

Detection of Antimicrobial Compounds by Bioautography from Star Fruit (*Averrhoa bilimbi* Linn.)

Herlina Rante^{1*}, Yasnidar Yasir², Sitti Nur Aminah Emba Semsuli

¹ Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin, Makassar, Sulawesi Selatan

² Program Studi Farmasi, Universitas Islam Makassar, Makassar, Sulawesi Selatan

Artikel info

Diterima : 14 April 2018
Direvisi : 13 Mei 2018
Disetujui : 17 Juni 2018

Keyword

Antibacterial
Averrhoa bilimbi L.
TLC-Bioautography
Group compounds

ABSTRACT

Indonesia has many plants that has been used as medicine, like star fruit (*Averrhoa bilimbi* L.). This study aims to determine the antibacterial activity of starfruit and to determine its active compounds against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* by TLC-Bioautography. The fruit of *A. bilimbi* was extracted by maceration method using 96% ethanol while the diffusion agar method was used to determine the antibacterial activity. The results showed that ethanol extract and partition at a concentration of 10% could inhibit *E. coli* and *S. aureus*. Identification of the active chemical compounds from ethanol extract which was thought to have antibacterial activity against *E. coli* and *S. aureus*, was terpenoids at $R_f = 0.11$ and 0.81 , respectively. While the n-hexane partition identified as terpenoids which can only inhibit *E. coli* at a R_f value of 0.78 . It can be concluded that *A. bilimbi* fruit extract can be used as an alternative in inhibiting of bacterial growth.

Deteksi Antimikroba Secara KLT- Bioautografi Ekstrak Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* Linn.)

Kata kunci

Antibakteri
Averrhoa bilimbi L.
KLT-Bioautografi
Golongan senyawa

ABSTRAK

Indonesia memiliki banyak tanaman yang digunakan sebagai obat salah satunya adalah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui adanya aktivitas antibakteri dari buah *A. bilimbi* dan untuk mengetahui golongan senyawa kimia aktif dari buah *A. bilimbi* terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* secara KLT-Bioautografi. Buah *A. bilimbi* diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan cairan penyari etanol 96% sedangkan metode difusi agar dilakukan untuk mengetahui aktivitas bakteri. Hasil penelitian menyatakan bahwa ekstrak etanol dan partisi buah *A. bilimbi* pada konsentrasi 10% dapat menghambat bakteri *E. coli* dan *S. aureus*. Identifikasi senyawa kimia aktif dari ekstrak etanol yang diduga mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* dan *S. aureus* secara KLT-Bioautografi secara berturut-turut yaitu senyawa terpenoid pada $R_f = 0,11$ dan $0,81$. Sedangkan partisi n-Heksana yaitu terpenoid yang dapat hanya mampu menghambat *E. coli* pada nilai R_f $0,78$. Sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak buah *A. Bilimbi* dapat digunakan sebagai alternative dalam menghambat pertumbuhan bakteri.

Koresponden author

Herlina Rante
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin, Kampus UNHAS Tamalanrea Jl Perintis Kemerdekaan KM 10, Makassar 90241
Email: h_rante@yahoo.co.id

PENDAHULUAN

Infeksi merupakan penyakit yang sering dijumpai oleh masyarakat di seluruh dunia. Penyakit infeksi sering terjadi di negara beriklim tropis seperti Indonesia. Salah satu penyebab penyakit infeksi bisa disebabkan oleh kuman. Penyakit infeksi secara umum merupakan patogen yang bersifat tidak terlihat atau asimtomatik (Suwanto, 2017).

Pengobatan penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri yang resistan terhadap antibiotik memerlukan produk baru yang memiliki potensi tinggi. Penelitian terhadap zat yang berkhasiat sebagai antibakteri perlu dilakukan untuk menemukan produk antibiotik baru yang berpotensi menghambat atau membunuh bakteri yang resistan terhadap antibiotik dengan harga yang terjangkau. Salah satu alternatif yang dapat ditempuh adalah memanfaatkan zat aktif yang bersifat antibakteri yang terkandung dalam tanaman obat (Geografi *et al.*, 2014; Sari *et al.*, 2017).

