

UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI AKTIF TERSTANDAR FLAVONOID DARI DAUN BELIMBING WULUH (*Averrhoa bilimbi* L.)

ANTIBACTERIAL ACTIVITY ASSAY OF STANDARDIZED ACTIVE FRACTION FROM BELIMBING WULUH LEAF (*Averrhoa Bilimbi* L.)

Dyah Aryantini, Fita Sari, Juleha

Info Artikel

Sejarah Artikel:
Diterima: 02 November
2017
Disetujui 15 Desember
2017
Dipublikasikan 16
Desember 2017

Kata Kunci:

Fraksi belimbing
wuluh, antibakteri
belimbing wuluh, fraksi
terstandar,

Abstrak

Latar belakang: Daun belimbing wuluh memiliki potensi besar sebagai obat tradisional, diantaranya sebagai antiradang, antibatuk, antihipertensi, mengobati ulkus lambung dan antiinfeksi. **Tujuan:** Menguji aktivitas dari fraksi terstandar marker flavonoid (rutin) yang aktif menghambat bakteri *Staphylococcus aureus*. **Metode:** Daun belimbing wuluh diekstrak dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%, fraksinasi ekstrak kental menggunakan metode ekstraksi cair-cair dengan corong pisah. Aktivitas antibakteri diuji dengan sampel fraksi semipolar dengan konsentrasi 10%, 7,5% dan 5%. Uji kualitatif KLT terhadap sampel fraksi dengan pembanding rutin sebagai marker golongan flavonoid untuk mengkonfirmasi keberadaan senyawa golongan flavonoid dalam fraksi. **Hasil:** Fraksi semi polar menunjukkan aktivitas dalam menghambat pertumbuhan *S. aureus* dengan zona hambat terbesar 11 mm pada konsentrasi fraksi 10%. Pola kromatogram dari fraksi aktif menunjukkan adanya noda pada Rf yang sama dengan standar rutin. **Simpulan dan saran:** Fraksi semi polar terstandar rutin memiliki aktivitas menghambat pertumbuhan *S. aureus* pada konsentrasi 10%, 7,5% dan 5%. Perlu identifikasi dan karakterisasi lebih lanjut senyawa yang muncul dalam pemisahan KLT

Keywords:

Belimbing wuluh
fraction, belimbing
wuluh antibacterial,
standard fraction

Abstract

Background: Leaf belimbing wuluh has great potential as a traditional medicine. Such as anti-inflammatory, antitussive, antihypertensive, treat gastric ulcers, and antiinfection. **Objectives:** Examine the activity of a standard active fraction with a flavonoid marker (rutin) against *Staphylococcus aureus*. **Methods:** Leaf belimbing wuluh extracted with maseration method using 70% ethanol as solvent and then fractionation of extract was using liquid-liquid extraction with separation funnel. Antibacterial activity was tested with semi polar fraction samples concentration of 10%, 7,5% and 5%. The TLC qualitative test with rutin as a standard of flavonoid group marker to confirm the presence of flavonoid compounds in the active fraction. **Results:** Semi-polar fraction showed activity in inhibiting *S. aureus* growth with the largest 11 mm inhibit zone at 10% fraction concentration. The chromatogram pattern of the active fraction shows a stain on the Rf equal to the standard rutine

Conclusions and suggestions: A standard semi-polar fraction has activity inhibiting *S. aureus* growth at concentrations of 10%, 7.5% and 5%. Need further identification and characterization of the compounds that appear in separation of TLC

PENDAHULUAN

Hingga saat ini penyakit infeksi masih mendominasi dan menjadi penyebab beberapa penyakit yang menjangkiti khususnya daerah tropis. Pemahaman masyarakat mengenai terapi penggunaan obat, efek samping penggunaan obat menggiring mereka untuk menggunakan obat yang berasal dari herbal sebagai alternatif dari terapi pengobatan. Penelusuran senyawa aktif dalam ekstrak tanaman yang memiliki efek sebagai antibakteri penyebab penyakit infeksi terus digali. Diantara jutaan diversitas tumbuhan berkhasiat obat di Indonesia, tanaman belimbing wuluh menjadi salah satu sumber dari senyawa-senyawa aktif yang memiliki efek farmakologi.

