

## IDENTIFIKASI SENYAWA METABOLIT SEKUNDER SERTA UJI AKTIVITAS EKSTRAK DAUN SIRSAK SEBAGAI ANTIBAKTERI

### IDENTIFICATION OF SECONDARY METABOLITES COMPOUNDS AND ANTIBACTERIAL ACTIVITIES ON THE EXTRACT OF SOURSOP LEAF

Dian Riana Ningsih<sup>1\*</sup>, Zufahair<sup>1</sup>, Dwi Kartika<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Jurusan Kimia FMIPA Universitas Jenderal Soedirman, Purwokerto, Indonesia

\*email: deeyan\_bik@yahoo.com

Received 23 February 2016; Accepted 27 April 2016; Available online 16 May 2016

#### ABSTRAK

Pengobatan penyakit infeksi bakteri menggunakan antibiotik semi sintetis dapat menimbulkan resistensi, sehingga untuk mengatasinya diperlukan pencarian bahan obat alami dari tanaman, salah satunya yaitu ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.). Penelitian ini bertujuan mengetahui aktivitas antibakteri daun sirsak terhadap *E.coli* dan mengidentifikasi golongan senyawa kimia yang paling aktif dari ekstrak tersebut. Daun sirsak diekstraksi secara maserasi menggunakan pelarut n-heksan, kloroform, dan metanol. Ekstrak diuji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi. Ekstrak dengan aktivitas tertinggi ditentukan konsentrasi hambat tumbuh minimumnya (KHTM) dan diuji kandungan metabolit sekundernya dengan uji fitokimia, selanjutnya diidentifikasi menggunakan spektrofotometer IR. Hasil ekstraksi daun sirsak dengan pelarut n-heksana, kloroform dan metanol menghasilkan ekstrak n-heksan (E1), ekstrak kloroform (E2), dan ekstrak metanol (E3) dengan rendemen berturut-turut sebesar 0,82%; 5,21%; 8,2% dan menghasilkan aktivitas antibakteri dengan zona hambat berturut-turut sebesar 3,52 mm; 8,34 mm; 3,00 mm. KHTM ekstrak kloroform daun sirsak terhadap bakteri *Escherichia coli* yaitu pada konsentrasi 1 ppm dengan zona hambat sebesar 3,23 mm. Berdasarkan hasil uji fitokimia ekstrak kloroform daun sirsak menunjukkan adanya senyawa golongan alkaloid, steroid, saponin dan tanin. Hasil identifikasi spektrofotometer IR menunjukkan bahwa ekstrak kloroform daun sirsak memiliki gugus fungsi OH, C-H alifatik, C=O, C=C aromatik, CH<sub>3</sub>, C-O eter dan C-H di luar bidang.

**Kata kunci:** antibakteri, daun sirsak, ekstrak kloroform, *Escherichia coli*

#### ABSTRACT

Treatment of bacterial infectious diseases using semi-synthetic antibiotics can lead to resistance, so as to overcome it necessary to search for natural ingredients from plant extracts that has potential as an antibacterial, one of which is the leaf extract of soursop (*Annona muricata* L.). This study aims to determine the antibacterial activity of soursop leaf against *E. coli* and identify groups most active chemical compounds from the extracts. Soursop leaves extracted by maceration using n-hexane, chloroform and methanol. The extracts were tested for antibacterial activity using the diffusion method. Extract with the highest activity determined the minimum inhibitory concentrations grow (MIC) and tested the content of secondary metabolites with phytochemical test, subsequently identified using IR spectrophotometer. Soursop leaves with extraction solvent n-hexane, chloroform and methanol to produce n-hexane extract (E1), the chloroform extract (E2), and the methanol extract (E3) with a yield respectively 0.82%; 5.21%; 8.2% and produce antibacterial activity with consecutive inhibition zone of 3.52 mm; 8.34 mm; 3.00 mm.

MIC soursop leaf chloroform extract of the *E. coli* bacteria that is at a concentration of 1 ppm with inhibition zone of 3.23 mm. Based on the test results phytochemical soursop leaf chloroform extract showed the presence of compounds alkaloids, steroids, saponins and tannins. IR spectrophotometer identification results showed that the chloroform extract of the leaves of the soursop has functional groups OH, aliphatic C-H, C = O, C = C aromatic, CH<sub>3</sub>, C-O ether and C-H outside the field.

**Keywords** : antibacterial, chloroform extract, *E. coli*, soursop leaves

## PENDAHULUAN

Penyakit infeksi merupakan salah satu masalah dalam bidang kesehatan yang dari waktu ke waktu terus berkembang. Infeksi merupakan suatu keadaan masuknya mikroorganisme ke dalam tubuh, berkembang biak dan menimbulkan penyakit. Keadaan ini dapat ditinjau sebagai suatu tipe parasitisme yang terjadi bila satu organisme hidup dengan merugikan organisme lain yaitu inangnya, parasit berkembangbiak dan aktif secara metabolik di dalam tubuh inang. Penyakit infeksi dapat disebabkan oleh empat kelompok besar hama penyakit, yaitu bakteri, jamur, virus, dan parasit (Jawetz, Melnick, & Adelberg, 2005).

