ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SENYAWA KIMIA DARI EKSTRAK ETIL ASETAT DAUN SIRSAK DAN UJI BAKTERI *STREPTOCOCCUS MUTANS* ATCC 31987

¹ Irvan Herdiana, ² Siswa Setyahadi, & ³ Partomuan S.

¹ Jurusan Farmasi Poltekkes Kemenkes Tasikmalaya,

² Pusat Penelitian Ilmu Pengetahuan dan Teknologi, Serpong, Tangerang.

³ Pusat Penelitian Bioteknologi, LIPI Cibinong

Abstrak

Berbagai obat antibiotik telah banyak digunakan secara klinis untuk pengobatan infeksi yang disebabkan oleh bakteri gram positif maupun gram negatif. Namun obat antibiotik tersebut memiliki sejumlah efek samping, baik ringan maupun berat. Bakteri *Streptococcus mutans* adalah bakteri penyebab utama dalam pembentukan karies gigi. Bermanfaat sebagai pengobatan infeksi. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui senyawa dari fraksi etil asetat daun sirsak yang berperan sebagai antibakteri dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 31987. Studi aktivitas penghambatan pertumbuhan bakteri dilakukan secara invitro dengan metode diameter daya hambat dengan mengukur diameter zona bening di sekitar disk pada media padat yang ditumbuhi bakteri menggunakan jangka sorong. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi etil asetat daun tumbuhan sirsak dari isolat Sub Fraksi F.7.IV memiliki aktivitas antibakteri melalui daya hambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 31987 pada konsentrasi 40%, 20%, 10% dan 5% dengan kategori tidak aktif. Analisis data dan identifikasi senyawa dilakukan dengan LCMS dan FT-IR, terdapat campuran 3 senyawa yaitu; annopentocin C, annopentocin B dan annomuricin D-one.

Kata kunci: Antibakteri, *Streptococcus mutans*, *Annona muricata*, Annopentocin C.

Abstract

Various antibiotic agents have been widely used clinically both Gram positif and Gram negative infection. Eventough those agent had a number of side effects ranging from mild to serious. *Streptococcus mutans* known as main cariogenic agent. Which empirically used as antibacteria as well. The purpose of this study was to determine the compound of ethyl acetate fraction of soursop leaf that can be used against *Streptococcus mutans* activity. Invitro study are performed with difussion method to measure the inhibition zone. The results showed that ethyl acetate fraction of the soursop leaf (*Annona muricata*) from Fr.F.7.IV islotate has lowactivity with concentration 40%, 20%, 10% dan 5% through *Streptococcus mutans* ATCC 31987. LCMS and FT-IR were performed to identify 3 chemical compound of fractions and showed the presence of annopentocin C, annopentocin B and annomuricin D-one.

Keywords: Antibacteria, *Streptococcus mutans*, *Annona muricata*, Annopentocin.

PENDAHULUAN

Metode uji aktivitas bakteri merupakan metode untuk mengetahui dan mendapatkan produk yang berpotensi sebagai bahan anti bakteri serta mempunyai kemampuan untuk menghambat pertumbuhan atau mematikan bakteri pada konsentrasi yang rendah, salah satunya yaitu dari bahan

alam. Mekanisme kerja dari senyawa antibakteri diantaranya yaitu menghambat sintesis dinding sel, menghambat keutuhan permeabilitas dinding sel bakteri, menghambat kerja enzim, dan menghambat sintesis asam nukleat dan protein (Jawetz, Melnick, & Adelberg, 2005).