Hampir seluruh bagian tanaman belimbing wuluh telah dimanfaatkan secara tradisional sebagai obat antihipertensi, antibatuk, antiradang, antiinflamasi, antijerawat, astringensia (Kumar *et.al*, 2013). Ekstrak daun belimbing wuluh mengandung senyawa golongan tannin, flavonoid dan triterpen yang memiliki aktivitas farmakologi bagi manusia. Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas fraksi aktif terstandar flavonoid yang mampu menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*.

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah tentang aktivitas antibakteri fraksi daun belimbing wuluh terstandar flavonoid dengan tujuan sebagai pertimbangan pada pembuatan produk obat herbal terstandar berbahan dasar fraksi daun belimbing wuluh (Hernani *et.al.*, 2009).

METODE PENELITIAN

Bahan dan Alat

Etanol 70% teknis, Aquadest bratachem, n-Heksana teknis, Etilasetat teknis dan pro analisis, Rutin (Merck), Silica Gel GF254, Tetrasiklin, Asam asetat glasial, Asam Sulfat pekat, HCl pekat, Serbuk Mg, Pereaksi Mayer, Wagner, Dragendorf, Lieberman Bucard, FeCl₃, Aseton pro analisis, Uap ammonia, Suspensi McFarland, NaCl Fisiologis, Nutrient Agar (Oxoid), Nutrient Broth (Oxoid), MHA (Oxoid). Simplisia daun belimbing wuluh dari Pare Kabupaten Kediri.

Perangkat KLT, Corong pisah, Rotavapor, Cawan penguap, Plate, Tabung reaksi, Bunsen.

Prosedur Kerja

1. Prosedur Penyiapan Sampel

Daun belimbing wuluh diperoleh dari daerah Pare dan diterminasi di MMI Batu Malang. Metode pembuatan ekstrak dengan maserasi selama 3 hari menggunakan pelarut etanol 70% dan remaserasi selama 2 hari. Fraksinasi dilakukan dengan prinsip ekstraksi cair-cair menggunakan corong pisah. Sepuluh gram ekstrak kental dilarutkan dalam 100 mL etanol 70% dimasukkan dalam corong pisah dengan penambahan n-heksan (1:1) untuk menarik senyawa non polar. Dua lapisan yang berbeda kepolaran dipisahkan, kemudian lapisan etanol ditambahkan etil asetat (1:1) untuk memisahkan senyawa semi polar dan senyawa polar pada. Fraksi polar dan semi polar dipisahkan dan diuapkan hingga pekat

2. Prosedur Skrining Fitokimia Ekstrak dan Fraksi Semi Polar Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.)

Skrining golongan senyawa flavonoid dengan cara tambahkan serbuk Mg dan 1 mL HCl pekat pada sampel kemudian dikocok. Hasil positif akan menunjukkan warna merah, jingga atau ungu (Markam, 1998).

Skrining golongan senyawa saponin dengan cara menambahkan HCl 2N sebanyak 5 mL pada sampel. Larutan didinginkan kemudian dikocok, hasil positif ditunjukkan dengan timbulnya busa konstan selama 30 detik.

Skrining golongan senyawa alkaloid dengan cara menambahkan HCl 2N sebanyak 5 mL pada sampel, kemudian dilakukan uji dengan reagen Mayer, Wagner, dan

Dragendorf. Hasil positif menunjukkan endapan putih dengan pereaksi Mayer, warna coklat muda dengan pereaksi Wagner, warna merah jingga dengan pereaksi Dragendorf.

Skrining golongan senyawa tannin dengan cara 1 mL sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi dengan 10 mL aquadest kemudian disaring dan diteteskan 2-3 tetes FeCl_3 . Hasil positif menunjukkan perubahan warna menjadi hijau kehitaman.

Skrining golongan senyawa triterpenoid dengan menambahkan 3 tetes reagen Lieberman-Buchard. Hasil positif akan menunjukkan warna merah atau ungu pada larutan sampel.

3. Prosedur Uji Bebas Etanol Terhadap Fraksi Etil Asetat (semi polar)

Dengan cara memasukkan sejumlah kecil masing-masing fraksi dalam tabung reaksi yang berbeda dengan penambahan 1 mL asam asetat glasial dan 1 mL asam sulfat pekat, homogenkan kemudian panaskan, bagian atas tabung ditutup kapas. Jika tidak berbau etanol maka positif bebas etanol.

4. Prosedur Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat (semi polar)

Pengujian aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* dimulai dengan sterilisasi alat yang digunakan dan pembuatan media *Muller Hilton Agar* sebagai media uji.