*Escherichia coli* adalah salah satu bakteri yang dapat menyebabkan infeksi enterobakteria yang banyak diderita masyarakat. Sifatnya unik karena dapat menyebabkan infeksi primer pada usus misalnya diare pada anak dan *travelers diarrhea*, seperti juga kemampuannya menimbulkan infeksi pada jaringan tubuh lain di luar usus yaitu dapat menyebabkan infeksi saluran kemih, meningitis, septicemia (*blood poisoning*), peritonitis, dan pneumonia. Keberadaannya dalam air dapat menjadi indikator adanya pencemaran air oleh tinja. Tercemarnya air akan berpengaruh pada makanan dan minuman yang dikonsumsi manusia sehingga dapat menimbulkan penyakit (Jawetz et al., 2005).

Banyak usaha yang telah dilakukan untuk melawan bakteri-bakteri patogen, antara lain dengan upaya penemuan senyawa yang mampu membunuh dan menghambat bakteri tersebut. Zat-zat

seperti ini kemudian dikenal dengan istilah zat antibakteri. Perkembangan obat antibakteri merupakan suatu kemajuan terpenting dalam bidang pengobatan, karena pengobatan efektif terhadap infeksi serius telah memperbaiki kualitas hidup dan memberi banyak kemajuan dalam bidang kedokteran maupun di bidang industri obat (Kumala, Tambunan, & Mochtar, 2006).

Salah satu zat antibakteri yang banyak digunakan adalah antibiotik semi sintetik. Meningkatnya penggunaan antibiotik dalam mengatasi berbagai penyakit yang disebabkan oleh bakteri mulai menimbulkan masalah baru, terutama karena sebagian besar bahan antibiotik yang digunakan merupakan zat kimia berbahaya dan sifatnya tidak aman bagi kesehatan (Nimah, Ma'ruf, & Trianto, 2012). Selain itu juga dapat menimbulkan resistensi mikroba patogen sehingga hal ini mengharuskan untuk mencari sumber molekul bioaktif baru untuk dijadikan antibiotik baru. Salah satu potensi antibiotik yaitu sebagai antimikroba (Doughari, 2007; Valgas, Souza, Smânia, & Smânia Jr, 2007).

Tanaman sebagai sumber yang paling umum agen antimikroba. Salah satu tanaman yang berpotensi sebagai antibakteri adalah tanaman sirsak (*Annona muricata* L.). Tanaman sirsak merupakan tanaman yang dapat digunakan sebagai obat-obatan alami termasuk kulit kayu, daun, akar, buah dan biji. Ekstrak *aqueous* kulit buah sirsak dengan konsentrasi 0,1 gram/mL mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Vibrio cholera* (Viera, Mourão, Ângelo, Costa, & Vieira, 2010). Ekstrak metanol daun sirsak

bersifat antibakteri dan mengandung senyawa golongan steroid, alkaloid, flavanoid dan tannin yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Stapylococcus aureus*, *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella Pneumonia* dan *Bacillus subtilis* (Solomon-Wisdom, Ugoh, & Mohammed, 2014)

Pada penelitian ini dilakukan uji aktivitas antibakteri ekstrak *n*-heksana, kloroform dan metanol ekstrak daun sirsak terhadap *E. coli*. Senyawa antibakteri dengan aktivitas tertinggi kemudian dilakukan penentuan konsentrasi hambat tumbuh minimumnya (KHTM) serta identifikasi golongan senyawa bioaktifnya menggunakan spektrofotometer FTIR.

## METODE PENELITIAN

### Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat-alat gelas, blender, autoklaf, timbangan analitik, alat *rotary evaporator Buchii*, inkubator (Memert Jerman), *shaker* inkubator (Memert Jerman), filler, pipet ukur, gelas arloji, *obyek glass*, corong *Buchner* dan pompa vakum, vial, *hot plate stirrer*, *magnetic stirrer*, pipet mikro otomatis, lampu spiritus, jarum ose, *drugalsky*, jangka sorong, *crok bor*, pH meter, Spektrofotometer Infra Merah FT-IR.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirsak diambil dari desa Langkap Purbalingga, kloroform, *n*-heksana, metanol, isolat bakteri *E. coli*, *Nutrient Agar* (NA), *Nutrient Broth* (NB), *Peptone Yeast Agar* (PYG), aquades steril, tetrasiklin HCl 500 mg, alkohol 70%, asam klorida, asam klorida pekat, eter, asetat anhidrida, asam sulfat pekat, pereaksi FeCl<sub>3</sub>, serbuk Mg, pereaksi Dragendorff, kertas saring, tissue, NaCl steril 0,9%, *wrapping*, kapas, kain kassa, aluminium foil.

### Prosedur Penelitian

*Preparasi penyiapan bahan* (Bawa Putra, Bogoriani, Diantariani, & Utari Sumadewi, 2014)

Daun sirsak dibersihkan dan selanjutnya daun sirsak di potong kecil-kecil untuk dikeringkan dengan cara diletakkan ditempat terbuka dengan sirkulasi udara yang baik dan tidak terkena sinar matahari langsung kemudian setelah kering diblender dan diayak.

*Ekstraksi* (Ningsih, Zufahair, & Purwati, 2014)

Ekstraksi dilakukan secara maserasi secara bertingkat dengan pelarut *n*-heksana, kloroform dan metanol. Sebanyak kurang lebih 200 g daun sirsak direndam dengan 700 mL *n*-heksana, ditutup lalu disimpan di ruang gelap dan dikocok dengan *shaker* 120 rpm selama satu minggu. Setelah itu, filtrat diambil dan residu dimaserasi kembali menggunakan 300 mL *n*-heksana selama 3 hari. Selanjutnya filtrat diambil dan residu dimaserasi kembali dengan pelarut kloroform dan metanol. Cara maserasi sama dengan yang telah dilakukan diatas. Maserasi yang telah dilakukan diperoleh filtrat *n* heksan, kloroform dan metanol.

