

UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL 96%, FRAKSI *N*-HEKSAN, ETIL ASETAT, FRAKSI AIR EKSTRAK DAUN SIRSAK (*ANNONA MURICATA L.*) TERHADAP *BACILLUS SUBTILLIS* ATCC 6633

Hepriza Rochensi^{1*}

Program Studi S1-Farmasi, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Duta Bangsa Surakarta, Jawa Tengah, Indonesia¹

*Corresponding author : hepreza@gmail.com

ABSTRAK

Daun hingga akar buah sirsak (*Annona muricata L.*) Merupakan tanaman yang telah digunakan sebagai tanaman obat oleh berbagai masyarakat suku di Indonesia. Memiliki senyawa-senyawa kimia seperti tannin, alkaloid, dan flavonoid. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol, fraksi *n*-Heksan, etil asetat, dan fraksi air daun sirsak (*Annona muricata L.*) Terhadap daya hambat *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Dan untuk mengetahui berapakah konsentrasi hambat minum serta konsentrasi bunuh minimum dari ekstrak etanol daun sirsak dan fraksi yang paling efektif. Penelitian ini menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% kemudian dilakukan fraksinasi dengan menggunakan pelarut *n*-Heksan, etil asetat dan fraksi air ekstrak etanol daun sirsak yang akan diuji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi dan dilusi dengan berbagai konsentrasi. Hasil pada penelitian ini menunjukkan bahwa fraksi *n*-Heksan, etil asetat, fraksi air dari ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata L.*) Mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Bacillus subtilis* ATCC 6633 dengan konsentrasi 50%, 25%, 12,5% dan 6,25%. KHM fraksi *n*-Heksan, etil asetat dan fraksi air dan ekstrak etanol 96% memiliki nilai rata-rata diameter zona hambat pada konsentrasi 50% berturut-turut adalah 26 mm; 24 mm; 23 mm; 24 mm dan didapatkan nilai KBM *Bacillus subtilis* ATCC 6633 konsentrasi 12,5 dan konsentrasi 6,25%. Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa Fraksi *n*-Heksan dari ekstrak daun sirsak memiliki aktivitas antibakteri paling efektif terhadap *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

Kata kunci : *bacillus subtilis*, daun sirsak, difusi, dilusi, kloramfenikol

ABSTRACT

Leaves to roots of soursop fruit (*Annona muricata L.*) is a plant that has been used as a medicinal plant by various tribal communities in Indonesia. It has chemical compounds such as tannins, alkaloids, and flavonoids. The purpose of this study was to determine the antibacterial activity of ethanol extract, *n*-hexane fraction, ethyl acetate, and water fraction of soursop leaf (*Annona muricata L.*) against the inhibition of *Bacillus subtilis* ATCC 6633. And to find out what are the drinking inhibitory concentrations and minimum kill concentrations of soursop leaf ethanol extract and the most active fraction of soursop leaf extract against *Bacillus subtilis* ATCC 6633. This study uses a maceration method with 96% ethanol solvent and then fractionation is carried out using *n*-Hexane solvent, ethyl acetate and water fraction of ethanol extract of soursop leaves which will be tested for antibacterial activity using the diffusion and dilution method with various concentrations. The results of this study showed that the *n*-hexane fraction, ethyl acetate, water fraction from ethanol extract of soursop leaves (*Annona muricata L.*) has antibacterial activity against *Bacillus subtilis* ATCC 6633 with concentrations of 50%, 25%, 12.5% and 6.25%. KHM fraction *n*-Hexane, ethyl acetate and water fraction and ethanol extract 96% had an average value of the diameter of the inhibition zone at a concentration of 50% respectively of 26 mm; 24 mm; 23 mm; 24 mm and obtained the KBM value of *Bacillus subtilis* ATCC 6633 concentration of 12.5 and concentration of 6.25%. From this study, it can be concluded that the *n*-Heksan fraction of soursop leaf extract has the most effective antibacterial activity against *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

Keywords : *bacillus subtilis*, chloramphenicol, diffusion, dilution, soursop leave

