat antimikrostatik yang dapat mencegah pertumbuhan bakteri gram positif dan gram negatif. Selain itu juga biji lamtoro mengandung senyawa selenium yang berfungsi sebagai antibakteri, sehingga dapat diteliti lebih lanjut mengenai selenium dalam biji lamtoro.

DAFTAR PUSTAKA

- Afriani, R. 2010. "Aktivitas Antimikroba Madu dari Lebah Apis dorsata dan Apis mellifera Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*". Tidak Diterbitkan. Skripsi. Pontianak. Universitas Tanjungpura
- Ambarwati. 2007. Efektivitas Zat Antibakteri Biji Mimba (*Azadirachta indica*) untuk Menghambat Pertumbuhan *Salmonella thyposa* dan *Staphylococcus aureus*. ISSN: 1412-033X. Vol 8
- Amer, R.A., Mady S. A., Yusef H., dan Sabry S. 2013. Determination of decimal reduction time (D-value) of chemical agents used in hospitals for killing airborne isolated bacteria. *African Journal of Microbiology Research*
- Atanassova, M., Georgieva S., dan Ivancheva K. 2011. Total phenolic and total flavonoid contents, antioxidant capacity and biological contaminants in medicinal herbs. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*. Vol. 46(1): 81-88.
- Aulia. 2008. Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Daun Arbenan (*Duchesnea indica* (Andr.) Focke) Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* Multiresisten Antibiotik Beserta Profil Kromatografi Lapis Tipisnya. Tidak diterbitkan. Skripsi. Surakarta. Universitas Muhammadiyah.
- Bahri S. R., Ben F. R., Boughalleb N., Shriaa J., Saguen S., Hilbert J. L., Troitin F., Ammar S., Bouzid S., Harzallah S. 2014. Phenolic Composition and Antioxidant and Antimicrobial Activities of Extracts Obtained from *Crataegus azarolus* L. var. *Aronia* (Willd.) *Batt. Ovaries Calli*. *Journal of Botany*. Article ID 623651.
- BPOM. 2014. Profil Laporan Efek Samping Obat Tahun 2013. Buletin Berita MESO, Vol 32 (1):9
- Brooks G. F., Butel JS, Morse S. A. 2005. *Mikrobiologi kedokteran*. Jakarta: Salemba Medika

- Chew Y. L., Chan E. W. L., Tan P. L., Lim Y. Y., Stanslas J., Goh J. K. 2011. Effect of Ethanol Concentration, Extraction Time and Extraction Temperature on the Recovery of Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of *Centella asiatica* Extracts. *International Food Research Journal* Vo18: 571-578.
- Dagmar H., Kristyna C., Pavel K., Vojtech A., Rene K. 2015. Selenium Nanoparticles And Evaluation Of Their Antimicrobial Activity On Bacterial Isolates Obtained From Clinical Specimens. *Nanocon Journal*.
- Dwidjoseputro. 1990. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jakarta. Djambatan
- Dwidjoseputro. 1985. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Malang. Djambatan
- Dzen, S. M. 2003. *Bakteriologi Medik*. Malang. Bayumedia.
- Gaspersz. 1991. *Analisis Sistem Terapan Berdasarkan Pendekatan Teknik Industri*. Bandung. Tarsito
- Hariana, A. 2008. *Tumbuhan Obat dan Khasiatnya*. Jakarta. Penebar Swadaya
- Jawetz E., Melnick J. L., Adelberg E. A. 2001. *Mikrobiologi Kedokteran*. Surabaya: Salemba Medical
- Lay B. W. 1994. *Analisis Mikroba di Laboratorium*. Jakarta. Rajawali Pers.
- Loh K. Y. 2008. *Know The Medicinal Herb: Leucaena leucocephala*. Malaysian Family Physicians
- Manoi, F. 2009. *Binahong (Anredera Cordifolia) Sebagai Obat*. Badan Penelitian Dan Pengembangan Pertanian
- Maulita C. N., Faizatun A, Sumantri. 2009. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Jarak Pagar (*Jatropha Curcas* L) Terhadap Bakteri *Staphylococcus Aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, Dan *Salmonella Typhi* ATCC 1408. *Mediagro*
- Ngajow M., Abidjulu J., Kamu V. S. 2013. Pengaruh Antibakteri Ekstrak Kulit Batang Matoa (*Pometia pinnata*) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* secara In vitro. *Jurnal MIPA UNSRAT Online* 2 (2) 128-132
- Norris dan Ribbons D. W. 1972. *Methods in Microbiology*. London. Academic Press
- Pratiwi, S. T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta. Erlangga
- Putra, W. S. 2015. *Kitab Herbal Nusantara: Aneka Resep dan Ramuan Tanaman Obat Untuk Berbagai Gangguan Kesehatan*. Yogyakarta. Katahati