Antibakteri adalah senyawa yang digunakan untuk mengendalikan pertumbuhan bakteri yang bersifat merugikan (Brogan dan Mossialos, 2016; Singer *et al.*, 2016). Pengendalian pertumbuhan mikroorganisme bertujuan untuk mencegah penyebaran penyakit dan infeksi, membasmi mikroorganisme pada inang yang terinfeksi dan mencegah pembusukan serta kerusakan bahan oleh mikroorganisme (Molloy, 2010).

Salah satu buah-buahan yang digunakan secara empiris oleh masyarakat sebagai obat adalah buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.). Buah *A. bilimbi* mengandung flavonoid, saponin, dan tanin (Hamdanah *et al.*, 2015). Zat-zat tersebut merupakan senyawa aktif dalam tanaman yang berkhasiat sebagai obat yang dapat menyembuhkan penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri.

METODE PENELITIAN

Pengambilan dan preparasi Sampel

Sampel berupa buah diambil di Jl Kande Raya, Kota Makassar, Provinsi Sulawesi Selatan. Buah dicuci dengan air mengalir sampai bersih lalu diiris tipis-tipis, dan dikeringkan dalam oven pada suhu 45–50°C selama 3x24 jam hingga kering lalu diserbukkan.

Ekstraksi Sampel

Serbuk buah ditimbang sebanyak 320 g kemudian dimasukkan ke dalam wadah maserasi, lalu ditambahkan Etanol 96% (hingga simplisia tersebut terendam) dibiarkan selama 3 hari dengan pengadukan sesekali dalam bejana tertutup dan terlindung dari cahaya. Setelah itu disaring dan ampasnya direndam lagi dengan cairan penyari yang baru. Hal ini dilakukan hingga proses ekstraksi sempurna. Hasil penyarian yang didapat kemudian diuapkan dengan menggunakan rotary evaporator hingga diperoleh ekstrak kental dan ditimbang untuk mengetahui rendamennya.

Partisi

Ekstrak etanol 96% yang diperoleh kemudian ditimbang sebanyak 5 g, kemudian dipartisi dengan pelarut n-heksana, kloroform, dan etil asetat. Setiap ekstrak yang diperoleh dilakukan pengujian pada 2 jenis bakteri.

Pengujian Aktivitas Antibakteri

Hasil pengujian aktivitas antibakteri ekstrak buah belimbing wuluh dengan beberapa larutan ekstrak hasil partisi (n-Heksana, Etil Asetat, Kloroform) dan ekstrak Etanol 96% dilanjutkan dengan uji aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* dan *S. aureus* dengan adanya zona hambat.

Ekstrak hasil partisi yang telah dibuat dalam konsentrasi 10% masing-masing diteteskan sebanyak 20 µl pada *paper disk* dengan diameter 6 mm. Kemudian diletakkan secara aseptik pada permukaan medium yang telah memadat, untuk kontrol negatif digunakan DMSO, setelah itu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya diukur daerah hambatan yang terbentuk. Ekstrak yang paling aktif kemudian dilanjutkan untuk KLT-Bioautografi.

Pemisahan secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Lempeng KLT diaktifkan dengan pemanasan dalam oven pada suhu 100°C selama 30 menit sebelum digunakan. Masing-masing ekstrak hasil partisi yang menunjukkan daya hambat ditotolkan pada lempeng KLT (7x1 cm), lalu dielusi dengan menggunakan eluen (n-heksana : etil asetat = 1 : 2). Kromatogram yang dihasilkan diamati di bawah sinar UV 254 nm dan 366 nm, serta penampakan noda penyemprotan H₂SO₄ 10 % dan dihitung nilai R_f-nya.