Filtrat *n*-heksana, kloroform dan metanol daun sirsak dipekatkan menggunakan rotavapor pada suhu  $\pm 40$  °C. Ekstrak pekat ini ditimbang untuk mendapatkan nilai rendemennya.

### Regenerasi bakteri uji

Bakteri yang akan dipakai untuk uji antibakteri harus diregenerasikan terlebih dahulu sebelum digunakan. Bakteri stok yang merupakan kultur primer, mula-mula dibiakkan ke dalam agar miring (*Nutrient Agar*), yaitu sebanyak satu ose bakteri digoreskan ke media NA miring lalu diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Biakan ini merupakan aktivitas awal stok bakteri yang kemudian disimpan pada suhu 5 °C

*Uji aktivitas antibakteri* (Ningsih et al., 2016)

Uji awal aktivitas antibakteri dilakukan dengan cara difusi. Sebanyak satu ose bakteri dari stok biakan diambil lalu diinkubasi di dalam 10 mL media cair (*Nutrient Broth*) selama 18-24 jam pada suhu 37 °C, sambil dikocok menggunakan penangas air bergoyang dengan kecepatan 100 rpm. Kemudian sebanyak 5 mL biakan bakteri diambil lalu diukur OD nya dengan nilai kurang dari satu pada panjang gelombang 620 nm. Bila nilai OD > 1 diambil biakan sebanyak 50 µL, bila OD < 1 biakan diambil 100 µL. Tuangkan 15 mL media *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA) bersuhu ± 40 °C ke dalam cawan petri dan dibiarkan memadat. Kemudian biakan disebarakan di atas media tersebut. Setelah itu agar dilubangi dengan diameter ± 8 mm menggunakan *cock bor*. Ke dalam masing-masing lubang tersebut dimasukkan ekstrak *n*-heksana, kloroform dan metanol daun sirsak sebanyak 50 µL dengan konsentrasi ekstrak yang digunakan untuk pengujian daya hambat adalah 1000 ppm lalu diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam, dengan kontrol positif tetrasiklin dan negatif aquades. Zona bening yang terlihat di sekeliling lubang, menandakan adanya aktivitas antibakteri kemudian zona bening yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong. Setelah diketahui bahwa ekstrak *n*-heksana, kloroform dan metanol daun sirsak mempunyai aktivitas antibakteri, kemudian ekstrak daun sirsak ditentukan Konsentrasi Hambat Tumbuh Minimum (KHTM) terhadap bakteri *E. coli* dengan metode yang sama.

*Pengujian konsentrasi hambat tumbuh minimum (KHTM) dari ekstrak yang memiliki aktivitas penghambatan Paling Tinggi*

Ekstrak kloroform daun sirsak mempunyai aktivitas antibakteri paling tinggi, selanjutnya ditentukan Konsentrasi Hambat Tumbuh Minimum (KHTM) terhadap bakteri uji. KHTM digunakan

untuk mengetahui konsentrasi minimum dari suatu larutan antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri tertentu. Variasi konsentrasi yang digunakan untuk menentukan KHTM Pada penelitian ini yaitu 1000; 500; 250; 125; 65; 30; 15; 10; 5; dan 1 ppm. Masing-masing konsentrasi sebanyak 50 µL diuji dengan memasukkan ke lubang media *Pepton Yeast Agar* (PYG) yang telah diinokulasi dengan bakteri uji. Setelah itu diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Aktivitas antibakterinya diperoleh dengan mengukur daerah zona bening di sekeliling lubang sampel dengan menggunakan jangka sorong.

*Identifikasi senyawa kimia ekstrak daun sirsak* (Harbone 1998)

Identifikasi kandungan metabolit sekunder pada ekstrak yang memiliki aktivitas antibakteri paling tinggi dilakukan dengan uji warna sebagai berikut:

a. Uji alkaloid

Sampel ekstrak dilarutkan dalam 2 mL asam klorida, dipanaskan 5 menit dan disaring. Filtrat yang diperoleh ditambah 2-3 tetes pereaksi Dragendorff. Adanya senyawa alkaloid ditunjukkan dengan endapan jingga.

b. Uji flavanoid

Sebanyak 2 mL sampel (0,05% b/v) dilarutkan dalam 2 mL metanol, kemudian ditambahkan serbuk Mg dan HCl pekat sebanyak 5 tetes. Adanya senyawa flavanoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah atau jingga.

c. Uji alkaloid

Sebanyak 2 mL sampel (±0,05% b/v) dilarutkan dalam 2 mL HCl 2% (v/v), dipanaskan 5 menit dan disaring. Filtrat yang diperoleh ditetesi dengan pereaksi Dragendorff sebanyak 2-3 tetes. Adanya senyawa alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan jingga.

d. Uji saponin

Sebanyak 2 mL sampel (±0,05% b/v) dilarutkan dalam aquades pada tabung reaksi ditambah 10 tetes KOH dan

dipanaskan dalam penangas air 50 °C selama 5 menit, dikocok selama 15 menit. Jika terbentuk busa mantap setinggi 1 cm dan tetap stabil selama 15 menit menunjukkan adanya senyawa saponin.

