

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETIL
ASETAT DAUN BINAHONG (*Anredera scandens* (L.)
Moq.) TERHADAP *Shigella flexneri* BESERTA PROFIL
KROMATOGRAFI LAPIS TIPIS**

**ANTIBACTERIAL ACTIVITY TEST OF ETHYL
ACETATE EXTRACT OF BINAHONG LEAF (*Anredera
scandens* (L.) Moq.) AGAINST *Shigella flexneri* WITH
THE PROFILE OF THIN LAYER
CHROMATOGRAPHY**

Lilies Kusuma Wardhani, Nanik Sulistyani
Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta

Abstrak

*Antibakteri adalah senyawa yang dapat digunakan untuk pengobatan infeksi yang disebabkan oleh bakteri. Secara tradisional tanaman Binahong (*Anredera scandens* (L.) Moq.) dikenal oleh masyarakat untuk mengobati berbagai macam penyakit, di antaranya adalah penyakit infeksi. Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat daun Binahong dan Kadar Bunuh Minimum (KBM) terhadap *Shigella flexneri*, serta untuk mengetahui kandungan kimia yang terdapat dalam ekstrak etil asetat daun Binahong (*Anredera scandens*(L.) Moq.). Serbuk daun Binahong diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etil asetat. Uji antibakteri dilakukan dengan metode dilusi cair dengan berbagai konsentrasi ekstrak (8,5%, 8%, 7,5%, 7%, 6,5%, 6%, 5,5%, dan 5% ^{b/v}) untuk menentukan KBM. Uji kromatografi lapis tipis dilakukan untuk mengetahui golongan senyawa yang terdapat dalam ekstrak etil asetat daun Binahong. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa KBM ekstrak etil asetat daun Binahong terhadap *Shigella flexneri* adalah 8 % ^{b/v}. Hasil uji skrining fitokimia dengan uji tabung dan kromatografi lapis tipis menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat daun Binahong mengandung polifenol, dan saponin.*

Kunci : *Ekstrak etil asetat daun Binahong (*Anredera scandens*(L.) Moq.).*

Abstract

Antibacterial compounds that can be used for the treatment of infections caused by bacteria. Traditionally, Anredera scandens is one of plant used as traditional medicine. The aims of this research are to find out the antibacterial activity of ethyl acetate extract of Anredera scandens leaf and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) against Shigella flexneri and to identify the chemical substances of the ethyl acetate extract found in Anredera scandens. The Anredera scandens leaf was extracted by use of maseration method using ethyl acetate as solvent. The antibacterial assay was done using liquid dilution method with varied concentration of Anredera scandens (8,5%, 8%, 7,5%, 7%, 6,5%, 6%, 5,5%, dan 5%^{w/v}) to determine MBC. Chromatography test was done to identify the chemical substances of Anredera scandens extract. The result of this research showed that the MBC of Anredera scandens leaf extract was 8%^{w/v}. The result of the phytochemical screening with tube test and thin layer chromatogram showed that the extract of Anredera scandens leaf contained, polyphenols, and saponin.

Key Word : *Anredera scandens (L.) Moq. leaf extract, Antibacterial, Shigella flexneri, Thin Layer Chromatography.*

PENDAHULUAN

Shigellosis adalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh berbagai spesies Shigella. Orang yang terinfeksi Shigella akan mengalami peradangan usus, diare, demam dan bahkan kram perut. Diare yang muncul sering bercampur darah. Banyak Shigella mengalami resisten terhadap antibiotik antara lain disebabkan oleh penggunaan antibiotik yang tidak tepat (Todarr, 2009). Oleh karena itu perlu dikembangkan senyawa anti bakteri yang poten terhadap Shigella.

Salah satu alternatif sumber pengembangan obat adalah tanaman obat. Penggunaan tanaman obat sebagai obat tradisional dipercaya cukup efektif dan aman karena jarang menimbulkan efek samping dan harganya relatif lebih

murah. Indonesia merupakan sebuah negara dengan sumber daya alam yang melimpah. Indonesia memiliki keanekaragaman tanaman yang berkhasiat sebagai obat, salah satunya adalah binahong (*Anredera scandens* (L.) Moq.). Seluruh bagian tanaman menjalar ini berkhasiat mulai dari akar, batang dan daunnya. Secara empiris, tanaman binahong memiliki beberapa khasiat di antaranya, mempercepat pemulihan kesehatan setelah operasi, melahirkan, khitan, segala luka-luka dalam, dan radang usus (Jaerony, 2008).

Tanaman Binahong diketahui mengandung saponin triterpenoid, flavonoid dan minyak atsiri (Rachmawati, 2008). Ekstrak etil asetat dari batang binahong mengandung polifenol, flavonoid, dan saponin

(Yuliasuti, 2011). Adapun ekstrak etanol 70% daun binahong diketahui mengandung polifenol, flavonoid, tanin, saponin, dan alkaloid (Andreani, 2011), sedangkan ekstrak etanol 70% batang binahong mengandung polifenol, flavonoid, dan saponin (Kumalasari, 2011). Golongan senyawa-senyawa tersebut merupakan senyawa bioaktif dalam tanaman, sehingga diduga juga berpotensi sebagai antibakteri. Oleh karena itu penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas ekstrak etil asetat daun Binahong terhadap *Shigella flexneri* sebagai upaya pencarian alternatif baru anti Shigellosis.

METODE PENELITIAN

Bahan

Bahan utama yang digunakan adalah daun Binahong (*Anredera scandens* (L.) Moq.) yang diperoleh dari Merapi Farma, Jalan Kaliurang Km 21,5 Hargobinangun, Pakem, Sleman. Serbuk kering daun binahong dimaserasi dengan penyari etil asetat. Bahan uji aktivitas antibakteri adalah *Shigella flexneri*, media BHI (Brain Heart Infusion), media BHI DS (Brain Heart Infusion Double Strength), media Mc Conkey, Standard Mc Farland 10^8 CFU/ml. Bahan uji kromatografi adalah Silika Gel 60F₂₅₄, kloroform : metanol (9 : 1), Sinar UV₂₅₄ nm, UV₃₆₆ nm, dan visibel, Pereaksi semprot uap amonia, Pereaksi semprot FeCl₃.