- Refdanita. 2004. Pola Kepekaa Kuman Terhadap Antibiotik di Ruang Intensif Rumah Sakit Fatmawati Tahun 2001-2002. *Makara Kesehatan*. Vol. 8.
- Simorangkir M, Sitepu M, Simanjuntak P. 2013. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Ranti Hitam (*Solanum Blumei Nees Ex Blume*) Terhadap *Salmonella Typhimurium*. *Prosiding SnYuBe*
- Sitanggang A. B., Chang Y. F. 2011. Antimicrobial Activity of Melinjo Seed dan peel Extract (*Gnetum gnemon*) Against Selected Pathogenic Bacteria. Boing.lipan.staff.ipb.ac.id. *Mikrobiol Indones*.
- Soehendro A.W., Manuhara G.J., Nurhartadhi E. 2015. Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Antioksidan Dan Antimikrobia Ekstrak Biji Melinjo (*Gnetum Gnemon L.*) Dengan Pelarut Etanol Dan Air. *Jurnal Teknosains Pangan*.
- Soeryoko, H. 2011. *Tanaman Obat Terpopuler Untuk Pelangsing dan Penurun Kolesterol*. Yogyakarta. Andi
- Subramanian R. dan Springer. 2013. Antioxidant Activity of the Stem Bark of *Shorea roxburghii* and Its Silver Reducing Power. *Springer Plus*. Vol. 2:28.
- Sulistiyowati. 2007. Uji Aktivitas Antioksidan Biji Lamtoro (*Leucaena Leucocephala* (Lamk) De Wit) Secara In-Vitro. *Jurnal FMIPA Universitas Negeri Yogyakarta*
- Suryabrata, S. 1994. *Metodologi Penelitian*. Jakarta. PT Raja Grafindo Persada
- Wazir, D. 2011. Antioxidant Activities of Different Parts of *Gnetum gnemon L.* *Journal Plant Biochemistry and Biotechnology*.
- Wijayakusuma, H. 2004. *Bebas Diabetes Militus Ala Hembing*. Jakarta. Puspa Swara
- Winarsi, H. 2005. *Isoflavon, sumber dan Sifatnya, serta Efek Pada Penyakit Degeneratif*. Yogyakarta. Kanisius
- Wulandari, M. A. 2014. Potensi Antibakteri Dan Bioautografi Ekstrak Etanol Daun Bintaro (*Carbera Odollam Gaertn.*) Terhadap *Salmonella Typhi* Dan *Staphylococcus Aureus*. *Jurnal Universitas Surakarta*

Lampiran A. Penelitian Pendahuluan

Biji lamtoro diekstrak menggunakan etanol 70% dan di maserasi selama 24 jam pada suhu ruang dan suhu 60°C dengan perlakuan agitasi dan tanpa agitasi

Sampel	Ulangan	Absorbansi	variabel			konesntrasi bubuk (μM)	konversi	konsentrasi akhir (mg GAE/ml)		
			x	konstanta	X			rata	stdev	
A1S1	1	0.377	0.0003	0.1358	804	40200	0.17012	6.838824	6.668704	0.240586
	2	0.365	0.0003	0.1358	764	38200	0.17012	6.498584		
A1S2	1	0.782	0.0003	0.1358	2154	107700	0.17012	18.32192	18.32192	0
	2	0.782	0.0003	0.1358	2154	107700	0.17012	18.32192		
A2S1	1	0.795	0.0003	0.1358	2197.333333	109866.6667	0.17012	18.69052	18.64799	0.060147
	2	0.792	0.0003	0.1358	2187.333333	109366.6667	0.17012	18.60546		
A2S2	1	0.964	0.0003	0.1358	2760.666667	138033.3333	0.17012	23.48223	23.59564	0.160391
	2	0.972	0.0003	0.1358	2787.333333	139366.6667	0.17012	23.70906		