e. Uji terpenoid

Sebanyak 2 mL sampel ( $\pm 0,05\%$  b/v) ditambah dengan pereaksi Liberman-Burchard 1 mL. Adanya senyawa terpenoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru tua atau hijau kehitaman.

f. Uji polifenol

Sebanyak 2 mL sampel ( $\pm 0,05\%$  b/v) dilarutkan dalam aquades 10 mL, dipanaskan 5 menit dan disaring. Filtrat yang terbentuk ditambahkan ditambahkan 4-5 tetes  $\text{FeCl}_3$  5% (b/v). Adanya fenol ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru tua atau hijau kehitaman.

g. Uji stereoid

Sebanyak 2 mL sampel ( $\pm 0,05\%$  b/v) ditambah dengan pereaksi Liberman-Burchard 1 mL. Adanya senyawa steroid ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru tua atau hijau kehitaman.

*Analisis spektrofotometer IR*

Ekstrak daun sirsak yang menunjukkan aktivitas antibakteri paling aktif terhadap *E. coli* dianalisis menggunakan spektrofotometer Infra-merah (Shimadzu FT-IR-8201 PC).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Persiapan Sampel

Pengeringan bertujuan untuk menghilangkan kadar air dalam sampel yang dapat menyebabkan terjadinya reaksi enzimatik yang mengakibatkan rusaknya sampel karena susunan senyawa yang terdapat dalam daun tersebut telah berubah.

Sampel daun sirsak yang telah kering patah tersebut kemudian dibuat serbuk dengan cara diblender agar ukuran partikelnya menjadi lebih kecil sehingga dapat memperluas kontak dan meningkatkan daya interaksinya dengan pelarut. Pembuatan sampel menjadi

serbuk menyebabkan kerusakan dinding sel yang menyebabkan pelarut lebih mudah menarik senyawa yang terkandung di dalam sel tersebut sehingga jumlah ekstrak yang diperoleh optimal. Serbuk daun sirsak selanjutnya dilakukan ekstraksi secara maserasi

### Ekstraksi

Daun sirsak diekstrak menggunakan metode maserasi. Maserasi merupakan teknik ekstraksi yang dilakukan untuk sampel yang tidak tahan panas dengan cara perendaman di dalam pelarut tertentu selama waktu tertentu. Dalam proses ekstraksi suatu bahan tanaman, banyak faktor yang dapat mempengaruhi kandungan senyawa hasil ekstraksi diantaranya: jenis pelarut, konsentrasi pelarut, metode ekstraksi dan suhu yang digunakan untuk ekstraksi (Senja, Issusilaningtyas, Nugroho, & Setyowati, 2015). Teknik ini mempunyai beberapa kelebihan antara lain alat yang dipakai sederhana, hanya dibutuhkan bejana perendaman tetapi menghasilkan produk yang baik, selain itu dengan teknik ini zat-zat yang tidak tahan panas tidak akan rusak.

Maserasi merupakan proses perendaman sampel menggunakan pelarut. Proses ini sangat menguntungkan dalam isolasi senyawa bahan alam, karena selama perendaman terjadi peristiwa plasmolisis yang menyebabkan terjadi pemecahan dinding sel akibat perbedaan tekanan di dalam dan di luar sel, sehingga senyawa yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik dan proses ekstraksi senyawa akan sempurna karena dapat diatur lama perendaman yang diinginkan. Pemilihan pelarut untuk proses maserasi akan memberikan efektivitas yang tinggi dengan memperhatikan kelarutan senyawa bahan alam dalam pelarut tersebut. Secara umum pelarut metanol merupakan pelarut yang banyak digunakan dalam proses isolasi senyawa organik bahan alam karena dapat melarutkan sebagian besar golongan

senyawa (Redha, 2013). Proses ini terus berulang sampai terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di dalam dan di luar sel. Maserasi juga dapat diatur lama perendaman yang dilakukan. (Bonaerense, 2005) membandingkan kadar flavonoid *Momordica charantia* L. menggunakan metode maserasi dan perkolasi, hasilnya bahwa metode maserasi lebih baik.

Maserasi berupa serbuk bertujuan untuk memperluas permukaan sehingga interaksi pelarut dengan senyawa yang akan diambil lebih efektif dan senyawa dapat terekstrak sempurna. Semakin kecil ukuran bahan yang digunakan maka semakin luas bidang kontak antara bahan dengan pelarut. Kondisi ini akan menyebabkan kecepatan untuk mencapai kesetimbangan sistem menjadi lebih besar. Jaringan bahan atau simplisia dapat mempengaruhi efektivitas ekstraksi. Ukuran bahan yang sesuai akan menjadikan proses ekstraksi berlangsung dengan baik dan tidak memakan waktu yang lama. Pengadukan berkala bertujuan untuk menghindari memadatnya serbuk sehingga pelarut sulit menembus bahan dan kesulitan mengambil senyawa-senyawa aktif karena serbuk yang digunakan cukup banyak. Daun sirsak diekstrak menggunakan teknik maserasi dengan metode (Harborne, 1998) yang dimodifikasi secara bertahap dengan beberapa pelarut dengan peningkatan polaritas yaitu berturut-turut *n*-heksan, kloroform, dan metanol.

