

Sinergisme aktivitas antibakteri ekstrak biji bengkuang (*Pachyrhizus erosus* L.) terhadap *Pseudomonas aeruginosa* berdasarkan bioautografi

(Synergistic antibacterial activity of jicama (*Pachyrhizus erosus* L.) seed extract against *Pseudomonas aeruginosa* based on bioautography)

Min Rahminiwati^{1*}, Arviani Rahmawati Supardi², Siti Mahyuni²

¹ Divisi Farmakologi dan Toksikologi, Sekolah Kedokteran Hewan dan Biomedis, IPB University, Bogor, Indonesia

² Program Studi Farmasi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pakuan, Bogor, Indonesia

Diterima: 24 Oktober 2023 | Direvisi: 14 November 2023 | Disetujui: 16 November 2023

Abstrak

Ekstrak etanol 70% biji bengkuang (*Pachyrhizus erosus* L.) dilaporkan mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa*. Hasil uji fitokimia ekstrak tersebut mengidentifikasi keberadaan senyawa kimia golongan alkaloid, flavonoid, saponin, dan tannin. Akan tetapi, senyawa yang bertanggung jawab sebagai antibakteri terhadap *P. aeruginosa* belum diteliti. Aktivitas antibakteri terhadap *P. aeruginosa* dari senyawa kimia yang terdapat dalam ekstrak etanol 70% biji bengkuang dikaji melalui konsentrasi bunuh minimum (KBM) ekstrak biji bengkuang konsentrasi 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, dan 34% pada media *Nutrient Agar* cair dan padat, nilai lebar daya hambat (LDH) dengan metode *Kirby Bauer*, dan nilai *retention factor* (Rf) ekstrak dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT)-bioautografi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak biji bengkuang memiliki nilai KBM sebesar 26% dan nilai LDH terbaik sebesar 5,68 mm terdapat pada ekstrak dengan konsentrasi 34%. Ekstrak dengan konsentrasi 34% yang menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *P. aeruginosa* memiliki nilai Rf 0,812, 0,750, 0,675, 0,625, dan 0,787 yang masing-masing teridentifikasi sebagai golongan flavonoid, tanin, kuinon, alkaloid, dan triterpenoid. Nilai LDH masing-masing senyawa tersebut lebih rendah dari nilai LDH ekstrak. Berdasarkan data nilai Rf, efek antibakteri ekstrak biji bengkuang terhadap *P. aeruginosa* kemungkinan sebagai hasil dari interaksi sinergisme antarsenyawa kimia yang terkandung di dalamnya.

Kata kunci: antibakteri | biji bengkuang | *Pseudomonas aeruginosa* | ekstraksi maserasi | KLT-bioautografi

Abstract

A 70% ethanol extract of jicama seeds has been reported to have antibacterial activity against *Pseudomonas aeruginosa*. Phytochemical tests of the extract have identified alkaloids, flavonoids, saponins, and tannins. However, the compounds responsible for its antibacterial effects against *P. aeruginosa* have not yet been studied. This study was conducted to determine the class of chemical compounds responsible for the antibacterial activity against *P. aeruginosa*. The antibacterial activity against *P. aeruginosa* of the chemical compounds contained in the 70% ethanol extract of jicama seeds was studied using the minimum bactericidal concentration (MBC) of the jicama seed extract at concentrations of 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, and 34% in liquid and solid *Nutrient Agar* media, the wide inhibitory zone (WIZ) using the *Kirby Bauer* method, and the retention factor (Rf) of the extract using thin-layer chromatography (TLC)-bioautography. The study results showed that the jicama seed extract had an MBC value of 26%, and the best WIZ value in the extract was 5.68 mm at concentration of 34%. The Rf value in the extract at

* **Penulis korespondensi:** WA: +62 813-8526-6270, Email: minrahminiwati@apps.ipb.ac.id

concentration of 34% which showed antibacterial activity against *P. aeruginosa* was 0.812, 0.750, 0.675, 0.625, and 0.787 of each compound group identified as flavonoids, tannins, quinones, alkaloids, and triterpenoids. The WIZ value of each compound was lower than the WIZ value of the extract. Based on the Rf data, the antibacterial effect of jicama seed extract against *P. aeruginosa* is likely the result of a synergistic interaction between the chemical compounds contained therein.

Keywords: anti-bacteria | jicama seed | *Pseudomonas aeruginosa* | maceration | TLC-bioautografi

Pendahuluan

Tanaman bengkuang (*Pachyrhizus erosus* L.) merupakan tanaman umbi-umbian yang potensial untuk dikembangkan sebagai bahan baku obat. Umbinya banyak dimanfaatkan sebagai bahan makanan dan bahan baku kosmetika, sedangkan bijinya dimanfaatkan sebagai pestisida. Senyawa kimia yang teridentifikasi mempunyai efek sebagai pestisida adalah rotenone dan derrid (Necha *et al.*, 2014) Selain sebagai pestisida, biji bengkuang juga berpotensi sebagai antibakteri. Ekstrak etanol 70% biji bengkuang secara *in vitro* dilaporkan mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, dan *Escherichia coli* (Rahminiwati *et al.*, 2020; Wiredu, 2004). Aktivitas antibakteri terhadap *P. aeruginosa* mulai terlihat pada ekstrak biji bengkuang konsentrasi 10% dengan rata-rata lebar daerah hambat (LDH) sebesar 2,30 mm.

P. aeruginosa merupakan bakteri patogen oportunistis yang penting secara medis. Bakteri ini menyebabkan infeksi nosokomial, terutama pada pasien yang mengalami penurunan imunitas (Vahdani *et al.*, 2012). Bakteri ini juga menyebabkan beragam penyakit infeksi, seperti dermatitis, otitis eksterna, folikulitis, infeksi mata, dan infeksi pada luka bakar. Selain itu, bakteri ini juga dapat menyebabkan infeksi pada saluran napas bagian bawah, saluran kemih, dan organ tubuh yang lain (Radji, 2011).

Biji bengkuang mengandung senyawa flavonoid, tanin, kuinon, saponin, alkaloid, dan triterpenoid. Triterpenoid, alkaloid, dan flavonoid merupakan

senyawa yang banyak dilaporkan mempunyai aktivitas antibakteri (Compean & Ynalvez, 2014; Mariita *et al.*, 2011; Allemailem, 2021). Aktivitas antibakteri senyawa tersebut bisa bersifat tunggal atau gabungan.

