

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil

1. Determinasi Tanaman

Hasil identifikasi sampel Daun Sirsak yang dilakukan di Laboratorium Farmasi UGM diperoleh bahwa sampel yang digunakan adalah daun sirsak (*Annona muricata* Linn) dengan hasil determinasi seperti yang tertera pada lampiran 1.

2. Penyiapan Bahan

Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn.) yang digunakan pada penelitian ini diambil dari desa Karangrejek, Karang Tengah, Imogiri, Bantul, DIY pada bulan Januari 2017. Penyiapan bahan 2 kg daun sirsak yang disortir, dikeringkan dengan sinar matahari yang ditutup kain hitam selama 3-4 hari. Simplisia kering sebanyak 527 gram kemudian diblender untuk meningkatkan luas permukaan Sehingga diperoleh hasil serbuk halus 278 gram. Serbuk yang dihasilkan berwarna hijau kecoklatan.

3. Ekstraksi

Proses ekstraksi daun sirsak menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%. Serbuk daun sirsak diekstrak sebanyak 0.278 kg : 2.78 L etanol 70% (1:10). Suhu yang digunakan adalah suhu ruangan tanpa terpapar cahaya matahari langsung dengan waktu maserasi selama 5 x 24 jam dan remaserasi 2x 24 jam. Setelah proses maserasi ekstrak etanol daun sirsak disaring dengan menggunakan kertas *Whatman* no 1 dan di dapat hasil 1,2 L ekstrak etanol daun sirsak.

Selanjutnya dilakukan evaporasi yang bertujuan untuk memisahkan pelarut dari ekstraknya dan didapat ekstrak kental sebanyak 34,2 gram. Ekstrak yang dihasilkan dari daun sirsak beraroma daun sirsak dan berwarna hitam kecoklatan.

Tabel 4.1 Hasil karakteristik ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn.)

Karakteristik Ekstrak	Hasil
Rendemen	12,30%
Organoleptik	
Warna	Hitam kecoklatan
Bentuk	Kental dan pekat
Bau	Khas daun sirsak

Perhitungan rendemen

Serbuk daun sirsak 278 kg, diekstraksi dengan menggunakan etanol 70%. Hasil penguapan pelarut diperoleh ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn.) 34,2 g.

$$\text{Rendemen} = \frac{34.2}{278} \times 100\% = 12,30\%$$

4. Analisis Kandungan Kimia dengan Metode KLT

Pada penelitian ini dilakukan pengujian kandungan kimia daun sirsak menggunakan metode KLT (Kromatografi Lapis Tipis) untuk memastikan adanya kandungan senyawa kimia yang berguna sebagai antibakteri. Pelarut pengembang (fase gerak) yang digunakan untuk flavonoid, terpenoid dan alkaloid adalah N-Hexane : Etil Asetat (4:1) dan untuk fase diam digunakan silika GF₂₅₄. Totolan pada plat silika menggunakan pipa kapiler. Untuk mengidentifikasi senyawa flavonoid digunakan pereaksi semprot sitroborat. Untuk mengidentifikasi senyawa

terpenoid digunakan pereaksi semprot vanillin sulfat. Untuk mengidentifikasi senyawa polifenol digunakan pereaksi semprot FeCl_3 .

Bercak yang dihasilkan pada KLT lalu dideteksi dengan sinar tampak, UV_{254} , dan UV_{366} . Bercak pada lempeng KLT agar terlihat jelas dan senyawa yang terkandung dapat ditentukan dengan jelas maka digunakan beberapa larutan pereaksi semprot (Depkes.R.I., 1979). Pada pengujian ini diperoleh bahwa senyawa yang ada pada daun sirsak (*Annona muricata* Linn) adalah seperti tabel dibawah ini :

Tabel 4.2 Hasil Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Golongan senyawa	Hasil
Flavonoid	Ada (+)
Terpenoid	Ada (+)
Polifenol	Ada (+)

Tabel 4.3 Hasil Analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kandungan kimia	RF	Sinar tampak		UV 366		UV 254 nm		Ket
		Tanpa pereaksi	Tambah pereaksi	Tanpa pereaksi	Tambah pereaksi	Tanpa pereaksi	Tambah pereaksi	
Flavonoid	0.17	-	kuning	pemadaman	-	-	kunng	+
Terpenoid	0.57	-	Biru keunguan	pemadaman	-	-	biru	+
Polifenol	0.28	kelabu	Hijau kehitaman	pemadaman	-	kelabu	biru	+

Tabel 4.4 Hasil Analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Flavonoid

Kandungan kimia	RF	Sinar tampak		UV 366		UV 254 nm		Ket
		Tanpa pereaksi	Pereaksi Sitroborat	Tanpa pereaksi	Pereaksi Sitroborat	Tanpa pereaksi	Pereaksi Sitroborat	
Flavonoid	0.17	-	kuning	pemadaman	-	-	kunng	+