Ekstrak *n*-heksana, kloroform dan metanol daun sirsak yang diperoleh selanjutnya diuapkan pelarutnya dengan *Rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak pekat. Rendemen ekstrak dihitung berdasarkan perbandingan berat akhir (berat ekstrak yang dihasilkan) dengan berat awal dikalikan 100% (Sani, Nisa, Andriani, & Maligan, 2013). Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh ekstrak metanol menghasilkan rendemen terbesar yaitu 8,2% dibandingkan ekstrak *n*-heksana dan kloroform. Hal tersebut mengindikasikan bahwa kandungan senyawa polar dari dalam daun sirsak lebih banyak dari senyawa semipolar dan nonpolar. Ekstrak *n*-heksana, kloroform dan metanol selanjutnya diuji aktivitas antibakteri dengan metode difusi dimana ekstrak yang memiliki aktivitas antibakteri paling tinggi ditentukan konsentrasi hambat tumbuh minimum (KHTM).

#### Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode Difusi

Aktivitas antibakteri dihitung dengan mengukur zona hambat di sekitar lubang sampel yang terlihat jernih. Berdasarkan pengujian yang telah dilakukan terdapat perbedaan zona hambat dari ekstrak *n*-heksana, kloroform dan metanol daun sirsak terhadap pertumbuhan *E. coli*. Zona hambat yang terbentuk diukur dengan menggunakan jangka sorong.

**Tabel 1.** Rendemen hasil ekstraksi daun sirsak

Ekstrak	Warna	Bentuk	Berat ekstrak (g)	Rendemen (%) (b/b)
E1	Hijau kehitaman	Pasta	0,82	0,82
E2	Hijau kehitaman	Pasta	5,21	5,21
E3	Coklat kemerahan	Pasta	8,2	8,2

Ket. E1: ekstrak *n*-heksana E2 : ekstrak kloroform E3: ekstrak metanol

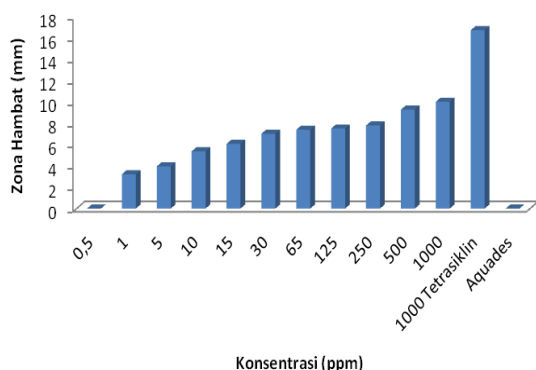
**Tabel 2.** Aktivitas antibakteri ekstrak kloroform daun sirsak terhadap bakteri *E. coli*

Ekstrak (1000 ppm)	Zona Hambat (mm)
<i>n</i> -Heksana	3,52
Kloroform	8,34
Metanol	3,00
Kontrol negatif (aquades)	0,00
Kontrol positif (Tetrasiklin)	16,73

Ekstrak *n*-heksana, kloroform dan metanol daun sirsak memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* dan aktivitas antibakteri terbesar adalah ekstrak kloroform dengan zona hambat sebesar 8,34 mm, sedangkan ekstrak *n*-heksana dan metanol menghasilkan zona hambat berturut-turut sebesar 3,52 mm dan 3 mm.

### Penentuan Konsentrasi Hambat Tumbuh Minimum Ekstrak Kloroform

Penentuan KHTM ini dilakukan untuk mengetahui konsentrasi minimum sampel yang dapat menghambat *E. coli*. Penentuan KHTM dilakukan dengan menguji sederetan konsentrasi sampel yang dibuat dengan cara pengenceran. Konsentrasi ekstrak kloroform daun sirsak yang digunakan dalam penentuan KHTM berkisar 5-1000 ppm. Grafik penentuan KHTM dari ekstrak kloroform terhadap *E. coli* dapat dilihat pada **Gambar 1**.



**Gambar 1.** Grafik konsentrasi hambat tumbuh minimum (KHTM) ekstrak daun sirsak terhadap *E.coli*

Berdasarkan hasil penelitian seperti yang disajikan pada **Gambar 1** menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri ekstrak kloroform daun sirsak menurun seiring dengan menurunnya konsentrasi. Semakin tinggi konsentrasi suatu bahan antimikroba maka aktivitas antimikrobanya semakin besar pula.

Ekstrak kloroform dengan konsentrasi terkecil yaitu konsentrasi 1 ppm masih dapat menghambat

pertumbuhan *E. coli* yakni sebesar 3,23 mm sedangkan pada konsentrasi 0,5 ppm sudah tidak menghambat pertumbuhan *E. coli*. Semakin kecil konsentrasi hambat minimum ekstrak menandakan semakin potensial ekstrak tersebut sebagai antibakteri, karena dengan konsentrasi kecil ekstrak sudah dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Berdasarkan penelitian ini, ekstrak kloroform daun sirsak memiliki aktivitas antibakteri yang sangat kuat karena memiliki nilai KHTM sebesar 1 ppm. Menurut (Holetz et al., 2002), senyawa aktif yang memiliki nilai KHTM kurang dari 100 ppm menunjukkan aktivitas antibakteri sangat kuat.