Pembuatan suspensi bakteri dengan cara kulturisasi koloni bakteri dalam 5 mL *Nutrient Broth* diinkubasi 1x24 jam suhu 37°C dan dibandingkan dengan kekeruhan standar *McFarland* skala 0,5.

Uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi cakram (*Kierby Bauer*) dengan membuat larutan uji pada konsentrasi 10%, 7,5% dan 5%. Konsentrasi 10% b/v diperoleh dengan menimbang 100 mg sampel fraksi dilarutkan dengan 1 mL aquadest steril, konsentrasi 7,5% b/v dengan menimbang 75 mg sampel dilarutkan dengan 1 mL aquadest steril, konsentrasi 5% b/v diperoleh dengan menimbang 50 mg dilarutkan dengan 1 mL aquadest steril. Pengujian dibuat dengan 3 replikasi.

Disk direndam selama 15 menit pada seri konsentrasi sampel dan ditempelkan pada media uji MHA bersama disk kontrol positif tetrasiklin dan kontrol negatif aquadest steril. Selanjutnya plate uji diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C . Zona bening yang terbentuk diukur menggunakan mistar atau jangka sorong.

5. Prosedur Uji Kualitatif Fraksi Terstandar Flavonoid Dengan Metode KLT

Pengujian secara kualitatif dimaksudkan untuk mengkonfirmasi keberadaan golongan senyawa flavonoid yang diduga merupakan senyawa yang memberikan aktivitas antibakteri.

Sampel fraksi yang sudah dilarutkan ditotolkan dalam fase diam plat KLT GF 254 aktif dengan pembanding rutin dan dikembangkan pada fase gerak butanol:asam asetat:air (4:1:5).

Hasil positif menunjukkan pemisahan yang sempurna dan bercak yang muncul pada R_f yang sama dengan R_f marker pembanding, pengamatan secara visual, di bawah lampu UV 254 nm dan 366 nm. Selanjutnya uji kualitatif terhadap golongan senyawa flavonoid dilanjutkan dengan memberikan uap ammonia pada plat dan mengamati perubahan warna yang terjadi.

6. Analisa Data

Pengaruh pemberian fraksi etil asetat sebagai anti bakteri terhadap *Staphylococcus aureus* diuji dengan analisa parametric One Way Anova untuk mengetahui perbedaan antara kelompok perlakuan dan kontrol (Notoadmojo, 2010)

HASIL PENELITIAN

1. Hasil Fraksinasi Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.)

Serbuk simplisia sebanyak 200 gram yang disari dengan 1600 mL etanol 70% dengan metode maserasi dan proses remaserasi untuk memperbanyak sari terlarut menghasilkan ekstrak kental dengan rendemen 16,83% b/b.

Fraksinasi dengan metode ekstraksi cair-cair menghasilkan 2 fraksi yaitu fraksi terlarut dalam etil asetat dan fraksi yang tak larut. Fraksi etil asetat (lapisan semi polar) yang diduga mengandung golongan senyawa flavonoid dan senyawa-senyawa antibakteri dipisahkan kemudian diuapkan hingga mengental dan dilakukan skrining fitokimia.

2. Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak dan Fraksi Semi Polar Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.)

Hasil penapisan golongan senyawa kimia pada ekstrak daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil skrining fitokimia ekstrak daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.)

Kandungan kimia	Pengujian	Hasil (+) literatur	Hasil pengujian	Ket
Flavonoid	+ serbuk Mg + HCl pekat 1 ml	Terbentuk warna orange, merah atau kuning.	Warna jingga kemerahan	Positif (+) Flavonoid
Saponin	+ aquadest, dipanaskan lalu di kocok	Terbentuk busa	Terbentuk busa	Positif (+) Saponin
Alkaloid	+ HCl 2N + pereaksi Mayer, Wagner dan Dragendroff	Terbentuk endapan putih, coklat muda dan jingga	Terbentuk endapan putih, coklat muda dan jingga	Positif (+) Alkaloid
Tanin	+ 10 ml aquadest lalu disaring + FeCl ₃ 1%	Terbentuknya warna biru tua atau hitam menunjukkan adanya tannin	Terbentuk hijau kehitaman	Positif (+) Tanin

Hasil penapisan golongan senyawa kimia pada fraksi semi polar daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil skrining fitokimia fraksi daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.)

