

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

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

Arif Setiawansyah¹⁾, Aliefman Hakim²⁾, Dyke Gita Wirasisya¹⁾

¹ Program Studi Farmasi, FK, Universitas Mataram, Jln. Majapahit No. 62 Mataram, Indonesia

² Program Studi Pendidikan Kimia, FKIP, Universitas Mataram, Jln. Majapahit No. 62 Mataram, Indonesia

*e-mail: arif12.setiawansyah@gmail.com

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-Dyhydrobenzofuran (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

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-Dyhydrobenzofuran (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.

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. Lapisan yang terbentuk dipisahkan dengan cara dekantasi. Rendemen ekstrak dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{ Rendemen ekstrak} = \frac{\text{bobot ekstrak kental (g)}}{\text{bobot simplisia yang di ekstrak (g)}} \times 100\%$$

Skrining 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 Blatt, 1996). Identifikasi flavonoid dengan menotolkan 5 µl ekstrak pada plat KLT dan dielusi dalam bejana KLT yang telah terjenuhkan dengan kloroform:etil asetat (6:4). Plat kemudian disemprot dengan AlCl₃ 5% (Wagner dan Blatt, 1996). Identifikasi polifenol dengan menotolkan 5 µl 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 FeCl₃ 5% (Harborne, 1973). Identifikasi steroid dan terpenoid dengan menotolkan 5 µl 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 Blatt, 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 µl 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 selektifitas yang cukup baik. Selain itu, metode ekstraksi sonikasi sangat efektif untuk mengekstraksi senyawa-senyawa termolabil karena dapat mengurangi paparan suhu tinggi (Azwanida, 2015).

Skrining 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 fluorosensi 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 fluorosensi merah, pink atau ungu di bawah UV 366 nm. Senyawa sterol ditandai dengan adanya fluorosensi kuning. Senyawa steroid akan berfluorosensi biru atau biru-hijau (Farnsworth, 1966).

Hasil skrining fitokimia ekstrak daun, minyak daun dan kulit batang mimba ekstrak dapat dilihat pada Tabel 1. Secara kualitatif, ketiga jenis ekstrak memiliki komponen yang hampir sama. Perbedaan terdapat pada kandungan triterpenoid, ekstrak kulit batang mimba menunjukkan hasil negatif, sedangkan ekstrak daun dan minyak daun positif triterpenoid.

Tabel 1. Hasil skrining fitokimia minyak daun, ekstrak daun dan kulit batang

No.	Komponen Kimia	Minyak Daun	Daun	Kulit Batang
1.	Alkaloid	Positif	Positif	Positif
2.	Flavonoid	Positif	Positif	Positif
3.	Fenolik	Positif	Positif	Positif
4.	Triterpenoid	Positif	Positif	Negative
5.	Steroid	Positif	Positif	Positif
6.	Sterol Jenuh	Positif	Positif	Positif
7.	Saponin	Positif sedang	Positif lemah	Positif kuat

Uji aktivitas antibakteri ekstrak dilakukan untuk membandingkan efektivitas antibakteri dari ketiga ekstrak yang diperoleh. Ketiga ekstrak (daun, minyak daun dan kulit batang) mimba memiliki potensi antibakteri yang ditunjukkan dengan adanya zona hambat yang terbentuk pada sekitar sumuran. Hasil uji berupa diameter zona hambat dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak

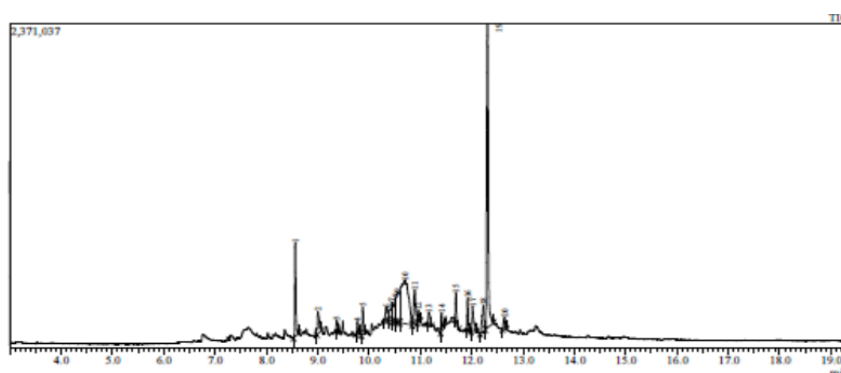
No.	Subjek Uji	Konsentrasi	Diameter Zona hambat (mm) ± SD
1.	Minyak daun	100 µl/ml	17,90± 0,80
2.	Ekstrak daun	1 mg/ml	10,42 ± 0,38
3.	Ekstrak kulit batang	1 mg/ml	15,17 ± 0,80
4.	Metronidazole	500 µl/ml	21,50 ± 0,66
5.	DMSO	10%	-