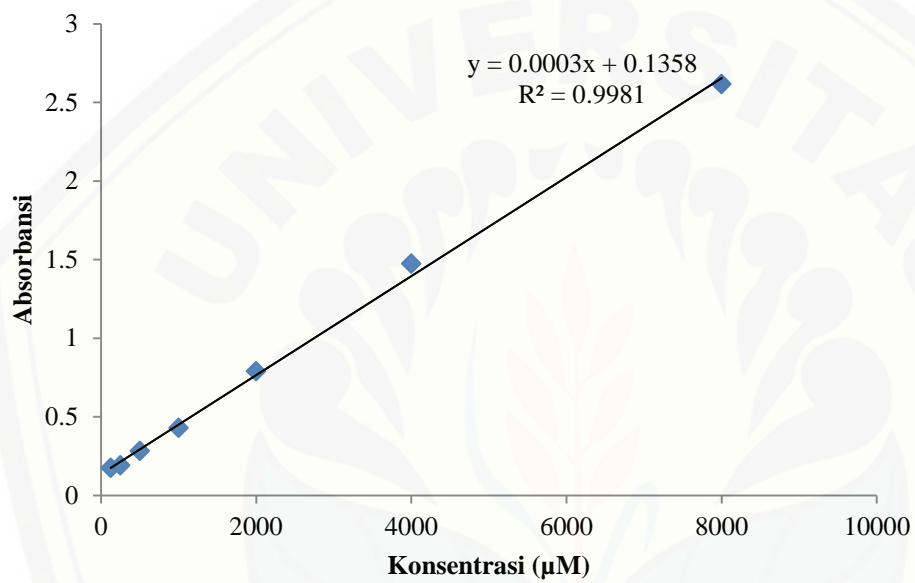
Keterangan:

A1S1 = suhu ruang tanpa agitasi, A1S2 = suhu 60°C tanpa agitasi, A2S1 = suhu ruang dengan agitasi, A2S2 = suhu 60°C dengan agitasi

Lampiran B. Perhitungan Total Polifenol CEL

Kurva Standard Asam Galat

Konsentrasi (μM)	Absorbansi
125	0,173
250	0,19
500	0,282
1000	0,428
2000	0,789
4000	1,473
8000	2,615



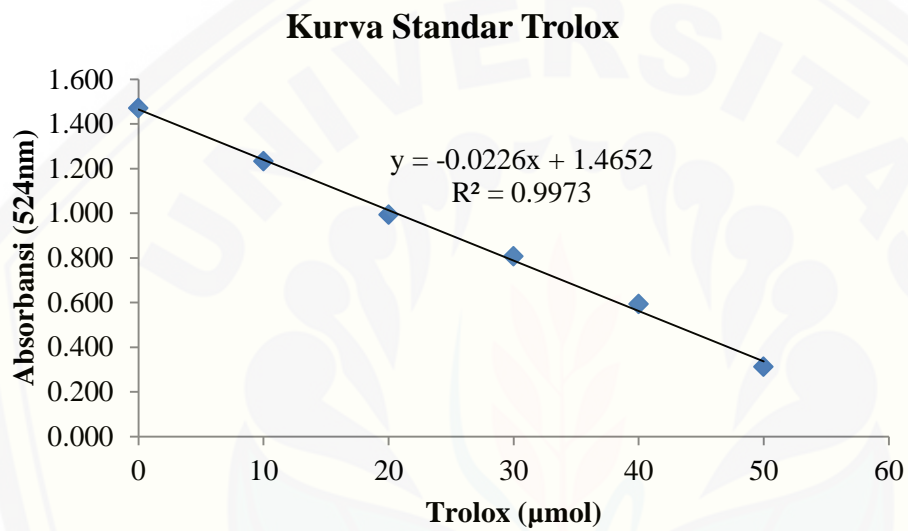
Total Polifenol CEL

Sampel	Ulangan	Absorbansi	variabel x	konstanta	x	konesentrasi bubuk (μM)	konversi	konsentrasi akhir (mg GAE/ml)		
								rata	stdev	
P0	1	0.570	0.0003	0.1358	1217.333333	608666.6667	0.17012	103.5463733	99.38788444	5.792228
	2	0.519	0.0003	0.1358	1090.666667	545333.3333	0.17012	92.77210667		
	3	0.552	0.0003	0.1358	1197.333333	598666.6667	0.17012	101.8451733		
P1	1	0.695	0.0003	0.1358	1634	817000	0.17012	138.98804	136.8142844	2.274166
	2	0.675	0.0003	0.1358	1610.666667	805333.3333	0.17012	137.0033067		
	3	0.667	0.0003	0.1358	1580.666667	790333.3333	0.17012	134.4515067		
P2	1	0.979	0.0003	0.1358	2580.666667	1290333.333	0.17012	219.5115067	220.4566178	5.448957
	2	0.990	0.0003	0.1358	2660.666667	1330333.333	0.17012	226.3163067		
	3	0.953	0.0003	0.1358	2534	1267000	0.17012	215.54204		
P3	1	0.840	0.0003	0.1358	2117.333333	1058666.667	0.17012	180.1003733	184.2588622	4.112048
	2	0.842	0.0003	0.1358	2167.333333	1083666.667	0.17012	184.3533733		
	3	0.857	0.0003	0.1358	2214	1107000	0.17012	188.32284		

