

## Isolasi Komponen Aktif Antibakteri Ekstrak Kloroform Daun Mimba (*Azadirachta indica* A. Juss.) dengan Bioautografi

### *Isolation of antibacterial compounds from chloroform extract of neem (Azadirachta indica A. Juss.) leaves guided by bioautography.*

DWI APRISTIANI, PUJI ASTUTI\*

Bagian Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada (UGM) Yogyakarta 55281

\* Korespondensi: Jl. Sekip Utara Yogyakarta 55281. Tel. +62-274-902568. Fax.: +62-274-543120. email: p.astuti@gmail.com

Diterima: 22 Maret 2005. Disetujui: 15 Juni 2005.

**Abstract.** Neem leaves (*Azadirachta indica* A. Juss.) have been traditionally used as an antibacterial agent for a long time. Former research mentioned that neem leaves were proven to have antibacterial activity. This study was aimed to isolate antibacterial components in the chloroform extract of neem leaves guided by bioautography. The maceration technique extracted neem leaves. Antibacterial testing of chloroform extract was conducted by the agar dilution method. Chloroform extract at 1000 µg/mL concentration inhibited the growth of *Staphylococcus aureus* but not *Escherichia coli*. The extract was then fractionated by Vacuum Liquid Chromatography (VLC) method, and the fractions obtained were tested for antibacterial activity. The mixture of 2 and 3 fractions eluted with n-hexane: ethyl acetate = 9:1 (v/v) and n-hexane: ethyl acetate = 5:1 (v/v), inhibited the growth of *S. aureus* at the concentration of 1000 µg/mL. TLC-bioautography of the fraction showed two inhibition zone with hRf values of 43.75 and 18.75. Isolate with hRf of 18.75 has a Minimum Inhibitory Concentration (MIC) value of 500 µg/mL and still contains many components such as terpenoid.

**Keywords:** neem, *Azadirachta indica* A. Juss., antibacterial agent, *Staphylococcus aureus*.

## PENDAHULUAN

Masyarakat Indonesia saat ini telah banyak memanfaatkan tanaman obat tradisional untuk menanggulangi berbagai macam penyakit. Penelitian mengenai obat tradisional dibutuhkan untuk memberikan bukti ilmiah mengenai khasiat suatu tanaman obat selain juga dapat digunakan sebagai sumber senyawa penuntun untuk sintesis senyawa obat baru. Salah satu tanaman yang telah lama digunakan sebagai obat tradisional tersebut adalah mimba (*Azadirachta indica* A. Juss.), yang nama lainnya adalah *Antelaea azadirachta* (L.) Adelb (Backer and van den Brink, 1965). Di Jawa tumbuhan ini dikenal dengan nama Mimba (Heyne, 1987). Neem, Nim, Margosa, Indian Lilac, Bead Tree, Pride of China, Holy Tree, Persian Lilac adalah sebutan untuk tumbuhan ini dalam bahasa Inggris (Gruenwald *et al.*, 1998).

Daun mimba tersusun spiralis, mengumpul di ujung ranting, merupakan daun majemuk menyirip genap. Tepi anak daun bergerigi, bergigi, beringgit, helaian tipis seperti kulit, bangun memanjang sampai tengah lanset, pangkal runcing, ujung runcing atau setengah meruncing, gundul atau sedikit berbulu, panjang 3-10,5 cm dan lebarnya 0,5-3,5 cm (Backer and van den Brink, 1965). Tumbuhan mimba banyak digunakan masyarakat sebagai obat, antara lain daunnya untuk pembangkit selera makan, obat disentri, borok,

malaria, minyaknya untuk eksema, kepala kotor, kudis, dan kulitnya untuk mengatasi gangguan lambung (Mardiswojo *et al.*, 1985). Sudarsono *et al.* (2002) juga mengatakan bahwa daun mimba digunakan untuk penambah nafsu makan, untuk menanggulangi disentri, borok, malaria, dan antibakteri. Mimba mengandung senyawa triterpen dan tetraterpen (limonoid, protolimonoid dan kelompok gedunin). Dalam minyak biji terdapat nimbolin A dan B, nimbin, dan gedunin. Tanin dan minyak atsiri terdapat pada kulit kayu dan daun (Gruenwald *et al.*, 1998). Metabolit yang ditemukan dari *A. indica* antara lain disetil vilasinin, nimbandioliol, 3-desasetil salanin, salanol, dan azadirachtin (Sudarsono *et al.*, 2002).