Uji KLT- Bioautografi

Hasil identifikasi KLT dilanjutkan dengan uji KLT-Bioautografi kontak dengan cara media NA steril sebanyak 10 ml yang dituang ke dalam cawan Petri steril, lempeng KLT yang telah dielusi diletakkan di atas permukaan medium agar yang telah disuspensikan dengan bakteri *Escherichia coli*, dan *Staphylococcus aureus* yang dibiarkan selama 60 menit. Setelah itu lempeng tersebut diangkat dan dikeluarkan. Selanjutnya media diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam.

Identifikasi Senyawa Kimia

Identifikasi senyawa kimia yang aktif anti mikroba meliputi pereaksi penampak bercak alkaloid, flavonoid, fenolik dan terpenoid.

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. bilimbi merupakan salah satu tanaman yang berkhasiat sebagai obat. Kandungan bahan kimia alami dari buah *A. bilimbi* yang mempunyai efek antibakteri yaitu flavonoid dan fenol (Wijayakusuma, 2006). Dalam penelitian ini dilakukan ekstraksi secara maserasi pelarut etanol 96%. Selanjutnya dipartisi dengan pelarut berdasarkan kepolaran pelarut. Prinsip partisi pada umumnya menggunakan pelarut dengan tingkat kepolaran yang lebih rendah dari pelarut yang dipartisi. Pemilihan pelarut berdasarkan prinsip kelarutan yaitu "like dissolve like" artinya pelarut polar akan melarutkan senyawa polar, begitu juga sebaliknya pelarut nonpolar akan melarutkan senyawa non polar. Penggunaan berbagai jenis pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda-beda ini bertujuan agar senyawa yang belum diketahui jenisnya dapat terpartisi secara optimal, baik secara kualitatif maupun kuantitatif (Ibrahim, 2011).

Sebanyak 11 g sampel buah kering yang telah dimaserasi menghasilkan 84,52 g ekstrak kental (rendamen = 26,42%).

Tabel 1. Rata-rata±SD diameter zona hambat uji aktivitas antibakteri buah *A. bilimbi* terhadap *E. Coli* dan *S. aureus*

| Jenis ekstrak | Diameter daya hambat (mm) terhadap | |
|-----------------|------------------------------------|------------------|
| | <i>E. coli</i> | <i>S. aureus</i> |
| Etanol 96% | 11.67±0.89 | 11.15±0.77 |
| n-Heksana | 8.01±1.51 | 7.45±0.64 |
| Etil asetat | 10.61±0.59 | 9.64±0.73 |
| Kloroform | 7.99±1.73 | 7.62±0.80 |
| Kontrol negatif | 24.38±1.98 | 24.91±1.64 |
| Siprofloksasin | 0 | 0 |

Tabel 2. Hasil pengujian KLT-Bioautografi dari kromatogram ekstrak etanol dan n-heksana buah *A. bilimbi*

| Bercak | Rf | Warna pada penampakan bercak | | | Bakteri uji yang dihambat |
|-----------|------|------------------------------|-----------------|--------------------------------|---------------------------|
| | | UV 254 nm | UV 366 nm | H ₂ SO ₄ | |
| Etanol | | | | | |
| 1 | 0,23 | Biru tua | - | - | <i>E. coli</i> |
| 2 | 0,11 | Abu-abu | - | Coklat | |
| 3 | 0,02 | Biru tua | - | - | |
| 4 | 0,81 | - | - | - | <i>S. aureus</i> |
| 5 | 0,49 | - | Biru berpendar | - | |
| n-Heksana | | | | | |
| 1 | 0,76 | Abu-abu | Merah berpendar | Coklat | <i>E. coli</i> |