Lampiran C. Perhitungan Aktivitas Antioksidan

Kurva standar Trolox

Konsentrasi (μmol)	Abs 1	Abs 2	Abs 2	Rata-rata
50	0.314	0.31	0.308	0.311
40	0.593	0.592	0.592	0.592
30	0.808	0.806	0.804	0.806
20	0.994	0.991	0.992	0.992
10	1.234	1.232	1.232	1.233
0	1.472	1.47	1.468	1.470



Aktivitas Antioksidan

Nomor Fraksi	Blanko Warna	Absorbansi	Abs-Blanko	mg TE
1	0.008	0.667	0.659	36.64545
2	0.019	0.523	0.504	43.69091
3	0.014	0.356	0.342	51.05455
4	0.073	0.258	0.185	58.19091
5	0.104	0.23	0.126	60.87273
6	0.093	0.265	0.172	58.78182
7	0.027	0.087	0.06	63.87273
8	0.023	0.15	0.127	60.82727
9	0.027	0.207	0.18	58.41818
10	0.032	0.206	0.174	58.69091
11	0.041	0.198	0.157	59.46364
12	0.025	0.192	0.167	59.00909
13	0.013	0.189	0.176	58.6
14	0.006	0.214	0.208	57.14545
15	0.004	0.194	0.19	57.96364
16	0.003	0.2	0.197	57.64545
17	0.003	0.633	0.63	37.96364
18	0.003	0.574	0.571	40.64545
50% Et	0	1.0215	1.0215	20.16818

Lampiran D. Perhitungan Konsentrasi Hambat Minimum

1. *Bacillus subtilis*Jumlah Koloni *Bacillus subtilis*

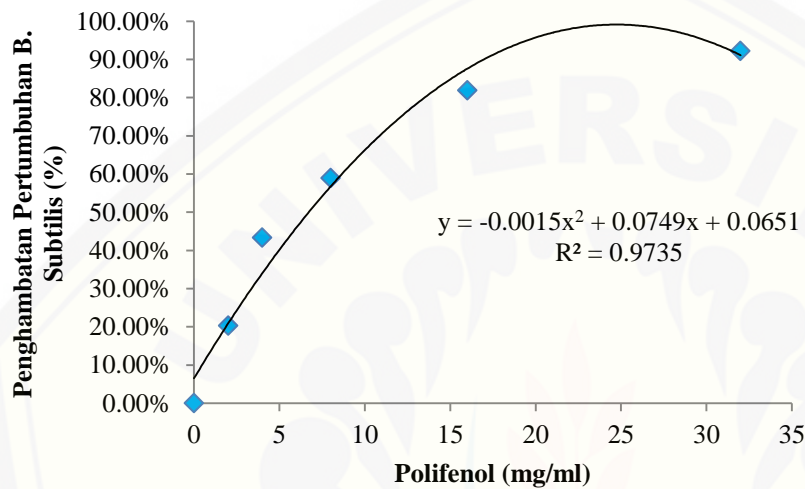
Polifenol (mg/ml)	jumlah koloni/200 μ l (U1)	jumlah koloni/200 μ l (U2)	jumlah koloni/200 μ l (U3)	rata-rata	SD
0	656	664	652	657.33	6.11
2	516	532	523	523.67	8.02
4	366	372	379	372.33	6.51
8	271	264	274	269.67	5.13
16	118	125	113	118.67	6.03
32	49	48	56	51.00	4.36

Jumlah Koloni *Bacillus subtilis* dalam CFU/ml

Polifenol (mg/ml)	jumlah koloni (CFU/ml) (U1)	jumlah koloni (CFU/ml) (U2)	jumlah koloni (CFU/ml) (U3)	rata-rata (CFU/ml)	log jumlah koloni	SD	% penghambatan
0	3.28E+08	3.32E+08	3.26E+08	3.29E+08	8.517	3.06E+06	0.00%
2	2.58E+08	2.66E+08	2.62E+08	2.62E+08	8.418	4.01E+06	20.33%
4	1.83E+08	1.86E+08	1.90E+08	1.86E+08	8.270	3.25E+06	43.36%
8	1.36E+08	1.32E+08	1.37E+08	1.35E+08	8.130	2.57E+06	58.98%
16	5.90E+07	6.25E+07	5.65E+07	5.93E+07	7.773	3.01E+06	81.95%
32	2.45E+07	2.40E+07	2.80E+07	2.55E+07	7.407	2.18E+06	92.24%