Kandungan kimia	Pengujian	Hasil (+) literature	Hasil pengujian	Ket
Flavonoid	+ serbuk Mg + HCl pekat 1 ml	Terbentuk warna orange, merah atau kuning.	Warna jingga kemerahan	Positif (+) Flavonoid
Saponin	+ aquadest, dipanaskan lalu di kocok	Terbentuk busa	Terbentuk busa	Positif (+) Saponin
Alkaloid	+ HCl 2N + pereaksi Mayer, Wagner dan Dragendroff	Terbentuk endapan putih, coklat muda dan jingga	Terbentuk endapan putih, coklat muda dan jingga	Positif (+) Alkaloid
Tanin	+ 10 ml aquadest lalu disaring + FeCl ₃ 1%	Terbentuknya warna biru tua atau hitam menunjukkan adanya tanin.	Terbentuk hijau kehitaman	Positif (+) Tanin

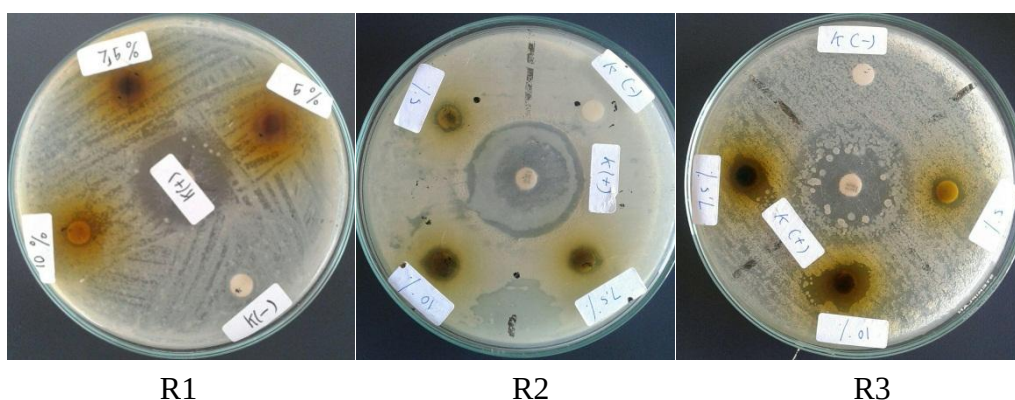
Triterpenoid	+ 3 tetes pereaksi Liberman- Burchard	Terbentuk warna merah atau ungu	Terbentuk warna merah atau ungu	Positif (+) Triterpenoid
--------------	--	------------------------------------	--	-----------------------------

3. Hasil Uji Bebas Etanol Fraksi Etil Asetat (semi polar)

Hasil uji bebas etanol fraksi semi polar daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) menunjukkan tidak adanya bau ester pada sampel.

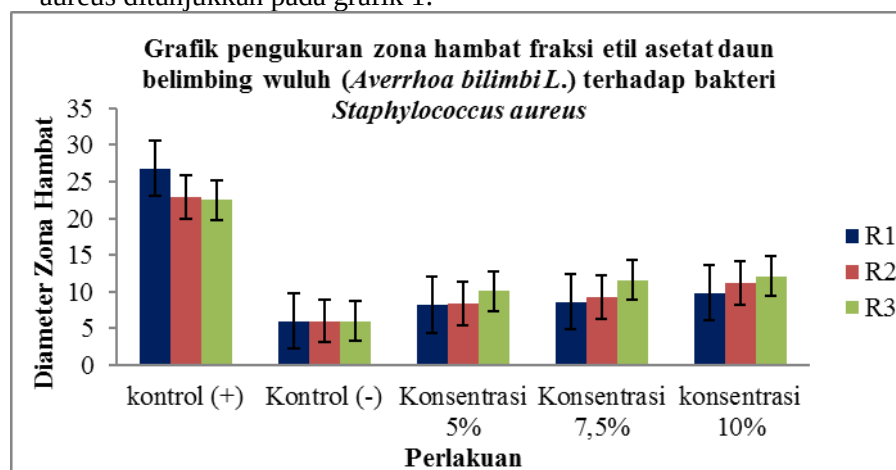
4. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat (semi polar)

Uji aktivitas antibakteri fraksi semi polar terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ditunjukkan pada gambar 1



Gambar 1. Uji aktivitas fraksi semi polar terhadap bakteri *S. aureus* dengan metode difusi cakram