Senyawa metabolit sekunder dalam ekstrak yang bertanggung jawab sebagai antibakteri baik tunggal maupun gabungan dapat diketahui melalui metode bioautografi. Metode bioautografi merupakan gabungan metode kimiawi (kromatografi) dan mikrobiologi (Sudirman, 2005) yang dapat mendeteksi aktivitas antibakteri karena letak bercak dapat ditentukan walaupun berada dalam campuran yang kompleks. Metode ini merupakan metode spesifik untuk mendeteksi bercak pada kromatogram hasil kromatografi lapis tipis (KLT) yang memiliki aktivitas antibakteri, anticendawan, dan juga antivirus (Pratiwi, 2008). Hasil bioautografi yang diperoleh berupa nilai *retention factor* (Rf) dan warna noda pada kromatogram sebagai hasil dari elusi lempeng KLT. Nilai Rf memberikan informasi tentang senyawa yang terdapat dalam ekstrak (Forestryana & Arnida, 2020) dan menunjukkan perbedaan sifat senyawa yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi senyawa yang berpotensi antibakteri (Gandjar & Rohman, 2007).

Penelitian ini dilakukan untuk menetapkan aktivitas antibakteri golongan senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada ekstrak etanol 70% biji bengkuang terhadap *P. aeruginosa*, konsentrasi bunuh minimum (KBM), lebar daerah hambat (LDH) ekstrak, dan LDH bercak spot hasil pemisahan KLT.

Metode

Pembuatan serbuk simplisia

Biji bengkuang (*Pachyrhizus erosus* L.) diperoleh dari perkebunan di Kecamatan Rancabungur, Kabupaten Bogor. Determinasi tanaman biji bengkuang (*Pachyrhizus erosus* L.) dilakukan di Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN) Bogor. Hasil yang diperoleh menunjukkan keautentikan sampel biji bengkuang yang digunakan (Surat BRIN No. B-3049/II.6.2/DI.05.07/9/2022).

Biji bengkuang sehat sebanyak 3 kg dicuci bersih menggunakan air mengalir kemudian ditiriskan. Setelah dikeringkan pada suhu 40°C selama ± 3 hari menggunakan oven, biji bengkuang disortir kembali, dibuat serbuk menggunakan *grinder*, dan diayak dengan ayakan *mesh* no. 40. Perolehan rendemen serbuk dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{ Rendemen serbuk} = \frac{\text{Berat serbuk}}{\text{Berat awal simplisia kering}} \times 100\%$$

Ekstraksi

Sebanyak 500 g serbuk simplisia biji bengkuang diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan 5000 mL pelarut etanol 70% (Merck, USA). Sebanyak 2 L pelarut etanol digunakan pada maserasi tahap pertama dalam bejana tertutup. Campuran dikocok selama 5 menit dan diulang setiap 6 jam sekali selama 24 jam. Senyawa yang terlarut dipisahkan dari ampas menggunakan kertas saring *Whatman* sedangkan filtrat yang diperoleh disimpan dalam suhu kamar (filtrat pertama). Ampas yang tersisa diperas dan dilakukan maserasi ulang dengan 2 L pelarut etanol. Proses yang sama dilakukan untuk memperoleh filtrat kedua. Pada hari terakhir ampas dimasukkan kembali ke dalam bejana lalu ditambahkan 1 L pelarut etanol. Proses yang sama dilakukan kembali sampai diperoleh filtrat ketiga. Semua filtrat dikumpulkan dan dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 45°C dan dilanjutkan dengan proses pengentalan menggunakan *water bath* pada suhu 50°C untuk membuat ekstrak kental. Perolehan rendemen dihitung berdasarkan rumus:

$$\% \text{ Rendemen ekstrak} = \frac{\text{Berat ekstrak}}{\text{Berat awal simplisia kering}} \times 100\%$$

Karakteristik serbuk dan ekstrak

Kadar air dan kadar abu

Penetapan kadar air dilakukan menggunakan metode gravimetri pada 2 g sampel dalam cawan yang telah ditara. Sampel dimasukkan dalam oven suhu 105°C hingga diperoleh bobot konstan, yakni selisih bobot antara dua penimbangan cawan berturut-turut setelah dikeringkan tidak lebih dari 0,25%. Penentuan kadar air dilakukan secara duplo. Syarat kadar air yang ditetapkan tidak boleh lebih dari 10% (Depkes RI, 2000).

Penetapan kadar abu dilakukan dengan cara memasukkan 2 g sampel ke dalam krus silikat yang telah dipijar dan ditara pada suhu 500–600°C, kemudian krus dimasukkan ke dalam tanur untuk dipijarkan sampai arangnya habis dan berubah warna menjadi abu putih. Setelah krus didiamkan sampai dingin, krus ditimbang dan dipijarkan kembali hingga bobot konstan ± 0,25%. Kadar abu yang ditetapkan tidak boleh lebih dari 3,5% (Depkes RI, 2000).

Uji fitokimia

Identifikasi flavonoid dilakukan dengan cara melarutkan 0,5 g sampel dalam 5 mL etanol 96%. Serbuk 0,1 g Mg (Merck, USA) dan 10 tetes HCl pekat (Merck, USA) berturut-turut dimasukkan ke dalam 2 mL larutan sampel. Keberadaan flavonoid ditunjukkan dengan warna merah atau jingga yang terbentuk setelah tabung dikocok secara perlahan-lahan (Hanani, 2015).

Identifikasi tanin dilakukan dengan cara melarutkan 20 mg sampel dalam 10 mL air panas. Setelah dingin, larutan disaring dan filtrat dibagi ke dalam tiga tabung reaksi. Endapan putih yang terbentuk setelah penambahan 3 tetes gelatin 10% (Eurotrade, SL) dan 3 tetes NaCl (Pharma, Indonesia) + gelatin 10% pada tabung reaksi pertama dan kedua, serta endapan hijau kehitam-hitaman

setelah penambahan FeCl_3 3% (Merck, USA) pada tabung reaksi ketiga (Hanani, 2015) menunjukkan larutan positif mengandung tanin.

Identifikasi kuinon dilakukan dengan cara menambahkan sebanyak 0,5 g sampel ke dalam 5 mL akuades. Setelah dididihkan selama 5 menit, dan disaring, larutan ditambahkan NaOH (Merck, USA) lalu dikocok secara perlahan-lahan. Larutan dinyatakan positif mengandung kuinon jika terbentuk larutan berwarna kuning atau merah (Depkes RI, 2000).

Identifikasi saponin dilakukan dengan cara melarutkan sebanyak 0,5 g sampel ke dalam 10 mL air panas. Setelah dingin, larutan dikocok selama 10 menit. Keberadaan saponin ditunjukkan dengan pembentukan busa setinggi 1 sampai 10 cm dan busa tidak hilang pada penambahan 1 tetes asam klorida 2N (Hanani, 2015).

Identifikasi alkaloid dilakukan dengan cara sebanyak 0,5 g sampel dilarutkan dalam 2 mL H_2SO_4 2N, kemudian larutan dibagi menjadi dua bagian. Larutan pertama dan kedua dinyatakan positif mengandung alkaloid bila terbentuk warna merah atau terbentuk endapan berwarna jingga setelah penambahan reagen *Dragendorff* (Merck, USA) dan endapan putih atau kuning setelah penambahan reagen *Mayer* (Merck, USA) (Hanani, 2015).

