

**EVALUASI DAN IDENTIFIKASI GOLONGAN SENYAWA
POTENSIAL ANTIBAKTERI PADA DAUN DAN KULIT
BATANG MIMBA (*Azadirachta indica* A. Juss)
TERHADAP *Escherichia coli***

Oleh :

Efi Srivita Sinambela¹

0101047703

Jamaluddin²

1901021003

Universitas Audi Indonesia

Jln. Bunga Ncole Raya, No. 83 Medan Tuntungan

efisrivita02@gmail.com

ABSTRAK

Mimba (*Azadirachta indica* A.Juss) merupakan tanaman yang berpotensi dikembangkan sebagai antibakteri baik bagian daun maupun kulit batang. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan efektivitas antibakteri ekstrak daun dan kulit batang mimba terhadap *Escherichia coli* dan mengidentifikasi golongan senyawa potensial antibakteri pada fraksi teraktif. Ekstraksi dilakukan dengan metode sonikasi. Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi padat menggunakan sumuran dan KLT-Bioautografi. Fraksinasi ekstrak dilakukan dengan metode partisi. Komponen kimia ekstrak dan fraksi dianalisis menggunakan KLT dan GCMS. Hasil ekstraksi sonikasi diperoleh minyak daun (12,02%), ekstrakdaun (4,3%) dan kulit batang (16,85%). Skrining fitokimia menunjukkan minyak daun, ekstrak daun dan kulit batang mimba mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, fenolik, saponin, triterpenoid, steroid dan sterol. Komponen kimia mayor hasil analisis GCMS minyak daun mimba adalah 2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one (6,06%), L- Proline,1-acetyl-(CAS) acetylproline (5,85%), 4-Hydroxy-2-methyl-pyrrolidine-2-carboxylic acid (21,42%), 2,3-Dyhidrobenzofuran (2,69%), alpha-d-methylglucopyranoside (4,54%), asam palmitat (2,92%), arabino-hex-1-enitol, 1,5-anhydro-2-deoxy-(CAS)glucal (31,69%). Hasil uji antibakteri menunjukkan minyak daun lebih efektif menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* dibandingkan dengan ekstrak daun dan kulit batang. Fraksi n-heksan menunjukkan aktivitas antibakteri paling besar dibandingkan fraksi etil asetat dan etanol. Hasil skrining fitokimia fraksi n-heksan menunjukkan adanya senyawa triterpenoid, steroid, sterol dan fenolik.

Kata kunci: antibakteri, minyak daun, *Azadirachta indica* A. Juss., KLT-Bioautografi, analisis GCMS.

***Evaluation and Identification of Antibacterial Compound of Neem Leaves
and Barks (*Azadirachta indica* A.Juss) Against *Escherichia coli****

ABSTRACT

Neem (Azadirachta indica A.Juss) is a plant that potentially developed for antibacterial agent for both the leaves and barks. The aims of this study were to compare the effectiveness of the antibacterial activity of neem leaves and stem barks extract and to identify the antibacterial compounds of the most active fractions. The extraction method was done using sonication method. Antibacterial activity was evaluated using wells solid diffusion method and TLC-Bioautography. Extract fractionation was conducted using liquid-liquid partitioning method. The chemical compounds of extracts and fractions were analyzed using TLC and GCMS. The result of sonication extraction obtained neem leaves oil (12,02%), leaves crude

extract (4,3%) and stem barks crude extract (16,85%). The major chemical constituents of GCMS analysis are 2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one (6,06%), L-proline, 1-Acetyl-(CAS) Acetylproline (5,85%), 4-hydroxy-2-methyl-pyrrolidine-2-carboxylic acid (21,42%), 2,3-Dyhidrobenzofuran (2,69%), alpha-D-methylglucopyranoside (4,54%), palmitic acid (2,92%), Arabino-hex-1-enitol, 1,5-Anhydro-2-deoxy-(CAS) glucal (31,69%). Phytochemical screening of neem leaves oil, leaves and barks crude extract revealed the presence of alkaloids, flavonoids, phenols, saponins, triterpenoids, steroids and sterols. Antibacterial test results showed neem leaves oil was more effective than leaves and stem barks crude extract against *Escherichia coli*. The n-hexane fraction showed higher antibacterial activity than ethyl acetate fraction and ethanol fraction. Phytochemical screening of n-hexane fraction showed the presence of triterpenoids, steroids, sterols and phenols.