Kurva Reguler Penghambatan Pertumbuhan *Bacillus subtilis*

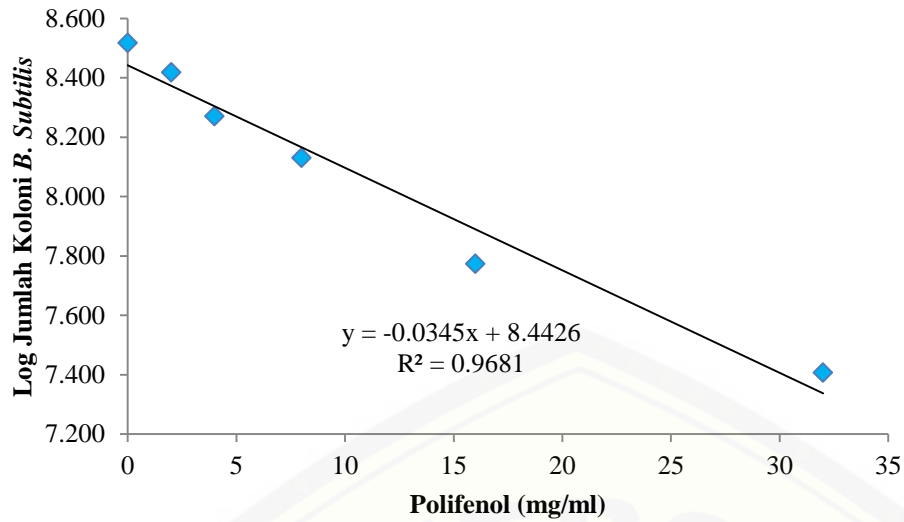
Polifenol (mg/ml)	% Penghambatan
0	0.00%
2	20.33%
4	43.36%
8	58.98%
16	81.95%
32	92.24%



$Y = -0,0015X^2 + 0,0749X + 0,0651$ $50\% = -0,0015X^2 + 0,0749X + 0,0651$ $0,5 = -0,0015X^2 + 0,0749X + 0,0651$	$Y = -0,0015X^2 + 0,0749X + 0,0651$ $90\% = -0,0015X^2 + 0,0749X + 0,0651$ $40,9 = -0,0015X^2 + 0,0749X + 0,0651$
<hr/> $X^2 - 50X + 307$ $(X - 43,3)(X - 6,7)$ $X = 43,3 \text{ mg/ml}$ $X = 6,7 \text{ mg/ml}$	<hr/> $X^2 - 50X + 593$ $(X - 16,8)(X - 33,2)$ $X = 33,2 \text{ mg/ml}$ $X = 16,8 \text{ mg/ml}$

Kurva Logaritmik Penghambatan Pertumbuhan *Bacillus subtilis*

Polifenol (mg/ml)	Log jumlah koloni
0	8.517
2	8.418
4	8.270
8	8.130
16	7.773
32	7.407



			Kons. Polifenol (mg/ml)
1 log	7	41.814	28.986
	6	70.800	
2 log	7	41.814	57.971
	5	99.786	
3 log	7	41.814	57.971
	5	99.786	

IC ₅₀		Polifenol (mg/ml)	
Y1 = 1 x 10 ⁸	Log Y1 = 8,000	X1 =	12,829
Y2 = 50% (Y1) = 5 x 10 ⁷	Log Y2 = 7,699	X2 =	21,554
		IC ₅₀	8,726

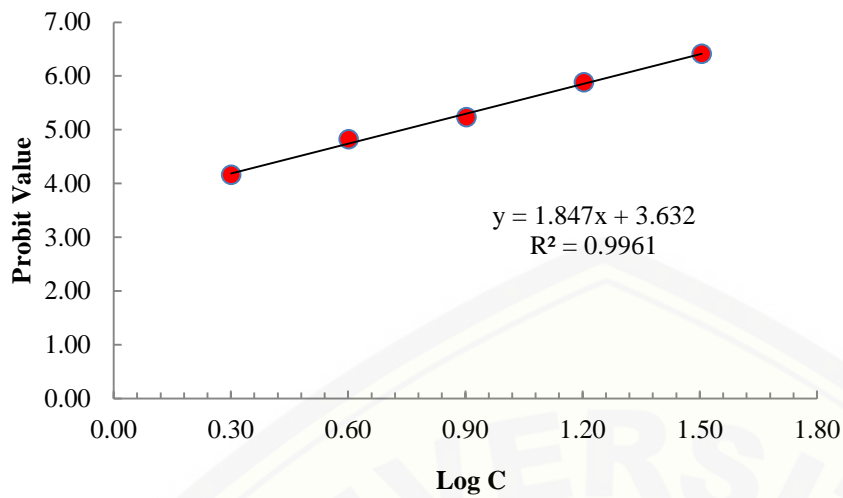
IC ₉₀		Polifenol (mg/ml)	
Y1 = 1 x 10 ⁸	Log Y1 = 7,000	X1 =	41,814
Y2 = 90% (Y1) = 5 x 10 ⁷	Log Y2 = 6,000	X2 =	70,800
		IC ₉₀	28,968