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara yang memiliki keanekaragaman hayati yang melimpah. Selain itu, berbagai jenis tumbuhan yang dapat dimanfaatkan sebagai sumber kesehatan, pangan, dan kosmetik. Salah satunya adalah pohon sirsak (*Annona muricata* Linn). Daun sirsak merupakan tumbuhan yang berasal dari daerah tropis. Memiliki kandungan senyawa dalam daun sirsak antara lain steroid/terpenoid, flavonoid, fenol, alkaloid, saponin, dan tannin (Senja et al., 2023). Daun sirsak memiliki senyawa flavonoid yang berfungsi sebagai antibakteri dengan cara menghambat aktivitas enzim yang akhirnya mampu mengganggu proses metabolisme bakteri (Fitriyanti et al., 2019). Tanaman sirsak (*Annona muricata* L.) yang juga dikenal dengan sebutan nangka belanda merupakan tanaman tropis dan sudah tidak asing lagi bagi masyarakat Indonesia. Tanaman ini mempunyai manfaat besar bagi manusia, yaitu sebagai bahan makanan ringan, dan obat-obatan. Tanaman sirsak juga dikenal sebagai tanaman obat (Rizky et al., 2024).

Beberapa penelitian telah membuktikan khasiat dari ekstrak air dan metanol daun sirsak (*Annona muricata* L) salah satu tanaman yang memiliki kandungan senyawa kimia berupa alkaloid, tannin, flavonoid, fenol, saponin, dan steroid/terpenoid, yang mempunyai fungsi sebagai obat infeksi pada luka, antitumor, antijamur, antimikroba, antikanker, dan antibakteri. Selain itu, senyawa *acetogenin* yang ditemukan pada daun sirsak (Puspitasari et al., 2016). Sehingga memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Bacillus subtilis* (Fibonacci & Hulyadi, 2018). Bakteri yang merugikan atau patogen yang dapat menimbulkan penyakit pada manusia seperti bakteri gram positif. Salah satunya *Bacillus subtilis* merupakan penyebab penyakit dengan mengganggu sistem imun, misalnya gastroenteritis akut dan meningitis (Sugiarto, 2016). Metode yang dapat digunakan untuk menguji aktivitas dari *Bacillus subtilis* ATCC 6633 menggunakan metode difusi dan dilusi (Fibonacci & Hulyadi, 2018).

Metode dilusi dapat digunakan untuk mengetahui Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) daerah hambat terbentuk mengelilingi obat berupa zona daerah yang dianggap sebagai ukuran hambatan terhadap mikroorganisme yang diperiksa (Setyaningrum, 2018) Metode dilusi untuk mengetahui Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Metode difusi digunakan dalam uji sensitivitas bakteri, metode tersebut dilakukan dengan cara mengamati daya hambat pertumbuhan mikroorganisme oleh ekstrak yang diketahui dari daerah di sekitar kertas cakram (*paper disc*) yang tidak ditumbuhi oleh mikroorganisme. Dari beberapa penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Bacillus subtilis* dengan Kadar Hambat Minimal (KHM) sebesar 12 mm (Meitania Utami et al., 2022).

Pengobatan yang diberikan untuk *Bacillus subtilis* adalah antibiotik kloramfenikol karena golongan ini berspektrum luas, dapat menghambat bakteri gram positif dan negatif aerob dan anaerob (Hamizah, 2023). Kloramfenikol adalah antibiotik untuk mengatasi infeksi bakteri serius yang bekerja dengan cara membunuh bakteri yang menjangkit didalam tubuh dan mencegahnya kembali. Pemakaian antibiotik yang kurang tepat dapat menyebabkan resistensi obat sehingga pemanfaatan tanaman obat sebagai alternatif pengobatan dapat dijadikan alternatif untuk pengembangan obat pada masa mendatang (Hasanah & Wahyuni, 2018). Berdasarkan latar belakang diatas, maka penelitian ini mengenai uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksi air, etil asetat dan *n*-heksan dari ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Namun, belum ada penelitian yang mengetahui aktivitas antibakteri daun sirsak (*Annona muricata* L.) yang menggunakan metode difusi dan metode dilusi dengan kontrol positif kloramfenikol terhadap *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

Tujuan dalam penelitian ini untuk mengevaluasi aktivitas ekstrak etanol 96%, fraksi air, etil asetat, dan *n*-Heksan dari daun sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap *Bacillus subtilis* ATCC 6633, serta untuk mengukur nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan

Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari ekstrak etanol 96%, fraksi etil asetat, *n*-Heksan, dan fraksi air daun sirsak (*Annona muricata L.*) serta membandingkannya dengan kontrol positif antibiotik kloramfenikol terhadap *Bacillus subtilis* ATCC 6633, dan menentukan aktivitas antibakteri dari KHM dan KBM pada fraksi daun sirsak yang berhasil, dan membandingkannya dengan kontrol positif antibiotik kloramfenikol terhadap *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