Keterangan tabel: Diameter lubang = 6 mm
Percobaan dilakukan dengan 3 replikasi

Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak dianalisis secara statistik untuk mengetahui perbedaan aktivitas antibakteri tiap ekstrak uji. Uji normalitas data menggunakan *Shapiro willk* menunjukkan data diameter zona hambat ekstrak daun, minyak daun dan kulit batang mimba

terhadap *Escherichia coli* terdistribusi normal dengan nilai signifikansi kontrol positif, ekstrak daun, minyak daun dan kulit batang berturut-turut adalah 0,363; 0,298; 0,298 dan 0,637 ($p > 0,05$), dan homogen (menggunakan uji Fisher F) dengan nilai signifikansi $p > 0,05$. Hasil analisis *one way Anova* menunjukkan ketiga ekstrak secara signifikan dapat menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* dengan $p = 0,000$ ($p < 0,05$) dan terdapat perbedaan efektivitas antibakteri yang nyata dari tiap kelompok uji dengan signifikansi $p < 0,05$. Dengan demikian minyak daun paling efektif dalam menghambat pertumbuhan *Escherichia coli*. Perbedaan kemampuan ketiga ekstrak kemungkinan disebabkan perbedaan kadar kandungan kimia aktif yang berperan sebagai antibakteri. Semakin tinggi kadar zat aktif yang terkandung dalam ekstrak maka semakin besar zona hambat pertumbuhan bakteri.

Dengan demikian, perlu dilakukan analisis menggunakan GC-MS untuk mengetahui senyawa kimia yang terkandung di dalam minyak daun mimba. Kromatogram GC menunjukkan adanya 20 puncak yang ditunjukkan pada Gambar 1.



Gambar 1. Kromatogram GC minyak daun mimba

Spektra dari masing-masing komponen senyawa akan dianalisis oleh MS menghasilkan data berupa rasio massa muatan (m/z) atau spektrum massa (Hussain dan Khushnuma, 2014). Spektrum massa yang diperoleh dianalisis dengan membandingkan spektra senyawa target dengan standar yang ada pada *library* alat yaitu *Wiley7.LIB*. Data senyawa hasil analisis GC-MS dapat dilihat pada Tabel 3.

Berdasarkan Tabel 3, terdapat beberapa senyawa yang kemungkinan berkontribusi dalam aktivitas antibakteri minyak daun mimba. Di antaranya, senyawa *2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one* (DDMP) merupakan senyawa flavonoid yang memiliki aktivitas antimikroba (Janani dan Singaravadivel, 2014). Senyawa *2,3-dihydrobenzofuran* merupakan senyawa turunan kumarin yang juga memiliki aktivitas antibakteri, dengan cara memutus ikatan peptidoglikan dan ikatan hidrofobik pada membran sel bakteri. Pemutusan ikatan tersebut akan menghambat pertumbuhan hingga kematian sel yang mengakibatkan sel bakteri menjadi lisis (Kaneswari *et al.*, 2013; Ramalakshmi dan Muthuchelian, 2011).

Senyawa *4-Hydroxy-2-methyl-pyrrolidine-2-carboxylic acid* merupakan senyawa golongan alkaloid yang menyumbang aktivitas antibakteri dengan cara menghambat sintesis asam nukleat melalui penghambatan enzim dihidrofolat reduktase (Cushnie *et al.*, 2014; Janani dan Singaravadivel, 2014). Selain itu, substitusi gugus *Pyrrolidine-2-carboxylic acid* pada turunan 1β -metil karba penem meningkatkan aktivitas antibakteri (Jiang *et al.*, 2014). Senyawa *3-Amino-2-hydroxy-pyridine* merupakan senyawa alkaloid dan menyumbang aktifitas antibakteri (Yang dan Stöckigt, 2010). Beberapa penelitian juga menunjukkan bahwa senyawa yang termasuk dalam golongan *bromo pyridine chalcones* dapat menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*,