Tabel 3. Hasil uji identifikasi golongan senyawa kimia aktif dari kromatogram ekstrak etanol buah *A. bilimbi* dengan Eluen n-Heksana : Etil Asetat (1 : 2)

| Rf | Golongan senyawa | Pereaksi | Pengamatan | Hasil Uji |
|-----------|------------------|---------------------|---------------------------------------|------------------------------|
| Etanol | | | | |
| 0,81 | Flavonoid | AlCl ₃ | Bercak berpendar pada UV 366 nm | Positif mengandung flavonoid |
| | Terpenoid | Lieberman-Bourchard | Ungu kehitaman | Positif mengandung terpenoid |
| 0,11 | Fenol | FeCl ₃ | Tidak ada bercak | Tidak mengandung fenolik |
| 0,81 | Alkaloid | Dragendorf-HCl | Tidak ada bercak | Tidak mengandung alkaloid |
| n-Heksana | | | | |
| 0,78 | Flavonoid | AlCl ₃ | Bercak tidak berpendar pada UV 366 nm | Tidak mengandung flavonoid |
| 0,78 | Terpenoid | Lieberman-Bourchard | Ungu kehitaman | Positif mengandung terpenoid |
| 0,78 | Fenol | FeCl ₃ | Tidak ada bercak | Tidak mengandung fenolik |
| 0,78 | Alkaloid | Dragendorf-HCl | Tidak ada bercak | Tidak mengandung alkaloid |

Tabel 4. Hasil pengujian pemisahan senyawa secara KLT ekstrak etanol buah *A. bilimbi* menggunakan eluen n-heksana : etil asetat (1 : 2)

| Bercak | Penampakan bercak | | | | | | | | | | | |
|--------|-------------------|----------|-----------|----------------|--------------------------------|---------|-----------|----------|-----------|-----------------|--------------------------------|--------------|
| | Ekstrak etanol | | | | | | n-Heksana | | | | | |
| | UV 254 nm | | UV 366 nm | | H ₂ SO ₄ | | UV 254 nm | | UV 366 nm | | H ₂ SO ₄ | |
| Rf | Warna | Rf | Warna | Warna | Rf | Warna | Rf | Warna | Rf | Warna | Rf | Warna |
| 1 | 0,90 | Biru tua | - | - | 0,89 | Hijau | 0,94 | Biru tua | - | - | 0,70 | Abu-abu tua |
| 2 | 0,61 | Biru tua | - | - | 0,8 | Ungu | 0,89 | Coklat | - | - | 0,54 | Kuning |
| 3 | 0,23 | Biru tua | - | - | 0,81 | Abu-abu | 0,78 | Abu-abu | 0,94 | Merah | 0,38 | Ungu |
| 4 | 0,18 | Biru tua | - | - | 0,70 | Abu-abu | 0,34 | Ungu | 0,78 | Merah berpendar | 0,29 | Hijau |
| 5 | 0,11 | Abu-abu | - | - | 0,29 | Coklat | 0,25 | Ungu | 0,72 | Merah | 0,23 | Abu-abu muda |
| 6 | 0,3 | Biru tua | - | - | 0,76 | Kuning | 0,16 | Coklat | 0,16 | Merah | 0,10 | Ungu |
| 7 | 0,09 | Biru tua | - | - | 0,18 | Ungu | 0,07 | Coklat | - | Merah | 0,07 | Ungu |
| 8 | 0,02 | Biru tua | 0,49 | Biru berpendar | 0,11 | Coklat | - | - | - | - | 0,78 | Coklat |
| 9 | | | | | | | | | | | 0,83 | Kuning |
| 10 | | | | | | | | | | | 0,87 | Hijau |
| 11 | | | | | | | | | | | 0,90 | Coklat |

Selanjutnya uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan metode difusi agar. Keuntungan dari metode ini kita dapat mengukur seberapa besar zona hambatan yang terbentuk. Uji ini dilakukan dengan menggunakan kertas cakram. Zona hambatan merupakan zona bening yang terbentuk di sekitar kertas cakram karena tidak adanya pertumbuhan bakteri uji yang disebabkan adanya zat yang menghambat pertumbuhan bakteri uji yang terdapat pada sampel uji yang dikeluarkan melalui kertas cakram yang berdifusi ke medium (Pertiwi dan Nursitasari, 2010).