Keywords: antibacterial, *Azadirachta indica* A.Juss, TLC-Bioautography, GCMS analysis

PENDAHULUAN

Penyakit infeksi merupakan masalah kesehatan di seluruh dunia baik di negara maju maupun berkembang. Infeksi bakteri pada umumnya diberikan terapi antibiotik konvensional (Amin, 2015). Antibiotik jika digunakan secara tidak tepat dapat memberikan efek samping yang tidak diinginkan bagi tubuh serta menyebabkan resistensi antibiotik. Di Indonesia telah terjadi resistensi *Escherichia coli* terhadap antibiotik metronidazol (Iswara, 2015). Oleh karena itu, penemuan antibiotik baru yang berasal dari bahan alam mendesak untuk dilakukan. Salah satu tanaman di Indonesia yang berpotensi untuk dikembangkan adalah mimba (*Azadirachta indica* A. Juss).

Mimba secara empiris digunakan pada pengobatan tradisional sebagai antidiabetes, penyakit kulit, tukak dan antidiare (Dulla dan Jahan, 2017). Pada pengobatan tradisional, bagian mimba yang biasa digunakan ialah kulit batang, daun dan biji (Koul *et al.*, 1990). Beberapa penelitian menunjukkan bahwa tanaman mimba memiliki aktivitas antimikroba. Ekstrak daun, kulit batang dan biji mimba telah diketahui sangat aktif melawan bakteri Gram positif (*Streptococcus spp*, *Staphylococcus aureus*), Gram negatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella spp*, *Coliform spp*), jamur (*Candida spp*) dan virus (*Vaccinia*, *Chikungunya*, *Measles*, *Coxsackie B*) serta menunjukkan adanya aktivitas antimikroba yang signifikan terhadap patogen yang diuji (Akpan *et al.*, 2016; Biswas *et al.*, 2002; Sinaga *et al.*, 2016). Beberapa penelitian lain juga menunjukkan bahwa minyak dari biji mimba mampu menghambat pertumbuhan *Salmonella thyposa* dan *Staphylococcus aureus* (Ambarwati, 2007).

Berdasarkan penelusuran pustaka tersebut, efektifitas minyak daun mimba terhadap *Escherichia coli* sampai saat ini masih belum diketahui. Kurangnya penelitian terkait dengan efektifitas dari bagian-bagian tanaman mimba terhadap bakteri spesifik menyebabkan pengembangan tanaman mimba sebagai agen antibakteri menjadi kurang optimal. Beberapa literatur menyebutkan bagian tanaman obat yang berbeda memiliki aktivitas antimikroba yang berbeda pula (Vashist dan Anil, 2012). Dengan demikian, penelitian ini dilakukan untuk membandingkan efektifitas antibakteri ekstrak daun, minyak daun dan kulit batang mimba terhadap *Escherichia coli* dan mengidentifikasi golongan senyawa aktif antibakteri pada fraksi teraktif.

METODE

Sampel tanaman diperoleh dari wilayah Kecamatan Narmada, Kabupaten Lombok Barat, Nusa Tenggara Barat dan dideterminasi di Program Studi Biologi FMIPA Universitas Mataram. Sampel dikeringkan menggunakan metode kering angin pada suhu ruangan, kemudian diserbuk. Sebanyak 200 gram sampel serbuk daun atau kulit batang kering

diekstraksi dengan 2 L etanol 96% menggunakan sonikator. Ekstraksi dilakukan selama 30 menit dengan 3 kali ulangan. Maserat yang diperoleh kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator*. Hasil evaporasi kemudian didiamkan selama 3 hari pada suhu ruangan hingga terbentuk 2 lapisan.