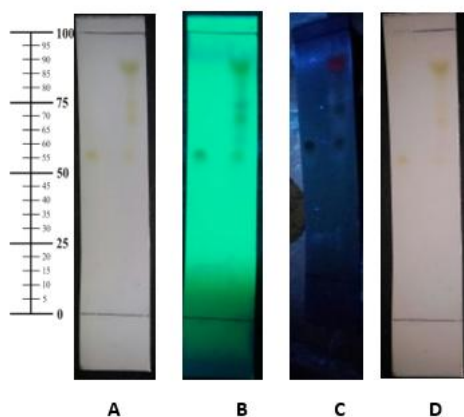
Hasil pengukuran zona hambat fraksi etil asetat (semi polar) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ditunjukkan pada grafik 1.



Grafik 1. Aktivitas Antibakteri Fraksi Semi Polar Daun Belimbing Wuluh

5. Hasil Uji Kualitatif Fraksi Terstandar Flavonoid (Rutin) Dengan Metode KLT

Bercak dan pemisahan senyawa yang terbentuk pada uji kualitatif secara KLT dari sampel fraksi semi polar terhadap marker flavonoid (rutin) ditunjukkan pada gambar 2.



Gambar 2. Hasil Uji Kualitatif KLT Fraksi Semi Polar Terhadap Standar Flavonoid (Rutin)
Keterangan gambar:

Fase Diam: Plat KLT GF 254

Fase Gerak : BAA (4:1:5)

Gambar 2.A: plat KLT diamati secara visual

Gambar 2.B : plat KLT diamati di bawah lampu UV 254 nm

Gambar 2.C: plat KLT diamati di bawah lampu UV 36 nm

Gambar 2.D: plat KLT direaksikan dengan uap ammonia (visual)

6. Hasil Analisa Data

Hasil uji anova menunjukkan bahwa kelima perlakuan pada uji aktivitas antibakteri terdapat perbedaan yang bermakna karena nilai probability menunjukkan bahwa nilai $p < 0,05$ yaitu sebesar 0,035.

PEMBAHASAN

Metode maserasi dalam penelitian ini digunakan karena metode tersebut relatif mampu menarik senyawa aktif yang berada dalam sel simplisia dalam jumlah yang besar karena waktu kontak yang panjang dengan pelarut, aman untuk senyawa yang labil dan tidak tahan pemanasan (BPOMRI, 2012). Penggunaan pelarut etanol 70% karena bersifat universal sehingga kemungkinan dapat menarik semua jenis golongan senyawa, mudah didapat dan bersifat semipolar (Rahmi, 2015). Etanol juga efektif menghambat pertumbuhan kapang dan kuman, etanol juga mampu bercampur dengan air pada berbagai perbandingan (Pasaribu, 2013). Fraksinasi terhadap ekstrak daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) dengan metode partisi ekstraksi cair-cair menggunakan corong pisah. Penggunaan pelarut n-heksana diharapkan dapat menarik senyawa non polar dan zat pengganggu lainnya, lapisan yang taklarut n-heksan kembali dipisahkan dengan pelarut etil asetat. Fraksi semi polar inilah yang dipisahkan dan dipekatkan dengan dugaan bahwa pada fraksi tersebut kemungkinan berkumpul senyawa yang aktif menghambat pertumbuhan bakteri, diantaranya *S. aureus* (Wulandari dkk, 2017). Menurut Anggraini, 2016 ekstrak daun belimbing wuluh mengandung senyawa flavonoid, saponin, tannin, alkaloid, dan triterpen. Dalam ekstrak maupun fraksi daun belimbing wuluh pada penelitian ini mengandui senyawa metabolit yang sama yaitu flavonoid, saponin, tannin, alkaloid dan triterpen.

Pengujian aktivitas antibakteri yang diawali dengan uji bebas etanol terhadap sampel dimaksudkan untuk memastikan bahwa sampel terbebas dari etanol sehingga tidak berpengaruh pada aktivitas antibakteri yang dimiliki senyawa dalam sampel. Sampel fraksi etil asetat diduga mengandung senyawa antibakteri dibandingkan dengan fraksi polar dan non polar (Abraham, 2016). Aktivitas fraksi semipolar pada konsentrasi 10% v/v menunjukkan aktivitas terkuat, hal ini membuktikan bahwa semakin meningkatnya konsentrasi fraksi maka meningkat pula aktivitas (Kumar *et.al*, 2013). Berdasarkan penggolongan antibakteri berdasar zona hambatnya menunjukkan bahwa pada konsentrasi 10% termasuk antibakteri kuat (zona hambat 10-20 mm).