Sebuah penelitian menyebutkan bahwa ekstrak kulit batang dan daun mimba telah teruji dapat melawan 105 galur bakteri dari 7 genus, yaitu *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, dan *Mycobacterium* (Fabry *et al.*, 1998). Fraksi kloroform daun mimba, dengan menggunakan metode difusi padat, diketahui mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhi* (Pramularsih, 2001). Penelitian ini dilakukan untuk mengisolasi komponen aktif antibakteri yang terdapat dalam ekstrak kloroform daun mimba dengan metode bioautografi.

## BAHAN DAN METODE

### Alat dan Bahan

Alat timbang, alat untuk penyarian: bejana tertutup, corong Buchner, dan cawan porselin, alat kromatografi lapis tipis: pipa kapiler, bejana kromatografi, lampu UV, lempeng kaca, kipas angin, dan oven. Seperangkat alat *Vacuum Liquid Chromatography* (VLC): kolom kromatografi, vakum, cawan porselin, Erlenmeyer, dan gelas ukur. Seperangkat alat untuk uji antibakteri: cawan petri, LAF hood, pipet mikro, ose, spreader glass, Erlenmeyer, autoklaf, inkubator.

Bahan utama daun mimba (*A. indica*) diambil dari Pronosutan, Kembang, Nanggulan, Kulonprogo, Daerah Istimewa Yogyakarta pada bulan Agustus 2003. Pelarut organik: kloroform, metanol, n-heksana, etil asetat. DMSO, aquades, silika gel F 254, Pereaksi semprot: serum (IV) sulfat, anisaldehyda-asam sulfat, Dragendorff,  $\text{FeCl}_3$ , uap amonia, sitroborat. Bahan uji antibakteri: mikroba (*Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*), media *nutrient agar* (NA), *nutrient broth* (NB), salin (larutan NaCl 0,9%), dan kloramfenikol sebagai kontrol.

### Cara kerja

#### Penyarian serbuk daun mimba

Penyarian serbuk daun mimba dilakukan dengan metode maserasi. Serbuk kering daun mimba direndam dalam bejana tertutup dengan pelarut kloroform selama 24 jam, sambil digojog di atas shaker, kemudian disaring dengan corong Buchner. Prosedur ini diulang tiga kali untuk mendapatkan ekstrak kloroform.

#### Fraksinasi ekstrak daun mimba dengan metode *Vacuum Liquid Chromatography* (VLC)

Fraksinasi dilakukan menurut Coll dan Bowden (1986) yang dimodifikasi dengan fase diam silika gel PF254 dan fase gerak bervariasi (n-heksana 100%; n-heksana: etil asetat = 15:1, 9:1, 5:1, 1:1, 1:5 (v/v); etil asetat 100%; metanol: kloroform = 1:1 (v/v)). Fraksi-fraksi ditampung dalam cawan porselin dan diuapkan pelarutnya hingga kering. Fraksi dengan profil KLT yang mirip digabung menjadi satu untuk diuji antibakteri.

#### Uji aktivitas antibakteri (Mitscher et al., 1972)

Uji antibakteri dilakukan dengan metode dilusi padat pada konsentrasi 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  media. Kloramfenikol digunakan sebagai kontrol positif (+), sedangkan untuk kontrol negatif (-) digunakan DMSO. Ada tidaknya aktivitas penghambatan pertumbuhan bakteri pada media yang mengandung ekstrak kloroform/fraksi dibandingkan dengan kontrol positif dan negatifnya. Penentuan harga KHM dilakukan dengan metode dilusi cair.

Bioautografi dilakukan dengan meletakkan plat KLT sampel yang telah dikeringkan di atas media yang telah diberi suspensi bakteri selama 20 menit. Media pertumbuhan bakteri tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Diamati zone hambatan yang terbentuk.

