



Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Batang Tumbuhan Johar (*Senna siamea* Lam) pada Berbagai Polaritas Pelarut

[Antibacterial Activity of Johar (*Senna siamea* Lam) Stem Bark Extract on Various Solvent Polarities]

Djumidar, Abd. Rahman Razak✉, Ahmad Ridhay, Ni Ketut Sumarni, Syamsuddin, Jusman, Nurhaeni, Erwin Abdul Rahim

Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Tadulako,
Jl. Soekarno-Hatta Km.9, Kampus Bumi Tadulako, Palu.

Abstract. Johar plant is a type of plant from the *Fabaceae* family which is widely used in traditional medicine such as malaria, itching and diabetes medicine. This study aims to determine the antibacterial activity of Johar stem bark extract with different levels of solvent polarity on the growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* bacteria and to determine the active compound class by TLC-Bioautography. The extraction of active compounds used a multilevel maceration method starting with *n*-hexane (non polar), followed by ethyl acetate (semi-polar) and ethanol (polar) solvents. Antibacterial activity testing was carried out by diffusion well method with a concentration variant of 25% and 50%. The results showed that *n*-hexane, ethyl acetate, and ethanol extract had antibacterial activity against the two test bacteria. Ethyl acetate and ethanol extract from Johar stem bark at a concentration of 50% were classified as very strong antibacterials with inhibition zone diameters against *S. aureus*, which were 22.02 ± 0.84 mm and 20.16 ± 0.23 mm, respectively. The results of the TLC-Bioautography test showed that the three test extracts had strong antibacterial activity against *S. aureus* and *E. coli*. In the *n*-hexane extract with *n*-hexane: ethyl acetate (9:1) eluent using Lieberman-Burchard spray reagent, it was suspected that triterpenoid compounds were present. In ethyl acetate extract with *n*-hexane: ethyl acetate (6:4) eluent and ethanol extract with chloroform: methanol (8:2) eluent using FeCl_3 1% spray reagent, it was suspected that the tannin compound was present in both extracts.

Keywords: *Senna siamea* Lam., inhibition, antibacterial, TLC-bioautography.

Abstrak. Tumbuhan Johar termasuk jenis tanaman dari family *fabaceae* yang banyak digunakan dalam pengobatan tradisional seperti obat malaria, gatal dan kencing manis. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak kulit batang Johar dengan perbedaan tingkat kepolaran pelarut terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* serta menentukan golongan senyawa aktif secara KLT-Bioautografi. Ekstraksi senyawa aktif menggunakan metode maserasi bertingkat yang dimulai dari pelarut *n*-heksan (non polar), diikuti dengan pelarut etil asetat (semi polar) dan pelarut etanol (polar). Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode sumur difusi dengan varian konsentrasi 25% dan 50%. Hasil penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa ekstrak *n*-heksan, ekstrak etil asetat dan ekstrak etanol mempunyai aktivitas antibakteri terhadap kedua bakteri uji. Ekstrak etil asetat dan etanol dari kulit batang Johar pada konsentrasi 50% tergolong antibakteri yang sangat kuat dengan diameter zona hambat terhadap bakteri *S. aureus* yaitu masing-masing $22,02 \pm 0,84$ mm dan $20,16 \pm 0,23$ mm. Hasil pengujian KLT-Bioautografi didapatkan bahwa ketiga ekstrak uji memiliki aktivitas antibakteri yang kuat terhadap kedua bakteri uji. Pada ekstrak *n*-heksan dengan eluen *n*-heksan:etil asetat (9:1) menggunakan pereaksi semprot Lieberman-Burchard diduga adanya senyawa terpenoid. Pada ekstrak etil asetat dengan eluen *n*-heksan:etil asetat (6:4) dan ekstrak etanol dengan eluen kloroform: metanol (8:2) menggunakan pereaksi semprot FeCl_3 1% diduga adanya senyawa tanin pada kedua ekstrak tersebut.

Kata kunci: Johar (*Senna siamea* Lam.), daya hambat, antibakteri, KLT-bioautografi

Diterima: 21 Juli 2022, Disetujui: 18 Agustus 2022

Sitasi: Djumidar., Razak, AR., Ridhay, A., Sumarni, NK., Syamsuddin., Jusman., Nurhaeni., dan Rahim, EA. (2022). Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Batang Tumbuhan Johar (*Senna siamea* Lam) pada Berbagai Polaritas Pelarut. *KOVALEN: Jurnal Riset Kimia*, 8(2): 184-195.

✉ Corresponding author

E-mail: arrazak71@gmail.com

<https://doi.org/10.22487/kovalen.2022.v8.i2.15970>



LATAR BELAKANG

Penyakit infeksi termasuk penyakit yang dapat diakibatkan oleh mikroba patogen. *Staphylococcus aureus* termasuk bakteri gram positif yang umumnya menyebabkan bisul, peradangan kulit dan selaput lendir, sedangkan *Escherichia coli* termasuk jenis bakteri gram negatif yang umumnya terdapat dalam saluran pencernaan dan dapat menyebabkan disentri serta diare (Fiari, 2016).

Infeksi dapat diobati menggunakan antibiotik, namun dapat terjadi resistensi antibiotik. Perihal ini menjadi salah satu aspek yang mendesak pemakaian bermacam tumbuhan dalam penyembuhan penyakit infeksi (Yuliana, 2011). Tumbuhan johar (*Senna siamea* Lam) termasuk salah satu tumbuhan yang mempunyai manfaat dalam pengobatan infeksi.