Skринing fitokimia dilakukan untuk mengidentifikasi golongan senyawa yaitu alkaloid, flavonoid, polifenol, steroid, terpenoid, dan saponin. Identifikasi alkaloid dilakukan dengan cara menotolkan 5 mikroliter ekstrak pada plat KLT dan dielusi dalam bejana KLT yang telah terjenuhkan dengan etil asetat:metanol:air (10:1.35:1). Plat kemudian disemprot dengan pereaksi Dragendorff (Wagner dan Bladt, 1996). Identifikasi flavonoid dengan menotolkan 5 μ l ekstrak pada plat KLT dan dielusi dalam bejana KLT yang telah terjenuhkan dengan kloroform:etil asetat (6:4). Plat kemudian disemprot dengan $AlCl_3$ 5% (Wagner dan Bladt, 1996). Identifikasi polifenol dengan menotolkan 5 μ l ekstrak pada plat KLT dan dielusi dalam bejana KLT yang telah terjenuhkan dengan etil asetat:metanol:air (10:1.35:1). Plat kemudian disemprot dengan pereaksi $FeCl_3$ 5% (Harborne, 1973). Identifikasi steroid dan terpenoid dengan menotolkan 5 μ l ekstrak dan dielusi dalam bejana KLT yang telah terjenuhkan dengan n- heksan:etil asetat (7:3). Plat kemudian disemprot dengan pereaksi Lieberman-Burchard dan dipanaskan pada suhu 100°C (Kusuma dan Nurul, 2014; Wagner dan Bladt, 1996). Identifikasi saponin dengan menotolkan 0,5 g ekstrak ditambahkan 10 ml aquades panas lalu didiamkan hingga dingin. Setelah dingin, ekstrak digojog kuat selama 10 detik. Adanya saponin ditandai dengan timbulnya busa stabil setinggi 1-10 cm dan tidak hilang pada penambahan HCl 2 N (Departemen Kesehatan RI, 1980).

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan pada *Escherichia coli* dengan metode difusi agar menggunakan sumuran. Suspensi bakteri diinokulasi pada media *nutrient agar* (NA) menggunakan *cotton swab* steril. Kemudian larutan ekstrak dimasukkan ke dalam lubang berdiameter 6 mm. Petri dish dibungkus lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Daya hambat ekstrak ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening di sekitaran sumuran.

Ekstrak yang memiliki daya hambat paling besar difraksinasi dengan metode partisi menggunakan n-heksan, etil asetat dan etanol dengan perbandingan ekstrak: solven (1:5). Partisi dimulai dari solven non polar hingga polar.

Uji bioautografi fraksi teraktif dilakukan dengan menotolkan sebanyak 20 μ l pada plat KLT, kemudian dielusi dalam bejana dengan eluen n-heksan:etanol (2:8). Plat yang telah dielusi ditempelkan selama 30 menit pada media NA yang telah diinokulasi bakteri uji. Kemudian plat diangkat, media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Aktivitas antibakteri ditandai dengan adanya daya hambat berupa zona bening pada area spot kromatogram.

Analisis GC-MS dilakukan untuk mengidentifikasi komponen kimia ekstrak. Kondisi alat GC-MS meliputi kolom Rtx-5MS, panjang kolom 30 meter, diameter kolom 0,25 mm, ketebalan 0,25 mm, suhu kolom 40°C, suhu injector 240°C.

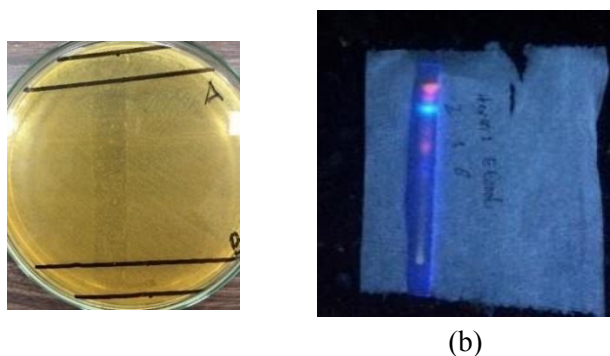
HASIL DAN PEMBAHASAN

Sonikasi daun mimba menghasilkan minyak daun sebesar 12,02% dan ekstrak etanol sebesar 4,3%, sedangkan ekstrak kulit batang diperoleh sebesar 16,85%. Berdasarkan literatur, daun mimba mengandung minyak sebesar 0,88%-9,53%. Kandungan minyak daun mimba dapat berbeda-beda tergantung lokasi tumbuh (Susila, 2017). Selain itu, perbedaan metode ekstraksi yang digunakan juga dapat menyebabkan perbedaan kadar minyak yang dihasilkan. Sonikasi merupakan metode yang paling efektif dalam ekstraksi bahan alam. Sonikasi menghasilkan rendemen tinggi, waktu ekstraksi cepat dan selektivitas yang cukup baik. Selain itu, metode ekstraksi sonikasi sangat efektif untuk mengekstraksi senyawa-senyawa termolabil karena dapat mengurangi paparan suhu tinggi (Azwanida, 2015).