Identifikasi triterpenoid dilakukan dengan cara sebanyak 0,1 g sampel dilarutkan dalam 5 mL etanol 96%. Keberadaan triterpenoid ditunjukkan dengan warna merah atau ungu yang terbentuk setelah penambahan 3 tetes *Lieberman-Burchard* pada 1 mL larutan sampel (Hanani, 2015).

Pembuatan media nutrient agar (NA) dan persiapan kertas cakram

Media NA dibuat dengan melarutkan 20 g media NA (Merck, USA) ke dalam 1 L akuades, kemudian dihomogenkan di atas penangas air sampai larutan mendidih. Tempat media ditutup dengan aluminium foil dan disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm. Media yang sudah steril dituangkan secara aseptis ke dalam

cawan petri steril dan didiamkan pada suhu ruang hingga media memadat secara sempurna (Caesar *et al.*, 2014).

Kertas cakram berukuran 6 mm disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm. Larutan uji ekstrak etanol biji bengkuang konsentrasi 6, 10, 14, 18, 22, 26, 30, dan 34%, kontrol positif siprofloksasin 100 ppm, dan kontrol negatif (pelarut akuades) masing-masing diteteskan sebanyak 20 μL pada kertas cakram steril, kemudian kertas cakram diletakkan pada permukaan agar sampai membentuk segitiga. Kertas cakram selanjutnya dikeringkan pada suhu 37°C

Uji antibakteri

Penetapan konsentrasi bunuh minimum (KBM)

Penetapan nilai KBM ekstrak biji bengkuang dilakukan dengan metode dilusi cair. Suspensi *P. aeruginosa* (koleksi Laboratorium Mikrobiologi, FMIPA Universitas Pakuan, Bogor) dengan konsentrasi $1,5 \times 10^8$ CFU/mL (kekeruhan yang setara dengan 0,5 McFarland) dimasukkan ke dalam delapan tabung reaksi yang berisi 8 mL larutan uji konsentrasi 6%, 10%, 14%, 18%, 22%, 26%, 30%, dan 34%, masing-masing sebanyak 2 mL. Tabung-tabung uji diinkubasi selama 24 jam dan diamati kekeruhan pada setiap tabung. Sebanyak 1 mL cairan diambil dari setiap tabung serial dan ditanam pada media NA. Konsentrasi terkecil yang menunjukkan tidak ada pertumbuhan bakteri pada media setelah diinkubasi kembali dinyatakan sebagai nilai KBM (Pratiwi, 2008).

Penetapan lebar daya hambat (LDH)

Pengujian LDH pada ekstrak biji bengkuang dilakukan menggunakan metode Kirby Bauer. Sebanyak 0,2 mL inokulat bakteri *P. aeruginosa* dengan konsentrasi $1,5 \times 10^8$ CFU/mL diambil dan dimasukkan ke dalam 15 mL media NA yang sudah didinginkan dan disterilkan secara aseptis. Cawan petri digerakkan melingkar untuk menyebarkan bakteri secara merata. Setelah agar mengeras,

kertas cakram yang berisi larutan uji dan kontrol diletakkan di atas media. Cawan petri diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam (Pratiwi *et al.*, 2019). Lebar zona yang terbentuk diukur menggunakan penggaris. Penetapan nilai LDH dilakukan triplo dan hasilnya dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Lebar daya hambat (LDH)} = \frac{\text{Daerah daya hambat} - \text{diameter kertas cakram}}{2}$$

Pengujian kromatografi lapis tipis (KLT)-bioautografi

KLT-bioautografi merupakan uji lanjutan yang digunakan untuk menemukan senyawa antibakteri yang belum diketahui. Hal ini dilakukan dengan cara mengidentifikasi aktivitas antibakteri pada kromatogram. Metode yang digunakan dalam KLT-bioautografi adalah bioautografi kontak di mana bercak noda terbentuk berdasarkan pada kemampuan senyawa antibakteri berdifusi dari lapisan lempeng kromatogram ke media agar yang masing-masing telah diinokulasi dengan bakteri uji. Penentuan jenis senyawa antibakteri dilihat dari nilai Rf dan perubahan warna yang terbentuk setelah penyemprotan dengan membandingkan zona bening yang terbentuk pada media agar.

Pemisahan senyawa dilakukan terlebih dahulu menggunakan plat silika berukuran 1 cm×10 cm. Tepi bawah plat diberi garis penanda pada jarak 1 cm untuk menandai posisi awal tolotan dan 1 cm dari tepi atas plat untuk menandai batas dari proses elusi. Plat diaktifkan dengan cara dipanaskan pada suhu 105°C selama 10 menit untuk menghilangkan kadar air pada plat KLT (Aslah *et al.*, 2019). Sebelum dilakukan proses elusi, eluen yang berada di dalam bejana dijenuhkan terlebih dahulu selama 10 menit untuk menyamakan tekanan uap pada seluruh bejana eluen yang digunakan, yaitu fase gerak n-heksan : kloroform : metanol dengan perbandingan (8 : 3 : 9). (Brawijasari, 2013).

Sebanyak 2 µL ekstrak biji bengkuang konsentrasi 34% ditotolkan pada masing-masing

plat KLT, kemudian dimasukkan ke dalam bejana pengembang yang berisi fase gerak yang sama. Setelah eluen mencapai batas atas, plat diambil dan disemprot dengan pereaksi AlCl₃ untuk flavonoid, FeCl₃ untuk kuinon dan tanin, *Dragendorff* untuk alkaloid, dan *Lieberman-Burchad* untuk steroid, triterpenoid dan saponin. Warna yang terbentuk pada masing-masing bercak diamati dengan lampu UV 254 nm dan UV 366 nm. Warna kuning kehijauan yang terbentuk pada penyemprotan AlCl₃ menunjukkan flavonoid (Sari & Puspitasari, 2021). Warna hitam yang kuat, biru, hijau, merah, dan ungu yang terbentuk pada penyemprotan FeCl₃ menunjukkan kuinon dan tanin (Lely *et al.*, 2017). Warna coklat, merah jingga, dan kuning yang terbentuk pada penyemprotan *Dragendorff* menunjukkan alkaloid (Tarman *et al.*, 2013). Triterpenoid ditunjukkan dengan pembentukan warna merah-ungu, sedangkan steroid dengan warna hijau atau biru pada penyemprotan *Lieberman-Burchad* (Paramita *et al.*, 2018). Selain itu, saponin dan triterpenoid ditunjukkan dengan pembentukan cincin warna coklat-ungu dan hijau-biru untuk saponin dan steroid pada penyemprotan *Lieberman-Burchad* (Pratama *et al.*, 2012). Penentuan nilai Rf dilakukan menggunakan rumus (Sastrohamidjojo, 2005):

$$\text{Nilai Retention Factor (Rf)} = \frac{\text{Jarak yang ditempuh oleh senyawa dari titik asal}}{\text{Jarak yang ditempuh oleh pelarut dari titik asal}}$$

Kromatogram yang telah di-elusi diletakkan pada media NA dalam cawan petri yang telah diinokulasi dengan 200 µL suspensi bakteri yang setara dengan 1,5×10⁸ CFU/mL. Cawan petri kemudian didiamkan selama 30 menit di lemari pendingin. Setelah 30 menit, lempeng kromatogram diangkat dan dikeluarkan dari media, selanjutnya media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil analisis aktivitas antibakteri dinyatakan dengan pembentukan zona jernih pada area kromatogram sebagai zona hambat (Kusumaningtyas *et al.*, 2008). Pengujian aktivitas antibakteri kromatogram

dilakukan secara duplo untuk memastikan ketepatan dan keakuratan hasil.