Kontrol positif yang digunakan pada penentuan KHTM digunakan tetrasiklin 500 mg (generik) dengan konsentrasi 1000 ppm dan menghambat bakteri *E. coli* dengan zona hambat sebesar 16,74 mm. Tetrasiklin merupakan antibiotik yang berspektrum luas. Mekanisme kerja tetrasiklin yaitu dengan menghambat sintesis protein pada ribosomnya. Terdapat dua proses masuknya tetrasiklin ke dalam bakteri gram negatif, pertama yang disebut difusi pasif melalui kanal hidrofilik. Kedua adalah sistem transport aktif. Setelah masuk maka antibiotik berikatan dengan ribosom 30S dan menghambat pemanjangan rantai polipeptida baru, sehingga menghambat sintesis protein. Pengikatan tetrasiklin dengan ribosom 30S bersifat sementara, sehingga aktivitas antibakteri yang dihasilkan tetrasiklin bersifat bakteriostatik.

### Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder

Uji warna digunakan untuk mengetahui adanya golongan senyawa metabolit sekunder seperti alkaloid, flavanoid, saponin, terpenoid, steroid, tanin dan polifenol. Hasil uji warna ekstrak yang paling aktif dapat dilihat pada **Tabel 3**.

**Tabel 3.** Hasil uji metabolit sekunder ekstrak daun sirsak dengan uji warna

Senyawa	Warna jika hasilnya positif	Keterangan
Alkaloid	Jingga	Terbentuk endapan jingga
Flavonoid	Merah atau jingga	Hijau
Saponin	Terbentuk busa	Terbentuk busa
Steroid	Biru tua atau hijau kehitaman	Cincin hijau
Terpenoid	Ungu	Hijau pekat
Tanin	Hijau kebiruan pekat	Hijau pekat
Polifenol	Hijau kebiruan	kekuningan

Uji metabolit sekunder yang pertama yaitu uji alkaloid. Uji ini bertujuan untuk mengetahui adanya senyawa golongan alkaloid dengan menggunakan pereaksi warna Dragendorff. Hasil uji alkaloid yang telah dilakukan menghasilkan larutan dengan warna oranye yang apabila dibiarkan beberapa saat akan menghasilkan endapan berwarna oranye kecoklatan pada dasar tabung. Hal ini menunjukkan hasil positif untuk golongan alkaloid. Adanya senyawa golongan alkaloid ditunjukkan dengan adanya endapan berwarna oranye dengan pereaksi Dragendorff. Mekanisme kerja alkaloid sebagai antibakteri yaitu dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut. Mekanisme lain antibakteri alkaloid yaitu komponen alkaloid diketahui sebagai interkelator DNA dan menghambat enzim topoisomerase sel bakteri (Karou et al., 2005).

Uji metabolit sekunder yang selanjutnya yaitu uji flavonoid. Uji flavonoid dilakukan dengan menggunakan serbuk Mg dan HCl pekat. Hasil uji flavonoid dengan menggunakan uji warna menghasilkan larutan warna hijau, yang menandakan hasil negatif. Ekstrak kloroform sebagai ekstrak kasar masih banyak mengandung golongan-golongan senyawa yang kompleks sehingga kemungkinan menumpuknya senyawa pada saat dilakukan uji sangat besar.

Uji metabolit sekunder selanjutnya yaitu uji saponin. Hasil uji saponin menghasilkan larutan dengan

terbentuknya busa yang stabil setinggi  $\pm 1,5$  cm, yang menandakan hasil positif. Hal ini menandakan bahwa ekstrak metanol daun mangga mengandung senyawa saponin. Mekanisme kerja saponin sebagai antibakteri yaitu dapat menyebabkan kebocoran protein dan enzim dari dalam sel Saponin dapat menjadi anti bakteri karena zat aktif permukaannya mirip detergen, akibatnya saponin akan menurunkan tegangan permukaan dinding sel bakteri dan merusak permeabilitas membran (Madduluri, Rao, & Sitaram, 2013). Rusaknya membran sel ini sangat mengganggu kelangsungan hidup bakteri. Saponin berdifusi melalui membran luar dan dinding sel yang rentan kemudian mengikat membran sitoplasma sehingga mengganggu dan mengurangi kestabilan membran sel. Hal ini menyebabkan sitoplasma bocor keluar dari sel yang mengakibatkan kematian sel. Agen antimikroba yang mengganggu membran sitoplasma bersifat bakterisida.

Uji metabolit sekunder selanjutnya yaitu uji terpenoid dan steroid dengan menggunakan pereaksi Lieberman Burchard. Senyawa steroid ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau dan adanya senyawa terpenoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna ungu.

Hasil penelitian yang diperoleh pada uji steroid menunjukkan hasil positif yang ditandai dengan terbentuknya perubahan warna dari kuning kehijauan menjadi hijau pekat, sedangkan pada uji terpenoid menunjukkan hasil negatif. Tidak terbentuknya warna merah keunguan pada uji warna kemungkinan bertumpuknya



senyawa yang ada di dalam sampel masih sangat besar.

Steroid banyak terdapat di alam sebagai fraksi lipid dari tanaman atau hewan. Zat ini penting sebagai pengatur aktivitas biologis dalam organisme hidup. Steroid dibentuk oleh bahan alam yang disebut sterol. Sterol merupakan senyawa yang terdapat pada lapisan malam (lilin) daun dan buah yang berfungsi sebagai pelindung untuk menolak serangan dan serangan mikroba.