METODE

Penelitian dilakukan pada bulan april-juni. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Ilmu Kesehatan Prodi Farmasi Universitas Duta Bangsa Surakarta dan Universitas Setia Budi Surakarta. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirsak (*Annona muricata L.*) yang diambil dari Desa Koripan, Kec. Matesih, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah. Sampel yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirsak (*Annona muricata L.*). Pembuatan ekstrak daun sirsak pada penelitian ini akan menggunakan metode maserasi. Fraksi *n*-Heksan dari ekstrak etanol daun sirsak akan dilakukan dengan cara ekstrak kental hasil perkolasi didalam beaker glass ditimbang sebanyak 20 gram ditambah air sebanyak 250 ml sedikit demi sedikit. Kemudian lakukan sebanyak 3 kali 75 ml *n*-Heksan.

Begitu juga dengan etil asetat dan fraksi air replikasi 3 kali (Mega, 2017). Fraksi *n*-Heksan, etil asetat, dan air yang diperoleh dari ekstrak etanol daun sirsak secara perkolasi diuji secara mikrobiologi terhadap *Bacillus subtilis* ATCC 6633 dengan metode difusi. Media MHA ditambahkan 11,5 gram dilarutkan dalam aquadest 300 ml dan dipanaskan hingga mendidih sehingga serbuk MHA terlarut. Pada media tersebut kertas cakram direndam dengan ekstrak etanol daun sirsak, fraksi *n*-Heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air dengan 4 konsentrasi 6,25%, 12,5%, 25%, 50%. kontrol positif 0,1% dan kontrol negatif. Daerah yang tidak ditumbuhi bakteri sekitar kertas cakram menandakan bahwa kandungan kimia daun sirsak memiliki daya hambat terhadap *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

Metode dilusi yang akan digunakan untuk mengetahui konsentrasi terendah sediaan yang dapat membunuh bakteri uji. Metode ini akan menggunakan 1 deretan tabung reaksi dari 6 tabung steril dengan interval pengenceran dua kali secara aseptis. Masing-masing tabung tersebut mempunyai beberapa konsentrasi pengenceran yaitu konsentrasi 6,25%, 12,5%, 25%, 50%. Seluruh tabung diinkubasi pada suhu kamar selama 24 jam, lalu diamati kekeruhannya. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ditentukan dengan cara tabung media yang jernih diinokulasi secara goresan pada media selektif diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ditunjukkan oleh konsentrasi terendah pada media *Muller Hinton Agar* (MHA) yang tidak menunjukkan koloni bakteri yang tumbuh dan pengujian dilakukan 3 kali replikasi.

Analisis data untuk membandingkan aktivitas antibakteri ekstrak etanol, fraksi *n*-Heksan, etil asetat, air dan kontrol positif hasil difusi daun sirsak (*Annona muricata L.*) terhadap *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Sebelum analisis data, dilakukan uji normalitas (*Shapiro-Wilk*) dan homogenitas (*Post Hoc Test*) dengan metode *Turkey* untuk mengetahui apakah data yang akan dianalisis berdistribusi normal atau tidak.

HASIL

Hasil Pembuatan Ekstrak Maserasi Daun Sirsak

Pembuatan ekstrak maserasi daun sirsak dengan berat serbuk 111.5 gram dapat menghasilkan ekstrak pekat sebesar 602 gram dan rendemen sebesar 53%.

Fraksinasi

Tabel 1. Hasil Rendemen Fraksi *n*-Heksan, Etil asetat dan Fraksi Air

Pelarut	Bobot Ekstrak (g)	Bobot Fraksi (g)	Rendemen (%)
<i>n</i> -Heksana	20 (g)	4,02 (g)	20,1 %
Etil asetat	20 (g)	4,36 (g)	21,8 %
Air	20 (g)	9,47 (g)	47,35 %

Berdasarkan data rendemen yang tertera diatas, fraksinasi ekstrak etanol daun sirsak memperlihatkan bahwa fraksi polar mengandung lebih banyak senyawa terlarut dibandingkan fraksi semi-polar dan non-polar. Rendemen dianggap memadai jika lebih dari 10% (*'Ulya et al.*, 2022). sehingga semakin tinggi rendemen maka semakin banyak ekstrak juga yang berhasil diperoleh.

