

**IDENTIFIKASI SENYAWA EKSTRAK ETANOL DAUN MIMBA
(*Azadirachta indica* A.Juss) SEBAGAI ANTIBAKTERI SECARA
KLT-BIOAUTOGRAFI TERHADAP BAKTERI *Staphylococcus aureus*
DAN *Escherichia coli***

Nurfijrin Ramadhani, Agung Giri Samudra, Jimmy Armando
Akademi Farmasi Al-Fatah Bengkulu
Email: nurfijrin@gmail.com

ABSTRAK

Rendahnya kesadaran masyarakat dan kurangnya sarana kesehatan membuat penyakit infeksi semakin meningkat. Pengobatan secara alami sekarang menjadi pilihan baru sebagai antibakteri, salah satunya adalah mimba. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa daun mimba dapat menghambat pertumbuhan bakteri, akan tetapi belum diketahui senyawa apa yang berperan sebagai antibakteri tersebut. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui di dalam daun mimba senyawa yang berperan sebagai antibakteri. Penelitian dilakukan dengan metode KLT Bioautografi langsung, dimana hasil maserasi ekstrak etanol daun mimba yang telah dielusi ditempelkan ke media yang telah ditanami bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Zona hambat yang terbentuk dilakukan identifikasi senyawa dengan menggunakan pereaksi semprot Dragendorf, FeCl_3 , Sitroborat, Lieberman Bouchardat, dan SbCl_3 . Hasil uji KLT-Bioautografi menunjukkan bahwa daun mimba dapat menghambat pertumbuhan bakteri yang ditandai dengan terbentuknya zona bening masing-masing dengan Rf 0,4 pada bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Senyawa yang berperan sebagai antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* diduga adalah senyawa saponin dimana terbentuk warna ungu dengan pereaksi SbCl_3 .

Kata Kunci : Daun Mimba (*Azadirachta indica* A.Juss), KLT Bioautografi, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*

ABSTRACT

Low public awareness and insufficient health facilities make infectious diseases is increasing. Natural medicine is now a new option as an antibacterial, one of which is mimba. Previous studies have shown that mimba leaf can inhibit the growth of bacteria, but is not yet known what compounds which act as antibacterial. This research purpose to know in mimba leaf that acts as an antibacterial compound. The research conducted by method of direct bioautografi T/C, where the results of the ethanol extract of mimba leaf maceration which has eluted affixed to the media which have been affixed *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteria. Inhibition zone formed to identify compounds using spray reagent Dragendorff, $FeCl_3$, Sitroborat, Lieberman Bouchardat, dan $SbCl_3$. Bioautografi TLC results indicate that mimba leaf can inhibit the growth of bacteria marked by the formation of a clear zone with rf 0,4 in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. Which act as antibacterial compounds against bacterial *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* is suspected saponins, which are formed purple with reagent $SbCl_3$.

Keywords : Mimba leaf (*Azadirachta indica* A.Juss), Bioautografi TLC, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*

PENDAHULUAN

Penyakit infeksi merupakan salah satu penyakit yang menjadi perhatian serius untuk segera diatasi (Kandhasamy dan Arunachalam, 2008). Menurut Profil Kesehatan Indonesia tahun 2010, prevalensi dan jumlah kasus penyakit infeksi di Indonesia lebih tinggi dibandingkan negara ASEAN yang lainnya.

Kasus penyakit infeksi yang masih banyak terjadi di Indonesia diantaranya disebabkan oleh bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Infeksi yang disebabkan oleh bakteri *Escherichia coli* seperti infeksi pada saluran kemih, diare, sepsis, dan meningitis (Jawetz et al., 1995).

Sedangkan *Staphylococcus aureus* menyebabkan bisul, jerawat, impetigo, infeksi luka, pneumonia, meningitis, osteomyelitis, dan endokarditis (Plata dkk, 2009).

Tanaman mimba mempunyai banyak manfaat bagi kehidupan manusia. Daun mimba dimanfaatkan untuk penambah nafsu makan, disentri, borok, malaria dan antibakteri (Sudarsono et al., 2002).