Tabel 4.5 Hasil Analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Terpenoid

Kandungan kimia	RF	Sinar tampak		UV 366		UV 254 nm		Ket
		Tanpa pereaksi	Pereaksi Vanilin	Tanpa pereaksi	Pereaksi Vanilin	Tanpa pereaksi	Pereaksi Vanilin	
Terpenoid	0.57	-	Biru keunguan	pemadaman	-	-	biru	+

Tabel 4.6 Hasil Analisis Kromatografi Lapis Tipis (KLT) Polifenol

Kandungan kimia	RF	Sinar tampak		UV 366		UV 254 nm		Ket
		Tanpa pereaksi	Pereaksi FeCl ₃	Tanpa pereaksi	Pereaksi FeCl ₃	Tanpa pereaksi	Pereaksi FeCl ₃	
Polifenol	0.28	kelabu	Hijau Kehitaman	pemadaman	-	kelabu	biru	+

Perhitungan Rf Flavonoid $Rf = \frac{\text{jaraktempukomponen}}{\text{jaraktempuheluen}} = \frac{1.3 \text{ cm}}{7 \text{ cm}} = 0,17$

Perhitungan Rf polifenol $Rf = \frac{\text{jaraktempukomponen}}{\text{jaraktempuheluen}} = \frac{2 \text{ cm}}{7 \text{ cm}} = 0,28$

$$\text{Perhitungan Rf Terpenoid} \quad Rf = \frac{\text{jaraktempukomponen}}{\text{jaraktempuheluen}} = \frac{4 \text{ cm}}{7 \text{ cm}} = 0.57$$

5. Pengujian Aktifitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) dilakukan dengan berbagai variasi konsentrasi ekstrak yaitu, 12,5%, 25%, 50% dan 75%. Sebelumnya ekstrak ditambahkan DMSO. Variasi konsentrasi dilakukan sebanyak 3 kali replikasi. Metode yang digunakan untuk pengujian adalah metode dilusi cair dilanjutkan dengan pengolesan pada media agar. Hasil aktivitas antibakteri dapat dilihat pada **Tabel 4.7**.

Tabel 4.7 Hasil Kadar Bunuh Minimum Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn.

Bakteri uji	Konsentrasi ekstrak Daun Sirsak (%)	KBM			Rata-Rata KBM
		1	2	3	
<i>Shigella dysentriae</i>	12,5	+	+	+	+
	25	+	+	+	+
	50	+	+	+	+
	75	-	-	-	-
<i>Ciprofloxasin</i> (+)		-	-	-	-
<i>DMSO</i> (-)		+	+	+	+

keterangan : (+) Adanya pertumbuhan bakteri

(-) Tidak adanya pertumbuhan bakteri

B. Pembahasan

Indonesia telah lama mengenal dan menggunakan tanaman berkhasiat obat sebagai salah satu upaya untuk mengatasi masalah kesehatan. Salah satu tanaman obat yang ada di Indonesia adalah Sirsak (*Annona muricata* L.). Sirsak merupakan tumbuhan dengan berbagai macam manfaat bagi kesehatan baik daging buah, daun maupun bijinya memiliki kandungan kimia yang bermanfaat untuk pengobatan, antara lain sebagai antibakteri, antivirus, antioksidan, antijamur, antiparasit, antihipertensi, antistres, dan menyetatkan sistem saraf. Daun sirsak mengandung bahan aktif, seperti saponin, acetogenin, alkaloid, flavonoid, dan polifenol (Yulianti, 2011)

Daun sirsak (*Annona muricata* Linn) yang digunakan pada penelitian ini adalah daun sirsak yang diperoleh dari desa Karangrejek, Karang Tengah, Imogiri, Bantul, DIY.

Determinasi tanaman dilakukan untuk menetapkan kebenaran sampel yang akan diuji. Berdasarkan hasil uji determinasi tanaman, diperoleh informasi bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirsak (*Annona muricata* Linn.).

Untuk melakukan proses ekstraksi, daun sirsak terlebih dahulu disortir untuk memisahkan daun yang tidak bagus. Daun sirsak kemudian dikeringkan untuk menghilangkan kadar air pada sampel tumbuhan agar kandungan senyawa yang diduga sebagai antibakteri tidak rusak oleh reaksi enzimatik dan juga mencegah terjadinya proses pembusukan selama proses penyimpanan (Katmo, 2008). Setelah kering simplisia dihaluskan hingga menjadi serbuk.