Analisis data

Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif dan kuantitatif. Analisis kuantitatif dilakukan pada data LDH ekstrak menggunakan ANOVA satu arah untuk rancangan percobaan acak lengkap dan dilanjutkan *post hoc test* Duncan. Perbedaan dikatakan signifikan bila $P < 0,05$. Sedangkan analisis deskriptif dilakukan terhadap data selain data tersebut.

Hasil

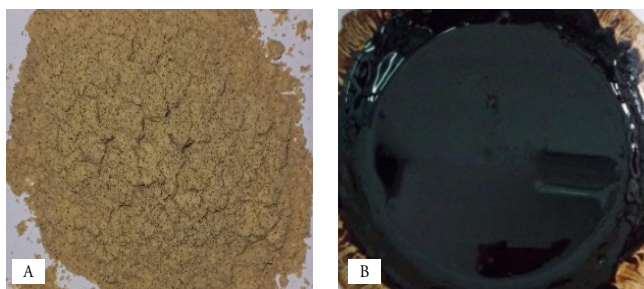
Perolehan rendemen dan karakteristik serbuk dan ekstrak kental

Sebanyak 3 kg biji kering menghasilkan 853 g serbuk dengan perolehan rendemen sebesar 28,43% dan dari 500 g serbuk yang diekstrak diperoleh ekstrak kental berwarna coklat tua sebanyak 95,9 g (**Gambar 1**) dengan perolehan rendemen sebesar 19,18%. Perolehan rendemen tidak jauh berbeda dari perolehan rendemen penelitian sebelumnya dengan cara ekstraksi yang sama (Rahminiwati *et al.*, 2020).

Serbuk simplisia mempunyai kadar air sebesar 6,67% dan kadar abu sebesar 2,06%; sedangkan ekstrak mempunyai kadar air sebesar 6,85 % dan kadar abu sebesar 1,24%. Serbuk maupun ekstrak keduanya mengandung senyawa flavonoid, tanin, kuinon, saponin, alkaloid, dan triterpenoid (**Tabel 1**).

Aktivitas antibakteri berdasarkan nilai KBM

Uji dilusi cair dan media cawan petri menunjukkan media lebih bening pada konsentrasi 26%



Gambar 1 Serbuk (A) dan ekstrak kental (B) biji bengkuang.

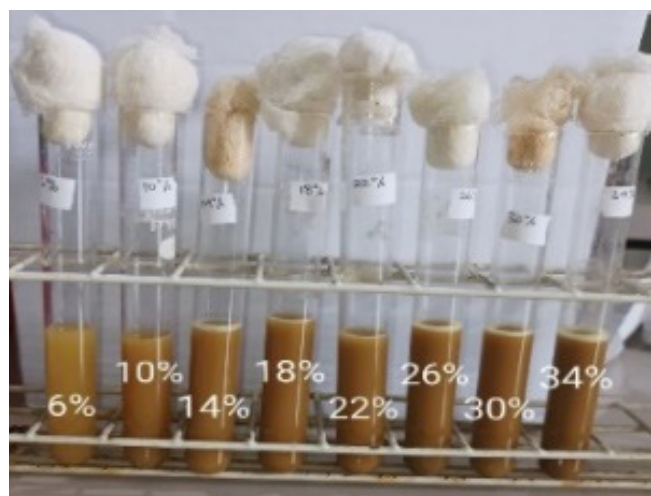
dibandingkan dengan konsentrasi sebelumnya. Berdasarkan data tersebut, nilai KBM ekstrak biji bengkuang ialah 26% (**Gambar 2, Gambar 3**). Nilai KBM pada penelitian ini lebih tinggi dibandingkan dengan hasil penelitian sebelumnya, yakni 10 mg/mL atau setara dengan 1% (Rahminiwati *et al.*, 2020).

Tabel 1 Hasil uji fitokimia serbuk dan ekstrak kental

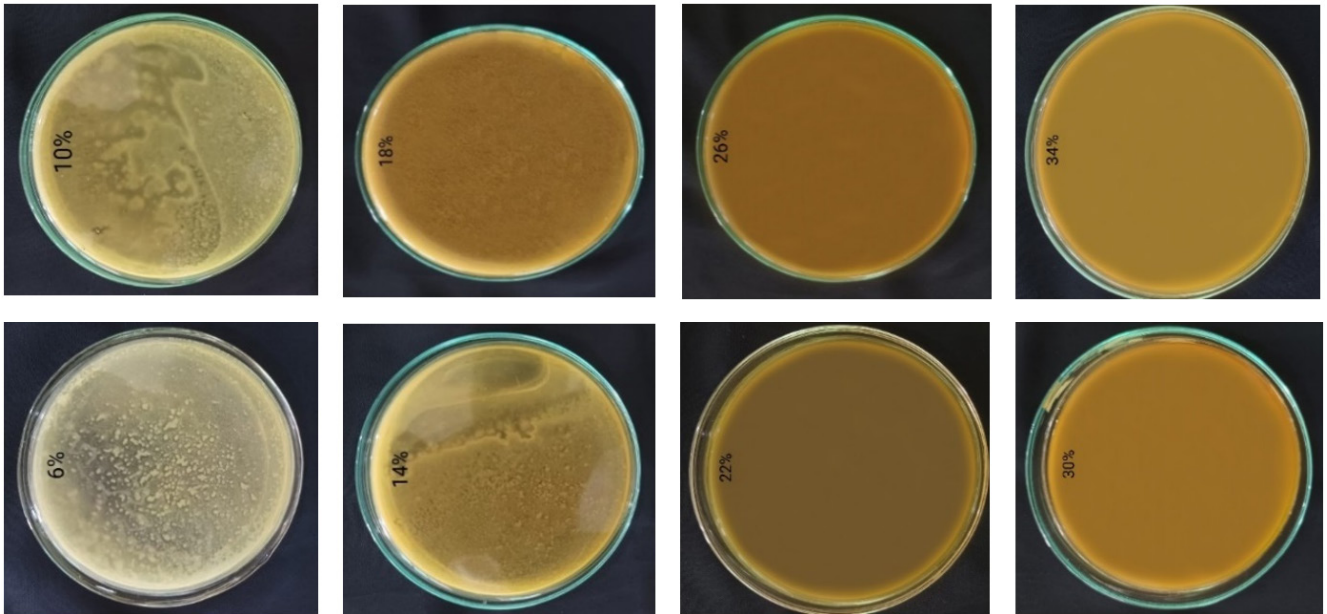
Senyawa	Pereaksi	Hasil	
		Serbuk	Ekstrak
Flavonoid	Serbuk Mg	+	+
Tanin	Gelatin 10%	+	+
	Gelatin 10% + NaCl 10%	+	+
	FeCl ₃	+	+
Kuinon	NaOH	+	+
Saponin	Akuades	+	+
Alkaloid	Dragendorff	+	+
	Mayer	+	+
Triterpenoid	Lieberman-Burchad	+	+