Pritima dan Pandian (2008) menyebutkan bahwa ekstrak daun mimba mampu menghambat *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*,

Proteus mirabilis, dan *Staphylococcus aureus*.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah seperangkat alat maserasi, gelas ukur, erlenmeyer, tabung reaksi, timbangan analitik, lemari pengering, *rotary evaporator*, *autoklaf*, lampu spiritus, cawan petri, jarum ose, jangka sorong, *pipa kapiler*, *chamber*, *Spray*, *LAF (Laminar Air Flow)*, inkubator, kapas, aluminium foil, lempeng silika gel gf 254. Bahan yang digunakan adalah daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss), etanol 70%, aquadest, Dimetil sulfoksida (DMSO), n-heksana, etil asetat, metanol, *Nutrient Agar* (NA), *Nutrient Broth* (NB), biakan murni *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*, Pereaksi semprot : dragendorf, $FeCl_3$, $SbCl_3$, liebarman bouchardat dan sitroborat.

Prosedur Kerja

Maserasi dilakukan dengan cara memasukkan 10 bagian simplisia kedalam sebuah bejana, dengan 75 bagian cairan penyari, tutup, biarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya sambil sering diaduk. Setelah 5 hari

serkai, peras, cuci ampas dengan cairan penyari secukupnya hingga diperoleh 100 bagian. Maserat diuapkan pada tekanan rendah pada suhu tidak lebih dari 50°C (Anonim, 2010).

Pemisahan Senyawa Secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Ekstrak senyawa dengan konsentrasi dibawah $\leq 1000 \mu\text{g/mL}$ dipisahkan secara KLT menggunakan fase diam selika gel GF 254. Ekstrak tersebut ditotolkan pada plat KLT, kemudian dielusikan dengan fase gerak berupa Etil asetat : Metanol : Amoniak 25% (85 : 10 : 5). Selanjutnya diamati di bawah lampu UV 254 dan dihitung nilai Rf nodanya.

Pembuatan Medium

Media yang digunakan adalah media padat NA dan media cair NB. Media dibuat dengan melarutkan NA/NB dalam aquadest kemudian dimasukan dalam erlenmeyer dan ditutup dengan kapas lalu dipanaskan dan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit

Peremajaan Bakteri

Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherhia coli* yang berasal dari biakan murni diambil satu ose lalu diinokulasikan dengan cara digoreskan dengan medium NA secara aseptik, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 16-18 jam.

Pembuatan Larutan Bakteri

Satu ose bakteri hasil peremajaan biakan murni dibiakkan dalam media cair NB dan dihomogenkan. Media cair tersebut dibandingkan dengan larutan standar kekeruhan yang dibuat dari 0,5 ml 1,175 % BaCl₂ 2H₂O ditambah 99,5 ml H₂SO₄ 1 %.

Pengujian KLT- Bioautografi

Suspensi *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* di goreskan ke NA menggunakan lidi kapas steril hingga seluruh permukaan NA tertutup. NA di biarkan selama 5-15 menit agar suspensi bakteri dapat meresap.

Setelah meresap, lempeng KLT yang telah dielusi diletakkan di atas permukaan media agar. Setelah 30 menit lempeng tersebut diangkat dan dipindahkan, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 16-18 jam.

Identifikasi Senyawa Antibakteri

Noda yang membentuk zona hambatan pada lempeng KLT disemprot dengan pereaksi semprot untuk menentukan jenis senyawa yang menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Determinasi tumbuhan dilakukan di Laboratorium Fakultas Biologi Universitas Bengkulu. Berdasarkan surat keterangan nomor 208/UN30.28.LAB.BIOLOGI/PM/2014 Hasil menunjukkan bahwa tumbuhan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah Mimba (*Azadirachta indica* A.Juss)

Tabel I. Hasil karakteristik ekstrak etanol daun mimba (*Azadirachta indica* A.Juss)

Karakteristik Ekstrak	Ekstrak EtanolDaun Mimba
a. Organoleptik <ul style="list-style-type: none"> ▪ Konsistensi ▪ Warna ▪ Bau ▪ Rasa 	Ekstrak Kental Hitam Kehijauan Khas Pahit
b. Susut Pengeringan	12 %
c. Kadar Abu	5,5 %

Keterangan :

* Memenuhi syarat kadar air bila < 30% (Voight, 1994)

** Memenuhi syarat kadar abu bila < 7 % (Anonim, 1989).

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bagian daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss). Sampel daun mimba yang telah dikumpulkan dibersihkan dari pengotor dan dicuci dengan air mengalir hingga bersih, lalu dirajang. Daun yang telah dirajang dikeringkan pada suhu kamar terlindung dari cahaya matahari langsung untuk mengurangi kadar air dan menghentikan reaksi enzimatik sehingga simplisia dapat disimpan dalam waktu yang lebih lama tanpa terjadi penurunan mutu atau perusakan simplisia (Prasetyo & Inorih, 2013).