Alat

Alat ekstraksi meliputi alat-alat gelas, timbangan analitik, corong Buchner dan labu hisap, kertas saring,

oven, cawan porselen. Alat uji daya antibakteri meliputi ose steril, mikropipet, propipet, tabung reaksi, rak, pipet ukur, cawan petri, *yellow tip*, *blue tip*, inkubator, *autoclave*, lampu spiritus. Alat kromatografi meliputi lempeng Silika Gel 60 F₂₅₄, seperangkat alat gelas, bejana pengembang, pipa kapiler, lampu UV, seperangkat alat penyemprot dan timbangan analitik.

Jalannya Penelitian

Pembuatan Ekstrak Etil Asetat Daun Binahong

Herba kering daun Binahong diblender sehingga menjadi serbuk kemudian dilakukan pengujian kadar air serbuk daun binahong hingga diperoleh kadar air di bawah 5%. Serbuk yang didapat ditimbang sebanyak 500 gram, lalu ditambah 2,5 L etil asetat dimixer selama 3 jam dengan kecepatan 400 rpm kemudian dimaserasi (direndam) selama 24 jam pada suhu kamar. Penyarian dilakukan sampai zat aktif yang terkandung dalam daun binahong tersari, penyarian dilakukan lagi sebanyak 1x dengan pelarut 1,5 L. Maserat yang didapat disaring dengan menggunakan corong Buchner hingga diperoleh maserat I-II, kemudian filtrat digabung menjadi satu lalu diuapkan di udara terbuka sehingga diperoleh ekstrak kental.

Skrining Fitokimia Dengan Uji Tabung

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui senyawa-senyawa yang terdapat dalam ekstrak etil asetat daun binahong. Uji ini dilakukan dengan metode tabung yang meliputi :

a. Uji Pendahuluan

Uji ini dilakukan untuk mengetahui gambaran umum tentang kandungan kimia yang terdapat dalam daun binahong, yaitu untuk mengetahui ada tidaknya gugus kromofor pada senyawa yang terdapat dalam ekstrak. Ekstrak etil asetat daun binahong dilarutkan dalam tween 2,5% selama 30 menit di atas penangas air mendidih, larutan yang terjadi disaring dengan kapas. Apabila larutan yang dihasilkan berwarna kuning sampai merah menunjukkan adanya senyawa yang mengandung kromofor (flavonoid, antraknon dan sebagainya) dengan gugus hidrofilik (gula, asam fenolat dan sebagainya). Bila larutan ditambah larutan KOH 1 N (3 tetes), warna larutan akan menjadi intensif.

b. Uji Polifenol

Ekstrak etil asetat daun binahong dipanaskan dengan tween 2,5% selama 1 menit dalam penangas air mendidih, kemudian saring panas-panas setelah dingin ditambah FeCl_3 sebanyak 3 tetes, jika timbul warna hijau, merah ungu, biru, atau hitam yang kuat menunjukkan adanya polifenolat (Harborne, 1987).

c. Uji Flavonoid

Ekstrak etil asetat daun binahong dilarutkan dalam tween 2,5%. Kemudian larutan ditetaskan di atas kertas saring. Selanjutnya kertas diuapi dengan ammonia (Harborne, 1987). Apabila timbul warna kuning intensif menunjukkan positif flavonoid.

d. Uji Tanin

Uji keberadaan tanin dilakukan dengan cara larutan uji dipanaskan selama 30 menit lalu disaring, 5 ml filtrat ditambah 1 ml larutan NaCl 2%, bila terjadi endapan disaring dengan kertas saring, kemudian ditambah 5 ml larutan gelatin 1%, timbulnya endapan menunjukkan adanya tanin atau zat samak.

e. Uji Saponin

Ekstrak etil asetat daun binahong dalam tabung reaksi ditambahkan aquadest, dikocok kuat selama 30 detik, kemudian dibiarkan dalam posisi tegak selama 30 menit. Apabila timbul buih yang konstan di permukaan yang tidak hilang setelah ditetesi HCl encer, menunjukkan adanya saponin.

f. Uji Alkaloid

Ekstrak etil asetat daun binahong dipanaskan dalam tabung reaksi dengan HCl 1% (10 ml) selama 10 menit di atas penangas air mendidih. Kemudian suspensi disaring dengan kapas dan dimasukkan dalam tabung reaksi I dan tabung reaksi II sama banyak. Larutan dibagi dua sama banyak, lalu ke dalam larutan I ditambah 3 tetes pereaksi Dragendorf dan larutan II ditambah 3 tetes pereaksi Mayer. Bila kedua pereaksi tersebut terbentuk endapan, menunjukkan adanya alkaloid.

g. Uji Antraknon

Uji keberadaan antraknon dilakukan dengan cara 1 gram ekstrak dididihkan selama 2 menit dengan 10 ml KOH 0,5 N dan 1ml larutan hidrogen

peroksida. Setelah dingin, suspensi disaring dengan kapas, kemudian diambil 5 ml filtrat ditambah dengan 10 tetes asam asetat glacial sampai pH 5, lalu ditambahkan 10 ml toluene, dan akan terbentuk 2 lapisan, lapisan atas sebanyak 5 ml dipisahkan dengan dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambah KOH 0,5 N. Warna merah yang terjadi pada lapisan air (basa) menunjukkan adanya senyawa antrakinin.