Penggunaan sirsak sebagai obat-obatan bukan merupakan suatu hal yang baru di Indonesia. Secara turun temurun, sirsak telah digunakan oleh sebagian masyarakat Indonesia untuk mengobati beberapa penyakit. Seperti di daerah Sunda (Jawa Barat) buah sirsak yang muda banyak digunakan untuk obat penurunan tekanan darah tinggi dan di Aceh buah sirsak digunakan sebagai obat hepatitis dan daunnya sebagai obat batuk (Lundeen and Roberson, 1995). Selain itu menurut Lavella, tanaman ini juga digunakan untuk obat ambeien, mencret pada bayi, bisul, sakit pinggang, anyang-anyangan dan sakit kandung air seni, tanaman ini juga bersifat antibakteri, antiparasit, antipasmodik, antikanker, insektisida, hipotensif, mengobati sakit perut dan mampu mengeluarkan racun.

Salah satu kandungan kimia sirsak yang berperan penting untuk obat adalah flavonoid. Flavonoid merupakan salah satu metabolit sekunder dan keberadaannya pada daun tanaman dipengaruhi oleh proses fotosintesis sehingga daun muda belum terlalu banyak mengandung flavonoid. Flavonoid merupakan senyawa bahan alam dari golongan fenolik. (Pitman, 1984).

Plak gigi merupakan salah satu masalah dalam kesehatan gigi dan mulut, yang merupakan deposit lunak yang melekat erat pada gigi, terdiri atas mikroorganisme yang berkembang biak jika seseorang melakukan kebersihan gigi dan mulutnya.⁵ Salah satu bakteri utama penyebab terjadinya plak pada gigi adalah *Streptococcus mutans*. Bakteri ini merupakan organisme paling kariogenik di rongga mulut karena kemampuan asidurik dan asidogeniknya tinggi. (Nimah, Ma'ruf, & Trianto, 2012).

Salah satu alternatif untuk dapat mengendalikan plak adalah dengan menggunakan bahan-bahan yang berasal dari alam seperti yang bersifat antibakteri untuk mengendalikan perubahan flora normal rongga mulut, salah satu bahan alam yang dapat digunakan adalah

polifenol yang terkandung dalam beberapa tanaman, salah satunya adalah dalam daun sirsak (Alali, Liu, Mc-Laughlin, 1999).

Berdasarkan manfaat dari daun sirsak tersebut, maka tujuan penelitian ini adalah isolasi dan identifikasi senyawa pada fraksi paling aktif ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.), terhadap daya hambatnya pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 31987.

BAHENDAN METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan penelitian *posttestonly control group design*. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari- Juli 2017. Subjek dari penelitian ini adalah bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 39187. Variabel penelitian ini yaitu ekstrak etil asetat daun sirsak dan pertumbuhan *Streptococcus mutans* ATCC 39187.

Pembuatan ekstrak dilakukan di Laboratorium Farmasi STIKes Muhammadiyah Pekalongan. Daun sirsak sebanyak 1000g didapatkan dari B2P2TOOT (Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional) Tawamangu. Daun sirsak diekstraksi bertingkat dengan cara maserasi menggunakan beberapa pelarut (*n*-heksan, etil asetat, etanol, dan air) secara berurutan, khusus untuk air dilakukan juga infusa. Semua serbuk direndam dalam pelarut selama $\pm$ 24 jam secara berulang-ulang untuk masing-masing pelarut yang digunakan sampai diperoleh filtrat bening, kemudian disaring. Ekstrak *n*-heksan dipisahkan dari pelarutnya dengan *rotary vacuum evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental *n*-heksan. Residu dimaserasi dengan pelarut etil asetat, diperoleh filtrat etil asetat, kemudian residunya dimaserasi dengan etanol didapat filtrat etanol dan residunya di maserasi dengan air, didapat filtrat Air. Infusa menggunakan pelarut air juga dilakukan pada simplisia langsung. Selanjutnya dilakukan pemekatan hasil

Uji aktivitas antibakteri dilakukan pada semua ekstrak yang didapat. Cawan petri yang berisi media Nutrien Agar dan bakteri *Streptococcus mutans* ATCC

31987 yang telah diberi perlakuan diambil dari dalam inkubator setelah diinkubasi selama 1x24 jam. Hasil menunjukkan ekstrak etil asetat memiliki aktivitas paling besar yaitu 6,53 mm pada konsentrasi 10%.