Ekstraksi senyawa kimia yang terkandung dalam tumbuhan daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) dilakukan dengan menggunakan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Proses maserasi dilakukan selama 5 hari (Anonim, 2010). Selama perendaman dilakukan pengadukan sesering mungkin, agar senyawa-senyawa yang terdapat pada simplisia dapat larut dengan baik. Ekstrak cair yang diperoleh kemudian diuapkan dengan menggunakan *vacum rotary evaporator* pada suhu 50°C, sehingga diperoleh ekstrak kental daun mimba.

Tabel II. Hasil pemeriksaan kandungan ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica* A.Juss)

No.	Senyawa Kimia	Hasil Pengamatan	Keterangan
1.	Flavonoid	Merah Jingga	+
2.	Saponin	Terbetuknya busa	+
3.	Terpenoid	Violet/ Biru	+
4.	Fenol	Biru Kehitaman	+
5.	Steroid	Biru	-
6.	Alkaloid	↙ Putih kuning/ jingga coklat	+

Keterangan :

(+) menunjukkan reaksi positif

(-) menunjukkan reaksi negatif

Ekstrak etanol daun mimba yang diperoleh, berwarna hitam kehijauan, memiliki bau khas, rasa yang pahit dan konsistensi berupa ekstrak kental. Selanjutnya, ekstrak etanol daun mimba dilakukan

pemisahan dengan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT). Fase diam yang digunakan yaitu silica gel GF 254, sedangkan fase gerak berupa campuran pelarut etil asetat : metanol : ammonia (85:10:5). Pada awalnya fase gerak yang digunakan berupa campuran n-heksan, etil asetat dan metanol dengan perbandingan 2:6:1. Akan tetapi dengan perbandingan tersebut tidak terjadi pemisahan senyawa sewaktu mengelusi ekstrak etanol daun mimba. Oleh karena itu, dilakukan optimasi pelarut berdasarkan pada indeks polaritas pelarut. Pada pengoptimasian pelarut/ eluen telah dilakukan optimasi dengan menggunakan beberapa perbandingan n-heksan : etil asetat : metanol (3:2:1 ; 2:1:3 ; 1:3:2 ; 1:2:3 ; 4:1:1), n heksan : etil asetat (8:2 ; 2:8 ; 9:1 ; 1:9) Ternyata, pengoptimasian berdasarkan indeks polaritas saja tidak cukup untuk dapat memisahkan senyawa yang terdapat pada ekstrak etanol daun mimba, maka perlu ada

penambahan sedikit asam etanoat atau amonia karena masing-masing akan meningkatkan solut-solut yang bersifat basa dan asam, dan agar dapat mengoptimasi fase gerak yang digunakan (Sutrisno, 1993). Oleh sebab itu fase gerak yang digunakan menjadi Etil asetat : Metanol : Amoniak 25% (85 : 10 : 5).

Pada lempeng silica dibuat garis batas bawah dan batas atas. Jarak dari batas bawah adalah 2 cm dengan jarak penotolan antar sampel masing-masing 2 cm serta jarak tempuh pelarut dengan jarak 12 cm. Jarak 12 cm dikarenakan untuk menyesuaikan dengan cawan petri yang ada agar plat hasil elusi dapat ditempelkan. Selanjutnya ekstrak ditotolkan dan dielusi. Setelah selesai bercak noda diamati di bawah sinar UV 254. Hasil menunjukkan bahwa terjadi pemisahan senyawa dengan terdapat 3 buah bercak noda pada Rf 0,40 Rf 0,55, Rf 0,90 seperti yang terlihat pada tabel IV.

Tabel III. Hasil pemisahan senyawa ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica* A.Juss) dengan kromatografi lapis tipis.