Hasil Uji Identifikassi Kandungan Senyawa Ekstrak Daun Sirsak

Tabel 2. Identifikasi Senyawa Ekstrak Daun Sirsak

Golongan senyawa	Uji	Hasil dan keterangan	Pustaka
Flavonoid	Ekstrak + metanol + serbuk Mg + 1 ml HCl pekat	(+) terbentuknya warna jingga pada lapisan amil alkohol	Reaksi positif ditunjukkan dengan warna merah, kuning, jingga pada amil alkohol (Hafiz <i>et al.</i> , 2020).
Alkaloid	Ekstrak + 1 ml HCl 2N + air panas didinginkan, bagi 3 tabung + masing-masing pereaksi mayer, wagner, dragendorff	(+) Mayer : terbentuk endapan putih (+) wagner terbentuk adanya endapan kecoklatan (+) dragendroff terbentuk adanya endapan merah	mayer terbentuk endapan menggumpal berwarna putih atau kuning dan dengan dragendorf terbentuk endapan berwarna coklat sampai hitam, maka ada kemungkinan terdapat alkaloid (Widiastuti, <i>et al</i> 2017).
Tanin	Ekstrak + FeCl ₃ 10% + dikocok	(+) terdapat warna hijau kehitaman	biru tua atau hijau kehitaman maka menunjukkan adanya tanin (Widiastuti, 2017)
Fenolik	Ekstrak + 10 ml aquadest + 3 tetes Fecl ₃ .	(+) terdapat warna hijau hitan saat ditambahkan Fecl ₃	biru hitam dengan penambahan larutan FeCl ₃ (Chandra <i>et al.</i> , 2019).
Terpenoid	Ekstrak + kloroform + anhidrida asetat + ml H ₂ SO ₄ pekat	(+) terbentuknya cincin kecoklatan pada perbatasan pelarut	Terbentuknya cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan larutan menunjukkan adanya triterpenoid (Viera Valencia & Garcia Giraldo, 2019).
Saponin	Ekstrak + air panas didinginkan, kocok 30 detik biarkan dalam posisi tegak (30 menit)	(+) terdapat buih saat ditambahkan HCl 2N	Terbentuknya buih yang mantap selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1 cm sampai 10 cm. Pada penambahan 1 tetes asam klorida 2N buih tidak hilang (Widiastuti, 2017).

Keterangan :

(+) = mengandung golongan senyawa

(-) = tidak mengandung golongan senyawa

Berdasarkan pada tabel dapat dilihat hasil penelitian uji fitokimia pada ekstrak daun sirsak (*Annona muricata L.*) menunjukkan bahwa mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, tanin, saponin, fenolik, dan terpenoid.

Hasil Pengujian Aktivitas Antibakteri Secara Difusi

Berdasarkan pada tabel 3 daerah zona hambat *Bacillus subtilis* ATCC 6633 pada ekstrak etanol daun sirsak. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun sirsak menunjukan bahwa fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air pada konsentrasi 50% dan 25% menunjukkan memiliki daya

hambat lebih efektif aktivitas antibakteri terhadap *Bacillus subtilis* dibandingkan konsentrasi lebih rendah. Kloramfenikol digunakan sebagai K+ dan pelarut DMSO 1% sebagai K- Hasil zona hambat uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun sirsak. Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata L.*) fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan fraksi air terhadap bakteri uji menunjukkan daya hambat yang ada pada sekitaran cakram yang tidak ditumbuhi bakteri.

Tabel 3. Hasil Pengujian Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Sirsak Secara Difusi

Tabel 5. Hasil Pengujian Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Sirih Secara Difusi							
Bahan uji	Konsentrasi	Daya hambat (mm)			Kategori		
		1	2	3		Rata-rata (mm)	
Fraksi Heksana	n-	50%	26	26	26	26,00	Kuat
		25%	24	23	24	23,66	Kuat
		12,5%	20	19	18	19,00	Kuat
		6,25%	11	11	10	10,66	Lemah
Fraksi asetat	etil	50%	24	24	23	23,66	Kuat
		25%	20	22	20	20,66	Kuat
		12,5%	15	15	16	15,33	Lemah
		6,25%	9	10	9	9,66	Lemah
Fraksi air		50%	23	23	24	23,33	Kuat
		25%	18	17	18	17,66	Sedang
		12,55	16	15	15	15,33	Lemah
		6,25%	11	12	11	12,66	Lemah
Ekstrak etanol		50%	24	24	23	23,66	Kuat
		25%	19	20	20	19,66	Sedang
		12,5%	17	16	17	16,66	Sedang
		6,25%	10	8	10	9,33	Lemah
Kontrol (+) kloramfenikol			20	22	20	20,66	Kuat
			25	23	23	23,66	Kuat
			20	22	20	20,66	Kuat
			21	20	22	21,00	Kuat
Kontrol (-) 1% DMSO			0	0	0	0,00	Tidak ada
			0	0	0	0,00	Tidak ada
			0	0	0	0,00	Tidak ada
			0	0	0	0,00	Tidak ada