Kurva Probit Penghambatan Pertumbuhan *Bacillus subtilis*

Polifenol (mg/ml)	rata-rata (CFU/ml)	Log	% Pertumbuhan	%Penghambatan	Log C	Probit
0	3.29E+08	8.517	100.00	0.00	0.00	0.00
2	2.62E+08	8.418	79.67	20.33	0.30	4.16
4	1.86E+08	8.270	56.64	43.36	0.60	4.86
8	1.35E+08	8.130	41.02	58.98	0.90	5.23
16	5.93E+07	7.773	18.05	81.95	1.20	5.88
32	2.55E+07	7.407	7.76	92.24	1.51	6.41

Table 3.2 Transformation of percentages to probits

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	—	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
—	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	8.09



$$Y = 1,847x + 3,632$$

$$5 = 1,847x + 3,632$$

$$5 - 3,632 = 1,847x$$

$$1,386 = 1,847x$$

$$X = \text{Log } C_{50} = 1,386/1,847=0,7236$$

$$\text{LOG } C_{50} = 0,7406$$

$$\text{IC}_{50} = 5,5030 \text{ (mg/ml)}$$

$$Y = 1,847x + 3,632$$

$$6,28 = 1,847x + 3,632$$

$$6,28 - 3,632 = 1,847x$$

$$2,648 = 1,847x$$

$$X = \text{Log } C_{90} = 2,648/1,847=1,4336$$

$$\text{LOG } C_{90} = 1,437$$

$$\text{IC}_{90} = 27,1394 \text{ (mg/ml)}$$

2. *Eschericia coli*Jumlah Koloni *Eschericia coli*

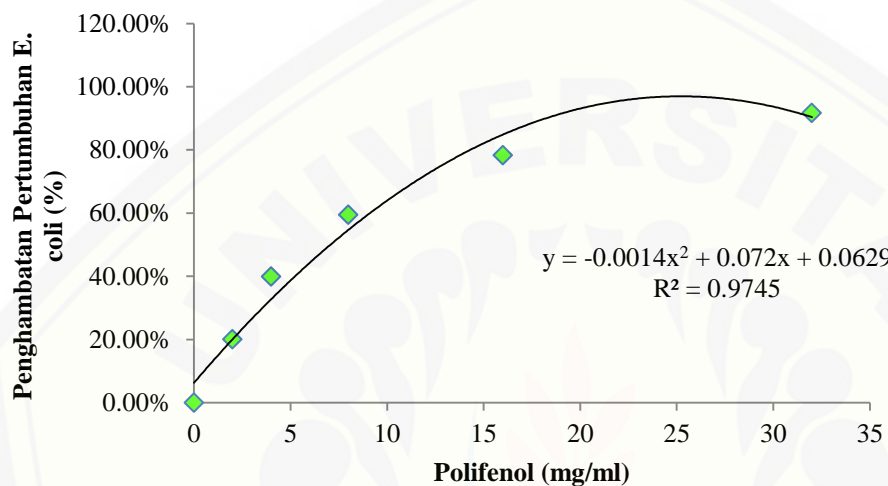
Polifenol (mg/ml)	jumlah koloni/200µl (U1)	jumlah koloni/200µl (U2)	jumlah koloni/200µl (U3)	rata-rata	SD
0	932	916	908	918.67	12.22
2	722	749	734	735.00	13.53
4	574	548	536	552.67	19.43
8	384	377	358	373.00	13.45
16	206	200	192	199.33	7.02
32	77	74	80	77.00	3.00

Jumlah Koloni *Eschericia coli* dalam CFU/ml

Polifenol (mg/ml)	jumlah koloni (CFU/ml) (U1)	jumlah koloni (CFU/ml) (U2)	jumlah koloni (CFU/ml) (U3)	rata-rata (CFU/ml)	log jumlah koloni	SD	% penghambatan
0	4.66E+08	4.58E+08	4.54E+08	4.59E+08	8.662	6.11E+06	0.00%
2	3.61E+08	3.75E+08	3.67E+08	3.68E+08	8.565	6.76E+06	19.99%
4	2.87E+08	2.74E+08	2.68E+08	2.76E+08	8.441	9.71E+06	39.84%
8	1.92E+08	1.89E+08	1.79E+08	1.87E+08	8.271	6.73E+06	59.40%
16	1.03E+08	1.00E+08	9.60E+07	9.97E+07	7.999	3.51E+06	78.30%
32	3.85E+07	3.70E+07	4.00E+07	3.85E+07	7.585	1.50E+06	91.62%