Jarak Tempuh Noda	Nilai Rf
4,8 cm	0,40
6,7 cm	0,55

10,9 cm	0,90
---------	------

Uji Bioautografi dilakukan dengan menempelkan hasil elusi dari KLT ke masing-masing permukaan agar yang telah ditanami bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* selama 30 menit dan diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam, kemudian diamati zona bening yang terbentuk. Pada bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* masing-masing terdapat zona bening pada Rf 0,40. Hasil penyemprotan noda yang menghambat tersebut dengan pereaksi SbCl₃ memberikan warna

ungu yang menandakan bahwa senyawa yang bersifat sebagai antibakteri tersebut adalah saponin. Saponin bekerja sebagai antibakteri dengan mengganggu stabilitas membran sel bakteri sehingga menyebabkan sel bakterilisis. Saponin mengganggu permeabilitas membran sel bakteri yang mengakibatkan kerusakan membran sel dan menyebabkan keluarnya berbagai komponen penting dari dalam sel bakteri yaitu protein, asam nukleat dan nukleotida (Ganiswarna, 1995)

Tabel IV. Hasil uji KLT- Bioautografi

No	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
	Nilai Rf	Nilai Rf
1	0,40	0,40

Tabel V. Hasil identifikasi senyawa ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica* A.Juss) dengan pereaksi semprot dari uji bioautografi

Pereaksi Semprot	Senyawa	Teori	Pengamatan	Kandungan Kimia
FeCl ₃	Fenol	Biru, Merah ungu, hijau, hitam kuat	Orange kekuningan	-
dragendorff	Alkaloid	Coklat jingga	Merah kecoklatan	-
Sitroborat	Flavonoid	Berpendar	Putih	-
SbCl ₃	Saponin	Ungu, coklat	Warna ungu pada sinar tampak	Saponin
Bourchad	Terpenoid	Biru kekuningan	Merah kecoklatan	-

KESIMPULAN

Metode KLT-Bioautografi dapat digunakan untuk mengetahui kandungan senyawa ekstrak etanol daun mimba yang mempunyai kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri. Senyawa paling berperan pada daun mimba sebagai antibakteri diduga adalah senyawa saponin.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim., 1989, *Materia Medika Indonesia Jilid V*, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta: 67-71.
- Anonim., 2010, *Acuan Sediaan Herbal*, Badan POM RI, Jakarta: 6-8.
- Anonim., 2011, *Profil Kesehatan Indonesia 2010*, Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Ganiswarna S. G., 1995, *Farmakologi dan Terapi, ed. IV*, UI-Fakultas Kedokteran, Jakarta.
- Jawetz E., J. L. Melnick, E. A. Adelberg, G. F. Brooks, J. S. Butel, L. N. Ornston., 1995, *Mikrobiologi Kedokteran, ed. XX*, University of California, San Francisco.
- Kandhasamy M., Arunachalam K.D., 2008, *Evaluation of in vitro antibacterial property of seaweeds of southeast coast of India*, African Journal of Biotechnology Vol 7 (12), pp, 1958-1951.
- Plata, K., Rosato, A, E., and Wegrzyn, G., 2009, *Staphylococcus aureus as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity*, Acta Biochimica Polonica 56 (4): 597-612.
- Prasetyo dan Inorah Entang., 2013, *Pengelolaan Budidaya Tanaman Obat-Obatan (Simplisia)*, Badan Penerbitan Fakultas Pertanian UNIB, Bengkulu: 17-20.
- Pritima, R.A. and Pandian, R.S., 2008, *Antibacterial Potency of Crude Extract of Azadirachta indica A. Juss (Leaf) Against Microbes Causing Reproductive Tract Infections Among Women*, Current Biotica, vol. 2, pp. 2-6.
- Sudarsono, Gunawan, D., Wahyuono, S., Donatus, A.I., dan Purnomo, 2002, *Tumbuhan Obat II, Hasil Penelitian, Sifat-Sifat, dan Penggunaan*, Pusat Studi Obat Tradisional UGM, Yogyakarta.
- Sutrisno, B., 1993, *Pereaksi Kromatografi Lapis Tipis*, Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Jakarta.
- Voight, R., 1994, *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi Edisi V*, Gadjah Mada University Pres. Yogyakarta.