Aktivitas antibakteri berdasarkan nilai LDH

Aktivitas antibakteri ekstrak dengan metode difusi cakram pada konsentrasi 22%, 26%, 30%, dan 34% terhadap bakteri *P. aeruginosa* diamati bersamaan dengan aktivitas kontrol positif siprofloksasin, dan kontrol negatif akuades (**Gambar 4**). Nilai LDH yang diperoleh menunjukkan bahwa ekstrak biji bengkuang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *P.*



Gambar 2. Hasil pengujian konsentrasi hambat minimum ekstrak kental biji bengkuang hari pertama.



Gambar 3 Hasil akurasi pengujian konsentrasi bunuh minimum media cawan petri hari kedua.

aeruginosa. Nilai LDH terkecil terdapat pada ekstrak konsentrasi 22% dengan nilai LDH sebesar 2,43 mm. Nilai LDH ekstrak meningkat sejalan dengan peningkatan konsentrasi ekstrak, yaitu sebesar 2,78 mm, 4,43 mm, dan 5,68 mm berturut-turut untuk konsentrasi 26%, 30%, dan 34% (**Tabel 2**).

Tabel 2 Lebar daya hambat (LDH) ekstrak biji bengkuang terhadap *Pseudomonas aeruginosa*

Konsentrasi	Diameter rata-rata (mm) ± SD	Kategori antibakteri
K (-)	0,00 ± 0,000 ^a	Tidak ada
22%	2,43 ± 0,057 ^b	Lemah
26%	2,78 ± 0,028 ^c	Lemah
30%	4,43 ± 0,028 ^d	Lemah
34%	5,68 ± 0,076 ^e	Sedang
K (+)	23,16 ± 0,057 ^f	Sangat Kuat

Kategori diameter zona hambat: 0 (tidak memiliki daya antibakteri); ≤ 5 mm (lemah); 5–10 mm (sedang); 10–20 mm (kuat); ≥ 20 mm (sangat kuat) (David & Stout, 1971); Huruf superskrip a-f menunjukkan berbeda nyata (P<0,05).

Aktivitas antibakteri berdasarkan KLT-bioautografi

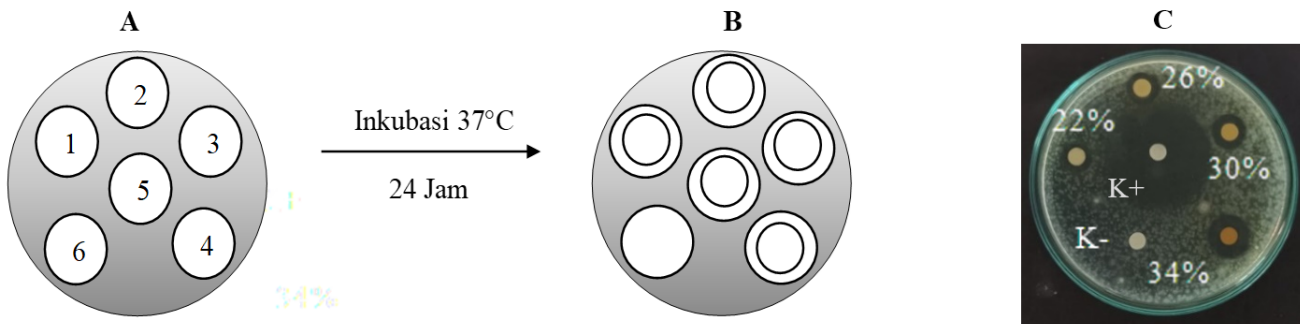
Penapisan dengan lempeng KLT berhasil teridentifikasi sebanyak 6 bercak noda, yakni bercak noda 1 dengan nilai Rf sebesar 0,812; bercak noda 2 dengan nilai Rf sebesar 0,750; bercak noda 3 dengan

nilai Rf sebesar 0,675; bercak noda 4 dengan nilai Rf sebesar 0,625; bercak noda 5 dengan nilai Rf sebesar 0,787; dan bercak noda 6 dengan nilai Rf sebesar 0,562. Lima dari 6 bercak noda yang terbentuk pada pengujian bioautografi kontak menunjukkan pembentukan zona bening, yakni pada Rf 0,812; 0,750; 0,675; 0,625; dan 0,787 yang termasuk dalam golongan senyawa flavonoid, tanin, kuinon, alkaloid, dan triterpenoid (**Gambar 5**, **Gambar 6**). Seluruh nilai LDH zona bening noda bercak tersebut tergolong lemah, yakni kurang dari 5 mm (**Tabel 3**)

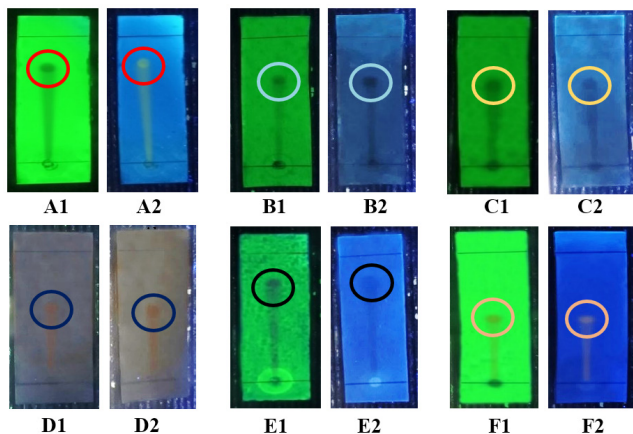
Tabel 3 Nilai Rf hasil uji fitokimia menggunakan plat kromatografi lapis tipis (KLT)

Bercak	Nilai Rf	Hasil	Zona bening	LDH (mm)	Kategori antibakteri
1	0,812	Flavonoid	+	0,194	Lemah
2	0,787	Triterpenoid	+	0,181	Lemah
3	0,750	Tanin	+	0,175	Lemah
4	0,675	Kuinon	+	0,225	Lemah
5	0,625	Alkaloid	+	0,175	Lemah
6	0,562	Saponin	-	-	-

Kategori diameter zona hambat: 0 (tidak memiliki daya antibakteri); ≤ 5 mm (lemah); 5–10 mm (sedang); 10–20 mm (kuat); ≥ 20 mm (sangat kuat) (David & Stout, 1971).