Skринing fitokimia ekstrak daun, minyak daun dan kulit batang mimba ekstrak dilakukan melalui identifikasi pendaran warna spot senyawa di bawah sinar UV. Senyawa flavonoid akan berfluorosensi biru, kuning-hijau di bawah sinar UV 366 nm apabila

direaksikan dengan $AlCl_3$ (Poblocka-Olech *et al.*, 2018). Senyawa fenol jika direaksikan dengan $FeCl_3$ 5% akan menghasilkan bercak warna hijau, merah, ungu, biru atau hitam pekat pada sinar tampak (Harborne, 1973). Alkaloid jika direaksikan dengan pereaksi Dragendorff akan membentuk bercak warna orange-cokelat dengan latar kuning pada sinar tampak (Harborne, 1973) dan fluoresensi biru, biru-hijau atau kuning dibawah UV 366 nm (Wagner dan Bladt, 1996). Hasil positif saponin ditunjukkan dengan terbentuknya busa setinggi 1-10 cm selama 10 menit dan busa tidak hilang setelah penambahan beberapa tetes HCl 2 N (Departemen Kesehatan RI, 1980). Adanya senyawa triterpenoid ditandai dengan munculnya fluoresensi merah, pink atau ungu di bawah UV 366 nm. Senyawa sterol ditandai dengan adanya fluoresensi kuning. Senyawa steroid akan berfluoresensi biru atau biru-hijau (Farnsworth, 1966).

Hasil uji KLT-bioautografi fraksi heksan terhadap *Escherichia coli* tidak menunjukkan adanya aktivitas antibakteri dari tiap Rf. Hal ini kemungkinan karena konsentrasi yang ditotolkan pada plat KLT sangat kecil sehingga tidak mencapai konsentrasi minimal senyawa untuk dapat menghambat pertumbuhan *Escherichia coli*. Hasil uji KLT-bioautografi dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. (a) Hasil KLT-Bioautografi Fraksi; (b) Hasil KLT fraksi n-heksan:etanol (2:8) dibawah UV 366 nm

KLT-Bioautografi digunakan untuk menggambarkan aktivitas antimikroba senyawa dalam suatu ekstrak maupun fraksi. KLT-Bioautografi dapat memberikan hasil yang baik jika senyawa tersebut terpisah dengan baik dan memiliki konsentrasi yang cukup tinggi (Horvath *et al.*, 2004). Dengan demikian aktivitas antibakteri yang diperoleh sesuai dengan kemampuan setiap senyawa tanpa adanya gangguan dari senyawa lain.

Hasil uji fitokimia menunjukkan fraksi n-heksan minyak daun mimba mengandung senyawa triterpenoid, steroid, sterol jenuh/triterpen jenuh dan fenolik. Senyawa triterpenoid, steroid dan sterol diidentifikasi dengan pereaksi Lieberman Burchard.

Senyawa golongan terpenoid merupakan senyawa lipofilik yang dapat membentuk ikatan polimer dengan protein transmembran yang terdapat pada dinding sel bakteri. Ikatan tersebut menyebabkan rusaknya protein transmembran. Akibatnya permeabilitas dinding sel bakteri menurun sehingga sel bakteri kekurangan nutrisi. Hal ini menyebabkan pertumbuhan bakteri terhambat kemudian mati (Haryati *et al.*, 2015). Senyawa fenol dapat membentuk ikatan hidrogen dengan protein sel bakteri yang menyebabkan rusaknya struktur protein sel bakteri sehingga terjadi denaturasi protein. Denaturasi protein menyebabkan terganggunya permeabilitas dinding sel dan membran sitoplasma, sehingga terjadi ketidakseimbangan makromolekul dan ion dalam sel. Akibatnya, sel menjadi lisis (Pelczar dan Chan, 2006).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian, disimpulkan bahwa minyak daun mimba lebih efektif dalam menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* dibandingkan dengan ekstrak daun dan ekstrak kulit batang mimba. Fraksi n-heksan minyak daun mimba merupakan fraksi yang

paling efektif dari fraksi etil asetat dan etanol dalam menghambat pertumbuhan *Escherichia coli*. Fraksi n-heksan minyak daun mimba mengandung komponen kimia golongan triterpenoid, steroid, sterol dan fenolik.