Tumbuhan johar ialah salah satu tipe tumbuhan dari family *fabaceae*. Johar diyakini secara tradisional dapat mengobati penyakit malaria, *febris* dan *diabetes mellitus*. Johar memiliki kandungan senyawa bioaktif, seperti alkaloid, flavonoid, saponin dan tanin (Crisdian & Siwi A, 2021). Kusumaningtyas dan Syah (2015) juga menyebutkan bahwa senyawa pada tanaman johar umumnya beragam, seperti flavonoid, steroid, terpenoid, alkaloid, stilbenoid, fenilpropanoid, poliketida dan senyawa minor lainnya. Metabolit sekunder tersebut berpotensi sebagai senyawa antibakteri (Kusumaningtyas & Syah, 2015). Senyawa metabolit sekunder yang diekstraksi menggunakan pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda dapat mempengaruhi total senyawa metabolit sekunder yang terekstrak (Hidayah dkk., 2016).

Pengujian antibakteri menggunakan ekstrak daun johar dengan kepolaran yang

berbeda telah dilakukan sebelumnya dan dilaporkan bahwa senyawa antibakteri daun johar tersebut bersifat polar dan semi polar (Fitriah dkk., 2017). Pada penelitian tersebut, ekstrak etanol memiliki aktivitas tertinggi terhadap bakteri *S. aureus*, *E. coli*, *Micrococcus luteus*, *Shigella dysenteriae* dengan zona hambat masing-masing 14,9 mm, 12,9 mm, 12 mm, dan 7,2 mm. Ekstrak metanol kayu batang Johar yang mengandung senyawa fenolik juga mampu menghambat pertumbuhan bakteri patogen *B. subtilis* dan *E. coli* dengan nilai KHM dan KBM terhadap *B. subtilis* 125 µg/mL dan terhadap *E. coli* 500 µg/mL yang termasuk dalam golongan aktivitas antibakteri sedang (Kusumaningtyas & Syah, 2015). Berdasarkan penelitian sebelumnya telah dilakukan uji aktivitas antibakteri pada beberapa bagian tumbuhan Johar, tetapi pada kulit batang Johar belum terdapat kajian lebih lanjut mengenai potensinya sebagai sumber senyawa antibakteri.

METODE PENELITIAN

Bahan dan Peralatan

Kulit batang Johar (*Senna siamea* Lam) diambil di daerah Tondo, Kecamatan Mantikulore, Palu, Sulawesi Tengah. Bahan lain yang digunakan seperti biakan bakteri *S. aureus* dan *E. coli*, air destilata, Nutrien Agar (NA), *n*-heksan, etil asetat, etanol, kloroform, metanol, *lactose broth* (LB), *handskun*, DMSO, tisu, spritus, plat KLT, pereaksi Dragendorff, pereaksi Liebermann-Burchard, FeCl₃ 1%, dan AlCl₃.

Alat yang digunakan ialah neraca analitik, *rotary vacuum evaporator*, jangka sorong digital, *autoklaf*, oven, inkubator, jarum ose, shaker, *Laminar Air Flow*, mikropipet, lampu UV₂₅₄ nm dan UV₃₆₆ nm, serta plat KLT.

Prosedur Penelitian

Identifikasi tumbuhan

Identifikasi tumbuhan dilakukan di Sumber Daya Hayati Sulawesi (*Herbarium Celebes*) Universitas Tadulako, Palu, untuk memastikan tumbuhan yang akan digunakan adalah tumbuhan Johar (*Senna siamea* Lam).

Preparasi sampel

Sampel berupa kulit batang johar dikumpulkan kemudian dibersihkan dari sisa kotoran, lalu dipotong kecil-kecil. Setelah itu, dikeringkan di bawah cahaya matahari kemudian dihaluskan dengan blender dan diayak menggunakan ayakan 60 mesh untuk memperoleh serbuk kulit batang johar.

Ekstraksi sampel

Metode yang digunakan yaitu metode maserasi yang terdiri dari 3 pelarut yaitu *n*-heksan, etil asetat dan etanol. Ekstraksi awal digunakan 3 L *n*-heksan untuk mengekstrak serbuk 1000 g kulit batang johar. Campuran disimpan selama 3 x 24 jam dan diaduk ekali setiap hari selama proses maserasi. Selanjutnya hasil maserasi disaring dan residu yang dihasilkan dilakukan remaserasi untuk memaksimalkan hasil ekstraksi. Filtrat dipisahkan dari pelarutnya menggunakan *rotary vacuum evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental *n*-heksan kulit batang johar. Residu dikering-anginkan, kemudian diekstrak kembali dengan pelarut etil asetat dan pelarut etanol (Fitriah, dkk., 2017).

Uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi

Peralatan gelas yang disterilkan terlebih dahulu dalam oven dengan temperatur 175°C dengan waktu ±90-120 menit (pemanasan kering). Sedangkan untuk media atau bahan kultur dengan cara uap air panas bertekanan

tinggi menggunakan *autoklaf* dengan tekanan 2 atm, suhu 121°C selama ± 1 jam. Setelah disterilkan, alat tersebut bisa langsung digunakan atau disimpan dengan kondisi tertutup. Metode yang digunakan yaitu metode sumur difusi. Sebanyak 25 mL media NA dicampur dengan suspensi bakteri 0,2 mL (*S. aureus* dan *E. coli*), dihomogenkan kemudian dituangkan ke dalam cawan petri yang steril, biarkan sampai padat. Selanjutnya, pembuatan sumuran dengan alat pelubang diameter ±9 mm, setiap cawan berisi 3 sumuran. Ekstrak 50 µL diisi pada tiap sumur dan kontrol negatif menggunakan DMSO, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, kemudian zona hambat yang terbentuk diamati dan diukur diameternya (Modifikasi metode Fitriah dkk., 2017 dan Lestari dkk., 2017).