### Isolasi komponen aktif dengan metode KLT preparatif

Isolasi dilakukan terhadap komponen aktif dalam fraksi yang menunjukkan zona hambatan pada sistem bioautografi dan dianalisis komponen yang terkandung di dalamnya dengan deteksi sinar UV 254 nm dan 365 nm, pereaksi Dragendorff, serum (IV) sulfat, anisaldehyda-asam sulfat, sitroborat,  $\text{FeCl}_3$ , dan uap amonia.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji pendahuluan terhadap ekstrak kloroform dengan konsentrasi 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  menunjukkan adanya penghambatan pertumbuhan bakteri *S. aureus* tetapi tidak terhadap *E. coli*. Kontrol positif dengan larutan obat kloramfenikol 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* dan *E. coli*. Kontrol negatif dengan larutan DMSO 100  $\mu\text{l}$  memperlihatkan pertumbuhan yang normal dari bakteri uji (Tabel 1).

Pada uji ini konsentrasi dipilih 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  sebab jika ekstrak aktif pada konsentrasi > 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ekstrak tersebut dianggap tidak efektif dikembangkan sebagai antimikroba baru dibanding obat-obat antibiotik yang sudah ada sekarang. Ekstrak dikatakan berpotensi jika pada kadar pemberian  $\leq 1000 \mu\text{g}/\text{mL}$  mampu menghambat pertumbuhan bakteri (Mitscher et al., 1972).

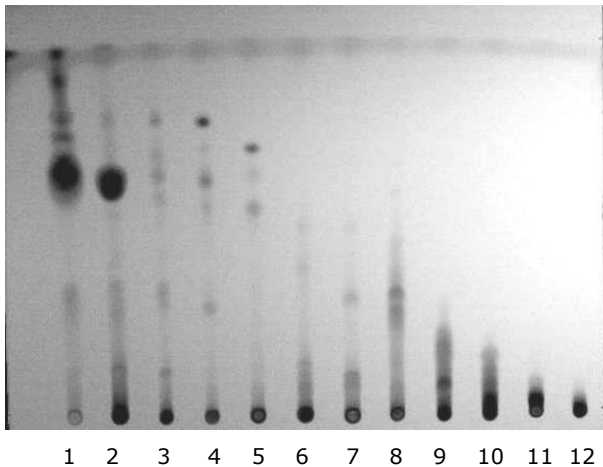
**Tabel 1.** Hasil uji pendahuluan aktivitas antibakteri ekstrak kloroform.

Sampel	Bakteri uji	
	SA	EC
Ekstrak kloroform 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$	++	--
K +	++	++
K -	--	--

Keterangan: SA: *S. aureus*, EC: *E. coli*, K +: Kontrol positif antibakteri (kloramfenikol 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), K -: Kontrol negatif antibakteri (DMSO 100  $\mu\text{l}$ ), ++: aktif (tidak ada pertumbuhan), +: aktif (sedikit pertumbuhan), --: tidak aktif.

Salah satu kemungkinan penyebab perbedaan aktivitas antibakteri ekstrak kloroform terhadap *S. aureus* dan *E. coli* adalah perbedaan komponen penyusun dinding sel bakteri tersebut. *S. aureus* merupakan bakteri gram positif dengan dinding sel yang relatif sederhana, hanya terdiri dari tiga lapisan, yaitu selaput sitoplasmik, lapisan peptidoglikan yang tebal, dan lapisan luar yang dinamakan simpai. Sedangkan dinding sel *E. coli* mempunyai struktur yang berlapis-lapis dan sangat kompleks (Jawetz et al., 1986). Kekompleksan struktur dinding sel bakteri gram negatif ini menjadi rintangan yang besar bagi agen antimikroba untuk menembusnya.

Dari hasil fraksinasi ekstrak kloroform diperoleh tiga belas fraksi (Gambar 1.) dan fraksi-fraksi dengan profil KLT yang hampir sama dijadikan satu sehingga diperoleh tujuh fraksi yang siap diuji antibakteri. Uji aktivitas fraksi menunjukkan beberapa fraksi aktif (Tabel 2).



**Gambar 1.** Hasil KLT fraksinasi ekstrak kloroform. Keterangan: Fase diam = silika gel GF 254. Fase gerak = n-heksana: etil asetat = 2:1 (v/v). Deteksi pereaksi sempromot serium(IV) sulfat.