Zona hambat yang dihasilkan dari masing-masing perlakuan memiliki diameter yang berbeda-beda. Pengamatan dilakukan dengan cara mengukur diameter zona bening yang terbentuk disekitar kertas cakram. Pengujian dilakukan pada setiap fraksi hasil dari kromatografi kolom. Hasil pengukuran diameter zona hambat yang terbentuk dapat dilihat pada Tabel berikut :

Tabel 2. Hasil Pengujian Gabungan Fraksi 1 sampai 4

Perlakuan	Rata2 Diameter Daya Hambat (mm)			
	Gab. F.7.1	Gab. F.7.2	Gab. F.7.3	Gab. F.7.4
5 %	1	0,73	1,53	2
10 %	1,20	0,83	1,67	2,10
20 %	1,57	1,03	2	2,27
40 %	1,67	1,07	2,27	2,47
Kontrol (-)	0	0	0	0
Kontrol (+)	6,90	6,90	6,90	6,90

3. Fraksinasi

Fraksinasi dilakukan pada ekstrak etil asetat. Tiap fraksi yang telah dipisahkan menggunakan kromatografi kolom dilihat profil KLT (Kromatografi Lapis Tipis), untuk dilakukan penggabungan dan kembali dilakukan uji antibakteri. Hal ini dilakukan sampai didapat isolat yang mempunyai satu noda pada KLT untuk selanjutnya dilakukan identifikasi senyawa.

Pengeringan dilakukan pada sub. Fraksi F.7.IV, hasil dari kromatografi kolom II, gabungan fraksi 7. Isolat yang didapat dengan berat 2 mg berbentuk cair seperti minyak dan berwarna kuning kehijauan. Hal ini dilakukan karena zona bening terbesar, terdapat pada fraksi ini.

4. Identifikasi Senyawa Kimia

Isolat dilakukan identifikasi senyawa menggunakan LC-MS dan gugus fungsi dengan FT-IR di Laboratorium terpadu Fakultas MIPA Universitas Negeri Sebelas Maret Surakarta Jawa Tengah.

Gambar 2. Hasil LC-MS isolat Fraksi F.7.4

Hasil puncak dari kromatografi cair kinerja tinggi dan spektroskopi massa menunjukan ada tiga senyawa yaitu pada waktu retensi 0,80, 0,87 dan 0,94. Diduga merupakan senyawa- senyawa isomer, hal ini dapat dilihat dengan berdekatnya waktu retensi pada ketiga senyawa.

Gambar 3. Hasil LC-MS isolat Fraksi F.7.4

Analisis senyawa dapat dilakukan dengan membandingkan gugus fungsi pada FT-IR dan pola fragmentasi senyawa pada sampel dan senyawa-senyawa yang terdapat pada daun sirih yang sudah teridentifikasi, salah satunya yaitu senyawa acetogenin.

Puncak senyawa I memiliki waktu retensi 0,80 menit, terdapat puncak ion molekul pada M^+ 612 ($C_{35}H_{64}O_8$) yang memiliki kemiripan dengan senyawa annonpentocin C.

Tabel 3. Spektrum IR Senyawa Sub. Fraksi F.7.4 dan annonpentocin C

Senyawa Hasil Isolasi	Anonpentocin C ⁷	Gugus Fungsi ⁸
3387 cm^{-1}	3378 cm^{-1}	OH (<i>Intra hydrogen bond</i>)
2931 cm^{-1}	2925 cm^{-1}	C-H <i>alkene</i>
2871 cm^{-1}	2853 cm^{-1}	C-H <i>alkene</i>
1724 cm^{-1}	1750 cm^{-1}	=O <i>Ketone</i>
1463 cm^{-1}	1458 cm^{-1}	-CH ₂ -

Data serapan IR memberikan pita serapan melebar dan kuat pada bilangan gelombang 3387 cm^{-1} , mengidentifikasi adanya gugus OH. Selanjutnya pada bilangan 2931 cm^{-1} yang mengidentifikasi adanya gugus C-H siklik jenuh yang diperkuat dengan munculnya serapan intensitas sedang pada 1463 cm^{-1} yang diduga milik -CH₂-. Kemudian terdapat serapan dengan intensitas sedang pada bilangan 1724 cm^{-1} dari gugus keton.