Pemisahan senyawa secara kromatografi lapis tipis (Djide, 2006)

Ekstrak sampel yang menunjukkan zona hambat akan dipisahkan secara KLT menggunakan plat KLT teraktivasi dengan cara dipanaskan dalam oven pada suhu 110°C dengan waktu ±30 menit sebelum digunakan. Sampel ditotolkan pada plat yang berukuran 6 x 1 cm dan dielusi dalam ruang jenuh dengan eluat dari atas plat hingga batas 0,5 cm. Keluarkan plat dari chamber dan angin-anginkan sampai eluat menguap. Selanjutnya, pengamatan dilakukan di bawah sinar UV₂₅₄ nm dan UV₃₆₆ nm, plat yang telah dielusi disemprot dengan penampak bercak. Kemudian hitung nilai *R_f* dan menentukan golongan senyawa (Djide, 2006).

Uji KLT-Bioautografi

Metode ini didasari oleh difusi dari senyawa yang telah dipisahkan secara kromatografi lapis tipis. Media NA steril 20 mL dan suspensi bakteri 0,2 mL dicampur

kemudian dituangkan ke dalam cawan petri yang telah steril, biarkan hingga padat. Selanjutnya, plat KLT yang telah terelusi diletakkan di atas permukaan media agar. Plat tersebut akan diangkat dan dipindahkan setelah ± 30 menit. Lalu media yang telah ditempel dengan plat KLT tadi selanjutnya akan diinkubasi pada suhu 37°C hingga 24 jam, mengamati zona hambat yang terbentuk (Djide, 2006).

Identifikasi senyawa

Reagen FeCl_3 1% untuk deteksi senyawa tanin, dengan uji positif memberikan warna hitam. Pereaksi AlCl_3 untuk deteksi senyawa flavonoid dengan uji positif munculnya warna kuning. Pereaksi Dragendorff untuk deteksi senyawa alkaloid, dengan uji positif munculnya warna coklat atau jingga. Pereaksi Lieberman-Burchard untuk deteksi senyawa Steroid dan triterpenoid, dengan uji positif munculnya warna hijau-biru untuk steroid dan munculnya warna merah, coklat atau ungu untuk triterpenoid (Harborne, 1987).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekstrak Tumbuhan Johar

Hasil identifikasi di Sumber Daya Hayati Sulawesi (*Herbarium Celebes*) Universitas Tadulako menunjukkan bahwa tumbuhan yang digunakan pada penelitian ini ialah benar tumbuhan johar (*Senna siamea* Lam). Ekstraksi kulit batang johar menggunakan metode maserasi sebanyak tiga kali serta dievaporasi untuk mendapatkan ekstrak kentalnya.

Sampel kulit batang johar yang dikeringkan bertujuan agar reaksi enzimatik terhenti, sehingga tidak terjadi penguraian maupun perubahan kandungan kimia dan sampel dibuat dalam bentuk serbuk untuk

memperluas permukaan sampel sehingga memudahkan kontak dengan pelarutnya.

Proses ekstraksi dengan metode maserasi dengan cara mengekstraksi kulit batang johar menggunakan pelarut *n*-heksan, etil asetat dan etanol. Dipilihnya metode ini karena pengerjaannya yang lebih mudah seret alat yang digunakan juga cukup sederhana. Ekstrak kental *n*-heksan, etil asetat dan etanol yang dihasilkan masing-masing sebanyak 11,552; 67,124 dan 80,583 gram dengan rendemen masing-masing 1,16%; 6,71% dan 8,06% (Tabel 1).

Tabel 1. Rendemen ekstrak kulit batang johar

Sampel	Pelarut	Berat Ekstrak Kental (g)	Rendemen (%)
Kulit Batang Johar (1000 gram)	<i>n</i> -heksan	11,552	1,16
	Etil Asetat	67,124	6,71
	Etanol	80,583	8,06

Hasil dari rendemen yang diperoleh menunjukkan bahwa kulit batang johar lebih banyak terdapat senyawa yang bersifat polar karena hasil rendemen yang dihasilkan oleh etanol cukup besar. Pelarut yang sifatnya polar sangat mampu mengekstrak senyawa organik, seperti air dan etanol mampu mengekstrak senyawa polifenol, misalnya tanin (Iriany dkk., 2017).

Tiwari et al. (2011) menjelaskan bahwa salah satu keefektifan etanol ialah dapat mendegradasi dinding sel sehingga menyebabkan polifenol yang tersari sangat melimpah. Selama ekstraksi, pelarut akan masuk ke dalam sel tumbuhan dan akan menarik senyawa yang sesuai dengan polaritasnya. Pada proses maserasi, perendaman sampel tumbuhan terjadi karena

kontak yang lama dengan sampel dan pelarut. Pelarut organik didistribusikan secara berkesinambungan dalam sel tumbuhan, yang menciptakan adanya perbedaan antara tekanan di dalam maupun di luar sel, yang menyebabkan pemecahan dinding sel, membran sel dan metabolit sekunder yang terdapat dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik serta perendaman yang