Hasil Pengujian Aktivitas Antibakteri Secara Dilusi

Tabel 4. Hasil Pengujian Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Sirsak Secara Dilusi

Bahan uji	Konsentrasi %	Replikasi		
		1	2	3
Fraksi <i>n</i> -Heksana	50%	-	-	-
	25%	-	-	-
	12,5%	+	+	+
	6,25%	+	+	+
Fraksi etil asetat	50%	-	-	-
	25%	-	-	-
	12,5%	+	+	+
	6,25%	+	+	+
Fraksi air	50%	-	-	-
	25%	-	-	-
	12,55	+	+	+
	6,25%	+	+	+
Ekstrak etanol	50%	-	-	-
	25%	-	-	-

	12,5%	+	+	+
	6,25%	+	+	+
Kontrol (+)		+	+	+
Kontrol (-) 1% DMSO		-	-	-

Keterangan :

+ : Ada pertumbuhan koloni bakteri pada media

- : Tidak ada pertumbuhan koloni bakteri pada media

K (+) : kontrol positif berisi suspensi bakteri

K (-) : kontrol negatif berisi larutan suspensi *Bacillus subtilis*

Berdasarkan tabel 4 menunjukkan bahwa konsentrasi larutan sampel fraksi teraktif dimasukan 1 ml kedalam media BHI lalu, dimasukan dari tabung 2 sampai tabung 5, secara aseptik masuk kedalam tabung 1 Seluruh tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, lalu diamati kekeruhannya. KBM ditentukan dengan cara tabung media yang jernih diinokulasi secara goresan pada media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Mengamati ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri pada permukaan media selektif. KBM ditunjukkan oleh konsentrasi terendah pada media MHA yang tidak menunjukan koloni bakteri yang tumbuh. Dari data dilusi bakteri *Bacillus subtilis*, maka didapatkan nilai Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Aktivitas antibakteri terhadap *Bacillus subtilis* ATCC 6633 dengan konsentrasi 50%; 25%; 12,5%; 6,25%. Pengujian tersebut dilakukan tiga kali replikasi, hasil pengamatan pada ekstrak etanol, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan air dengan konsentrasi 12,5% 6,25%. terlihat adanya bakteri, sedangkan pada konsentrasi 50%, 25% tidak terlihat pertumbuhan bakteri begitu pula pada replikasi kedua dan ketiga, sehingga dapat disimpulkan bahwa memiliki nilai Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) 50% dan 25%.

PEMBAHASAN

Metode ekstraksi pada penelitian ini menggunakan metode maserasi. Metode maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari yang akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Maserasi dilakukan dengan menggunakan pelarut etanol 96%. Proses maserasi dilakukan 3 kali 24 jam dengan 2 kali 24 jam remaserasi atau pergantian pelarut baru yang bertujuan agar senyawa yang terdapat didalam sampel dapat terekstrak secara menyeluruh. Hasil maserasi selanjutnya dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 50°C dan dikentalkan menggunakan *waterbath* sehingga didapat ekstrak etanol Pembuatan ekstrak maserasi daun sirsak dengan berat serbuk 111.5 gram dapat menghasilkan ekstrak pekat sebesar 602 gram dan rendemen sebesar 53%.

Hasil penelitian uji fitokimia pada ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) menunjukkan bahwa mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, tanin, saponin, fenolik, dan terpenoid. Fraksinasi adalah prosedur pemisahan yang bertujuan memisahkan golongan utama kandungan yang satu golongan utama, pemisahan senyawa berdasarkan perbedaan kepolarannya. Fraksinasi dilakukan dengan ekstraksi cair-cair menggunakan pelarut *n*-Heksan, etil asetat, dan air. Fraksinasi dilakukan dengan cara menimbang 20 gram ekstrak etanol daun sirsak dari hasil maserasi kemudian difraksinasi dengan pengulangan 3 kali dan fraksinasi dilakukan menggunakan 3 pelarut berdasarkan polaritasnya, pelarut non polar yang digunakan adalah *n*-Heksan, pelarut semi polar etil asetat dan sebagai pelarut polar adalah air untuk dilakukan fraksinasi Rendemen dinyatakan baik jika nilainya lebih dari 10%. Semakin tinggi nilai rendemen, maka semakin banyak ekstrak yang dihasilkan. Rendemen juga berkaitan dengan kandungan bioaktif dalam bahan baku. Semakin tinggi rendemen, maka semakin tinggi kandungan zat yang tertarik pada bahan baku (Senduk et al., 2020). Hasil rendemen fraksinasi berbeda dari banyaknya senyawa yang terkandung di dalam daun sirsak.