Hasil uji aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan *E. coli* dan *S. aureus* dapat diketahui dari adanya zona hambatan di sekitar kertas cakram. Uji aktivitas antibakteri masing-masing ekstrak menggunakan konsentrasi 10%. Ekstrak Etanol buah *A. bilimbi* pada *E. coli* diameter hambatannya sebesar 11,67 mm, sedangkan pada *S. aureus* memiliki diameter hambatan sebesar 11,15 mm. Ekstrak partisi n-heksana pada bakteri *E. coli* sebesar 8,01 mm; sedangkan pada *S. aureus* memiliki sebesar 7,45 mm. Ekstrak partisi kloroform *E. coli* sebesar 7,99 mm, sedangkan pada *S. aureus* sebesar 7,62 mm. Ekstrak partisi etil asetat pada *E. coli* sebesar 10,61 mm, sedangkan pada *S. aureus* sebesar 9,64 mm (Table 1). DMSO digunakan sebagai kontrol negatif untuk membuktikan bahwa zona hambat yang terbentuk bukan disebabkan oleh DMSO, melainkan disebabkan oleh senyawa-senyawa antibakteri yang terdapat dalam ekstrak dan pembading positif siprofloksasin dengan diameter hambatan pada *E. coli* sebesar 30,16 mm, sedangkan pada *S. aureus* memiliki sebesar 24,91 mm (Table 1).

Hasil uji aktivitas antibakteri menunjukkan bahwa larutan uji lebih banyak menghambat bakteri Gram negatif dibandingkan dengan bakteri Gram positif, hal ini disebabkan oleh adanya perbedaan komposisi dan struktur dinding sel pada bakteri Gram negatif dan bakteri Gram positif.

Hasil uji pemisahan golongan senyawa dari ekstrak etanol secara KLT dengan eluen n-heksana : etil (1 : 2) pada penampak bercak UV 254 nm tampak 8 bercak, pada UV 366 nm tampak 1 bercak, dan penampak bercak menggunakan H₂SO₄ tampak 8 bercak. Ekstrak partisi dengan pelarut n-heksan secara KLT dengan eluen n-heksana : etil asetat (1 : 2) pada penampak bercak UV 254 nm tampak 7 bercak, pada UV 366 nm tampak 5 bercak, dan pada penampak bercak menggunakan H₂SO₄ tampak 11 bercak (Tabel 2).

Metode KLT-Bioautografi merupakan pengujian lanjutan yang berfungsi untuk

menemukan senyawa anti mikroba yang belum teridentifikasi. KLT-Bioautografi yang digunakan ialah metode kontak yaitu dengan cara menempelkan lempeng KLT pada medium yang telah disuspensikan dengan bakteri uji selama 60 menit. Dasar pemilihan metode ini ialah agar memudahkan dalam pengamatan identifikasi komponen kimia aktif, relatif aman bagi peneliti dan juga dapat memperkecil kesalahan yang mungkin terjadi dalam penelitian, serta dalam pemilihan metode ini agar supaya diperoleh proses pemindahan senyawa aktif ke dalam medium agar sehingga menghasilkan zona hambatan yang lebih besar dengan kekurangannya sensitivitas dan kemampuan membedakan antara senyawa aktif dengan nilai Rf yang sama (Mustary, 2011).

Hasil uji KLT-Bioautografi menunjukkan bahwa ekstrak etanol buah *A. bilimbi* memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *E. coli* pada nilai Rf 0,11 dan Rf 0,23 dan pada *S. aureus* bercak aktif pada nilai Rf 0,22; Rf 0,49, dan Rf 0,81. Sedangkan pada partisi n-heksana memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* pada nilai Rf 0,78 dan pada *S. aureus* tidak terdapat bercak aktif. Kemampuan suatu ekstrak menghambat pertumbuhan bakteri dipengaruhi oleh sifat dinding sel bakteri. Bakteri Gram negatif dan Gram positif mempunyai dinding sel yang berbeda sensitivitasnya terhadap perlakuan fisik, enzim, dan antibiotik (Jawetz dan Adelberg, 2007).