Uji metabolit sekunder yang berikutnya adalah uji polifenol dan uji tanin. Hasil uji polifenol dengan menggunakan uji warna menghasilkan larutan warna hijau kebiruan, yang menandakan hasil positif. Uji polifenol pada penelitian ini menghasilkan warna ekstrak yang kekuningan hal ini menandakan bahwa ekstrak daun sirsak tidak mengandung polifenol. Sedangkan untuk tanin menghasilkan warna hijau kebiruan yang lebih pekat dibandingkan uji polifenol. Hal ini menandakan bahwa ekstrak kloroform daun sirsak mengandung senyawa tanin.

Tanin bekerja dengan cara mengendapkan protein dan dapat merusak membran sel sehingga pertumbuhan jamur terhambat. (Sudira, Merdana, & Wibawa, 2011) menambahkan bahwa senyawa tanin merupakan senyawa organik yang aktif menghambat pertumbuhan mikroba dengan mekanisme merusak dinding sel mikroba dan membentuk ikatan dengan protein fungsional sel mikroba.

Mekanisme antibakteri yang dimiliki tanin yaitu kemampuannya menghambat sintesis khitin yang digunakan untuk pembentukan dinding sel pada jamur dan merusak membran sel sehingga pertumbuhan jamur terhambat. Tanin juga merupakan senyawa yang bersifat lipofilik sehingga mudah terikat pada dinding sel dan mengakibatkan

kerusakan dinding sel (Sudira et al., 2011).

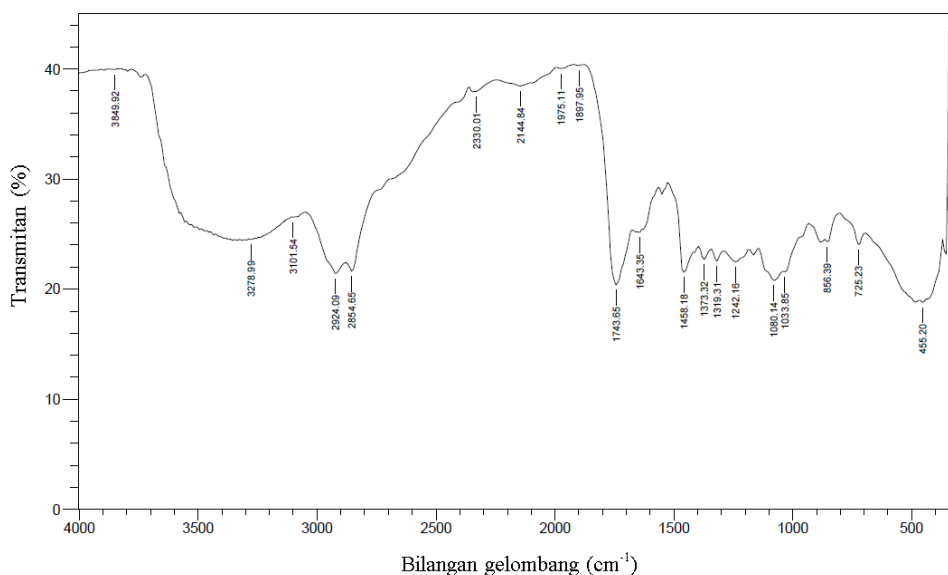
### Analisis Spektroskopi FT-IR

*Identifikasi senyawa kimia ekstrak kloroform dengan spektroskopi FT-IR*

Analisis menggunakan spektrofotometer IR dilakukan untuk mengetahui pita serapan gugus fungsi dari senyawa kimia dalam sampel. Spektrum FT-IR ekstrak kloroform daun sirsak dapat dilihat pada **Gambar 2**.

Berdasarkan hasil analisis spektrofotometer IR, diperoleh pita-pita serapan yang muncul pada bilangan gelombang tertentu. Data spektrum ekstrak kloroform daun sirsak menunjukkan adanya pita serapan melebar dengan intensitas kuat dengan jenis vibrasi ulur pada daerah bilangan gelombang  $3278,99\text{ cm}^{-1}$  yang diduga dari serapan gugus OH terikat. Adanya gugus OH didukung dengan munculnya serapan kuat pada bilangan gelombang  $2924,09\text{ cm}^{-1}$  dan  $2854,65\text{ cm}^{-1}$  yang diduga mengandung gugus C-H alifatik *stretching*.

Serapan tajam dengan intensitas kuat pada daerah bilangan gelombang  $1743,65\text{ cm}^{-1}$  diduga karena adanya serapan gugus fungsi C=O dari suatu asam karboksilat. Sedangkan munculnya pita serapan lemah pada bilangan gelombang  $1643,35\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya gugus fungsi C=C aromatik *stretching*. Dugaan ini diperkuat oleh adanya serapan pada bilangan gelombang  $1458,18\text{ cm}^{-1}$  yang merupakan serapan dari  $\text{CH}_3$  *bending*. Pita serapan lemah pada bilangan gelombang  $1242,16\text{ cm}^{-1}$  dan  $1080,14\text{ cm}^{-1}$  menunjukkan adanya gugus fungsi C-O eter dengan vibrasi ulur dan diperkuat oleh adanya serapan pada bilangan gelombang  $856,39\text{ cm}^{-1}$  dan  $725,23\text{ cm}^{-1}$  yang merupakan serapan dari C-H di luar bidang.