Suspensi *Bacillus subtilis* diambil menggunakan jarum ose steril dan dibuat suspensi dalam tabung reaksi yang berisi larutan NaCl 0,9% dan kekeruhannya disamakan dengan kekeruhan 0,5 Mc Farland yang menunjukkan jumlah sel bakteri, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Metode difusi cakram digunakan pada pengujian aktivitas antibakteri pada penelitian ini dan media yang digunakan adalah *Mueller Hinton Agar* (MHA). Hasil fraksi *n*-Heksan, etil asetat, dan air dari daun sirsak dilakukan pengujian aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Bacillus subtilis* ATCC 6633 untuk mengetahui fraksi yang paling aktif. Pengujian aktivitas antibakteri dari fraksi ekstrak daun sirsak dilakukan pada bakteri uji dengan konsentrasi 50%, 25%, 12,5% dan 6,25% perbandingan kontrol positif kloramfenikol, kontrol negatif DMSO 1%. Media uji yang digunakan MHA disterilkan pada suhu 121°C selama 15 menit, kemudian dimasukkan ke cawan petri dan dibiarkan memadat. Kertas cakram kosong direndam pada masing-masing konsentersasi ekstrak dan fraksi. Cakram yang sudah direndam selanjutnya diletakkan diatas media dan diberi label. Daerah yang tidak ditumbuhi bakteri disekitar cakram menandakan bahwa kandungan ekstrak daun sirsak dan fraksi teraktif memiliki daya hambat terhadap bakteri uji.

Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun sirsak pada tabel menunjukkan bahwa fraksi *n*-Heksan, etil asetat dan air pada konsentrasi 50% dan 25% memiliki daya hambat lebih efektif terhadap *Bacillus subtilis* dibandingkan konsentrasi lebih rendah. Kloramfenikol digunakan sebagai K+ dan pelarut DMSO 1% sebagai K-. Hasil zona hambat uji aktivitas antibakteri etil asetat daun sirsak fraksi *n*-Heksana memiliki zona hambat yang lebih besar daripada fraksi lain karena *n*-Heksana dapat menarik senyawa non-polar pada ekstrak. *n*-Heksana juga merupakan pelarut yang baik untuk mengekstrak senyawa non-polar karena stabil, dan selektif. Aktivitas antibakteri terhadap *Bacillus subtilis* ATCC 6633 dengan konsentrasi 50%; 25%; 12,5%; 6,25%. Pengujian tersebut dilakukan tiga kali replikasi, hasil pengamatan pada ekstrak etanol, fraksi *n*-Heksan, fraksi etil asetat dan air dengan konsentrasi 12,5% 6,25% terlihat adanya bakteri, sedangkan pada konsentrasi 50%, 25% tidak terlihat pertumbuhan bakteri begitu pula pada replikasi kedua dan ketiga, sehingga dapat disimpulkan bahwa memiliki nilai Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) 6,25%.

Untuk mengetahui signifikansi analisi data yang diperoleh dari hasil pengujian aktivitas antibakteri dengan metode difusi secara statistik *Analisis Of Varians* (Anova) *one way* untuk membandingkan fraksi pada setiap konsentrasi 50%, 25%, dan 12,5% dan 6,25% ekstrak etanol fraksi *n*-Heksan, etil asetat dan air. Maka dilakukan analisis data menggunakan SPSS 26 dengan uji normalitas (*Shapiro-Wilk*) dan homogenitas (*Post Hoc Test*) dengan metode *Turkey* untuk mengetahui apakah data yang akan dianalisis berdistribusi normal atau tidak. Sementara, apabila data berdistribusi tidak normal maka uji yang dapat digunakan adalah uji *Kruskal Wallis* (James W, Elston D, 2020). Hasil uji normalitas data *Shapiro-Wilk* untuk daya hambat pada *Bacillus subtilis* ATCC 6633 diperoleh signifikansi $p > 0,05$ maka hasil dapat diterima dan terdistribusi normal. Hasil probabilitas statis replikasi 1 hingga replikasi 3 yaitu menunjukkan bahwa $\text{sign} > 0,05$ maka menunjukkan bahwa H_0 diterima. Tujuan untuk melihat data zona hambat setiap perlakuan terdistribusi normal atau tidak (data sampel < 25 menggunakan *Shapiro-Wilk*).