Gambar 4 Pengujian aktivitas antibakteri difusi cakram untuk menentukan nilai lebar daya hambat (LDH). A. Media agar yang sudah diinokulasi dengan bakteri; B. Zona bening hasil inkubasi selama 24 jam, kertas cakram mengandung ekstrak biji bengkuang 22% (1), 26% (2), 30% (3); 34% (4); kontrol positif Siprofloksasin (5), dan kontrol negatif akuades (6). C. Hasil uji LDH pada difusi cakram.

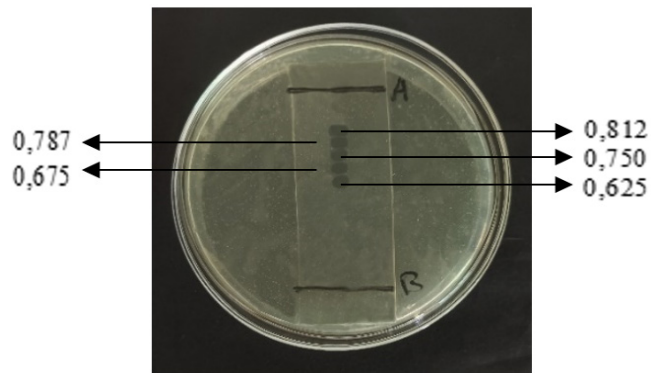


Gambar 5 Hasil uji fitokimia ekstrak biji bengkuang menggunakan plat kromatografi lapis tipis (KLT). Bercak yang menandakan golongan senyawa flavonoid (A), tanin (B), kuinon (C), alkaloid (D), triterpenoid (E), dan saponin (F). Lempeng yang berwarna hijau (1) menggunakan deteksi sinar UV 254 nm dan lempeng yang berwarna biru-keunguan (2) menggunakan deteksi sinar UV 366 nm.

Pembahasan

Kadar abu dan kadar air serbuk simplisia maupun ekstrak pada penelitian ini telah memenuhi persyaratan sesuai ketentuan Departemen Kesehatan Republik Indonesia, yaitu tidak boleh melebihi dari 3,5% dan 10 % masing masing untuk kadar abu dan kadar air (Depkes RI, 2000). Ekstrak yang diperoleh mengandung senyawa golongan tanin, saponin, kuinon, alkaloid, flavonoid, dan triterpenoid.

Brooks *et al.*, (2007) mengemukakan bahwa efektivitas suatu zat antibakteri dipengaruhi oleh konsentrasi zat yang diberikan. Konsentrasi terbaik dari ekstrak biji bengkuang yang dapat membunuh



Gambar 6 Hasil uji aktivitas antibakteri dengan metode kromatografi lapis tipis (KLT)-bioautografi menunjukkan lima bercak noda yang menunjukkan zona bening dengan nilai *retention factor* (Rf) berturut-turut 0,812, 0,750, 0,675, 0,625, dan 0,787 yang termasuk dalam golongan senyawa flavonoid, tanin, kuinon, alkaloid, dan triterpenoid.

bakteri *P. aeruginosa* adalah 34% (uji Duncan, $P < 0,05$), dengan nilai LDH sebesar 5,68 mm. Menurut David & Stout (1971), respons hambatan pertumbuhan bakteri yang dilihat berdasarkan diameter zona bening dapat dikelompokkan ke dalam kelompok respons lemah (diameter ≤ 5 mm), sedang (diameter 5–10 mm), kuat (diameter 10–20 mm), dan sangat kuat (diameter ≥ 20 mm). Berdasarkan data yang diperoleh, ekstrak tersebut mempunyai aktivitas antibakteri tergolong sedang. Aktivitas antibakteri yang ditunjukkan oleh ekstrak biji bengkuang pada konsentrasi 34% masih lebih rendah dibandingkan dengan kontrol positif.

Peneliti sebelumnya menunjukkan ekstrak biji bengkuang pada konsentrasi 16 % menghasilkan nilai LDH 5,45 mm (Rahminiwati *et al.*, 2020). Cara ekstraksi menghasilkan rendemen yang sama namun aktivitas antibakterinya lebih rendah dibanding dengan ekstrak yang diperoleh penelitian terdahulu. Perbedaan kualitas bahan baku dan tempat tumbuh bengkuang dapat memberikan kontribusi yang signifikan terhadap kandungan metabolit yang berpotensi antibakteri.

Senyawa fenolik, alkaloid, dan triterpenoid merupakan senyawa yang mempunyai aktivitas antibakteri (Tiwari *et al.*, 2011) yang luas, baik terhadap bakteri Gram positif seperti *S. aureus*, maupun terhadap Gram negatif seperti *P. aeruginosa* dan *E. coli*. Aktivitas antibakteri senyawa-senyawa ini memiliki mekanisme kerja yang beragam (Villanueva *et al.*, 2023; Li *et al.*, 2014; Larghi *et al.*, 201; Kelley *et al.*, 2013).

Aktivitas antibakteri flavonoid terjadi melalui mekanisme penghambatan pada sintesis asam nukleat, fungsi membran sitoplasma, metabolisme energi, pelekatan dan pembentukan biofilm, fungsi porin dan permeabilitas membran, serta patogenisitas (Xie *et al.*, 2015). Kemampuan senyawa bioaktif tersebut melewati dinding sel bakteri hingga ke membran internal dapat mengganggu metabolisme sel dan menyebabkan sel bakteri menjadi hancur (Kaczmarek, 2020).

Senyawa kelompok polifenol yang lain, selain flavonoid, yang mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *P. aeruginosa* adalah tanin dan kuinon. Tanin mempunyai aktivitas antibakteri dan antibiofilm terhadap *P. aeruginosa* (Villanueva *et al.*, 2023). Kuinon, yang merupakan sumber radikal bebas, dapat membentuk senyawa kompleks dengan asam amino nukleofilik dalam protein yang berakibat pada penghilangan fungsi protein. Kemungkinan target aktivitas antibakteri dalam sel bakteri adalah adhesin yang terpajan di permukaan, polipeptida dinding sel, dan enzim yang terikat membran. Kuinon juga dapat mengganggu

ketersediaan substrat untuk mikroorganisme (Cowan, 1999). Aktivitas antibiofilm kuinon terjadi karena kekurangan substrat, membran yang pecah, pengikatan kompleks adhesin ke dinding sel, pengikatan protein, dan interaksi dengan DNA eukariotik (Lu *et al.*, 2019).