Kurva Reguler Penghambatan Pertumbuhan *Eschericia coli*

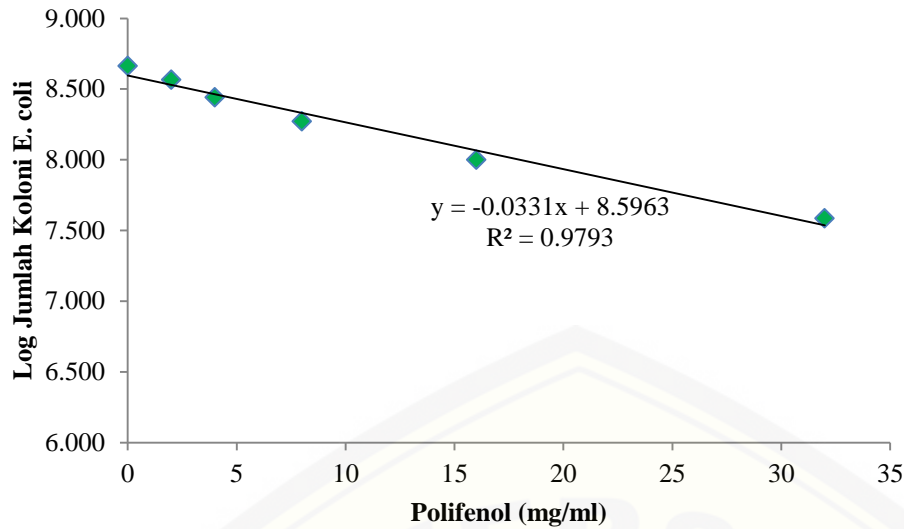
Polifenol (mg/ml)	% Penghambatan
0	0,00%
2	19.99%
4	39.84%
8	59.40%
16	78.30%
32	91.62%



$y = -0,0014x^2 + 0,072x + 0,0629$	$y = -0,0014x^2 + 0,072x + 0,0629$
$50\% = -0,0014x^2 + 0,072x + 0,0629$	$90\% = -0,0014x^2 + 0,072x + 0,0629$
$0,5 = -0,0014x^2 + 0,072x + 0,0629$	$0,9 = -0,0014x^2 + 0,072x + 0,0629$
<hr/>	
$X^2 - 51X + 297$	$X^2 - 51X + 547$
$(X - 43,88) (X - 7,12)$	$(X - 32,7) (X - 18,3)$
$X = 43,88 \text{ mg/ml}$	$X = 32,7 \text{ mg/ml}$
$X = 7,12 \text{ mg/ml}$	$X = 18,3 \text{ mg/ml}$

Kurva Logaritmik Penghambatan Pertumbuhan *Eschericia coli*

Polifenol (mg/ml)	Log jumlah koloni
0	8.662
2	8.565
4	8.441
8	8.271
16	7.999
32	7.585



			Kons. Polifenol (mg/ml)
1 log	7	48.2265861	30.21148036
	6	78.43806647	
2 log	7	48.2265861	60.42296073
	5	108.6495468	
3 log	7	48.2265861	60.42296073
	5	108.6495468	

IC 50%

Polifenol (mg/ml)

$Y1 = 1 \times 10^8$	Log Y1 =	8,000	X1 = 18.0163
$Y2 = 50\% (Y1) = 5 \times 10^7$	Log Y2 =	7,699	X2 = 27.1109
			X% = 9.09456

IC 90%

Polifenol (mg/ml)

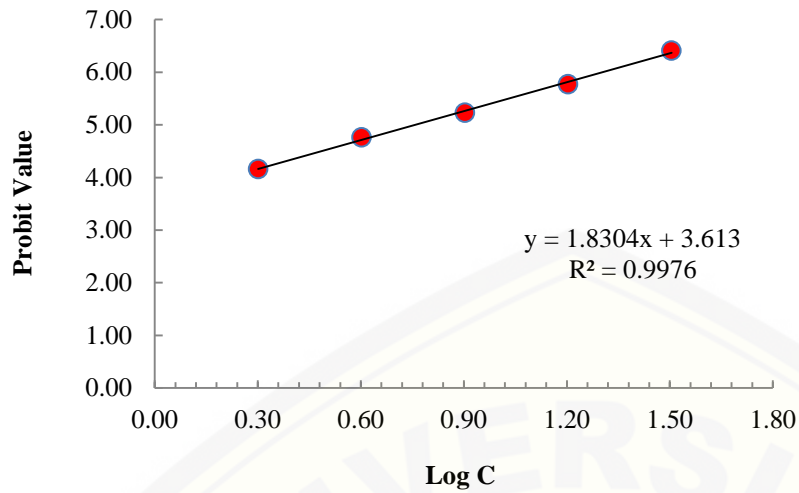
$Y1 = 1 \times 10^8$	Log Y1 =	7,000	X1 = 48.2278
$Y2 = 90\% (Y1) = 5 \times 10^7$	Log Y2 =	6,000	X2 = 78.4393
			X% = 30.2115