Skrining Fitokimia dengan Metode Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi Lapis Tipis dilakukan dengan fase gerak adalah kloroform : metanol (9:1) $\frac{v}{v}$, sedangkan fase diam yang digunakan adalah Silica Gel 60 F₂₅₄ dengan jarak elusi 8 cm. Cuplikan dibuat dengan konsentrasi 1% $\frac{b}{v}$ dan ditotolkan sebanyak 5 totolan dengan menggunakan pipa kapiler. Setiap penotolan dilakukan setelah totolan sebelumnya kering (Gritter dkk, 1991).

a. Pemeriksaan Polifenol

Pada pemeriksaan polifenol deteksi dilakukan dengan menggunakan pereaksi semprot FeCl₃. Pereaksi semprot FeCl₃ digunakan secara luas untuk mengidentifikasi senyawa fenol, tetapi tidak dapat digunakan untuk membedakan macam-macam golongannya (Robinson, 1995). Adanya senyawa fenol dapat ditunjukkan dengan pereaksi FeCl₃ yang memberikan bercak warna biru kehitaman, hijau atau biru kehijauan.

b. Pemeriksaan Saponin

Glikosida saponin jika dideteksi dengan pereaksi semprot vanillin-asam

sulfat atau anisaldehyd-asam sulfat akan memberikan warna biru sampai biru violet terkadang berupa bercak warna merah, kuning, biru tua, ungu, hijau, atau berupa kuning coklat pada sinar tampak. Glikosida saponin tanpa perlakuan kimia (pereaksi semprot) di bawah sinar UV_{254nm} tidak terjadi pemataman bercak dan di bawah sinar UV_{365nm} bercak tidak berfluorosensi (Wagner dkk, 1984).

Uji Aktivitas Antibakteri dengan Metode Dilusi Cair

a. Kelarutan Ekstrak Etil Asetat Daun Binahong (*Anredera scandens* (L.) Moq.)

Uji dilakukan dengan melarutkan ekstrak yang akan diuji dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Hal ini penting untuk mengetahui pelarut yang dapat mengencerkan ekstrak etil asetat daun binahong, namun tidak memiliki kemampuan untuk membunuh bakteri.

b. Pembuatan Suspensi Bakteri

Satu ose bakteri dari stok bakteri disuspensikan ke dalam 1 ml media cair BHI, diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Setelah itu diambil 100 μ l, dimasukkan dalam 1 ml BHI dan diinkubasi selama 4-8 jam pada suhu 37°C. Selanjutnya diencerkan dengan NaCl 0,9% sampai kekeruhannya sama dengan standar Mc Farland (10⁸ CFU/ml). Hasil pengenceran tersebut diencerkan lagi hingga konsentrasi 10⁶ CFU/ml dengan media BHI DS. Suspensi yang terbentuk disebut suspensi bakteri.

c. Pembuatan Larutan Uji

Uji pendahuluan aktivitas anti-bakteri menghasilkan konsentrasi ekstrak etil asetat daun binahong terhadap *Shigella flexneri* yaitu 8,5%, 8%, 7,5%, 7%, 6,5%, 6%, 5,5%, dan 5%^{b/v}

d. Penentuan Kadar Bunuh Minimum (KBM)

KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum) ditentukan dengan pengamatan ada tidaknya bakteri yang tumbuh pada media Mc Conkey. Larutan hasil uji dilusi cair digoreskan pada media agar darah. Amati ada tidaknya pertumbuhan bakteri dalam goresan pada media yang dibandingkan dengan kontrol, maka dapat ditentukan berapa konsentrasi terendah larutan ekstrak etil asetat daun binahong yang dapat membunuh pertumbuhan bakteri (KBM) konsentrasi terendah yang memperlihatkan kematian bakteri ditandai dengan tidak adanya bakteri yang tumbuh pada media Mc Conkey tersebut merupakan KBM.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Identifikasi Simplisia Daun Binahong (*Anredera scandens*(L.) Moq.)

Identifikasi simplisia daun binahong dilakukan untuk memastikan kebenaran simplisia daun binahong yang akan digunakan dalam penelitian ini, sehingga dapat dihindari kesalahan dalam pemilihan simplisia yang selanjutnya dapat mengganggu jalannya penelitian. Identifikasi simplisia ini dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Hasil me-

nunjukkan bahwa tanaman yang diidentifikasi adalah daun Binahong (*Anredera scandens* (L.)Moq.)dari familia Basellaceae.

Hasil Uji Kadar Air Simplisia Daun Binahong (*Anredera scandens* (L.) Moq.)

Sebelum simplisia dimaserasi, terlebih dahulu dilakukan pengujian kadar air. Tujuan dari pengujian ini adalah untuk mengetahui kadar air dalam simplisia apakah sudah sesuai dengan persyaratan yang berlaku, sehingga tidak mempengaruhi proses selanjutnya. Hasil pengujian kadar air yaitu sebesar 3,89% dengan alat pengukur *Halogen Moisture Analyzer*. Hasil ini sesuai syarat yang baik dari suatu proses pengeringan simplisia yang mengandung kadar air kurang dari 10%(Anonim, 1985). Untuk simplisia daun kadar air yang dipersyaratkan adalah kurang dari 5% (Anonim, 1985).

Pembuatan Ekstrak Etil Asetat Daun Binahong (*Anredera scandens* (L.) Moq.)

Pada pembuatan ekstrak etil asetat daun binahong cara penyarian yang dipilih adalah metode maserasi. Metode ini dipilih karena memiliki beberapa keuntungan antara lain tidak adanya proses pemanasan sehingga senyawa-senyawa yang bersifat labil tidak menjadi rusak atau hilang oleh adanya panas, cara pengerjaannya mudah, peralatannya sederhana dan mudah diusahakan (Anonim, 1986).

Serbuk daun binahong seberat 500 gram, direndam dengan cairan penyari yaitu etil asetat. Dipilih pelarut etil asetat karena sifatnya semipolar yang volatil

dan dapat melarutkan senyawa semipolar pada dinding sel seperti aglikon flavonoid (Harborne, 1987), tidak beracun dan tidak higroskopis. Di samping itu, etil asetat digunakan sebagai pelarut karena etil asetat dapat menyari senyawa-senyawa yang memberikan aktivitas antibakteri, diantaranya flavonoid polihidroksi dan fenol lain.