Gambar 4. Struktur annonpentocin C⁷

Gambar 5. Pola Fragmentasi senyawa I

Fragmentasi senyawa hasil isolasi memiliki perbedaan yang sangat kecil dengan fragmentasi senyawa annonpentocin C. Hal ini dapat disimpulkan bahwa senyawa I, diduga merupakan

senyawa annonpentocin C. Dan berikut ini kemungkinan pola fragmentasi dari senyawa I.

Senyawa I mengalami fragmentasi dengan melepaskan gugus CH_8H_{14} menghasilkan fragmen dengan m/z 500,33 membentuk struktur dengan fragmen m/z 500, 33 ($C_{29}H_{48}O_7$).

Puncak senyawa II memiliki waktu retensi 0,868 menit, terdapat puncak ion molekul pada M^+ 612 ($C_{35}H_{64}O_8$) yang memiliki kemiripan dengan senyawa annonpentocin B.

Tabel 4. Spektrum IR Senyawa Sub. Fraksi F.7.4 dan Annonpentocin B

Senyawa Hasil Isolasi	Annonpentocin B ⁷	Gugus Fungsi ⁸
3387 cm^{-1}	3400 cm^{-1}	OH (<i>Intra hydrogen bond</i>)
2931 cm^{-1}	2935 cm^{-1}	C-H <i>alkene</i>
2871 cm^{-1}	2845 cm^{-1}	C-H <i>alkene</i>
1724 cm^{-1}	1749 cm^{-1}	=O <i>Ketone</i>
1463 cm^{-1}	1463 cm^{-1}	-CH ₂ -

Data serapan IR memberikan pita serapan melebar dan kuat pada bilangan gelombang 3387 cm^{-1} , mengidentifikasi adanya gugus OH. Selanjutnya pada bilangan 2931 cm^{-1} 2931 cm^{-1} yang mengidentifikasi adanya gugus C-H siklik jenuh yang diperkuat dengan munculnya serapan intensitas sedang pada 1463 cm^{-1} yang diduga milik -CH₂-. Kemudian terdapat juga serapan dengan intensitas sedang pada bilangan 1724 cm^{-1} yang diduga merupakan gugus keton.

Gambar 6. Struktur annonpentocin B⁷

Fragmentasi senyawa hasil isolasi memiliki perbedaan yang sangat kecil dengan fragmentasi senyawa Annonpentocin B. Dengan ini dapat disimpulkan bahwa senyawa II, diduga merupakan senyawa Annonpentocin B.

Gambar 7. Pola Fragmentasi senyawa II

Puncak senyawa III memiliki waktu retensi 0,94 menit, terdapat puncak ion molekul pada M^+ 612 ($C_{35}H_{64}O_8$) yang memiliki kemiripan dengan senyawa anomuricin-D-one.