Bacillus subtilis dan *Escherichia coli* (Jasril *et al.*, 2012). Senyawa lain yang berkontribusi dalam aktivitas antibakteri pada minyak daun mimba ialah asam palmitat. Asam palmitat telah diketahui mampu membunuh bakteri *L. garvieae*, *V. anguillarum*, *V. harveyi* dan *V. Alginolyticus* (Benkendorff *et al.*, 2005) dan mampu menghambat pertumbuhan *Propionobacterium acnes* (Yang *et al.*, 2009).

Tabel 3. Data senyawa hasil analisis GCMS minyak daun mimba

No.	RT (menit)	Nama Senyawa	RM	BM	Ke-limpahan (%)
1.	8.565	2,3-Dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one	C ₆ H ₈ O ₄	144	6.06
2.	9.007	2,3-Dihydrobenzofuran	C ₈ H ₈ O	120	2.69
3.	9.371	Tidak teridentifikasi	-	-	1.08
4.	9.775	Tidak teridentifikasi	-	-	0.86
5.	9.880	6-Hydroxy-7-methyl-5-nitro-bicyclo[4.4.0]decan-2-one	C ₁₂ H ₂₂ O	182	1.97
6.	10.339	1,6-Anhydro-Beta-D-Glucopyranose	C ₆ H ₁₀ O ₅	162	1.64
7.	10.442	Tidak teridentifikasi	-	-	3.35
8.	10.515	Tidak teridentifikasi	-	-	3.68
9.	10.550	L-Proline, 1-acetyl-(CAS) acetylproline	C ₇ H ₁₁ NO ₃	157	5.85
10.	10.705	4-Hydroxy-2-methyl-pyrrolidine-2-carboxylic acid	C ₆ H ₁₁ NO ₃	145	21.42
11.	10.892	Alpha-D-methylglucopyranoside	C ₇ H ₁₄ O ₆	194	4.54
12.	10.961	Alpha-D-trehalose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342	1.07
13.	11.167	Tidak teridentifikasi	-	-	1.46
14.	11.413	3-Amino-2-hydroxy-pyridine	C ₅ H ₆ N ₂ O	110	1.48
15.	11.692	Tidak teridentifikasi	-	-	1.78
16.	11.919	Tidak teridentifikasi	-	-	1.82
17.	12.017	Asam palmitat	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256	2.92
18.	12.229	Tidak teridentifikasi	-	-	3.34
19.	12.309	Arabino-hex-1-enitol, 1,5-anhydro-2-deoxy-(CAS) glucal	C ₆ H ₁₀ O ₄	146	31.69
20.	12.641	Tidak teridentifikasi	-	-	1.27

Pengujian aktivitas antibakteri fraksi dilakukan menggunakan metode yang sama dengan pengujian aktivitas antibakteri ekstrak kasar. Aktivitas antibakteri dari fraksi dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil pengujian aktivitas antibakteri fraksi minyak daun mimba

No.	Subjek Uji	Konsentrasi	Diameter Zona hambat (mm)± SD
1.	Fraksi n-heksan	1mg/mL	14.81 ± 0.26
2.	Fraksi etil Asetat	1 mg/mL	11.67 ± 0.58
3.	Fraksi etanol	1 mg/mL	-

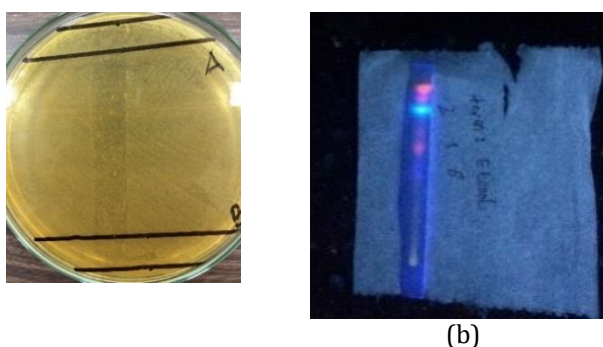
Keterangan tabel: Diameter lubang = 6 mm