Jumlah cairan penyari yang ditambah disesuaikan dengan jumlah serbuk yaitu sampai seluruh serbuk terendam. Maserasi dilakukan dengan cara perendaman dalam etil asetat dan pengadukan dengan menggunakan elektrik stirer selama 3 jam. Kemudian dilakukan perendaman serbuk selama 24 jam yang selanjutnya disaring. Tujuan dilakukan pengadukan berulang adalah untuk meratakan konsentrasi larutan, sehingga kondisi jenuh yang terlalu cepat dapat dihindari dan proses penyarian lebih maksimal. Tujuan perendaman selama 24 jam adalah untuk mengendapkan senyawa-senyawa yang tidak diinginkan yang ikut tersari dalam pelarut. Pada proses penyarian dilakukan remaserasi sebanyak dua kali dengan harapan senyawa yang tersari lebih banyak.

Maserat yang diperoleh diuapkan di dalam almari asam sampai terbentuk ekstrak kental tanpa bau etil asetat. Apabila masih ada pelarut di dalam ekstrak, maka akan dapat mengganggu penelitian karena dimungkinkan pelarut itu sendiri yang membunuh bakteri. Proses penguapan tidak boleh dilakukan di atas api ataupun penangas, karena cairan penyari etil asetat merupakan pelarut yang mudah terbakar dan juga dikhawatirkan senyawa aktif yang ada dalam ekstrak akan rusak oleh adanya

pemanasan. Ekstrak kental yang diperoleh sebesar 41,3221 gram dari 500 gram serbuk daun binahong dengan 4 liter pelarut etil asetat sehingga diperoleh rendemen sebesar 8,26 %.

Hasil Uji Kelarutan Ekstrak Etil Asetat Daun Binahong (*Anredera scandens* (L.) Moq.)

Ekstrak etil asetat hasil penyarian selanjutnya diuji kelarutannya dalam aquadest. Apabila ekstrak tersebut tidak dapat larut secara sempurna di dalam aquadest, maka harus ditambahkan *suspending agent* untuk membantu kelarutan sehingga dalam pengujian aktivitas antibakteri ekstrak dapat bercampur dengan media.

Observasi *suspending agent* dilakukan dengan menggunakan beberapa jenis *suspending agent*. Diantaranya tween 80, span 80, PEG 400, dan propilen glikol masing-masing dibuat konsentrasi 5%. Cuplikan ekstrak ditambahkan pelarut dan *suspending agent* dalam tabung reaksi kemudian dikocok sehingga ekstrak dapat tersuspensi dengan baik. Hasil uji kelarutan ekstrak etil asetat serbuk daun binahong dapat dilihat pada Tabel I.

Tabel I. Hasil Uji Kelarutan Ekstrak Etil Asetat Serbuk Daun Binahong

Suspending agent (5% b/v)	Kelarutan Ekstrak
Tween 80	+
Span 80	-
PEG 400	-
Propilen glikol	-

Keterangan:

(+) : ekstrak larut

(-) : ekstrak tidak larut

Hasil Uji Aktivitas Antibakteri

Metode yang digunakan dalam pengujian aktivitas antibakteri pada penelitian ini adalah dilusi cair yang didasarkan pada prinsip pengenceran (Jawetz, 2005). Metode ini dipilih karena prinsip dari metode ini adalah pengenceran larutan uji sampai diperoleh seri kadar dan pada masing-masing larutan uji ditambah suspensi bakteri (Sylvia, 2008). Hal tersebut memungkinkan terjadinya interaksi yang homogen antara larutan uji dengan suspensi bakteri sehingga penghambatan terhadap bakteri bisa lebih sensitif. Selain itu, pada metode ini penggunaan media dan bahan uji lebih hemat dan tidak dipengaruhi oleh tebal tipisnya media. Parameter yang digunakan adalah Kadar Bunuh Minimum (KBM). Untuk mengetahui Kadar Bunuh Minimum (KBM) dilakukan dengan penggoresan larutan uji di media padat sehingga dapat diketahui aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat daun binahong.

Media yang digunakan adalah media Mc Conkey yang merupakan media yang cocok bagi pertumbuhan *Shigella flexneri* karena merupakan media padat yang khas untuk kuman perut (enterobacteriaceae). Kuman-kuman perut yang dapat memfermentasi laktosa akan berwarna merah sedangkan kuman-kuman perut yang tidak dapat memecah laktosa tidak menimbulkan warna pada media. *Shigella flexneri* merupakan bakteri yang tidak dapat memfermentasi laktosa sehingga dalam media Mc Conkey tidak menimbulkan warna (Suwandi, 1999).