Kurva Probit Penghambatan Pertumbuhan *Eschericia coli*

Polifenol (mg/ml)	rata-rata (CFU/ml)	Log	% Pertumbuhan	%Penghambatan	Log C	Probit
0	4.59E+08	8.662	100.00	0.00	0.00	0.00
2	3.68E+08	8.565	80.01	19.99	0.30	4.16
4	2.76E+08	8.441	60.16	39.84	0.60	4.76
8	1.87E+08	8.271	40.60	59.40	0.90	5.23
16	9.97E+07	7.999	21.70	78.30	1.20	5.77
32	3.85E+07	7.585	8.38	91.62	1.51	6.41

Table 3.2 Transformation of percentages to probits

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	—	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
—	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	8.09



$$Y = 1,8304x + 3,613$$

$$5 = 1,8304x + 3,613$$

$$5 - 3,613 = 1,8304x$$

$$1,387 = 1,8304x$$

$$X = \text{Log } C_{50} = 1,387 / 1,8304 = 0,7578$$

$$\text{LOG } C_{50} = 0,7578$$

$$\text{IC}_{50} = 5,7253 \text{ (mg/ml)}$$

$$Y = 1,8304x + 3,613$$

$$6,28 = 1,8304x + 3,613$$

$$6,28 - 3,613 = 1,8304x$$

$$2,667 = 1,8304x$$

$$X = \text{Log } C_{90} = 2,667 / 1,8304 = 1,4571$$

$$\text{LOG } C_{90} = 1,4571$$

$$\text{IC}_{90} = 2864837 \text{ (mg/ml)}$$

Lampiran E. Dokumentasi Foto Penelitian



Buah lamtoro segar



Biji lamtoro setelah pengupasan dan pencucian



Penghancuran menggunakan blender



Biji lamtoro dalam pelarut sebelum dimasukkan *shaker waterbath*



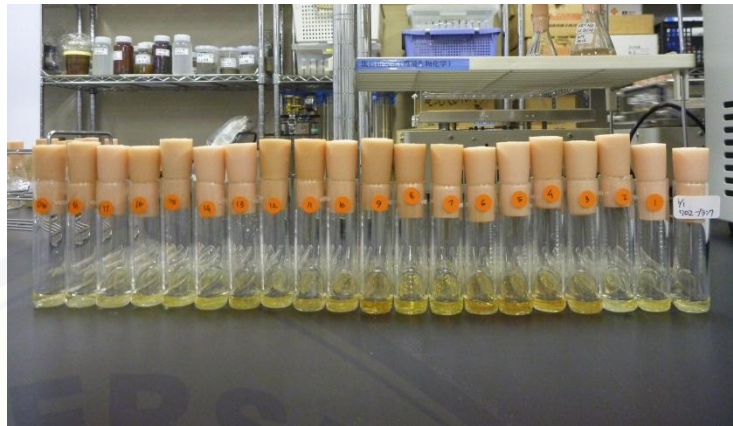
Biji lamtoro dalam pelarut setelah ekstraksi dalam *shaker waterbath*



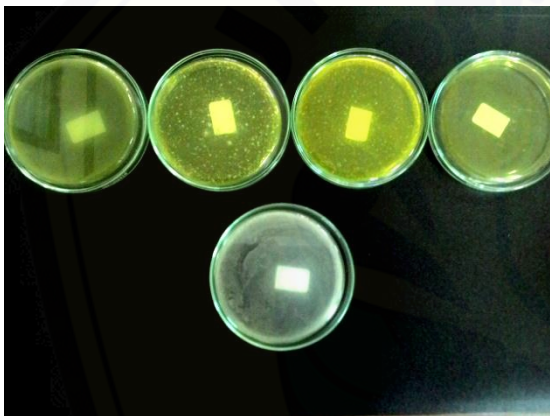
Bubuk ekstrak biji lamtoro



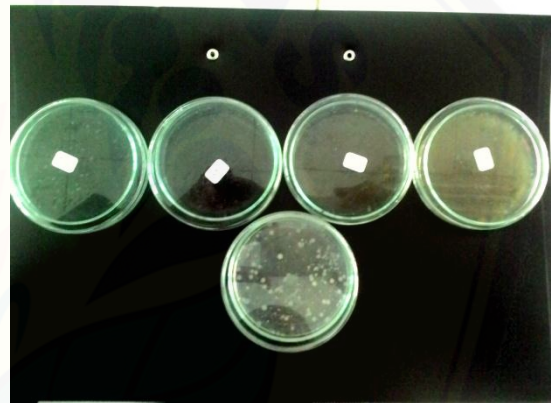
Fraksinasi



Antibakteri dilusi media cair



Uji KHM bakteri *B. subtilis*



Uji KHM bakteri *E. coli*