Penyerbukan bertujuan untuk memperluas permukaan agar mudah menarik senyawa kimia yang terkandung, sehingga kontak antara pelarut dan sampel lebih efektif dan senyawa dapat terdesak dengan optimal. Proses pembuatan serbuk simplisia harus dilakukan dengan hati-hati karena dapat mempengaruhi kualitas (Depkes RI, 2000).

Maserasi dilakukan selama 5 hari dan dilanjutkan 2 hari remaserasi. Proses maserasi dengan pengulangan (remaserasi) lebih efektif dibandingkan maserasi tunggal dikarenakan ada kemungkinan senyawa aktif dalam sampel masih tertinggal dari proses maserasi yang pertama sehingga hasil ekstraksi yang diperoleh lebih optimal. Menurut Ditjen POM (2000) menyatakan bahwa proses ekstraksi suatu tanaman harus dilakukan secara berulang agar bisa mendapatkan kadar zat aktif yang maksimal sehingga dapat dicapai potensi terapi yang maksimal.

Proses ekstraksi dilakukan dengan 278 gram serbuk simplisia dengan 2,78 liter pelarut etanol 70% (1:10 b/v). Menurut Voigh (1995) menyatakan bahwa semakin besar perbandingan antara serbuk simplisia dengan cairan pengekstraksi, maka akan semakin banyak hasil yang diperoleh dari proses maserasi tersebut. Selama proses maserasi dilakukan pengadukan secara periodik yang dimaksudkan untuk memberi kemudahan pelarut untuk melarutkan senyawa yang terdapat dalam sel tanaman (Baraja, 2008).

Kelebihan dari metode maserasi adalah sederhana, relatif murah, tidak memerlukan peralatan yang rumit, terjadi kontak antara sampel dan pelarut yang

cukup lama dan dapat menghindari kerusakan komponen senyawa yang tidak tahan panas. Kekurangan dari metode ini adalah membutuhkan waktu yang lama untuk mencari pelarut organik yang dapat melarutkan dengan baik senyawa yang akan diisolasi dan harus mempunyai titik didih yang tinggi pula sehingga tidak mudah menguap (Voight, 1995).

Selanjutnya dilakukan identifikasi senyawa kimia menggunakan kromatografi lapis tipis. Kromatografi lapis tipis (KLT) adalah suatu metode analisis yang digunakan untuk memisahkan suatu campuran senyawa secara cepat dan sederhana. Analisis kromatografi lapis tipis terhadap ekstrak daun sirsak dilakukan dengan menggunakan fase diam GF₂₅₄ dan fase gerak menggunakan campuran *n*-heksan dan etilasetat (4:1). Campuran antara *n*-heksan dan etilasetat digunakan karena memberikan pemisahan yang baik (Heble dkk., 1968; Kaul, 1968). Senyawa golongan alkaloid, steroid/terpenoid, flavonoid, dan polifenol diperkirakan akan terikat pada pelarut etilasetat yang bersifat semipolar atau pelarut *n*-heksan yang bersifat nonpolar (Harborne, 1984).

Pada penelitian ini diperoleh senyawa kimia flavonoid, terpenoid dan polifenol. Untuk mendeteksi senyawa dilakukan dengan metode penyemprotan. Penyemprotan dilakukan untuk mempermudah identifikasi bercak KLT. Pengujian KLT untuk flavonoid ini disertai dengan penyemprotan menggunakan sitroborat. Sebelum penyemprotan masih belum terlihat adanya bercak pada plat KLT, setelah penyemprotan terlihat bercak yang berwarna kuning dengan pengamatan sinar tampak dan UV₂₅₄, dan pepadaman dengan pengamatan pada UV₃₆₆. Harga R_f untuk flavonoid adalah 0.17.

Reaksi perubahan warna pada flavonoid disebabkan sitroborat yang memiliki komponen utama H_3BO_3 yang dapat membentuk kompleks khelat dengan gugus ortho dihidroksi dan ortho hidroksi karbonil pada flavonoid.

Uji terpenoid, ini disertai dengan penyemprotan menggunakan Vanilin sulfat. Sebelum dan setelah dilakukan penyemprotan, tidak ada menunjukkan perubahan, namun setelah dipanaskan, bercak menjadi terlihat dengan menampakkan perubahan warna menjadi biru keunguan atau coklat keunguan. Menurut Wagner (1984) senyawa terpenoid dapat dideteksi dengan pereaksi vanilin asam sulfat dengan mekanisme terbentuk senyawa yang memiliki ikatan rangkap terkonjugasi. Ikatan rangkap dua pada struktur kimia terpenoid memiliki spektrum serapan pada sinar ultraviolet dan sinar visibel, sehingga deteksi di daerah cahaya tampak terlihat berwarna violet (Wagner, 1984). Harga Rf untuk terpenoid adalah 0.57.