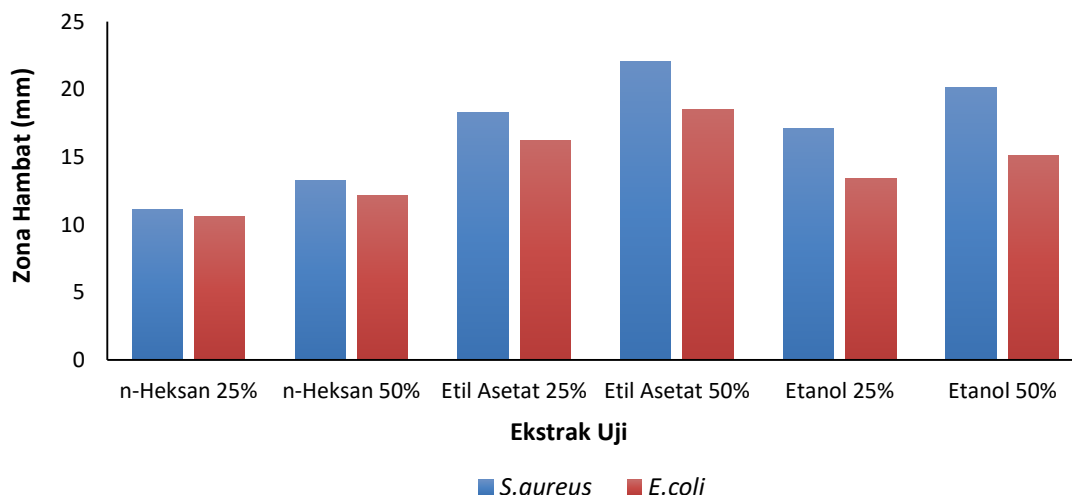
dilakukan dengan lama membuat ekstraksi senyawa berlangsung sempurna (Latifah, 2015).

Aktivitas Antibakteri

Hasil pengukuran zona hambat bakteri pada masing-masing ekstrak kulit batang johar terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli* terlihat pada Tabel 2 dan Gambar 1.

Tabel 2. Aktivitas antibakteri ekstrak kulit batang johar terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli*

Perlakuan	Konsentrasi (%)	Loading Dose (mg)	Rata-rata Diameter Zona Hambat (mm±SD)	
			<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Ekstrak <i>n</i> -Heksan	25	12,5	11,11±0,16	10,62±0,09
	50	25	13,29±0,27	12,16±0,06
Ekstrak Etil Asetat	25	12,5	18,25±0,15	16,20±0,20
	50	25	22,02±0,84	18,53±0,43
Ekstrak Etanol	25	12,5	17,08±0,17	13,40±0,16
	50	25	20,16±0,23	15,10±0,17
Kontrol negatif (DMSO)	0	0	0	0



Gambar 1. Diameter zona hambat bakteri *S. aureus* dan *E. coli* menggunakan ekstrak kulit batang johar

Tabel 2 dan Gambar 1 memperlihatkan bahwa ekstrak *n*-heksan, etil asetat dan etanol mempunyai aktivitas antibakteri pada kedua bakteri uji yakni *S. aureus* yang mewakili bakteri gram positif dan *E. coli* mewakili bakteri gram negatif. Diameter zona hambat bakteri

yang terbentuk dari ekstrak *n*-heksan pada konsentrasi 25% dan 50% terhadap bakteri *S. aureus* yaitu masing-masing 11,11 mm dan 13,29 mm, sedangkan terhadap bakteri *E. coli* masing-masing 10,26 mm dan 12,16 mm.

Diameter zona hambat yang dihasilkan pada ekstrak etil asetat pada konsentrasi 25% dan 50% terhadap bakteri *S. aureus* masing-masing 18,25 mm dan 22,02 mm, sedangkan terhadap bakteri *E. coli* masing-masing 16,20 mm dan 18,53 mm. Ekstrak etanol pada konsentrasi 25% dan 50% menghasilkan zona hambat terhadap bakteri *S. aureus* masing-masing 17,08 mm dan 20,16 mm, sedangkan terhadap bakteri *E. coli* masing-masing 13,40 mm dan 15,10 mm. Hasil yang diperoleh terhadap ketiga ekstrak tersebut pada kedua bakteri uji menunjukkan bahwa dengan konsentrasi yang besar maka zona hambat yang dihasilkan besar pula. Menurut Fiari (2016), menyatakan besarnya diameter zona hambat yang dihasilkan berbanding lurus dengan konsentrasi bahan yang diberikan (Fiari, 2016). Faktor yang menyebabkan besarnya daya hambat diantaranya yakni tingkatan sensitifitas bakteri uji, kecepatan berdifusi dan konsentrasi dari senyawa antibakterinya (Prescott, 2005).

Gambar 1 menunjukkan bahwa bakteri gram positif *S. aureus* mempunyai zona hambat yang lebih besar dibandingkan bakteri gram negatif *E. coli* terhadap ketiga ekstrak uji. Bakteri gram negatif memiliki struktur dinding sel yang tersusun dari lipoprotein, peptidoglikan dan lipopolisakarida atau lebih kompleks daripada gram positif sehingga lebih sulit dilewati oleh senyawa antibakteri (Pelczar, 1986 dalam Lestari dkk., 2016).

Pelarut DMSO sebagai kontrol negatif, untuk melarutkan ketiga jenis ekstrak, hasilnya tidak adanya zona hambat yang dihasilkan pada kedua bakteri uji. DMSO termasuk jenis senyawa organosulfur yang dapat larut dalam senyawa polar, non polar, dan bermacam pelarut organik (Pratiwi, 2008). Hasil yang

diperoleh pada DMSO menjadi bukti bahwa aktivitas antibakteri tidak dipengaruhi oleh pelarutnya, melainkan disebabkan oleh aktivitas senyawa aktif ekstrak kulit batang johar).

Menurut Davis dan Stout (1971), kemampuan antibakteri suatu ekstrak dapat dilihat dari seberapa kuatnya daya hambat yang diperoleh. Terdapat empat kategori kekuatan antibakteri diantaranya kategori sangat kuat, kuat sedang dan lemah. Kategori sangat kuat jika zona hambat yang dihasilkan > 20 mm. Kategori kuat jika zona hambatnya sekitar 10 mm – 20 mm. Kategori sedang jika zona hambat yang diperoleh sekitar 5 mm- 10 mm dan kategori lemah jika zona hambat yang diperoleh < 5 mm. Berdasarkan kategori kekuatan antibakteri tersebut, maka dapat dilihat bahwa ekstrak etil asetat pada konsentrasi 50% terhadap bakteri *S. aureus* tergolong kategori sangat kuat, sedangkan pada ekstrak etil asetat dengan konsentrasi 25 % terhadap bakteri *E. coli* tergolong kategori kuat. Begitu pun, pada ekstrak etanol dan ekstrak *n*-heksan tergolong kategori kuat untuk kedua bakteri uji.