Hasil uji *anova oneway* pada tabel diameter hambat didapatkan hasil F replikasi 1 = 98,473 dan hasil F replikasi 2 = 117,792 dan hasil F replikasi 3 = 149,284 dengan probabilitas $0,000 < 0,05$ hasil ekstrak dan fraksi teraktif tersebut menunjukan adanya perbedaan nyata pada penghambatan aktivitas antibakteri *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Selanjutnya uji pengolahan data *Test of homogeneity of variance* untuk menguji apakah sample yang diambil memiliki varians yang sama dan terdistribusi homogen atau tidak. Uji homogenitas dilakukan dengan pengolahan data *Test of homogeneity of variance* untuk menguji apakah sample yang diambil memiliki varians yang sama. Replikasi 1 sebesar $0,177 > 0,05$, dan untuk replikasi 2 sebesar $0,107 > 0,05$, untuk replikasi 3 sebesar $0,099 > 0,05$ maka nilai rata-rata antara

perbandingan berbeda makna. Selanjutnya dilakukan uji homogenitas dengan nilai yang signifikan. Uji *One Way Anova* yang diperoleh nilai untuk Selanjutnya hasil uji *post hock* yang akan menunjukkan nilai $p > 0,05$ berarti data tersebut signifikansi atau berbeda dengan konsentrasi lain untuk mengetahui data daya zona hambat mana yang relatif sama atau berbeda.

Uji *post hock* menunjukkan diameter zona hambat *Bacillus subtilis* ATCC 6633 pada perbandingan konsentrasi 50%, 25%, 12,5% dan 6,25% memiliki perbedaan yang bermakna terhadap kontrol positif dan kontrol negatif. Nilai $\text{sign} < 0,05$ antar perlakuan memiliki perbedaan nilai daya hambat. Berdasarkan tabel *turkey test* dan dapat dijelaskan bahwa ada tanda (*) pada *Mean Difference*, maka perbedaan tersebut signifikan dengan maksud memiliki perbedaan diameter penghambatan aktivitas antibakteri, sedangkan tidak ada tanda (*) maka perbedaan signifikan dengan maksud tidak memiliki perbedaan diameter penghambatan aktivitas antibakteri. Selanjutnya hasil uji *Homogeneous Subsets* untuk mengetahui urutan perlakuan yang memiliki zona hambat paling besar.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol 96% fraksi *n*-Heksan, etil asetat dan fraksi air dari daun sirsak (*Annona muricata* L.) memiliki daya zona hambat terhadap *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Nilai KHM ekstrak etanol 96% dengan nilai rata-rata konsentrasi 50% sebesar 23,66 mm, fraksi *n*-Heksan dengan nilai rata-rata konsentrasi 50% sebesar 26,00 mm dan fraksi etil asetat memiliki aktivitas antibakteri dengan nilai rata-rata konsentrasi 50% sebesar 23,66 mm, dan fraksi air dengan nilai rata-rata konsentrasi 50% sebesar 23,33 mm, dengan perbandingan nilai daya hambat kontrol positif antibiotik kloramfenikol sebesar 21,00 mm. Nilai KBM dari ekstrak etanol 96% fraksi *n*-Heksan, etil asetat, dan fraksi air dari ekstrak daun sirsak terhadap *Bacillus subtilis* ATCC 6633 terdapat pada konsentrasi 12,5% dan 6,25%. Aktivitas antibakteri yang mempunyai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) yang paling luas terhadap *Bacillus subtilis* ATCC 6633 yaitu fraksi *n*-Heksan dengan konsentrasi sebesar 26 mm dan yang mempunyai Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) terhadap *Bacillus subtilis* ATCC 6633 yaitu konsentrasi 12,5% dan 6,25%.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Universitas Duta Bangsa Surakarta yang mana telah memberikan izin penelitian sehingga penelitian ini bisa terlaksana dengan baik hingga selesai.