Studi terhadap mekanisme antibakteri alkaloid alami menunjukkan alkaloid memiliki kemampuan merusak membran sel bakteri (Li *et al.*, 2014), memengaruhi fungsi DNA (Larghi *et al.*, 2015), dan menghambat sintesis protein (Kelley *et al.*, 2013). Triterpenoid, selain memengaruhi struktur peptidoglikan, juga memengaruhi ekspresi gen dan pembentukan biofilm. (Huang *et al.*, 2015; Park *et al.*, 2015).

Data bioautografi menunjukkan keluasan sensitivitas *Pseudomonas* terhadap metabolit sekunder dari ekstrak bengkuang yang lebih baik dibandingkan dengan sensitivitas *Pseudomonas* terhadap ekstrak lengkuas putih dan bunga teratai putih. Tiga dari 5 bercak noda ekstrak metanol lengkuas putih mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Pseudomonas* yang teridentifikasi sebagai fenolik, flavonoid, dan terpenoid (Puspita & Muflihah, 2023) dan satu dari 6 bercak noda ekstrak eter bunga teratai putih yang teridentifikasi sebagai karotenoid (Dhuha & Wahid, 2020).

Data bioautografi juga menunjukkan bahwa LDH bakteri yang dihambat pada setiap nilai Rf yang dihasilkan lebih kecil dan tergolong lemah (**Gambar 6, Tabel 3**) daripada nilai LDH ekstrak etanol 70 % konsentrasi 34% (**Tabel 2**). Aktivitas antibakteri yang lemah tercermin dari nilai LDH yang kecil ketika bioaktif dalam keadaan terpisah, namun aktivitasnya berubah menjadi tergolong sedang, yang ditunjukkan dengan nilai LDH yang lebih luas, ketika bioaktif bergabung dalam bentuk ekstrak kasar. Mekanisme kerja yang beragam dari masing-masing golongan senyawa tersebut sebagai antibakteri menghasilkan suatu spekulasi bahwa aktivitas antibakteri ekstrak biji bengkuang dalam penelitian ini merupakan hasil interaksi antara

komponen penyusun ekstrak tersebut. Hal ini sejalan dengan apa yang dikemukakan oleh Wrońska *et al.* (2022) bahwa aktivitas antibakteri flavonoid bersinergi dengan aktivitas antibakteri triterpenoid dalam membunuh bakteri, baik bakteri Gram positif maupun bakteri Gram negatif.

Simpulan

Ekstrak biji bengkuang mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *P. aeruginosa* yang berasal dari senyawa yang teridentifikasi pada Rf 0,812; 0,750; 0,675; 0,625; dan 0,787 sebagai golongan senyawa flavonoid, tanin, kuinon, alkaloid, dan triterpenoid. Aktivitas antibakteri ekstrak biji bengkuang terhadap *P. aeruginosa* kemungkinan sebagai hasil dari interaksi secara sinergis antara senyawa-senyawa yang terdapat di dalam ekstrak biji bengkuang tersebut. Senyawa kimia yang saling berinteraksi untuk menimbulkan efek antibakteri terhadap *P. aeruginosa* perlu diteliti lebih lanjut.

Ucapan terima kasih: Penulis mengucapkan terima kasih kepada laboran di Laboratorium Mikrobiologi, FMIPA Universitas Pakuan, Bogor yang telah membantu pelaksanaan penelitian ini.

Pendanaan: Tidak ada

Konflik kepentingan: Semua penulis menyatakan tidak terdapat konflik kepentingan dalam penelitian ini.

Kontribusi penulis: MR, SM, dan ARS merancang dan menganalisis data, ARS melaksanakan penelitian, dan MR menulis artikel.

Referensi

- Allemailem KS. 2021. Antimicrobial potential of naturally occurring bioactive secondary metabolites. *Journal of Pharmacy & Bioallied Science*, 13(2): 155–162. DOI: 10.4103/jpbs.JPBS_753_20.
- Aslah A, Lolo WA, Jayanto I. 2019. Aktivitas antibakteri dan analisis KLT-bioautografi dari fraksi daun mengkudu (*Morinda citrifolia* L.). *Pharmacon*, 8(2): 505–515. DOI: 10.35799/pha.8.2019.29320.
- Kaczmarek B. 2020. Tannic acid with antiviral and antibacterial activity as a promising component of biomaterials—a minireview. *Materials (Basel)*, 13(14): 3224. DOI: 10.3390/ma13143224.
- Brawijasari LK. 2013. Aktivitas antibakteri dan bioautografi ekstrak etanol kulit kayu akway (*Drimys piperita* Hook. f.) terhadap *Bacillus subtilis* dan *Pseudomonas aeruginosa*. [Disertasi]. Surakarta (ID): Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Brooks G, Butel JS, Morse SA. 2007. Jawetz, Melnick, dan Adelberg's Medical Microbiology Kedokteran. Jilid 1. Jakarta (ID): Penerbit EGC.
- Caesar RY, Hapsari I, Dhiani BA. 2014. formulasi dan aktivitas antibakteri lotion minyak atsiri buah adas (*Foeniculum vulgare* Mill). *Media Farmasi*, 11(1): 41–54. DOI: 10.12928/MFV1111.1396.
- Compean KL, Ynalvez RA. 2014. Antimicrobial activity of plant secondary metabolites: A reviews. *Research Journal of Medicinal Plant*, 8(5): 204–213.
- Cowan MM. 1999. Plant product as antimicrobial agent revolution. *Clinical Microbiology Review*. 12(4): 561–82. DOI: 10.1128/CMR.12.4.564.
- David WW, Stout TR. 1971. Disc plate method of microbiological antibiotic assay. I. Factors influencing variability and error. *Applied Microbiology*, 22(4): 659–665. DOI: 10.1128/am.22.4.659-665.1971.
- Dhuha NS, Wahid A. 2020. Aktivitas senyawa bioaktif ekstrak bunga teratai putih (*Nymphaea alba* L) terhadap *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus aureus* dengan metode bioautografi. *Medical Sains: Jurnal Ilmiah Kefarmasian*, 5(1): 69–78. DOI: 10.37874/ms.v5i1.151.
- [Depkes RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2000. Parameter standar mutu ekstrak tumbuhan obat. Jakarta (ID): Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Forestryana D, Arnida. 2020. Skrining fitokimia dan analisis kromatografi lapis tipis ekstrak etanol daun jeruju (*Hydrolea Spinosa* L.). *Jurnal*