Fitriah dkk. (2017) melaporkan bahwa ekstrak daun johar memiliki aktivitas antibakteri kuat pada ekstrak etil asetat dan etanol terhadap *S. aureus* dan *E. coli*, sedangkan Kusumaningtyas dan Syah (2015) melaporkan bahwa aktivitas antibakteri ekstrak methanol kayu batang johar tergolong sedang. Crisdian dan Siwi A (2021) juga mendapatkan bahwa pada konsentrasi ekstrak etanol daun johar yang tinggi akan menghasilkan aktivitas antibakter yang tinggi pula.

Hasil uji statistik menunjukkan nilai zona hambat terhadap kedua bakteri uji dari ekstrak kulit batang johar memperoleh nilai signifikan

0,000 < α (0,05), maka diteruskan dengan uji Duncan dengan hasil adanya perbedaan nyata terhadap nilai zona hambatan yang diperoleh dari setiap perlakuan ekstrak kulit batang johar.

Hasil Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

KLT yakni metode pemisahan senyawa fitokimia yang didasari atas perbedaan

kecepatan dari komponen campuran fase diam dan fase gerak, dimana fase diam berupa ekstrak yang ditotolkan pada lempeng KLT dan fase geraknya berupa eluen yang diisi dalam bejana tertutup. Pengerjaan dari metodenya mudah serta biayanya sedikit jika dibandingkan dengan kromatografi kolom. Hasil dari uji KLT terlihat pada Tabel 3, 4, dan 5.

Tabel 3. Hasil uji KLT ekstrak *n*-heksan

Eluen	No. Noda	Nilai RF (cm)	Warna Noda						Golongan Senyawa
			UV ₂₅₄ nm	UV ₃₆₆ nm	FeCl ₃ 1%	AlCl ₃	Drage ndorff	Lieberman-Burchard	
<i>n</i> -heksan : Etil Asetat (9:1)	1	0,08	Hitam	Merah Coklat	Kuning Kecoklatan	Kuning kecoklatan	Hijau	Merah kecoklatan	Triterpenoid
	2	0,13	Hitam	Merah Coklat	Hijau tua	Kuning kecoklatan	Hijau	-	-
	3	0,21	Hitam	Merah	Hijau tua	Kuning kecoklatan	Hijau	-	-
	4	0,26	Hitam	Ungu	-	-	-	-	-
	5	0,35	-	Biru Terang	-	-	-	-	-
	6	0,50	Hitam	Merah Muda	-	-	-	-	-
	7	0,66	Hitam	-	Merah	-	-	Merah kecoklatan	Triterpenoid
	8	0,70	Hitam	Kuning	-	Jingga Kemerahan	-	-	-
	9	0,75	Hitam	Ungu	-	-	-	-	-
	10	0,83	Hitam	-	-	Kuning muda	-	-	Flavonoid
	11	0,90	Hitam	-	-	-	-	-	-

Tabel 4. Hasil uji KLT ekstrak etil asetat

Eluen	No. Noda	Nilai RF (cm)	Warna Noda						Golongan Senyawa
			UV ₂₅₄ nm	UV ₃₆₆ nm	FeCl ₃ 1%	AlCl ₃	Dragen dorff	Lieberman-Burchard	
<i>n</i> -heksan : Etil Asetat (6:4)	1	0,12	Hitam	Putih	Hitam	-	-	-	Tanin
	2	0,33	Hitam	-	-	-	Coklat	-	Alkaloid
	3	0,45	Hitam	-	Hitam	-	-	-	Tanin
	4	0,57	Hitam	Biru	-	-	-	-	-
	5	0,68	-	-	-	-	-	-	-
	6	0,75	Hitam	-	-	Kuning muda	-	-	Flavonoid
	7	0,80	-	-	-	Hijau	-	Kuning	-
	8	0,85	-	Merah	-	Jingga kemerahan	Hijau	Hijau	Steroid
	9	0,90	Hitam	Merah Coklat	-	-	-	-	-

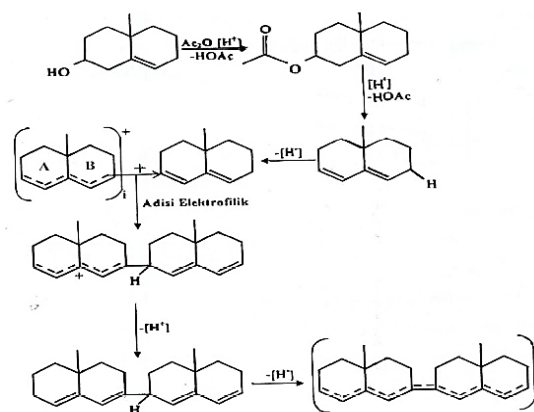
Tabel 5. Hasil uji KLT ekstrak etanol

Eluen	No. Noda	Nilai RF (cm)	Warna Noda						Golongan Senyawa
			UV ₂₅₄ nm	UV ₃₆₆ nm	FeCl ₃ 1%	AlCl ₃	Dragendorff	Lieberman-Burchard	
Kloroform : Metanol (8:2)	1	0,13	Biru	Biru	-	-	-	Hitam	-
	2	0,32	Biru	Biru	-	-	Orange	-	Alkaloid
	3	0,58	Hitam	Biru	-	-	-	-	-
	4	0,73	-	-	-	Abu-abu	-	-	-
	5	0,76	Biru	Biru	-	-	-	-	-
	6	0,88	-	-	-	Orange kecoklatan	-	-	-
	7	0,92	Hitam	Merah biru	Hitam	-	-	-	Tanin

Bahan alam biasanya mengandung senyawa yang tidak berwarna, sehingga untuk mengubah senyawa tersebut menjadi berwarna, lempeng yang telah dielusi disemprotkan dengan larutan pereaksi warna. Hasil KLT dari ekstrak *n*-heksan, etil asetat dan etanol kulit batang johar yang telah dielusi disemprot dengan pereaksi FeCl₃ 1%, AlCl₃, Dragendorff dan Lieberman-Burchard.