Ekstrak etanol buah *A. bilimbi* memiliki aktivitas antibakteri karena adanya senyawa kimia yaitu terpenoid yang dapat menghambat bakteri *E. coli* pada nilai Rf 0,11. Senyawa kimia yang kedua yaitu flavonoid, dapat menghambat bakteri *S. aureus* pada nilai Rf 0,81. Ekstrak partisi n-heksana memiliki aktivitas antibakteri karena adanya senyawa kimia yaitu terpenoid yang dapat menghambat bakteri *E. coli* pada nilai Rf 0,78.

Sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol dan ekstrak partisi n-heksana buah *A. bilimbi* memiliki aktivitas antibakteri karena adanya kandungan senyawa kimia yaitu senyawa flavonoid dan terpenoid.

KESIMPULAN

Ekstrak etanol dan ekstrak partisi (n-heksana, kloroform, dan etil asetat) buah *A. bilimbi* memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *E. coli* dan *S. aureus*.

DAFTAR PUSTAKA

- Brogan DM, Mossialos E. A critical analysis of the review on antimicrobial resistance report and the infectious disease financing facility. *Globalization and Health*. 2016;12(1); 1-8
- Geografi L, Wahyono D, Yasin NM. Evaluasi penggunaan antibiotik untuk terapi infeksi saluran kemih pada pasien sindrom nefrotik pediatri. *Jurnal Manajemen dan Pelayanan Farmasi*. 2014;4(1); 1-6
- Hamdanah S, Anam S, Jamaluddin. Isolasi dan identifikasi senyawa flavonoid dari ekstrak etanol buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) dengan metode spektrofotometri UV-VIS. *Galenika Journal of pharmacy*. 2015;1(1); 22-34
- Ibrahim A. Aktivitas antimikroba ekstrak dan fraksi ekstrak daun rami (*Boehmeria virgata* (Forst.) Guill terhadap beberapa mikroba organisme. *J Trop Pharm Chem*. 2011;1(2); 86-93
- Jawetz M, Adelberg. Mikrobiologi untuk profesi kesehatan. 2007. Penerbit Kedokteran EGC, Jakarta.
- Molloy S. Reactive resistance. *Nature Reviews Microbiology*. 2010;8(4); 248
- Mustary M. Uji daya hambat dan analisis KLT-Bioautografi perasan buah sawo meniran (*Achras zapota* L.) terhadap bakteri uji *Salmonella thyposa*. 2011. Sarjana Farmasi. Universitas Hasanuddin. PS Farmasi. Makassar
- Pertiwi, Nursitasari. Uji aktivitas antibakteri dan mekanisme penghambatan ekstrak air campuran daun (*Piper betle* L.) dan kapur sirih terhadap beberapa bakteri uji. 2010. Sarjana Farmasi. Universitas Islam Negeri Jakarta. PS Farmasi. Jakarta
- Sari, Putra D, Handayani D. Senyawa antibiotik dari *Bacillus* sp1 (HA1) yang bersimbiosis pada spon laut *Haliclona fascigera*. *J Sains Farm Klin*. 2017;3(2); 134-140
- Singer AC, Shaw H, Rhodes V, Hart A. Review of Antimicrobial Resistance in the Environment and Its Relevance to Environmental Regulators. *Frontiers in Microbiology*. 2016;7(1); 1728-1730
- Suwarto S. Penyakit tropik dan infeksi pada abad 21: Apakah Masih Relevan? *Jurnal Penyakit Dalam Indonesia*. 2017;1(2); 77-78
- Wijayakusuma H. Ramuan tradisional untuk pengobatan darah tinggi. 2006. Penebar Swadaya, Jakarta.