Tabel 5. Spektrum IR Senyawa Sub. Fraksi F.7.IV dan anomuricin-D-one

Senyawa Hasil Isolasi	anomuricin-D-one ⁷	Gugus Fungsi ⁸
3387 cm^{-1}	3425 cm^{-1}	OH (<i>Intra hydrogen bond</i>)
2931 cm^{-1}	2925 cm^{-1}	C-H <i>alkene</i>
2871 cm^{-1}	2835 cm^{-1}	C-H <i>alkene</i>
1724 cm^{-1}	1765 cm^{-1}	=O <i>Ketone</i>
1704 cm^{-1}	1715 cm^{-1}	=O <i>Ketone</i>
1463 cm^{-1}	1455 cm^{-1}	-CH ₂ -
1367 cm^{-1}	1362 cm^{-1}	CH(CH ₃) ₃

Data serapan IR memberikan pita serapan melebar dan kuat pada bilangan gelombang 3387 cm^{-1} , mengidentifikasi adanya gugus OH. Selanjutnya pada bilangan 2931 cm^{-1} dan 2871 cm^{-1} yang mengidentifikasi adanya gugus C-H siklik jenuh yang diperkuat dengan munculnya serapan intensitas sedang pada 1463 cm^{-1} yang diduga milik -CH₂-. Kemudian terdapat serapan dengan intensitas sedang pada bilangan 1724 cm^{-1} dan 1704 cm^{-1} yang berasal dari gugus keton dan adanya serapan pada 1362 cm^{-1} menandakan adanya gugus alkena tert-butyl.

Gambar 8. Struktur Annomuricin-D-One⁷

Senyawa III mengalami fragmentasi dengan melepaskan gugus C_2H_4 menghasilkan fragmen dengan m/z 584, kemudian melepaskan lagi C_2H_4 dan membentuk fragmen dengan m/z 556 dan selanjutnya melepaskan CH_2 membentuk struktur dengan fragmen m/z 542, 38 ($C_{30}H_{54}O_8$).

Gambar 9. Pola Fragmentasi senyawa III

KESIMPULAN

Isolat pada Sub Fraksi F.7.IV dari ekstrak daun sirsak memiliki aktivitas antibakteri melalui daya hambat pertumbuhan pada bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 31987 pada konsentrasi 40%, 20%, 10% dan 5% dengan kategori tidak aktif, Analisis data dan identifikasi senyawa dilakukan dengan LCMS dan FT-IR, terdapat campuran 3 senyawa yaitu; Annopentocin C, Annopentocin B dan Annomuricin D-one.

DAFTAR PUSTAKA

- Alali F.Q, Liu X, McLaughlin J.L., (1999). Annonaceous Acetogenins; Recent Progres. Department of Medicinal Chemistry and Molecular Pharmacology, School of Pharmacy and Pharmacal SciencesPurdue University, West Lafayette, Indiana 47907. 1998. Journal. Nat. Prod.
- De jong, M.F., (1999). *Progressive and nonprogressive atrophic rhinitis. Disease of Swine. 8th ed.* Iowa State University Press. Aress. Ames. Iowa, USA.

- Jawetz, E., Melnick, J., & Adelberg, E., (2005). Mikrobiologi Kedokteran, Diterjemahkan oleh Mudihardi. E., Kuntaman, Wasito, EB, Mertaniasih, NM, Harsono, S., Alimsardjono, L, Edisi XXII. Salemba Medika. Jakarta.
- Lavelle C.L.B. *Applied oral physiology*. 2nd ed. London: Wright. p. 96–7.
- Lundeen T.F., Roberson T.M. (1995). *Cariology: the lesion, etiology, prevention, and control*. In: CM Sturdevant, TM Roberson, HO Heymann, JR Sturdevant, editors. *The art and science of operative dentistry*. 3th ed. St Louis: Mosby-Year Book Inc.
- Mulja M dan Suharman, (1995). Analisis Instrumental. Airlangga University Press. Surabaya.
- Nimah, S., Ma'ruf, W. F., & Trianto, A., (2012). Uji Bioaktivitas ekstrak Terimpang Pasir (*holothuria scabra*) terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Bacillus cereus*. Jurnal Pengolahan dan Bioteknologi Hasil Perikanan, 1.
- Pitman, M. (1984). *Genus Bordetella*. In Krieg. N.R. And J.G. Holt (Eds). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Williams and Wilkins*. Baltimor and London.