**Tabel 2.** Hasil uji aktivitas antibakteri beberapa fraksi dari ekstrak kloroform pada konsentrasi 1000 µg/mL.

Sampel uji	SA
Fraksi 1	--
Fraksi 2+3	++
Fraksi 4+5	++
Fraksi 6	++
Fraksi 7+8+9	++
Fraksi 10+11+12	++
Fraksi 13	+
K +	++
K -	--

Keterangan: SA: *S. aureus*, K +: Kontrol positif antibakteri (kloramfenikol 1000 µg/mL), K -: Kontrol negatif antibakteri (DMSO 100 µl), ++: aktif (tidak ada pertumbuhan), +: aktif (sedikit pertumbuhan), --: tidak aktif.

**Tabel 3.** Hasil uji penentuan KHM.

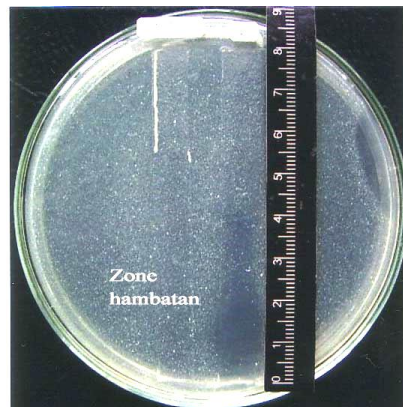
Kadar isolat (µg/mL)	SA
500	+
250	--
125	--
62,5	--
31,25	-
K + (25)	++
K+ (12,5)	+
KP	--
KM	--

Keterangan: SA: *S. aureus*, K + (25): Kontrol positif (kloramfenikol 25 µg/mL), K + (12,5): Kontrol positif (kloramfenikol 12,5 µg/mL), KP: Kontrol pelarut (DMSO 20 µl), KM: Kontrol media (media + bakteri), ++: aktif (tidak ada pertumbuhan), +: aktif (sedikit pertumbuhan), --: tidak aktif.

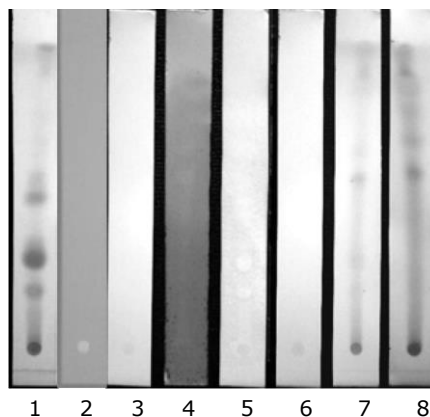
Salah satu fraksi aktif diisolasi komponen aktifnya dengan metode bioautografi. Kontrol negatif digunakan untuk memastikan bahwa zona jernih yang terjadi disebabkan oleh senyawa yang terdapat dalam kromatogram sampel. Hasil uji menunjukkan adanya dua zona jernih dengan hRf

43,75 dan 18,75 pada sistem KLT dengan fase diam silika gel F254 dan fase gerak n-heksana-etil asetat 3:1 (v/v) (Gambar 2). Isolasi dilakukan terhadap senyawa dengan hRf tersebut dan diketahui isolat dengan hRf 18,75 mampu menghambat pertumbuhan bakteri dengan KHM 500 µg/mL (Tabel 3).

Deteksi kromatogram isolat dengan sinar UV 254 memperlihatkan beberapa pemataman yang menunjukkan adanya senyawa-senyawa yang mengandung minimal 2 ikatan rangkap terkonjugasi. Sedangkan pada sinar UV 365 tidak terjadi pemendaran yang menunjukkan tidak adanya senyawa dengan ikatan rangkap terkonjugasi yang lebih panjang (inti aromatis atau gugus kromofor dan aoksokrom). Kromatogram isolat menunjukkan hasil negatif terhadap pereaksi uap amonia, sitroborat, Dragendorff, dan FeCl<sub>3</sub> yang menunjukkan tidak adanya kandungan flavonoid, fenol, dan alkaloid dalam isolat. Deteksi dengan serium (IV) sulfat dan anisaldehyda-asam sulfat memunculkan banyak bercak pada kromatogram. Anisaldehyda-asam sulfat digunakan salah satunya untuk deteksi senyawa terpenoid (Tabel 4, Gambar 3).