Diduga senyawa metabolit dalam fraksi tersebut yaitu alkaloid, tannin, flavonoid dan triterpen memiliki aktivitas antibakteri. Flavonoid mampu menyebabkan kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri, mikrosom, dan lisosom (Dima, 2016). Oleh karena itu untuk mengkonfirmasi keberadaan golongan senyawa flavonoid yang terkandung dalam fraksi tersebut dilakukan KLT dengan pembanding rutin. Hasil positif terlihat pada pemisahan golongan senyawa dengan metode KLT menggunakan fase gerak yang polar yaitu BAA (4:1:5). Pada gambar2 terlihat rutin (marker) yang sejajar dengan senyawa dalam fraksi semi polar tersebut pada Rf 0,55. Kandungan rutin dalam fraksi tersebut dapat pula menjadi acuan untuk penelitian lebih lanjut terkait dengan aktivitas rutin secara farmakologis yang sekaligus menjadi salah satu alternatif pengembangan produk herbal terstandar.

SIMPULAN

Fraksi semi polar terstandar flavonoid (rutin) aktif menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi 5% v/v, 7,5% v/v dan 5% v/v

SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk identifikasi dan karakterisasi senyawa lain yang terlihat dalam pemisahan KLT. Serta perlunya isolasi senyawa-senyawa aktif dalam fraksi tersebut untuk optimalisasi efek farmakologi.

REFERENSI

- Abraham, C. Merin. 2016. Antibacterial Effects Of *Averrhoa bilimbi* L. Fruit Extracts. *International Research Journal Of Biological Sciences*. Vol. 5(8). Agustus 2016. E-ISSN 2278-3202
- Badan Pengawasan Obat Makanan Republik Indonesia. 2012. *Pedoman Teknologi Formulasi Sediaan Berbasis Ekstrak*. Jakarta: Badan Pengawasan Obat Makanan Republik Indonesia
- Dima, Lusi, L.R.H., Fatimawali., Widya, Astuty, L. 2016. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Kelor (*Moringa Oleifera* L.) Terhadap Bakteri *Escherichia Coli* Dan *Staphylococcus Aureus*. *Jurnal Ilmiah Farmasi UNSRAT*. Vol. 5 No. 2 Mei 2016 ISSN: 2302-2493.
- Hernani., Winarti, C., Marwati, T.2009. Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Belimbing Wuluh Terhadap Penurunan Tekanan Darah Pada Hewan Uji. *Jurnal Pascapanen*. Vol 6(1). 2009. Halaman: 54-61
- Kumar, K. Ashok, Gousia, S.K., M., Anupama dan Latha, J. Naveena Lavanya. 2013. A Review On Phytochemical Constituents And Biological Assays Of *Averrhoa Bilimbi*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science Research* 2013; 3(4): 136-139 ISSN: 2249-0337.
- Markham, K.R. 1998. *Cara Pengidentifikasi Flavonoid*. Diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata. Bandung : ITB Press.
- Pasaribu, Sabar P., Wahidatul Nuriah dan Erwin. 2013. Uji Toksisitas Dan Aktivitas Antibakteri Berbagai Ekstrak Daun Tanaman Kamboja (*Plumeria acuminata* Ait.). *Jurnal KimiaMulawarman*. Vol 10(2). Mei 2013. ISSN: 1693-5616

- Rahmi, Anggita, H., Tri, Cahyanto., Toni, Sujarwo., Rahayu, Indri, Lestari. 2015. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Beluntas(*Pluchea Indica* (L.) Less.) Terhadap *Propionibacterium Acnes* Penyebab Jerawat. *Jurnal Kajian Islam, Sains dan Teknologi*. Edisi Juni 2015 Volume 10(1). Juni 2015. ISSN: 1979-8911.
- Saputra, O., Anggraini, N. Khasiat Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) terhadap Penyembuhan Acne Vulgaris. *Majority*. Volume 5 (1). Februari 2016
- Wulandari, N. Dyah Ayu., Yuliawati, K. Mulkiya., Kodir, R. Abdul. 2016. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak dan Fraksi Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) Terhadap *Propionibacterium acnes* Menggunakan Metode Bioautografi. *Prosiding Farmasi*. Gelombang 2. 2016. ISSN: 2460-6472