Hasil identifikasi senyawa pada ekstrak *n*-heksan dengan perbandingan eluen *n*-heksan-etil asetat (9:1) diperoleh senyawa berupa triterpenoid (Rf₁ = 0,08); (Rf₇ = 0,66) yang ditandai dengan munculnya warna merah kecoklatan saat disemprot dengan pereaksi Lieberman-Burchard dan flavonoid (Rf₁₀=0,83) ditandai dengan munculnya warna kuning saat disemprot dengan pereaksi AlCl₃. Identifikasi senyawa pada ekstrak etil asetat dengan perbandingan eluen *n*-heksan-etil asetat (6:4) diperoleh senyawa tanin (Rf₁=0,12); (Rf₃=0,45) dengan adanya noda bewarna hitam yang menandakan senyawa tanin saat disemprotkan dengan FeCl₃ 1%, alkaloid (Rf₂ = 0,33) munculnya warna coklat saat disemprot dengan pereaksi Dragendorff dan flavonoid (Rf₆ = 0,75) ditandai dengan muncul warna kuning saat disemprot dengan pereaksi AlCl₃, steroid (Rf₈ = 0,85) adanya noda warna hijau

dengan reagen Lieberman-Burchard, sedangkan identifikasi senyawa pada ekstrak etanol diperoleh senyawa alkaloid (Rf₂ = 0,32) timbulnya warna orange saat disemprot dengan Dragendorff dan tanin (Rf₇ = 0,92) adanya warna hitam dengan pereaksi FeCl₃ 1%. Hal ini sesuai dengan penelitian Mohammed *et al.* (2013) yang mendapatkan bahwa hasil uji kualitatif ekstrak kulit batang Johar mengandung senyawa flavonoid, tannin, polifenol, antraquinon, saponin, dan glikosida.

**Gambar 2.** Reaksi triterpenoid dan reagen Lieberman-Burchard (Siadi, 2012).

Uji positif reagen Liebermann-Burchard dengan senyawa terpenoid akan memberikan warna merah, ungu, atau coklat. Anhidrida asetat akan menyebabkan asetilasi gugus hidrogen, setelah itu, gugus hidrogen dan elektronnya dilepaskan, hingga beresonansi dan

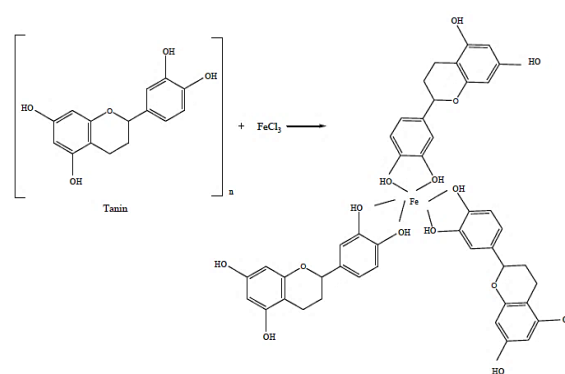
bertindak sebagai elektrofil atau karbokation. Penyerangan terhadap karbokation akan mengakibatkan adisi elektrofil dan lepasnya hidrogen (Gambar 2). Gugus hidrogen dan elektron kemudian dilepaskan, menyebabkan senyawa mengalami pemanjangan konjugasi, memberikan warna merah, ungu atau coklat. (Siadi, 2012).

Uji positif steroid dengan reagen Lieberman–Burchard memberikan warna hijau-biru. Hadirnya molekul air hadir dalam larutan menyebabkan anhidrida asetat diubah menjadi asam asetat. Senyawa steroid bereaksi dari warna biru-hijau melalui dehidrasi dengan penambahan asam kuat membentuk garam (Muklisoh, 2010). Reaksi oksidasi gugus steroid lewat pembentukan ikatan rangkap terkonjugasi menjadi penyebab berubahnya warna (Sriwahyuni, 2010).

Uji senyawa flavonoid dikatakan positif jika adanya perubahan warna merah, kuning, atau orange terhadap lapisan amil alkohol (Harbone, 1987). Kegunaan pereaksi $AlCl_3$ ialah agar terbentuk kompleks antara gugus hidroksil dan keton yang berdekatan atau dengan gugus hidroksil yang saling berdekatan. Terbentuknya senyawa yang kompleks stabil berwarna kuning terjadi karena adanya reaksi antara $AlCl_3$ dengan gugus keton pada C4 dan gugus OH pada C3 atau C5 terhadap senyawa flavon atau flavonol (Sari, 2017).