**Gambar 2.** Spektrum FT-IR ekstrak kloroform daun sirsak.

## KESIMPULAN

Ekstrak *n*-heksana, kloroform dan metanol daun sirsak terbukti dapat menghambat pertumbuhan *E.coli* dengan zona hambat berturut-turut adalah 3,52 mm; 8,34 mm; dan 3,00 mm. Ekstrak kloroform daun sirsak mempunyai aktivitas antibakteri yang tertinggi terhadap *E. coli* dengan zona hambat 8,34 mm. Konsentrasi hambat tumbuh minimum (KHTM) ekstrak kloroform daun sirsak terhadap *E. coli* yaitu pada konsentrasi 1 ppm dengan zona hambat 3,23 mm. Golongan senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam ekstrak kloroform daun sirsak berdasarkan uji warna yaitu senyawa alkaloid, saponin, steroid dan tanin. Berdasarkan hasil analisis spektrofotometer IR dan UV-Visible memberikan gugus fungsi antara lain O-H, C-H alifatik, C=O, C=C aromatik, CH<sub>3</sub>, C-O eter dan C-H di luar bidang.

## DAFTAR PUSTAKA

- Bawa Putra, A. A., Bogoriani, N. W., Diantariani, N. P., & Utari Sumadewi, N. L. (2014). Ekstraksi zat warna alam dari bonggol tanaman pisang (*musa paradiasciaca* l.) dengan metode maserasi, refluks, dan sokletasi. *Journal of Chemistry*, 8(1), 113-119.
- Bonaerense, A. F. (2005). Standardization of extracts from *Momordica charantia* L.(*cucurbitaceae*) by total flavonoids content determination. *acta farmaceutica bonaerense*, 24(4), 562-566.
- Doughari, J. (2007). Antimicrobial activity of *Tamarindus indica* Linn. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5(2), 597-603.
- Harborne, A. (1998). *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis*: Springer Science & Business Media.
- Holetz, F. B., Pessini, G. L., Sanches, N. R., Cortez, D. A. G., Nakamura, C. V., & Dias Filho, B. P. (2002). Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(7), 1027-1031.
- Jawetz, E., Melnick, J., & Adelberg, E. (2005). Mikrobiologi Kedokteran, diterjemahkan oleh Mudihardi. E., Kuntaman, Wasito, EB, Mertaniasih, NM, Harsono, S., Alimsardjono, L. Edisi XXII. Penerbit Salemba Medika. Jakarta, 327-335.

- Karou, D., Savadogo, A., Canini, A., Yameogo, S., Montesano, C., Simpore, J., Traore, A. S. (2005). Antibacterial activity of alkaloids from *Sida acuta*. *African Journal of Biotechnology*, 4(12), 195-200.
- Kumala, S., Tambunan, R. M., & Mochtar, D. (2006). Uji aktivitas anti-bakteri ekstrak etil asetat kembang pukul empat (*mirabilis jalapa* l.) dengan metode bioautografi. *JFIOOnline/ Print ISSN 1412-1107/ e-ISSN 2355-696X*, 3(2), 97-102.
- Madduluri, S., Rao, K. B., & Sitaram, B. (2013). In vitro evaluation of antibacterial activity of five indigenous plants extracts against five bacteria pathogens of humans. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(4), 679-684.
- Nimah, S., Ma'ruf, W. F., & Trianto, A. (2012). Uji bioaktivitas ekstrak teripang pasir (*holothuria scabra*) terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *bacillus cereus*. *Jurnal Pengolahan dan Bioteknologi Hasil Perikanan*, 1(1), 9-17.
- Ningsih, D. R., Zufahair, Z., & Purwati, P. (2014). Antibacterial activity cambodia leaf extract (*Plumeria alba* l.) to *Staphylococcus aureus* and identification of bioactive compound group of cambodia leaf extract. *Molekul*, 9(2), 101-109.
- Redha, A. (2013). Efek Lama Maserasi Bubuk Kopra Terhadap Rendemen, Densitas, dan Bilangan Asam Biodiesel yang Dihasilkan dengan Metode Transesterifikasi In Situ.
- Sani, R. N., Nisa, F. C., Andriani, R. D., & Maligan, J. M. (2013). Analisis rendemen dan skrining fitokimia ekstrak etanol mikroalga laut *Tetraselmis chuii* [in press april 2014]. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, 2(2), 121-126.
- Senja, R. Y., Issusilaningtyas, E., Nugroho, A. K., & Setyowati, E. P. (2015). The comparison of extraction method and solvent variation on yield and antioxidant activity of *Brassica oleracea* l. Var. *Capitata* f. *Rubra* extract. *Traditional Medicine Journal*, 19(1), 43-48.
- Solomon-Wisdom, G., Ugoh, S., & Mohammed, B. (2014). Phytochemical screening and antimicrobial activities of *Annona muricata* (L) leaf extract. *American Journal Biology Chemistry Pharmaceutical Sciences*, 2(1), 1-7.
- Sudira, I. W., Merdana, I., & Wibawa, I. (2011). Uji daya hambat ekstrak daun kedondong (*Lannea Grandis Engl*) terhadap pertumbuhan bakteri *Erwinia carotovora*. *Buletin Veteriner Udayana*, 3(1), 45-50.
- Valgas, C., Souza, S. M. d., Smânia, E. F., & Smânia Jr, A. (2007). Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(2), 369-380.
- Viera, G. H. F., Mourão, J. A., Ângelo, Â. M., Costa, R. A., & Vieira, R. H. S. d. F. (2010). Antibacterial effect (in vitro) of *Moringa oleifera* and *Annona muricata* against Gram positive and Gram negative bacteria. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 52(3), 129-132.