DAFTAR PUSTAKA

- 'Ulya, K. H., Listyani, T. A., & Wardani, T. S. (2022). Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi *n*-HEKSAN, FRAKSI ETIL ASETAT DAN FRAKSI AIR BIJI PEPAYA (*Carica Papaya* L.) TERHADAP BAKTERI *Salmonella Typhi* ATCC 13311. *Jurnal Jamu Kusuma*, 2(2), 89–95.
- Admin. (2017). POTENSI ANTIBAKTERI DAN ANTICANDIDA EKSTRAK ETANOL DAUN PEGAGAN (*Centella Asiatica* (L) Urb.). *Jurnal Ilmu Kesehatan Bhakti Setya Medika*, 1(L).
- Chandra, B., Sari, R. P., Misfadhila, S., Azizah, Z., & Asra, R. (2019). SKRINING FITOKIMIA DAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK METANOL DAUN KEMANGI (*Ocimum Tenuiflorum* L.) DENGAN METODE DPPH (1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil).
- Fibonacci, A., & Hulyadi, H. (2018). Uji Aktivitas Antimikroba Daun Sirsak (*Annona muricata*

- L.) Terhadap *Bacillus subtilis* dan *Escherichia coli*. *Walisongo Journal of Chemistry*, 1(1), 14.
- Fitriyanti, Pratama, A. S., & Astuti, K. I. (2019). Uji Efektivitas Antibakteri Infusa Daun Sirsak Tua (*Annona muricata* L.) Terhadap *Propionibacterium acnes*. *Jurnal Penelitian Dan Kajian Ilmiah*, 5(2), 91–96.
- Hamizah, H. M. (2023). *Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat dan n-Heksana Buah Lerak (Sapindus rarak) Hasil Ekstraksi Sonikasi Terhadap Bakteri Staphylococcus dan Escherichia coli*.
- Hasanah, M., & Wahyuni, P. (2018). Analisis Kloramfenikol dalam Sampel Sediaan Tetes Telinga di Kota Palembang dengan Metode Kromatografi Cair Kinerja Tinggi. *Jurnal Penelitian Sains*, 20(1), 30–35.
- Irmawati, I. (2019). Uji Aktifitas Antibakteri Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata*) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* Secara In Vitro. *Teknosains: Media Informasi Sains Dan Teknologi*, 12(1), 19–26.
- James W, Elston D, T. J. Et al. (20 C.E.). *Andrew's Disease of the Skin Clinical Dermatology*, 1(Random 1), 33–44.
- Meitania Utami, S., Andriati, R., & Hamdiah, S. (2022). Studi Literatur Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) Terhadap Berbagai Sampel Bakteri. *PHRASE (Pharmaceutical Science) Journal*, 2(1), 107–115.
- Monica Sandy, Siska Wardani, T., & Dwi Septiarini, A. (2021). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak, Fraksi N-Heksan, Fraksi Etil Asetat, Fraksi Air Daun Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urb) Terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922. *Media Farmasi Indonesia*, 16(2), 1683–1692.
- Puspitasari, M. L., Wulansari, T. V., Widyaningsih, T. D., & Mahar, J. (2016). Aktivitas Antioksidan Suplemen Herbal Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) Dan Kulit Manggis (*Garcinia mangostana* L.): Kajian Pustaka Antioxidant Activity Herbal Supplements of Soursop Leaf (*Annona muricata* L.) And Pericarp of Mangosteen (*Garcinia man*). *Pangan Dan Agroindustri*, 4(1), 283–290.
- Rizky, V. A., Siregar, S., Krisdianilo, V., & Khadijah, S. (2024). VOLUME 9 *Staphylococcus epidermidis* THE EFFECTIVENESS OF HAND ANTISEPTIC GEL PREPARATION OF SOURSOP LEAF EXTRACT *Annona muricata* linn AS ANTIBACTERIAL. 9, 105–112.
- Senduk, T. W., Montolalu, L. A. D. Y., & Dotulong, V. (2020). The rendement of boiled water extract of mature leaves of mangrove *Sonneratia alba*. *Jurnal Perikanan Dan Kelautan Tropis*, 11(1), 9.
- Senja, R. Y., Didi Rohadi, & Risa Rusliani. (2023). Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) Terhadap *Staphylococcus epidermidis*. *Medimuh : Jurnal Kesehatan Muhammadiyah*, 4(2), 119–126.
- Setyaningrum, E. (2018). *Aktivitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat Daun Sirsak (Annona muricata L.) Terhadap Pertumbuhan Staphylococcus aureus*.
- Sugiarto. (2016). 4(1), 1–23.
- Viera Valencia, L. F., & Garcia Giraldo, D. (2019). *Angewandte Chemie International Edition*, 6(11), 951–952., 2.
- Warnis, M., Aprilina, L. A., & Maryanti, L. (2020). Pengaruh Suhu Pengeringan Simplisia Terhadap Kadar Flavonoid Total Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera* L.). *Seminar Nasional Kahuripan*, 264–268.