Pada penelitian ini digunakan larutan kontrol terdiri dari kontrol media,

pelarut, ekstrak, obat, *suspending agent*, dan kontrol suspensi bakteri. Kontrol media berisi media uji tanpa suspensi bakteri yaitu menggunakan BHI DS, yang berfungsi untuk mengetahui sterilitas dari media uji. Pada kontrol media ini tidak boleh ditemukan adanya pertumbuhan bakteri. Kontrol pelarut berisi cairan pelarut berupa tween 80 ditambah media BHI DS. Fungsi dari kontrol pelarut adalah untuk mengetahui sterilitas dari cairan pelarut. Kontrol ekstrak berisi ekstrak etil asetat daun binahong ditambah media BHI DS. Kontrol ekstrak ini berfungsi untuk memastikan bahwa ekstrak yang digunakan benar-benar steril tidak terdapat kontaminan yang dapat mengganggu penelitian. Kontrol obat berisi obat antibakteri kotrimoksazol ditambah suspensi bakteri. Kontrol obat ini berfungsi untuk mengetahui kadar obat yang dapat membunuh bakteri sehingga dapat digunakan sebagai pembanding. Kontrol *suspending agent* berisi tween 80 ditambah suspensi bakteri. Kontrol *suspending agent* merupakan kontrol yang digunakan untuk mengetahui apakah *suspending agent* yang digunakan dalam pelarut mempunyai aktivitas antibakteri atau tidak. Pada kontrol ini harus menunjukkan adanya koloni bakteri, karena kalau tidak tumbuh koloni maka *suspending agent* yang digunakan mampu membunuh bakteri, sehingga akan mengganggu hasil penelitian karena kemungkinan *suspending agent* yang digunakan berkhasiat sebagai antibakteri bukan hasil aktivitas antibakteri yang diperoleh dari ekstrak. Kontrol suspensi bakteri berisi aquadest ditambah suspensi bakteri dalam media BHI DS. Kontrol suspensi bakteri ini berfungsi untuk

memastikan ada tidaknya pertumbuhan bakteri serta untuk melihat apakah bakteri yang digunakan hanya bakteri yang diuji saja atau ada bakteri lain yang ikut tumbuh.

Berdasarkan hasil uji pendahuluan diperoleh data *Shigella flexneri* menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat daun binahong dengan kadar kadar yang lebih kecil yaitu 8,5%, 8%, 7,5%, 7%, 6,5%, 6%, 5,5% ^{b/v}, dan 5% ^{b/v}. Dari pengujian, diperoleh harga KBM ekstrak etil asetat daun binahong untuk *Shigella flexneri* adalah 8% ^{b/v}. Hasil untuk kontrol, pada kontrol media, kontrol pelarut, dan kontrol ekstrak menunjukkan tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri, sehingga membuktikan bahwa media, pelarut, dan ekstrak yang digunakan sudah steril. Pada kontrol obat menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri, sehingga menunjukkan bahwa obat dapat membunuh bakteri. Pada kontrol *suspending agent* kontrol suspensi bakteri menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri yang menunjukkan bahwa pelarut yang digunakan tidak mempunyai aktivitas membunuh bakteri. Pada kontrol suspensi bakteri menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri dan tidak terdapat kontaminan, sehingga membuktikan bahwa bakteri benar-benar dapat tumbuh tanpa kontaminan. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat daun binahong terhadap *Shigella flexneri* dapat dilihat pada Tabel II.

Tabel II. Hasil Uji Penentuan KBM Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Serbuk Daun Binahong (*Anredera scandens* (L.) Moq.) Terhadap *Shigella flexneri*

Cuplikan	K/J	Koloni
8,5 %b/v	K	-
8 %b/v	K	-
7,5 %b/v	K	+
7 %b/v	K	+
6,5 %b/v	K	+
6 %b/v	K	+
5,5 %b/v	K	+
5 %b/v	K	+
K1	J	-
K2	J	-
K3	K	-
K4	J	-
K5	K	+
K6	K	+

Keterangan :

- J : Jernih K1 : Kontrol media
- K : Keruh K2 : Kontrol pelarut
- : Tidak terdapat koloni
- K3 : Kontrol ekstrak
- + : Terdapat koloni
- K4 : Kontrol obat
- K5 : Kontrol *suspending agent*
- K6 : Kontrol suspensi bakteri

Data tersebut menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat daun binahong mempunyai aktivitas terhadap *Shigella flexneri* dengan Kadar Bunuh Minimum 8%^{b/v}. Pada penelitian aktivitas antibakteri ekstrak daun binahong dengan penyari etanol 70% (Andreani, 2011) terhadap bakteri yang sama diperoleh KBM sebesar 15% ^{b/v}. Pada kedua penelitian ini dapat dilihat bahwa Kadar

Bunuh Minimum (KBM) ekstrak etil asetat daun binahong terhadap *Shigella flexneri* diperoleh kadar yang lebih kecil yaitu 8%^{b/v} dibandingkan dengan ekstrak etanol 70% dengan bahan dan bakteri yang sama yaitu 15%^{b/v}. Hal ini dimungkinkan karena golongan senyawa yang berpotensi sebagai antibakteri pada daun binahong lebih banyak tersari dalam etil asetat dibandingkan dengan etanol 70%. Dilihat dari sifatnya etil asetat merupakan pelarut yang volatil dan mudah terbakar, sehingga dalam penguapannya tanpa pemanasan, sedangkan etanol proses penguapannya dengan pemanasan. Proses pemanasan inilah yang memungkinkan menjadi salah satu faktor perbedaan jumlah kandungan golongan senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri dalam masing-masing ekstrak tersebut, sehingga Kadar Bunuh Minimum yang diperoleh juga berbeda. Pada penguapan ekstrak etanol terdapat proses pemanasan yang dimungkinkan menyebabkan rusaknya senyawa-senyawa yang sebenarnya memiliki aktivitas sebagai antibakteri, sedangkan pada penguapan ekstrak etil asetat dilakukan tanpa pemanasan dan rusaknya senyawa karena pemanasan dapat dihindari, sehingga Kadar Bunuh Minimum yang diperoleh lebih kecil dari ekstrak etanol.

Pada penelitian aktivitas antibakteri ekstrak etil asetat batang binahong terhadap *Salmonella thypi* (Definingsih, 2011) diperoleh Kadar Bunuh Minimum 25%^{b/v}, berbeda dengan Kadar Bunuh Minimum yang diperoleh dalam penelitian daun binahong dengan etil asetat terhadap *Shigella flexneri* yaitu 8%. Perbedaan Kadar Bunuh Minimum tersebut bisa

dimungkinkan karena dalam ekstrak etil asetat daun binahong terdapat senyawa golongan polifenol lain selain flavonoid dan tanin yang belum teridentifikasi dan tidak ditemukan dalam ekstrak etil asetat batang binahong, yang juga memberi kontribusi dan berpotensi sebagai antibakteri terhadap bakteri gram negatif.