Uji positif alkaloid jika muncul warna coklat muda-kuning (jingga). Endapan yang dimaksud ialah kalium alkaloid. Dalam pembuatan reagen dragendorff, bismut nitrat dilarutkan dalam HCl, sehingga terbentuk ion bismut (BiO^+), karena garam bismut mudah terhidrolisis. Sehingga tidak terjadi reaksi hidrolisis. Kesetimbangan bergeser ke kiri dengan menambahkan asam ke larutan untuk menjaga ion Bi^{3+} dalam

larutan. Selain itu, terbentuknya endapan hitam bismuth (III) iodida karena adanya reaksi yang terjadi antara ion Bi^{3+} dari bismut nitrat dengan kalium iodida, dan akan terbentuk kalium bismuth tetraiodobismutat karena dilarutkan dalam kalium iodida yang berlebih. Dalam pengujian alkaloid, nitrogen berfungsi untuk membuat ikatan kovalen terkoordinasi dengan ion logam, K^+ (Svehla, 1985).



Gambar 3. Reaksi tanin dengan $FeCl_3$ (Sa'adah, 2010)

Uji positif tanin jika muncul warna hitam atau biru tinta. Terbentuknya warna tersebut, disebabkan oleh tanin yang akan membentuk senyawa kompleks dengan ion Fe^{3+} . Karena ion Fe^{3+} hadir sebagai atom pusat, maka terbentuk kompleks antara tanin dan $FeCl_3$, serta tanin mempunyai atom O dengan PEB (pasangan elektron bebas) yang dapat berkoordinasi dengan atom pusat sebagai ligan (Gambar 3). Pada reaksi tersebut, ion Fe^{3+} memiliki 6 PEB yang berkoordinasi dengan atom pusat melalui ikatan dengan 2 atom donor, yaitu 3 tanin dengan atom O pada posisi dihidroksi 4' dan 5'. Pada posisi tersebut atom O mempunyai energi yang sangat rendah saat membentuk senyawa kompleks, oleh karenanya disebut ligan (Sa'adah, 2010).

Hasil Uji KLT-Bioautografi

Bioautografi yaitu metode untuk mendeteksi adanya senyawa aktif yang mempunyai aktivitas antibakteri pada suatu

kromatogram hasil KLT. Pengujiannya menggunakan plat KLT yang diberi batas elusi atas dan bawah dengan jarak sepanjang 6 cm. Pemisahan senyawa ekstrak kulit batang Johar menggunakan berbagai perbandingan eluen. Pada ekstrak *n*-heksan menggunakan perbandingan eluen *n*-heksan: etil asetat (9:1). Pada ekstrak etil asetat menggunakan perbandingan eluen *n*-heksan: etil asetat (6:4), sedangkan pada ekstrak etanol menggunakan perbandingan eluen kloroform: metanol (8:2). Pemilihan eluen berdasarkan hasil skrining,

dimana eluen tersebut menghasilkan pemisahan terbaik. Metode yang digunakan yaitu bioautografi kontak, pemilihan metode ini karena pengerjaannya cukup sederhana dan hasil yang diperoleh juga terlihat dengan baik dan jelas (Djide, 2006).

Nilai *Rf* (*Retardation factor*) pada KLT merupakan kecepatan rambat suatu senyawa yang diperoleh dari jarak tempuh senyawa dari titik awal dan jarak tempuh fase gerak dari titik awal. Nilai *Rf* digunakan buat mengidentifikasi senyawa yang akan diuji (Rohman, 2007).

Tabel 6. Hasil uji KLT-Bioautografi

Ekstrak	Eluen	Nilai <i>Rf</i> (cm)	Bakteri		Golongan senyawa	Kekuatan Antibakteri
			<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>		
<i>n</i> -heksan	<i>n</i> -heksan : Etil Asetat (9 : 1)	0,08	+	+	Triterpenoid	Kuat
Etil Asetat	<i>n</i> -heksan : Etil Asetat (6 : 4)	0,12	+	+	Tanin	Kuat
Etanol	Kloroform : Metanol (8 : 2)	0,92	+	+	Tanin	Kuat

Pada Tabel 6 terlihat hasil KLT-Bioautografi ekstrak *n*-heksan, ekstrak etil asetat dan ekstrak etanol kulit batang johar menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap kedua bakteri uji yang dilokalisir pada kromatogram dengan adanya zona jernih dipermukaan media agar. Pada ekstrak *n*-heksan, ekstrak etil asetat dan ekstrak etanol menunjukkan adanya zona bening dengan nilai *Rf* berurutan yakni 0,08 cm; 0,12 cm; 0,92 cm. Untuk mengetahui golongan senyawa yang mempunyai aktivitas tersebut, maka dilakukan identifikasi senyawa.

Hasil identifikasi senyawa pada ekstrak *n*-heksan, diduga terdapat senyawa triterpenoid yang ditandai dengan munculnya warna merah kecoklatan. Senyawa triterpenoid berperan sebagai antibakteri karena interaksi porin dengan membran luar dinding sel bakteri dapat

membentuk ikatan polimer yang kuat yang berdampak pada jalur penyerapan nutrisi bakteri terhambat sehingga mengakibatkan matinya bakteri tersebut (Latief dkk., 2022).

Ekstrak etil asetat dan ekstrak etanol diduga terdapat senyawa tanin yang ditandai dengan munculnya warna hitam setelah disemprotkan dengan pereaksi FeCl_3 1% yang menandakan tanin akan membentuk kompleks dengan ion Fe^{3+} . Tanin berfungsi sebagai antibakteri karena merusak sintesis peptidoglikan yang mengakibatkan dinding sel bakteri yang terbentuk kurang sempurna dan menyebabkan sel bakteri mati (Naim, 2004).

KESIMPULAN

Ekstrak *n*-heksan, etil asetat dan etanol kulit batang johar mampu menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* dan *E. coli*.

Ekstrak etil asetat dan ekstrak etanol pada konsentrasi 50% memiliki aktivitas antibakteri yang sangat kuat terhadap *S. aureus*, sedangkan ekstrak *n*-heksan, etil asetat dan etanol terhadap *E. coli* tergolong antibakteri kuat. Golongan senyawa yang menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* dan *E. coli* adalah golongan senyawa triterpenoid dan tanin.