- Ilmiah Farmako Bahari*, 11(2): 113–124. DOI: 10.52434/jfb.v11i2.859.
- Gandjar IG, Rohman A. 2007. Kimia farmasi analisis. Yogyakarta (ID): Penerbit Pustaka Pelajar.
- Hanani E. 2015. Analisis fitokimia. Jakarta (ID): Penerbit EGC.
- Huang L, Luo H, Li Q, Wang D, Zhang J, Hao X, Yang X. 2015. Pentacyclic triterpene derivatives possessing polyhydroxyl ring A inhibit Gram-positive bacteria growth by regulating metabolism and virulence genes expression. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 95: 64–75. DOI: 10.1016/j.ejmech.2015.01.015.
- Kelley C, Lu S, Parhi A, Kaul M, Pilch DS, LaVoie EJ. 2013. Antimicrobial activity of various 4- and 5-substituted 1-phenyl-naphthalenes. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 60: 395–409. DOI: 10.1016/j.ejmech.2012.12.027.
- Kusumaningtyas E, Astuti E, Darmono. 2008. Sensitivitas metode bioautografi kontak dan agar overlay dalam penentuan senyawa antikapang. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 6(2): 75–78.
- Larghi E, Bracca A, Aguilar, AA, Heredia D, Pergomet J, Simonetti S, Kaufman, T. 2015. Neocryptolepine: a promising indolisoquinoline alkaloid with interesting biological activity. evaluation of the drug and its most relevant analogs. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 15(17): 1683–1707. DOI: 10.2174/1568026615666150427113937.
- Lely N, Triwidodo J, Sari ER. 2017. Uji aktivitas antimikroba ekstrak daun wungu (*Graptophyllum pictum* L.Griff) dengan metode bioautografi. *Jurnal Ilmiah Bakti Farmasi*, 2(1): 49–56.
- Li N, Tan SN, Cui J, Guo N, Wang W, Zu YG, Jin S, Xu XX, Liu Q, Fu YJ. 2014. PA-1, a novel synthesized pyrrolizidine alkaloid, inhibits the growth of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by damaging the cell membrane. *The Journal of Antibiotics*, 67: 689–696. DOI: 10.1038/ja.2014.49.
- Lu L, Hu W, Tian Z, Yuan D, Yi G, Zhou Y, Cheng Q, Zhu J, Li M. 2019. Developing natural products as potential anti-biofilm agents. *Chinese Medicine*, 14: 11. DOI: 10.1186/s13020-019-0232-2.
- Mariita RM, Ogol CKPO, Oguge NO, Okemo PO. 2011. Methanol extract of three medicinal plants from Samburu in Northern Kenya show significant antimycobacterial, antibacterial and antifungal properties. *Research Journal of Medicinal Plant*, 5: 54–64. DOI: 10.3923/RJMP.2011.54.64.
- Necha LLB, Banos SB, Luna LB, Suarez FJLG. 2014. Antifungal activity of seed powders, extracts, and secondary metabolites of *Pachyrhizus erosus* (L.) Urban (Fabaceae) against three postharvest fungi. *Revista Mexicana de Fitopatologia*, 22(3): 356–361.
- Paramita S, Yasir Y, Yuniati Y, Sina I. 2018. Analisis bioautografi kromatografi lapis tipis dan aktivitas antibakteri ekstrak etanol bawang tawai (*Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb.) terhadap Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Jurnal Sains dan Kesehatan*, 1(9): 470–478. DOI: 10.25026/jsk.v1i9.86.
- Park SN, Ahn SJ, Kook JK. 2015. Oleanolic acid and ursolic acid inhibit peptidoglycan biosynthesis in *Streptococcus mutans* UA159. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2): 613–617. DOI: 10.1590/S1517-838246246220130209.
- Pratama, M. A, Hosea JE, Jovie MD. 2012. isolasi dan identifikasi senyawa saponin dari ekstrak metanol batang pisang ambon (*Musa paradisiaca* var. *sapientum* L.). *Pharmakon*. 1(2): 86–92. DOI: 10.35799/pha.1.2012.914.
- Pratiwi. 2008. Mikrobiologi farmasi. Jakarta (ID): Penerbit Erlangga.
- Puspita IT, Mufflihah CH. 2023. Aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi rimpang lengkuas putih (*Alpinia galanga*) terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Bacillus subtilis* serta bioautografinya. *Usadha Journal of Pharmacy*,

- 2(2): 144–62. DOI: 10.1234/ujp.v2i2.143.
- Radji M. 2011. Buku ajar mikrobiologi panduan mahasiswa farmasi dan kedokteran. Jakarta (ID): Penerbit EGC.
- Rahminiwati M, Ramadhan J, Komala O. 2020. Aktivitas antimikroorganisme ekstrak etanol 70% biji bengkuang terhadap *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Candida albicans*. *Jurnal Sain Veteriner*, 38(3): 289–298. DOI: 10.22146/jsv.44589.
- Sari GNF, Puspitasari I. 2021. Aktivitas antibakteri dan bioautografi ekstrak daun rambusa (*Passiflora foetida* L) terhadap *Pseudomonas aeruginosa* dan *Klebsiella pneumoniae*. *Media Farmasi*, 18(2): 102–114. DOI: 10.12928/mf.v18i2.21537.
- Sastrohamidjojo H. 2005. Kromatografi. Yogyakarta (ID): Penerbit Liberty.
- Sudirman LI. 2005. Deteksi senyawa antimikroba yang diisolasi dari beberapa lentinus tropis dengan metode bioautografi. *Hayati Journal of Biosciences*, 12(2): 67–72. DOI: 10.1016/S1978-3019(16)30327-8.
- Tarman K, Purwaningsih S, Negara AAPAP. 2013. Aktivitas antibakteri ekstrak daun bakau hitam (*rhizophora mucronata*) terhadap bakteri penyebab diare. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 16(3): 249–258. DOI: 10.17844/jphpi.v16i3.8063.
- Tiwari P, Kumar B, Kaur M, Kaur G, Kaur H. 2011. Phytochemical screening and extraction: a review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1(1): 98–106.
- Vahdani M, Azimi L, Asghari B, Bazmi F, Rastegar Lari A. 2012. Phenotypic screening of extended-spectrum ss-lactamase and metallo-ss-lactamase in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from infected burns. *Annals of Burns and Fire Disasters*, 25(2): 78–81.
- Villanueva X, Zhen L, Ares JN, Vackier T, Lange H, Crestini C, Steenackers HP. 2023. Effect of chemical modifications of tannins on their antimicrobial and antibiofilm effect against Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 13: 987164. DOI: 10.3389/fmicb.2022.987164.
- Wiredu CB. 2014. Evaluation of starch properties, phytochemical composition and antimicrobial activities of yam bean (*Pachyrhizus erosus* L. Urban.). [Thesis]. Kumasi (GH): Kwame Nkrumah University of Science and Technology.
- Wrońska N, Szlaur M, Zawadzka K, Lisowska K. 2022. The synergistic effect of triterpenoids and flavonoids—New approaches for treating bacterial infections? *Molecules (Basel)*, 27(3): 847. DOI: 10.3390/molecules27030847.
- Xie Y, Yang W, Tang F, Chen X, Ren L. 2015. Antibacterial activities of flavonoids: structure-activity relationship and mechanism. *Current Medicinal Chemistry*, 22(1): 132–49. DOI: 10.2174/0929867321666140916113443.