Pengujian KLT untuk polifenol ini disertai dengan penyemprotan menggunakan $FeCl_3$. Suatu senyawa fenolik apabila disemprot dengan $FeCl_3$ akan memberikan warna hijau, merah ungu, biru atau hitam (Harborne, 1987). Harga Rf untuk polifenol adalah 0.28 (Siswandono, 1995 dalam Rohadi, 2016). Reaksi perubahan warna pada polifenol ini terjadi akibat terbentuknya kompleks ion Fe^{3+} dengan gugus $-OH$ dari senyawa fenol.

Uji aktifitas antibakteri ekstrak etanol daun sirsak digunakan beberapa konsentrasi yaitu (12,5%, 25%, 50%, 75%,). Untuk KBM (Kadar Bunuh Minimum) diperoleh bahwa ekstrak daun sirsak (*Annona muricata*Linn.) dapat membunuh pertumbuhan bakteri *Shigella dysentriae* yaitu pada kadar 75%..

Terbunuhnya bakteri dapat dilihat melalui perbandingan antara kontrol positif (Ciprofloxacin) yaitu dengan tidak tumbuhnya bakteri *Shigella dysenteriae* pada media agar sehingga media agar menunjukkan zona tetap jernih tanpa tumbuhnya bakteri. Hal ini ditunjukkan pada **Tabel 4.7** dengan tidak terbentuknya pertumbuhan bakteri pada media agar setelah dioles kadar ekstrak pada dilusi cair. Untuk KHM (Kadar Hambat Minimum) pada pengujian kali ini didapatkan pada kadar 50% yang ditunjukkan dengan pengurangan pertumbuhan pada media agar TSA. Terhambatnya pertumbuhan bakteri ini dapat dilihat pada kadar 50% pada lampiran gambar yang dibandingkan dengan kontrol negatif (DMSO) yaitu pengurangan pertumbuhan pada agar 50%. Kontrol positif pada penelitian ini digunakan Ciprofloxacin. Ciprofloxacin merupakan antibiotik golongan Quinolon yang memiliki spektrum luas yaitu mampu membunuh bakteri (bakterisid) gram positif dan gram negatif. Ciprofloxacin ini bekerja yaitu menghambat DNA gyrase bakteri. Pemilihan Ciprofloxacin sebagai kontrol positif disebabkan Ciprofloxacin ini merupakan lini pertama untuk disentri oleh *Shigella dysenteriae* sehingga untuk mengetahui apakah ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) memiliki potensi yang sama dengan ciprofloxacin. Pemilihan DMSO sebagai kontrol negatif disebabkan DMSO memiliki kelarutan yang sempurna dengan ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.).

Hasil penelitian ini menyatakan bahwa daun sirsak (*Annona muricata* Linn.) mengandung beberapa senyawa antibakteri seperti flavonoid, Terpenoid dan polifenol. Hal tersebut sesuai dengan literatur yang dijadikan acuan (Naufalin, (2010) dan Hakim (2009)).

Flavonoid diduga memiliki efek sebagai antibakteri. Flavonoid berfungsi sebagai bakteriostatik dan mekanisme kerjanya mendenaturasi protein sel bakteri dan dapat merusak membran sitoplasma. Senyawa flavonoid dapat merusak membran sitoplasma yang dapat menyebabkan bocornya metabolit penting dan menginaktifkan sistem enzim bakteri. Kerusakan ini memungkinkan nukleotida dan asam amino merembes keluar dan mencegah masuknya bahan-bahan aktif ke dalam sel, keadaan ini dapat menyebabkan kematian bakteri (Prajitno, 2007).

Mekanisme terpenoid sebagai antibakteri adalah bereaksi dengan porin (protein transmembran) pada membran luar dinding sel bakteri, membentuk ikatan polimer yang kuat sehingga mengakibatkan rusaknya porin. Rusaknya porin yang merupakan pintu keluar masuknya senyawa akan mengurangi permeabilitas dinding sel bakteri yang akan mengakibatkan sel bakteri akan kekurangan nutrisi, sehingga pertumbuhan bakteri terhambat atau mati (Cowan, 1999 dalam Kusworo, 2012).

Polifenol merupakan senyawa fenol, turunan fenol bekerja sebagai antiseptik dan disinfektan dengan cara denaturasi dan koagulasi protein sel bakteri. Pada konsentrasi rendah terbentuk kompleks protein-fenol dengan ikatan lemah, diikuti penetrasi fenol ke dalam sel dan menyebabkan denaturasi protein. Pada kadar tinggi fenol menyebabkan koagulasi protein sel sehingga membran sel mengalami lisis. Turunan fenol juga dapat mengubah permeabilitas membran sel, dapat menimbulkan kebocoran sel sehingga bakteri mengalami kematian.