DAFTAR PUSTAKA

- Akpan, I. O., Ejele, A. E., Ogali, R. E., Achugasim, O., dan Osuagwu, C. G. (2016). Bioassay-guided isolation of antimicrobial compound against (*Staphylococcus aureus*) from *Azadirachta indica* Plant. *Journal of Current Chemical and Pharmaceutical Sciences*, 6(2), 17–26.
- Ambarwati (2007). Efektivitas zat antibakteri biji mimba (*Azadirachta indica*) untuk menghambat pertumbuhan *Salmonella thyposa* dan *Staphylococcus aureus*. *Biodiversitas*, 8(3), 320-325.
- Amin, L. Z. (2015). Tatalaksana diare akut. *Continuing Medical Education*, 42(7), 504–508.
- Azwanida, N. N. (2015). A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Medicinal Aromatic Plants*, 4(3), 1–6.
- Benkendorff, K., Andrew, R. D., Cary, N. R., dan John, B. B. (2005). Free fatty acids and sterols in the benthic spawn of aquatic molluscs, and their associated antimicrobial properties. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 316, 29–44.
- Biswas, K., Chattopadhyay, I., Banerjee, R. K., dan Bandyopadhyay, U. (2002). Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*). *Current Science*, 82, 1336–1345.
- Cushnie, T., J. L., A., dan Benjamar, C. (2014). Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 44(5), 377–386.
- Departemen Kesehatan RI. (1980). *Materia Medika Indonesia*. Jakarta.
- Dulla, O. dan Jahan, F. (2017). Ethnopharmacological survey on traditional medicinal plants at Kalaroa Upazila, Satkhira District, Khulna Division, Bangladesh. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 6(3), 316-25.
- Farnsworth, N. R. (1966). Biological and phytochemical screening of plants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55(3), 225–269.
- Harborne, J. B. (1973). *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*.
London: Chapman and Hall Ltd.
- Haryati, N. A., Chairul, S., dan Erwin. (2015). Uji toksisitas dan aktivitas antibakteri ekstrak daun merahtanaman pucuk merah (*Syzygium myrtifolium* Walp.) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Jurnal Kimia Mulawarman*, 13(1), 35–40.
- Horvath, G., Laszlo, G. S., Eva, L., Lajos, B., dan Bela, K. (2004). Characterization and TLC– bioautographic detection of essential oils from some *thymus taxa*. Determination of the activity of the oils and their components against plant pathogenic bacteria. *Journal of Planar Chromatography*, 17, 300–304.
- Hussain, S. Z., dan Khushnuma, M. (2014). GC-MS: Principle, technique and its application in food science. *International Journal Current Science*, 13, 116–126.
- Iswara, A. (2015). Pola sensitivitas *Escherichia coli* terhadap antibiotik metronidazole. In *The 2nd University Research Coloquium 2015*.
- Janani, S. R., dan Singaravadivel. (2014). Screening of phytochemical and GC-MS analysis

of some bioactive constituents of asparagus racemosus. *International Journal of Pharmaceutical Technology Research*, 6(2), 428–432.

Jasril, Y. T., H., Zamri, A., Alfatos, D., Yuslinda, E., dan Nurulita, Y. (2012). Sintesis dan uji antibakteri senyawa bromo kalkon piridin. *Jurnal Natur Indonesia*, 14(3), 172–175

Jiang, X., Zhedong, Y., dan Weicheng, Z. (2014). Synthesis and antimicrobial activity of some new 1 β -Methylcarbapenem derivatives having pyrrolidine or piperidine moieties. *Bulgarian Chemical Communications*, 46(4), 852–856.

Kaneswari, M. S., Mahatmi, H., dan Besung, I. N. K. (2013). Perasan daun mengkudu (*Morinda citrifolia*) menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* secara *in vitro*. *Indonesian Medicus Veterinus*, 2(2), 216–224.