Pada penelitian aktivitas antifungi ekstrak etanol batang binahong terhadap *Candida albicans* (Kumalasari, 2011) diperoleh Kadar Bunuh Minimum 86%. Kadar Bunuh Minimum yang diperoleh jauh lebih besar dibanding dengan terhadap bakteri. Perbedaan tersebut dikarenakan dinding sel fungi lebih tebal daripada dinding sel bakteri, sehingga dinding sel bakteri lebih mudah ditembus dan Kadar Bunuh Minimum yang diperoleh lebih kecil.

Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak Etil Asetat Serbuk Daun Binahong (*Anredera scandens* (L.) Moq.)

Skrining fitokimia dilakukan untuk mengetahui gambaran umum tentang golongan senyawa yang terdapat dalam ekstrak etil asetat daun binahong. Uji ini dilakukan dengan metode tabung yang meliputi uji pendahuluan, uji polifenol, uji flavonoid, uji tanin, uji saponin, uji alkaloid, dan uji antraknon.

Pada uji pendahuluan diperoleh larutan uji berwarna kuning, dan setelah dilakukan penambahan basa (KOH), warna larutan menjadi lebih intensif. Warna kuning yang dihasilkan ini dikarenakan adanya penambahan gugus hidroksil pada struktur senyawa. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat daun binahong positif mengandung gugus kromofor. Pada uji keberadaan

polifenol, setelah larutan ekstrak daun binahong ditambahkan dengan FeCl_3 , larutan menunjukkan warna yang lebih tua yaitu hijau kebiruan. Perubahan warna menjadi lebih tua ini menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat daun binahong positif mengandung polifenol.

Pada uji keberadaan flavonoid, setelah larutan ekstrak daun binahong diteteskan di atas kertas saring kemudian dilewatkan pada uap amoniak tidak menunjukkan perubahan warna menjadi lebih intensif (kuning flourosens), hal ini menunjukkan bahwa larutan ekstrak etil asetat daun binahong tidak mengandung flavonoid.

Pada uji keberadaan tanin, dilakukan penambahan larutan NaCl 2% ke dalam larutan ekstrak daun binahong, dengan tujuan untuk mengendapkan zat-zat lain bukan tanin, endapan yang terbentuk disaring kemudian ditambah larutan gelatin 1%, timbulnya endapan menunjukkan adanya tanin atau zat samak. Tanin bersifat dapat menggumpalkan protein (Harborne, 1987), endapan yang terbentuk ini berasal dari reaksi antara tanin dengan gelatin yang merupakan protein. Hasil uji yang diperoleh tidak timbul endapan pada larutan ekstrak etil asetat daun binahong. Ini menunjukkan bahwa larutan ekstrak etil asetat daun binahong tidak mengandung tanin atau zat samak.

Pada uji keberadaan saponin, dilakukan dengan penggojokan kuat larutan ekstrak etil asetat daun binahong dalam aquadest selama 30 detik kemudian dibiarkan dalam posisi tegak selama 30 menit. Apabila timbul buih yang konstan di permukaan yang tidak hilang setelah ditetesi HCl encer,

menunjukkan adanya saponin. Hasil uji yang diperoleh terbentuk buih yang konstan setelah ditetesi HCl encer, ini menunjukkan bahwa larutan ekstrak etil asetat daun binahong positif mengandung saponin.

Pada uji keberadaan alkaloid, terlebih dahulu ekstrak dilarutkan dalam HCl . Penambahan HCl ini bertujuan agar terbentuk garam yang mudah larut dari HCl dan alkaloid yang merupakan suatu basa, sehingga bisa bereaksi dengan pereaksi Dragendorff dan Meyer. Hasil yang diperoleh pada larutan yang ditambahkan dragendorff dan meyer tidak terbentuk endapan, hal ini menunjukkan bahwa larutan ekstrak etil asetat daun binahong tidak mengandung alkaloid. Pada uji keberadaan antrakinin dilakukan dengan mendidihkan ekstrak dalam KOH dan larutan hidrogen peroksida. Setelah itu dilakukan penambahan asam asetat glasial, toluene, dan larutan KOH pada lapisan atas. Warna merah yang terjadi pada lapisan air (basa) menunjukkan adanya senyawa antrakinin. Hasil uji keberadaan antrakinin adalah negatif, karena larutan tidak menunjukkan warna merah. Tabel hasil uji skrining fitokimia dapat dilihat pada Tabel III.

Hasil Uji Kualitatif Secara Kromatografi

Setelah dilakukan skrining fitokimia dengan uji tabung kemudian dilanjutkan dengan uji kualitatif secara kromatografi. Uji ini untuk mempertegas uji tabung. Pemeriksaan kandungan kimia dilakukan terhadap polifenol, dan saponin yang diduga mempunyai aktivitas antibakteri. Kromatografi Lapis Tipis adalah metode pemisahan yang mempunyai beberapa keuntungan yaitu

Tabel III. Uji Skrining Fitokimia Dengan Metode Tabung Ekstrak Etil Asetat Daun Binahong (*Anredera scandens* (L.) Moq.)

Jenis Uji	Penambahan Pereaksi	Hasil
Pendahuluan	Basa (KOH)	+ (Kuning kecoklatan)
Polifenol	FeCl ₃	+ (Biru hijau)
Flavonoid	Uap Amonia	-
Tanin	NaCl 2%, Gelatin 1%	-
Saponin	HCl encer	+ (Buih konstan)
Alkaloid	Dragendrof	-
	Meyer	-
Antraknon	KOH, Hidrogen peroksida, Asam asetat glasial, Toluena	-

peralatan yang digunakan sedikit, murah, sederhana, waktu analisis cepat, dan daya pisah baik (Sudjadi, 1988).