Percobaan dilakukan dengan 3 replikasi

Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi dianalisis secara statistik untuk mengetahui perbedaan aktivitas antibakteri tiap fraksi. Uji normalitas data menunjukkan fraksi n-heksan terdistribusi normal $p=0,174$ ($p>0,05$), namun pada fraksi etil asetat data tidak terdistribusi normal dengan nilai $p = 0,000$. Analisis statistik untuk mengetahui efektifitas antibakteri fraksi menggunakan analisis non-parametrik *Kruskal Wallis*. Hasil uji menunjukkan signifikansi $0,023$ ($p<0,05$) yang berarti fraksi n-heksan dan etil asetat efektif menghambat pertumbuhan *Escherichia coli*. Selanjutnya dilakukan analisis *Mann Whitney Test*, yang menunjukkan adanya perbedaan aktivitas antibakteri yang nyata antar fraksi minyak daun dengan nilai $p=0,046$ ($p<0,05$).

Berdasarkan diameter hambat pada Tabel 4 menunjukkan bahwa fraksi n-heksan merupakan fraksi teraktif dalam menghambat pertumbuhan *Escherichia coli*. Hasil pengujian potensi antibakteri fraksi-fraksi minyak daun mimba memiliki aktivitas antibakteri yang lebih kecil dibandingkan dengan aktivitas antibakteri ekstrak baik minyak daun maupun kulit batang. Hal ini dikarenakan kandungan kimia ekstrak sangat kompleks dibandingkan dengan fraksi-fraksi hasil pemisahan. Beberapa senyawa kimia dalam ekstrak akan bekerja secara sinergis sehingga aktivitas antibakteri yang dihasilkan lebih efektif dibandingkan dengan aktivitas antibakteri dari senyawa tunggal (Jawetz *et al.*, 1995).

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. Hasil uji fitokimia fraksi n-heksan minyak daun mimba dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil skrining fitokimia fraksi n-heksan minyak daun mimba

No.	Komponen Kimia	Pereaksi	Keterangan
1.	Triterpenoid	Lieberman-Burchard	Positif
2.	Steroid	Lieberman-Burchard	Positif
3.	Sterol	Lieberman-Burchard	Positif
4.	Fenolik	FeCl ₃ 5%	Positif

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 merahanaman 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.
- Koul, O., Isman, M. B., dan Ketkar, C. M. (1990). Properties and uses of neem, *Azadirachta indica*. *Canadian Journal of Botany*, 68(1), 1–11.
- Kusuma, T., dan Nurul, U. (2014). Isolasi dan identifikasi minyak atsiri dari simplisia basah dan simplisia kering daun sirih merah (*Piper crocatum*). *Pharmacy*, 11(1), 1–5.
- Pelczar, M. dan Chan, E. C. (2006). *Dasar-dasar mikrobiologi*. Jakarta: UI Press.
- Poblocka-Olech, L., Piotr, M., dan Mirosława, K. B. (2018). TLC determination of some flavonones in the buds of different genus populus species and hybrids. *Acta Pharmaceutica*, 68, 199–210.
- Ramalakshmi, S., dan Muthuchelian, K. (2011). Analysis of bioactive constituents from the ethanolic leaf extract of tabebuia rosea (Bertol.) DC by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *International Journal of Chemical Technology Research*, 3(3), 1054–1059.
- Sinaga, M., Ganesan, K., Nair, S. K. P., dan Gani, S. B. (2016). Preliminary phytochemical analysis and *in vitro* antibacterial activity of bark and seeds of Ethiopian neem (*Azadirachta indica* A. Juss). *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(4), 1714–1723.
- Susila, I. W. W. (2017). Potensi produk mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) dan Faktor-faktor yang mempengaruhi potensi daun mimba di Lombok. *Jurnal FALOAK*, 5(4), 1714–1723.
- Vashist, H. dan Anil, J. (2012). Antimicrobial activities of medicinal plants: Review. *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 3(1), 222–230.
- Wagner, H., dan Blatt, S. (1996). *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography* (2nd ed.). New York: Springer.
- Yang, D., Pornpattananangkul, D., Nakatsuji, T., Chan, M., Carson, D., Huang, C., dan Zhang, L. (2009). The antimicrobial activity of liposomal lauric acids against *Propionibacterium acnes*. *Biomaterials*, 30(30), 6035–6040.
- Yang, L., dan Stöckigt, J. (2010). Trends for diverse production strategies of plant medicinal alkaloids. *Natural Product Reports*, 27, 1469–1479.