**Gambar 2.** Bioautografi gabungan fraksi 2 dan 3. Fase diam silika gel F254; fase gerak n-heksana-etil asetat 3:1 (v/v).



**Gambar 3.** Profil KLT isolat dengan hRf 18,75. Keterangan: Fase diam: silika gel F 254. Fase gerak n-heksana: etil asetat = 1:1 (v/v) + 3 tetes asam asetat glasial: 1. UV 254, 2. UV 365, 3. uap amonia, 4. Dragendorff, 5. FeCl<sub>3</sub>, 6. sitroborat, 7. serium (IV) sulfat, 8. anisaldehyda-asam sulfat.

**Tabel 4.** Hasil analisis KLT isolat daun mimba. Fase diam: silika gel F 254, fase gerak n-heksana: etil asetat = 1:1 (v/v), + 3 tetes asam asetat glasial.

hRF	Penampak bercak							
	254	365	UA	SB	DD	FeCl <sub>3</sub>	CS	AA
18,75 pepadaman	-	-	-	-	-	-	coklat	-
28,75 pepadaman	-	-	-	-	-	-	kuning	-
48,75 pepadaman	-	-	-	-	-	-	kuning	-
56,25	-	-	-	-	-	-	coklat	hijau
68,75	-	-	-	-	-	-	coklat	ungu
78,13	-	-	-	-	-	-	-	hijau
88,75	-	-	-	-	-	-	coklat	hijau
98,75 pepadaman	-	-	-	-	-	-	coklat	hijau ungu

Keterangan: 254: UV 254, 365: UV 365, DD: Dragendorff, CS: serium(IV) sulfat, AA: anisaldehyda-asam sulfat, UA: uap amonia, SB: sitroborat.

### KESIMPULAN

Ekstrak kloroform (konsentrasi 1000 µg/mL) aktif menghambat pertumbuhan *S. aureus* tetapi tidak aktif terhadap *E. coli*. Isolat pita bawah pada sistem KLT preparatif dengan fase gerak n-heksana: etil asetat = 2:1 (v/v) aktif terhadap *S. aureus* sampai kadar 500 µg/mL. Isolat yang diperoleh mengandung senyawa terpenoid.

### DAFTAR PUSTAKA

- Backer, C.A. and R.C. Bakhuizen van den Brink Jr. 1965. *Flora of Java (Spermatophytes only)*. Vol. II. Groningen: N.V.P. Noordhoff.
- Fabry, W., P.O. Okemo, and R. Ansorg. 1998. Antibacterial activity of East African medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 60 (1): 79-84.
- Gruenwald, J., T. Brendler, and C. Jaenicke. 1998. *Physicians' Desk Reference for Herbal Medicines*. 1<sup>st</sup> edition. Montvale, NJ.: Medical Economic Company.
- Heyne, A. 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia*. Jilid III. Jakarta: Badan Litbang Kehutanan.
- Jawetz, Z.E., J.L. Melnick, and E.A. Adelberg. 1986. *Mikrobiologi untuk Profesi Kedokteran*. Edisi XIV. Penerjemah: Tonang, H. Jakarta: EGC Penerbit Buku Kedokteran.
- Mardiswojo, S. dan H. Rajakmangunsudarso. 1985. *Cabe Puyang Warisan Nenek Moyang*. Cetakan Pertama. Jakarta: Balai Pustaka.
- Mitscher, L.A., R.P. Leu, M.S. Bathala, W. Wu, J.L. Beal, 1972. *Lloydia* 35: 157.
- Pramularsi, E.D. 2001. *Uji Aktivitas Antibakteri Daun Mimba (Azadirachta indica Juss.) terhadap Staphylococcus aureus dan Salmonella typhi beserta Profil KLTnya*. [Skripsi]. Yogyakarta: Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada.
- Sudarsono, D. Gunawan, S. Wahyuono, I.A. Donatus, dan Purnomo. 2002. *Tumbuhan Obat II, Hasil Penelitian, Sifat-Sifat, dan Penggunaan*. Yogyakarta: Pusat Studi Obat Tradisional UGM.