Berdasarkan hasil orientasi maka yang digunakan sebagai fase gerak adalah kloform : metanol (9:1) $\frac{v}{v}$ dengan hasil pemisahan bercak yang cukup baik, sedangkan fase diam yang digunakan adalah Silica Gel 60 F₂₅₄ dengan jarak elusi 8 cm.

Cuplikan dibuat dengan konsentrasi 1% $\frac{b}{v}$ dan ditotolkan sebanyak 5 totolan dengan menggunakan pipa kapiler. Setiap penotolan dilakukan setelah totolan sebelumnya kering. Jumlah penotolan harus optimum, karena jika penotolan terlalu banyak maka totolan akan terlalu pekat sehingga sulit digerakkan oleh fase gerak, sedangkan jika penotolan terlalu sedikit maka bercak yang dihasilkan samar (Gritter dkk, 1991).

a. Pemeriksaan Polifenol

Dari hasil KLT terdapat satu bercak yang diduga merupakan polifenol pada R_f 0,21. Bercak yang muncul

setelah disemprot dengan menggunakan FeCl₃ menunjukkan warna hijau kehitaman (Wagner, 1996) akibat pembentukan kompleks antara gugus fenol dengan Fe yang terdapat pada pereaksi semprot FeCl₃. Reaksi tersebut dianalogkan dengan reaksi antara gugus fenol pada flavonoid dengan senyawa AlCl₃ karena Fe juga merupakan logam. Hal ini menunjukkan bahwa dalam ekstrak etil asetat daun binahong mengandung polifenol. Hasil identifikasi polifenol ekstrak etil asetat daun binahong dengan metode KLT dapat dilihat pada Tabel IV.

b. Pemeriksaan Saponin

Glikosida saponin jika dideteksi dengan pereaksi semprot vanillin-asam sulfat atau anisaldehyd-asam sulfat akan memberikan warna biru sampai biru violet terkadang berupa bercak warna merah, kuning, biru tua, ungu, hijau, atau berupa kuning coklat pada sinar tampak. Glikosida saponin tanpa perlakuan kimia (pereaksi semprot) di bawah sinar UV_{254nm} tidak terjadi pemadaman bercak

Tabel IV. Hasil Identifikasi Polifenol Ekstrak Etil Asetat Daun Binahong (*Anredera scandens* (L.) Moq.) menggunakan KLT

Cuplikan	Rf	Warna Hasil Kromatografi Lapis Tipis			Polifenol
		UV 254	UV 366	FeCl ₃	
Sampel	0,21	Pemadaman	Flourosensi Biru	Hijau kehitaman	+
	0,21	Pemadaman	Flourosensi Biru	Hijau kehitaman tipis	+
	0,47	Pemadaman	Flourosensi Biru	Hijau kehitaman tipis	+
	0,90	Pemadaman	Flourosensi Biru	-	-
	0,97	Pemadaman	Flourosensi Biru	-	-

dan di bawah sinar UV_{365nm} bercak tidak berfluorosensi (Wagner dkk, 1984).

Dari hasil KLT dapat diketahui bahwa setelah disemprot dengan anisaldehyd-asam sulfat, bercak saponin untuk sampel ekstrak etil asetat daun binahong dapat diamati pada Rf 0,16; 0,30; 0,45; dan 0,66 yang secara visual berwarna biru hingga biru keunguan. Di

bawah sinar UV_{254nm} tidak terjadi pemadaman bercak dan di bawah sinar UV_{365nm} bercak tidak berfluorosensi karena saponin tidak mempunyai ikatan rangkap terkonjugasi. Hal ini menunjukkan bahwa dalam daun binahong mengandung saponin. Hasil identifikasi saponin ekstrak etil asetat daun binahong dengan metode KLT dapat dilihat pada Tabel V.

Tabel V. Hasil Identifikasi Saponin Ekstrak Etil Asetat Daun Binahong (*Anredera scandens* (L.) Moq.) menggunakan KLT

Cuplikan	Rf	Warna Hasil Kromatografi Lapis Tipis			Saponin
		UV 254	UV 366	Anisaldehyd H ₂ SO ₄	
Sampel	0,16	-	-	Biru	+
	0,23	Pemadaman	Biru	-	-
	0,30	-	-	Biru	+
	0,45	-	-	Biru	+
	0,50	Pemadaman	Biru	Kuning coklat	-
	0,66	-	-	Biru keunguan	+
	0,95	Pemadaman	Biru	-	-
	0,99	Pemadaman	Biru	-	-

Hubungan Kandungan Kimia Ekstrak Etil Asetat Daun Binahong (*Anredera scandens* (L.) Moq.) dengan Aktivitas Antibakteri

Berdasarkan hasil kromatografi ekstrak etil asetat daun binahong mengandung polifenol dan saponin. Kemungkinan senyawa kimia yang terkandung dalam ekstrak etil asetat daun binahong tersebut dapat membunuh bakteri *Shigella flexneri*.

Senyawa polifenol merupakan senyawa mempunyai ciri-ciri yaitu cincin aromatis yang mengandung satu atau dua gugus hidroksil (Harborne, 1987). Senyawa fenol juga dapat merusak membran sel sehingga terjadi perubahan permeabilitas dinding sel yang akan mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan sel atau matinya sel (Pelczar and Chan, 1988).

Saponin merupakan senyawa aktif permukaan yang kuat yang menimbulkan busa jika dikocok dalam air (Hostettmann, 1995). Saponin akan mengubah tegangan muka dan mengikat lipid pada sel bakteri yang menyebabkan lipid terekskresi dari dinding sel sehingga permeabilitas membran bakteri terganggu.