DAFTAR PUSTAKA

- Crisdian, HA., Siwi A, K. (2021). Aktivitas Antibakteri Kombinasi Ekstrak Etanol Daun Johar (*Cassia siamea* Lamk.) dan Daun Alpukat (*Persea americana* Mill.) terhadap *Salmonella typhi*. *Jurnal Farmasi Indonesia*, 18(2): 133-140.
- Davis and Stout. (1971). Disc Plate Methode of Microbiological Antibiotic Essay. *Journal of Microbiology*. 22(4).
- Fiari, HZP. (2016). Uji Aktivitas Antibakteri Sediaan Gel Ekstrak Etanol Gulma Siam *Chromolaena odorata* L. King dan *H.E Robins*. [Skripsi]. Universitas Sumatra Utara, Medan.
- Fitriah, F., Mappiratu, M., Prosmawiryanti, P. (2017). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Tanaman Johar (*Cassia siamea* Lamk.) Dari Beberapa Tingkat Kepolaran Pelarut. *Kovalen: Jurnal Riset Kimia*, 3(3): 242-251.
- Harborne, J. B. (1987). *Metode Fitokimia*. Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan. Penerjemah: Kosasih P, Soerdiro Iwang. ITB. Bandung.
- Hidayah, N., Hisan, AK., Solikin, A., Irawati., Mustikaningtyas, D. (2016). Uji Efektivitas Ekstrak *Sargassum muticum* Sebagai Alternatif Obat Bisul Akibat Aktivitas *Staphylococcus aureus*. *Journal of Creativity Students*, 1(1): 1-9.
- Iriany., Pandiangan, F., Eka P, C. (2017). Ekstraksi Tanin Dari Kulit Kayu Akasia Dengan Menggunakan Microwave: Pengaruh Daya Microwave, Waktu Ekstraksi Dan Jenis Pelarut. *Jurnal Teknik Kimia USU*, 6(3): 52-57.
- Kusumaningtyas, V A., dan Syah, Y M. (2015). Aktivitas Antibakteri Ekstrak Metanol Kayu Batang Johar (*Cassia grandis*). *Prosiding SNIJA 2015*. LPPM Unjani, Cimahi.
- Latief, M., Meriyanti., Fadhilah N., Tarigan, IL., Ayu, AN., Maharani, R., Aulia, E., Siregar, D. (2022). Isolasi Senyawa Triterpenoid Ekstrak Etanol Daun Jeruju (*Achantus ilicifolius*) dan Aktivitas Antibakterinya Terhadap *S. aureus* dan *E. coli*. *Jurnal Kimia (Journal of Chemistry)*, 16 (1): 34-44.
- Latifah. (2015). *Identifikasi Golongan Senyawa Flavonoid dan Uji Aktivitas antioksidan Pada Ekstrak Rimpang Kencur Kaemferia galangal L. Dengan Metode DPPH*. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim, Malang.
- Lestari, Y., Ardiningsih, P., Nurlina. (2016). Aktivitas Antibakteri Gram Positif Dan Negatif Dari Ekstrak Dan Fraksi Daun Nipah (*Nypa fruticans* Wurmb.) Asal Pesisir Sungai Kakap Kalimantan Barat. *JKK*, 5(4): 1-8.
- Mohammed, A., Liman, M. L., and Atiku, M. K. (2013). Chemical composition of the methanolic leaf and stem bark extracts of *Senna siamea* Lam. *J. Pharmacognosy Phytother.*, 5(5): 98-100.
- Naim, R. (2004). *Senyawa Antimikroba dari Tumbuhan*. Fakultas Kedokteran Hewan dan Sekolah Pascasarjana IPB. Bogor.
- Pratiwi, S.T. (2008). *Mikrobiologi Farmasi*. Erlangga. Jakarta.
- Prescott, LM. 2005. *Microbiology*. Mc. Grow-Hill. New York.
- Rohman, Abdul. (2007). *Kimia Farmasi Analisis*. Pustaka Pelajar. Yogyakarta.
- Sa'adah, L. (2010). Isolasi dan Identifikasi Senyawa Tanin dari Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.). [Skripsi]. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim. Malang.
- Sari, K.A. (2017). *Penetapan Kadar Fenolik Total dan Flavonoid Total Ekstrak Beras Hitam (Oryza sativa L)*. *Jurnal Ilmiah Ibnu Sina*, 2(2): 327-335.
- Siadi, K. (2012). Ekstrak Bungkil Biji Jarak Pagar (*Jatropha curcas*) Sebagai Biopeptisida yang Efektif dengan Penambahan Larutan NaCl. *Jurnal MIPA*, 35(1): 77-83.
- Sriwahyuni, I. (2010). *Uji Fitokimia Ekstrak Tanaman Anting-anting (Acalypha indica Linn) dengan Variasi pelarut dan Uji Toksisitas Menggunakan Brine Shrimp (Artemia salina Leach)*. [Skripsi]. UIN Maulana Malik Ibrahim. Malang.

- Svehla, G. (1985). *Analisis Anorganik Kualitatif Makro dan Semimikro*. Edisi Kelima, Bagian I. Kalman Media Pusaka. Jakarta.
- Tiwari, Kumar, Kaur Mandeep, Kaur Gurpreet dan Kaur Harleem. (2011). Phytochemical Screening and Extraction: A Review. *Internationale Pharmaceutica Scienca*, 1(1).
- Yuliana, A. (2011). Uji Aktivitas Antimikroba Infusum Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L) Dengan Metode Difusi Agar. *Jurnal Ilmu-ilmu Keperawatan Analis Kesehatan dan Farmasi*, 7(1): 15-25