Daun binahong mengandung alkaloid, saponin, dan polifenol (Katno, 2006). Hasil penelitian pendahuluan yang dilakukan di Universitas Gadjah Mada, menyatakan bahwa pada kultur in vitro daun binahong terkandung senyawa aktif flavonoid, alkaloid, terpenoid dan saponin. Senyawa-senyawa ini dapat berperan sesuai fungsinya masing-masing. Kemampuan binahong untuk menyembuhkan berbagai jenis penyakit ini berkaitan erat dengan

senyawa aktif yang terkandung di dalamnya seperti flavonoid. Flavonoid dapat berperan langsung sebagai antibiotik dengan mengganggu fungsi dari mikroorganisme seperti bakteri dan virus. Senyawa terpenoid adalah senyawa hidrokarbon isometrik membantu tubuh dalam proses sintesa organik dan pemulihan sel-sel tubuh (Manoi, 2009).

Dalam hal ini belum dapat ditentukan secara pasti satu golongan senyawa aktif yang berfungsi sebagai antibakteri. Untuk mengetahui dengan pasti golongan senyawa yang aktif sebagai antibakteri maka perlu dilakukan pemeriksaan lebih lanjut terhadap masing-masing golongan senyawa tersebut. Selain dari golongan senyawa yang teridentifikasi menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT), tidak tertutup kemungkinan terdapatnya metabolit / golongan senyawa aktif lain dalam ekstrak etil asetat daun binahong yang belum teridentifikasi dan berpotensi sebagai antibakteri terhadap *Shigella flexneri*.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa ekstrak etil asetat daun binahong (*Anredera scandens* (L.) Moq.) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Shigella flexneri* secara invitro. Nilai Kadar Bunuh Minimum (KBM) ekstrak etil asetat daun binahong (*Anredera scandens* (L.) Moq.) terhadap *Shigella flexneri* adalah 8%^{b/v}. Pada pemeriksaan profil kromatografi menunjukkan ekstrak etil asetat daun binahong (*Anredera scandens* (L.) Moq.) mengandung senyawa polifenol dan saponin.

SARAN

Perlu dilakukan penelitian tentang uji aktivitas antibakteri terhadap *Shigella flexneri* dengan pelarut dan teknik penyarian yang berbeda, yaitu pelarut yang lebih polar dan non polar. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang kandungan zat aktif pada Ekstrak etil asetat daun binahong (*Anredera scandens* (L.) Moq.) yang berkhasiat sebagai antibakteri secara in vitro dengan metode yang lain. Perlu dilakukan lebih lanjut mengenai bioautografi untuk mengetahui bercak warna yang mempunyai daya antibakteri.

DAFTAR PUSTAKA

- Andreani, Rizky D., 2011, Uji Aktivitas Ekstrak Etanol 70% Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Tenore) Steen) Terhadap Bakteri *Shigella flexneri* Dan Skrining Fitokimianya. *Skripsi*, Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta.
- Anonim, 1985, *Cara Pembuatan Simplisia*, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, 1, 4, 7-9, 15.
- Anonim, 1986, *Sediaan Galenik*, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta, Hal 1-2, 5, 10-12, 16-17, 28.
- Gritter, R.J., J. M. Bobbit, A. E. Schwarting, 1991, *Pengantar Kromatografi*, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, Penerbit ITB, Bandung, Hal 111.
- Harborne, J. B., 1987, *Metode Fitokimia*, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro, Penerbit ITB, Bandung, Hal 47-49, 97, 102-103, 234-235.
- Hostettmann, K., Marston, A., 1995, *Saponins*, University Press, Cambridge, Hal 1.
- Jaerony, 2008, *Tanaman Obat Binahong*, <http://www.google.com/>, diakses 20 April 2008.
- Jawetz, Melnick, dan Adelberg, 2005, *Mikrobiologi Kedokteran*, Penerbit Salemba Medika, Jakarta.
- Katno, dkk, 2006, *Inventaris Tanaman Obat Indonesia Edisi VI*, Jakarta, Departemen Kesehatan Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Balai Penelitian Tanaman Obat, Hal 16-17.
- Kumalasari, Eka, 2011, Uji Aktivitas Antifungi Ekstrak Etanol Batang Binahong (*Anredera cordifolia* (Tenore) Steen) Terhadap *Candida albicans* Serta Profil Kromatografi Lapis Tipisnya, *Skripsi*, Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta.
- Manoi, Feri, 2009, Binahong (*Anredera cordifolia*) sebagai Obat, *Majalah Warta* Vol.15, Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian.
- Pelczar and Chan, 1988, *Dasar-Dasar Mikrobiologi*, Universitas Indonesia Press, Jakarta, Hal 7-18.
- Rachmawati, S., 2008, Study Makroskopi, Mikroskopi dan Skrining Fitokimia Daun *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis, *Thesis*, Airlangga University, Surabaya.

- Robinson, T., 1995, *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*, edisi keenam, Departement of Biochemistry University of Maasachussetts, diterjemahkan oleh Kosasih, P., Penerbit ITB, Bandung, Hal 71-72, 157, 191-192.
- Sudjadi, 1988, *Metode Pemisahan*, Kanisius, Yogyakarta, Hal 77, 167-174.
- Suwandi, Usman, 1999, Peran Media Untuk Identifikasi Mikroba Patogen, *Cermin Dunia Kedokteran*, Hal 124.
- Sylvia, T. Pratiwi, S.Si, M.Si, 2008, *Mikrobiologi Farmasi*, Fakultas Farmasi Universitas Gadjja Mada Yogyakarta, Penerbit Erlangga, Jakarta, Hal 154-161, 190-191.
- Todar, K., 2009, *Online Textbook of Microbiology*, Madison, Wisconsin.
- Wagner, Hidelbert, 1984, *Plant rug Analysis, A Thin layer Chromatography Atlas Second Edition*, Springer-Verlag, Berlin.
- Yuliasuti, Definingsih, 2011, Uji Aktivitas Antibakteri Etil Asetat Batang Binahong (*Anredera cordifolia* (Tenore) Steen) Terhadap *Salmonella thypi* Dan Skrining Fitokimianya. *Skripsi*, Fakultas Farmasi Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta.