

## Identifikasi Senyawa Bioaktif dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) sebagai Inhibitor *Propionibacterium acne*

### **IDENTIFICATION OF BIOACTIVE COMPOUND AND ANTIBACTERIAL ACIVITY OF NONI FRUIT (*MORINDA CITRIFOLIA* L.) EXTRACT AS INHIBITOR PROPIONIBACTERIUM ACNE**

Sogandi\*, Mega Fitrianingrum, dan Astari Thursina  
Fakultas Farmasi, Universitas 17 Agustus 1945 Jakarta,  
Jl Sunter Karya-Sunter, Jakarta Utara, DKI Jakarta 14356  
\*Email: Sogandi@uta45jakarta.ac.id

*Submitted : 27-02-2020, Revised : 05-03-2020, Revised : 13-03-2019, Accepted : 29-03-2020*

#### **Abstract**

*Acne is a skin problem that troubles the sufferers because it could reduce confidence. One of the causes of acne is the growth of *Propionibacterium acnes* in the skin. Common acne medication is antibiotic, but it's starting to be abandoned because it could cause resistance. The purpose of the present study was to determine the inhibitory activity and bioactive compound of Noni leaves extract which could inhibit the growth of one of the bacteria which causes acne, i.e. *Propionibacterium acne*. Extraction was performed by maceration using 96% ethanol, then multilevel fractionation using *n*-hexane, chloroform, and ethyl acetate solvents. Antibacterial activity was measured by measuring MIC (Minimum Inhibitory Concentration) 2%, 4%, 6%, 8%, and 10% value and the formed inhibition zone. The bioactive compound was identified from the most active fraction by GC-MS (Gas Chromatography-Mass Spectrophotometry). The research result showed that the lowest MIC value was chloroform fraction with 4% concentration and average inhibition zone of 24.13 mm. The chloroform fraction of Noni leaves extract contains a terpenoid group of squalene (13.32%), palmitic acid group of *n*-hexadecanoic acid (13.17%), pyridine-3-carboxamide, oxime, alkaloid group of *n*-(2-trifluoromethylphenyl) (8.05), and steroid group of beta-sitosterol (7.19%).*

*Keyword: antibacterial, bioactive, chloroform fraction, Noni leaves, *Propionibacterium acne**

#### **Abstrak**

Jerawat merupakan penyakit kulit yang cukup merisaukan bagi beberapa penderita karena dapat menurunkan rasa percaya diri. Salah satu penyebab tumbuhnya jerawat adalah adanya pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acne* di kulit. Obat jerawat yang sering digunakan adalah antibiotik, tetapi penggunaan antibiotik mulai ditinggalkan karena dapat menimbulkan resistensi. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas inhibisi dan senyawa bioaktif ekstrak daun mengkudu yang dapat menghambat pertumbuhan salah satu bakteri penyebab jerawat *Propionibacterium acne*. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan etanol 96%, kemudian difraksinasi bertingkat dengan pelarut *n*-heksan, kloroform, dan etil asetat. Aktivitas antibakteri dilakukan dengan mengukur nilai KHM (Kadar Hambat Minimal) pada konsentrasi 2%, 4%, 6%, 8% dan 10% dengan zona hambat yang terbentuk. Identifikasi senyawa bioaktif dari fraksi paling aktif dilakukan dengan GC-MS (*Gas Chromatography Mass Spektrophotometry*). Hasil penelitian menunjukkan nilai KHM terendah terdapat pada fraksi kloroform dengan konsentrasi 4% dan memiliki rata-rata zona hambat yang terbentuk adalah 24,13 mm. Fraksi kloroform ekstrak daun mengkudu mengandung senyawa squalene golongan terpenoid (13,32%), *n*-hexadecanoic acid golongan asam palmitat (13,17%), pyridin-3-carboxamide, oxime, *n*-(2-trifluoromethylphenyl) golongan alkaloid (8,05), dan beta-sitosterol golongan steroid (7,19%).

Kata kunci : antibakteri, bioaktif, fraksi kloroform, daun mengkudu, *Propionibacterium acne*

## PENDAHULUAN

Jerawat sering kali terjadi pada saat pubertas, dengan rentang usia antara 10 sampai 17 tahun pada perempuan dan 14 sampai 19 tahun pada laki-laki.<sup>1</sup> Hampir setiap orang pernah mengalami acne vulgaris dan biasanya dimulai ketika masa pubertas, dan dari survei yang dilakukan Narayenah (2017) bahwa jerawat didominasi oleh perempuan usia 18-20 tahun dan berlokasi di wajah.<sup>2</sup> Jerawat menjadi masalah yang banyak dikhawatirkan oleh kaum muda. Walaupun jerawat bukan sesuatu penyakit yang serius, tetapi jerawat menjadi pertimbangan psikologis karena dapat membuat rasa percaya diri seseorang menurun yaitu 63,6% pada wanita dan 36,4% pada laki-laki.

Patogenesis jerawat meliputi empat faktor, yaitu hiperpoliferasi epidermis folikular sehingga terjadi sumbatan folikel, produksi sebum berlebihan, inflamasi, dan aktivitas *Propionibacterium acnes*. *Propionibacterium acnes* berperan pada patogenesis jerawat dengan menghasilkan lipase yang memecah asam lemak bebas dari lipid kulit. Asam lemak ini dapat mengakibatkan inflamasi jaringan ketika berhubungan dengan sistem imun dan mendukung terjadinya jerawat.<sup>3</sup> Berdasarkan penelitian yang dilakukan Sinnot *et al* (2016) dilaporkan bahwa pasien berjerawat yang menerima pengobatan dengan antibiotik *tetrasiklin* mengalami resistensi 25%, *eritromisin*, *klindamisin* ataupun keduanya juga mengalami resistensi sebesar 80%.<sup>4</sup> Penggunaan antibiotik dalam jangka panjang dapat menyebabkan resistensi bakteri dan kerusakan organ.<sup>5</sup>

Mengkudu diketahui mempunyai aktivitas penghambatan terhadap bakteri penyebab karies gigi *Streptococcus mutans*.<sup>6</sup> Menurut Usha *et al* (2010) ekstrak petroleum eter dan ekstrak air daun mengkudu telah terbukti mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*.<sup>7</sup> Kameswari *et al* (2013) melaporkan perasan daun mengkudu mampu menghambat pertumbuhan *Escherichia coli*, dan menurut Simatupang *et al* (2017) ekstrak etanol 96% daun mengkudu dapat menghambat pertumbuhan jamur *Candida albicans*.<sup>8,9</sup> Tidak hanya ekstrak dari tanaman mengkudu yang memiliki aktivitas antibakteri, metabolit

sekunder dari bakteri endofit yang diisolasi dari buah mengkudu juga diketahui memiliki aktivitas penghambatan terhadap bakteri *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dan *Shigella dysenteriae*.<sup>10</sup> Selain mempunyai aktivitas antibakteri, daun mengkudu juga diketahui memiliki aktivitas sebagai antivirus, antituberkulosis, antitumor, analgesik, hipotensif, imunologi, antikanker, antioksidan, antiinflamasi, dan aktivitas kardiovaskular.<sup>7</sup>

Menurut Sogandi *et al* (2019) buah mengkudu mengandung senyawa kimia golongan alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, steroid, dan senyawa fenol.<sup>6</sup> Selain itu, buah mengkudu juga memiliki kandungan *skopoletin*, *antrakuinon*, *akubin*, dan *alizarin* yang merupakan zat fitokimia dan berperan sebagai antibakteri.<sup>11</sup> Bagian daun mengkudu selain mengandung *alkaloid* (*antrakuinon*, *glikosida*, *resin*), *asam amino*, mineral, dan vitamin yang dapat mempengaruhi pertumbuhan bakteri.<sup>12</sup>

Aktivitas antibakteri ekstrak buah mengkudu terhadap beberapa bakteri sudah diketahui. Namun aktivitas dari ekstrak daun mengkudu, baik fraksi serta kandungan senyawa bioaktifnya dari fraksinya belum diketahui, sehingga penting untuk dilakukan penelitian mengenai identifikasi jenis senyawa kimia yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri penyebab jerawat, *Propionibacterium acne* sebagai alternatif untuk mengatasi jerawat. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui nilai Kadar Hambat Minimum (KHM) dan aktivitas antibakteri dari ekstrak dan fraksi daun mengkudu terhadap bakteri penyebab jerawat *Propionibacterium acne* serta mengetahui jenis senyawa kimia yang berperan sebagai senyawa bioaktif antibakteri penyebab jerawat.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan

Penelitian ini menggunakan daun mengkudu (*Morinda citrifolia* L) yang diperoleh dari Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat (BALITTRO). Bakteri yang digunakan adalah *Propionibacterium acne* ATCC11827 yang diperoleh dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan Jakarta. Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini di antaranya adalah etanol 96%, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>OH, HCl, FeCl<sub>3</sub>, logam Mg,

pelarut amil alkohol, etil asetat, akuades, NaOH, NaCl, DMSO (Dimetil sulfoksida), pereaksi Mayer, Dragendorf, Lieberman-Burchard, BaCl<sub>2</sub> 1%, Serbuk Zn, *Mueller Hinton Agar* (MHA) (Himedia), *Mueller Hinton Broth* (MHB) (Himedia) dan kontrol positif klindamisin.

## Cara Kerja

### Pembuatan Simplisia

Daun mengkudu yang diperoleh dari BALITTRO (Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat) dideterminasi di LIPI (Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia) Cibinong, Bogor. Dari 10 kilogram daun basah yang telah dideterminasi, dikeringkan hingga diperoleh 3000 gram simplisia kering. Simplisia kemudian dihaluskan membentuk serbuk dengan ukuran 40 mesh.<sup>13</sup>

### Ekstraksi Daun Mengkudu

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan cara maserasi. Tiga kilogram serbuk daun mengkudu dibagi menjadi 3 bagian dengan berat masing-masing 1000 gram. Serbuk mengkudu kemudian direndam dalam etanol 96% sebanyak 3 L selama 3x24 jam, dan dilakukan pengocokan sebanyak 3 kali dalam sehari. Filtrat kemudian disaring dan diuapkan menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental.<sup>14</sup>

### Fraksinasi Ekstrak Daun Mengkudu

Ekstrak etanol daun mengkudu difraksinasi secara berturut-turut menggunakan pelarut air, *n-hexan*, *etil asetat* dan *n-butanol*. Diawali dengan fraksi heksan air dimasukkan ke dalam corong pisah hingga diperoleh fraksi heksan dan fraksi air. Fraksi *hexan* dipisahkan, kemudian fraksi air *difraksinasi* kembali menggunakan etil asetat sehingga diperoleh fraksi etil *asetat* dan fraksi air, fraksi etil *asetat* dipisahkan dan fraksi air difraksinasi kembali menggunakan kloroform, diperoleh fraksi kloroform dan fraksi air. Masing-masing hasil fraksi dilakukan proses pemekatan dengan menggunakan *water bath* kemudian semua fraksi dibuat dalam konsentrasi 100mg/mL untuk uji aktivitas antibakteri.<sup>15</sup>

### Pemeriksaan Karakteristik Ekstrak

#### Penentuan Kadar Air

Kadar air ditentukan dengan menimbang 3 gram ekstrak. Sampel dimasukkan ke dalam

oven pada suhu 105°C selama 5 jam, kemudian dikeluarkan dari oven dan didinginkan dalam desikator selama 30 menit, setelah itu sampel ditimbang. Perlakuan ini dilakukan tiga kali pengulangan.<sup>16</sup>

### Perhitungan Rendemen

Perhitungan rendemen ekstrak dengan cara menghitung berat ekstrak kering yang diperoleh terhadap berat serbuk kering sebelum dilakukan ekstraksi.<sup>16</sup>

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{Berat hasil ekstraksi}}{\text{Berat awal simplisia}} \times 100\%$$

### Uji Bebas Etanol

Identifikasi dilakukan dengan cara ekstrak dilarutkan dengan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan asam asetat dan ditutup dengan kapas, dipanaskan sampai mendidih selanjutnya diidentifikasi bau ester pada kapas, jika ekstrak tidak mengandung etanol maka tidak tercium bau ester.<sup>17</sup>

### Kandungan Metabolit Sekunder

#### Pemeriksaan Antrakuinon

Sebanyak 0,5 gram ekstrak dipanaskan dengan 10 mL asam sulfat dan disaring selagi panas. Filtrat kemudian dicampur dengan 5 mL *kloroform*. Lapisan *kloroform* kemudian dipisahkan ke tabung berbeda dan ditambahkan dengan 1 mL NH<sub>4</sub>OH. Jika terjadi perubahan warna, maka positif mengandung antrakuinon.<sup>18</sup>

#### Pemeriksaan Alkaloid

Sebanyak 100 mg ekstrak ditambahkan 5 mL *kloroform*, kemudian tambahkan NH<sub>4</sub>OH saring dan uapkan sampai mengental, tambahkan dengan HCl 2N dan dikocok, mengambil lapisan asam lalu dibagi menjadi 3 bagian, dan memasukkan ke dalam tabung reaksi, dan menambahkan beberapa tetes pereaksi Dragendorf dan Mayer. Hasil positif akan menghasilkan endapan jingga pada pereaksi Dragendorf dan endapan putih pada pereaksi Mayer.<sup>13</sup>

#### Pemeriksaan Saponin

Sebanyak 100 mg ekstrak ditambahkan dengan akuades hingga seluruh sampel terendam, dididihkan selama 3 menit, didinginkan, dan

dikocok kuat-kuat. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya buih yang stabil.<sup>19</sup>

#### **Pemeriksaan Tanin**

Sebanyak 100 mg ekstrak dididihkan dengan 20 mL air lalu disaring, kemudian ditambahkan beberapa tetes FeCl<sub>3</sub> 1%, jika terbentuk warna coklat kehijauan atau biru kehitaman menunjukkan adanya senyawa tannin.<sup>20</sup>

#### **Pemeriksaan Senyawa Fenolik**

Pemeriksaan fenolik dilakukan dengan melarutkan 10 mg ekstrak dengan 2 mL DMSO kemudian ditambahkan 3 tetes FeCl<sub>3</sub>. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan hijau, ungu atau biru.<sup>21</sup>

#### **Pemeriksaan Flavonoid**

Sebanyak 2 mL ekstrak dengan konsentrasi 10 mg/mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, tambahkan serbuk Mg dan 1 mL larutan HCl. Perubahan warna larutan menjadi warna merah jingga sampai merah ungu menunjukkan adanya flavonoida.<sup>22</sup>

#### **Pemeriksaan Steroid dan Triterpenoid**

Pemeriksaan steroid dan triterpenoid dilakukan dengan reaksi Lieberman-Burchard. Sebanyak 2 mL larutan uji dengan konsentrasil 10 mg/mL diuapkan dalam cawan uap. Residu dilarutkan dengan 0,5 mL kloroform, tambahkan 0,5 mL asam asetat. Selanjutnya ditambahkan 2 mL asam sulfat pekat. Terbentuknya cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan larutan menunjukkan adanya *triterpenoid*, sedangkan bila muncul cincin biru kehijauan menunjukkan adanya steroid.<sup>19</sup>

#### **Pemeriksaan Glikosida**

Pemeriksaan glikosida dilakukan dengan melarutkan 20 mg ekstrak dengan 2 mL DMSO (*Dimetil sulfoksida*) kemudian ditambahkan 3 tetes larutan *feri klorida*<sup>22</sup>.

#### **Pembuatan Media**

##### **MHA (Mueller Hinton Agar)**

Media MHA dibuat dengan melarutkan 25 g dengan 1,25 L akuades. Media disterilkan dalam *autoklaf* pada suhu 121°C selama 15 menit.

##### **MHB (Mueller Hinton Broth)**

Sebanyak 8 gram MHB dilarutkan dalam 1 liter air suling, kemudian disterilkan dalam *autoklaf* pada suhu 121°C selama 15 menit.

#### **Pembuatan Larutan Standar *Mc. Farland***

Bakteri *Propionibacterium acne* distandarkan dengan Larutan *Mc Farland*. Larutan terdiri atas dua komponen, yaitu larutan BaCl<sub>2</sub> 1% dan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1%. Sebanyak 0,05 mL larutan BaCl<sub>2</sub> 1% dicampurkan dengan 9,95 mL larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1% dan dikocok hingga tercampur secara merata. Kekeruhan larutan diukur pada panjang gelombang 620 nm. Sebagai blanko digunakan akuades. Nilai *absorban* larutan baku berada di kisaran 0,08 sampai 0,13. Larutan baku *Mc Farland* 0,5 ekuivalen dengan suspensi sel bakteri *Propionibacterium acne* konsentrasi 1,5x10<sup>8</sup> CFU/mL.<sup>23</sup>

#### **Uji Aktivitas Antibakteri**

Bakteri uji *Propionibacterium acne* yang sudah diremajakan sehari sebelumnya diambil 1 mL dan diencerkan dengan 8 mL larutan NaCl 0,9%. Suspensi diambil 3 mL dan dicampurkan dengan media agar bersuhu ± 45°C sebanyak 17 mL. Setelah homogen, campuran media agar dan suspensi bakteri dituangkan ke cawan petri, didiamkan selama 15 menit hingga media agar memadat. Kertas cakram yang sudah dicelupkan dengan sampel ekstrak etanol, fraksi etil asetat, fraksi *n-heksan*, fraksi *klorofom* masing-masing 100 mg/mL, kontrol negatif (akuades), dan kontrol positif *klindamisin* konsentrasi 4µg/mL ditempelkan pada permukaan media agar. Cawan petri diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam, zona bening yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong dan ditetapkan sebagai aktivitas antibakteri.<sup>24</sup>

#### **Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)**

Penentuan Kadar Hambat Minimum dilakukan dengan menggunakan metode dilusi cair. Konsentrasi larutan uji terdiri atas 2%, 4%, 6%, 8%, dan 10% ditambahkan kedalam media *Mueller Hinton Broth* dengan total volume akhir 5 mL, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, kekeruhan yang terjadi diamati. Konsentrasi terendah dari larutan sampel yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri

ditetapkan sebagai Kadar Hambat Minimum. Tabung reaksi yang tampak jernih ditetapkan sebagai nilai KHM.<sup>25</sup>

### Analisis GCMS

Senyawa bioaktif dari fraksi daun mengkudu dengan aktivitas antibakteri tertinggi diidentifikasi menggunakan instrumen GCMS (Agilent Technologies 7890). Jenis kolom yang digunakan adalah HP Ultra 2. *Capillary Column* (30 m × 0.20 mm LD, 0.11 µm *film thickness*) dengan kondisi temperatur kolom 250°C, helium sebagai gas pembawa memiliki laju alir 30 cm/detik, rasio 1/30, temperatur sumber ion 230°C, dan suhu ion permukaan adalah 280 °C.<sup>25</sup>

### HASIL

Penelitian ini diawali dengan determinasi tanaman yang digunakan di lembaga ilmu pengetahuan Indonesia (LIPI) Bogor untuk memastikan bahwa tanaman yang digunakan benar spesies tanaman mengkudu (*Morinda citrifolia* L). Berdasarkan sertifikat determinasi tanaman dengan nomor B-386/IPH.3/KS/II/2019 hasil determinasi menunjukkan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah benar dari spesies (*Morinda citrifolia* L).

Proses ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi. Hasil maserasi simplisia serbuk daun mengkudu sebanyak 1000 gram menghasilkan ekstrak etanol sebanyak 76,6 gram dengan berat rendemen yang diperoleh adalah 7,66%, dan kadar air sebesar 8,27%. Penggunaan etanol 96% sebagai cairan penyari dalam penelitian ini dengan tujuan agar tidak ada zat aktif yang rusak oleh proses pemanasan karena metode maserasi merupakan metode ekstraksi dengan cara dingin. Menurut Tiwari *et al* (2011) etanol 96% lebih efisien dalam mendegradasi dinding sel, sehingga metabolit sekunder akan tersari lebih banyak dibandingkan dengan konsentrasi 70%. Etanol 96% juga lebih meminimalisir kontaminasi dan pertumbuhan mikroorganisme lain pada ekstrak karena hanya mengandung 4% air.<sup>19</sup> Kadar air ditetapkan untuk menjaga kualitas dari ekstrak, kadar air dapat mempengaruhi sifat-sifat fisik seperti kekerasan, kekeringan dan sifat fisiko-kimia serta perubahan kimia seperti pencoklatan enzimatis, kerusakan mikrobiologis serta perubahan enzimatis.<sup>26</sup>

Senyawa kimia yang terkandung dalam ekstrak etanol, etil asetat, n-heksan dan kloroform daun mengkudu terlihat dari hasil skrining secara kualitatif yang ditunjukkan pada Tabel 1.

**Tabel 1. Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol dan Fraksi Daun Mengkudu**

Pengujian	Hasil			
	Ekstrak etanol	Fraksi etil asetat	Fraksi n-heksan	Fraksi kloroform
Antrakuinon	+	-	+	+
Alkaloid	+	+	+	+
Tanin	+	-	-	-
Flavonoid	+	+	+	+
Steroid	+	-	-	+
Triterpenoid	+	+	+	+
Saponin	+	+	+	+
Fenolik	+	-	+	+

Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ekstrak etanol dan fraksi dari daun mengkudu terhadap bakteri *Propionibacterium acne* disajikan pada Tabel 2. Uji aktivitas anti bakteri ini ditentukan dengan metode difusi agar dengan cara mengukur zona hambatnya. Hasil diameter zona hambat disajikan pada Tabel 3.

**Tabel 2. Hasil Pengamatan Nilai KHM**

Fraksi	Konsentrasi (%)				
	2	4	6	8	10
Etanol	+++	++	++	++	-
Etil Asetat	++	++	+	+	-
Kloroform	+	-	-	-	-
N-heksan	+++	+	+	-	-

Keterangan:

- : tidak terdapat pertumbuhan bakteri
  - +
  - ++
  - +++
- : terdapat pertumbuhan bakteri intensitas lemah  
 : terdapat pertumbuhan bakteri intensitas sedang  
 : terdapat pertumbuhan bakteri intensitas banyak

**Tabel 3. Zona Hambat Ekstrak Etanol dan fraksi Daun Mengkudu Terhadap *Propionibacterium acne***

Fraksi	Zona hambat (mm) ± SD
K (+) Klindamisin 4µg/mL	29,76 ± 0,17
K (-) Akuades	-
Ekstrak Etanol 100mg/mL	7,20 ± 0,08
Etil asetat 100mg/mL	9,15 ± 0,12
Kloroform 100mg/mL	24,13 ± 0,12
N-heksan 100mg/mL	16,45 ± 0,11

Identifikasi jenis senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam fraksi yang memiliki aktivitas tertinggi dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acne* yaitu fraksi kloroform diidentifikasi menggunakan instrumen GCMS, hasil identifikasi menunjukkan terdapat 4 senyawa yaitu *n-hexadecanoic acid* (13,37%), *Squalene* (13,32%), *Pyridin-3-carboxamide, oxime, N-(2-trifluoromethylphenyl)* (8,05%), dan Beta – sitosterol (7,19%).

**Tabel 4. Hasil Identifikasi Fraksi Kloroform Daun Mengkudu**

Nama Senyawa	Kelimpahan (%)	Golongan
<i>n-hexadecanoic acid</i>	57,04	Asam Palmitat
<i>Squalene</i>	26,18	Terpenoid
<i>Pyridin-3-carboxamide, oxime, N-(2-trifluoromethylphenyl)</i>	14,61	Alkaloid
<i>Beta-sitosterol</i>	2,17	Steroid

## PEMBAHASAN

### Ekstraksi

Simplisia daun mengkudu diekstraksi dengan metode maserasi. Maserasi adalah salah satu metode ekstraksi secara dingin dengan tujuan agar tidak ada zat aktif yang rusak oleh proses pemanasan. Proses ini sangat menguntungkan dalam isolasi bahan alam karena dengan proses maserasi menggunakan etanol 96% tersebut akan terjadi pemecahan dinding sel yang diakibatkan oleh adanya perbedaan tekanan antara di dalam dengan diluar sel, sehingga metabolit sekunder yang ada di sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik. Pemilihan pelarut untuk proses maserasi dapat memberikan efektivitas yang tinggi dengan memperhatikan kelarutan senyawa bahan alam pelarut tersebut.<sup>22</sup> Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi adalah pelarut etanol yang memiliki sifat polar sehingga dapat menarik senyawa metabolit sekunder yang juga bersifat polar.

### Uji Bebas Etanol

Hasil ekstraksi menggunakan pelarut etanol yang diperoleh dalam penelitian ini dilakukan uji bebas etanol dengan tujuan untuk memastikan bahwa ekstrak kental hasil maserasi yang akan digunakan sebagai sampel dalam pengujian aktivitas antibakteri ini sudah bebas

dari sisa pelarut etanol, karena etanol bersifat sebagai antibakteri dan antifungi sehingga tidak akan menimbulkan positif palsu pada perlakuan sampel nantinya. Dari hasil pengujian diketahui bahwa sampel sudah bebas dari etanol dengan ditandai tidak terciumnya bau ester setelah mereaksikan ekstrak dengan asam sulfat dan asam asetat yang dipanaskan.

### Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Ekstrak Etanol dan fraksi Daun Mengkudu

Konsentrasi hambat minimum dari ekstrak etanol dan fraksi daun mengkudu menunjukan adanya daya penghambatan terhadap bakteri *Propionibacterium acne*. Berdasarkan data pada Tabel 2 ekstrak etanol dan fraksi etil asetat diketahui pada konsentrasi 10% yang setara dengan konsentrasi ekstrak sebesar 10 mg/mL ini sudah mampu menghambat pertumbuhan bakteri yang ditunjukkan dengan warna larutan media masih jernih. Fraksi *n-heksan* memiliki konsentrasi hambat minimum pada konsentrasi 8%, dan pada fraksi *kloroform* konsentrasi hambat minimum diketahui sebesar 4%. Konsentrasi hambat minimum yang terendah terdapat pada fraksi kloroform, karena pada konsentrasi 4% sudah dapat menghambat pertumbuhan bakteri ditandai dengan warna larutan media yang tetap jernih setelah diinkubasi. Adanya perbedaan kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri dari masing- masing fraksi ini diduga disebabkan adanya perbedaan kandungan senyawa yang terekstraksi pada masing-masing pelarut. Berdasarkan data skrining fitokimia (Tabel.1) senyawa yang terekstraksi pada fraksi *kloroform* lebih banyak dibandingkan dengan senyawa yang terekstraksi pada fraksi etil *asetat*, dan *n-heksan*.

Hasil pengukuran nilai KHM ini berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Miratunnisa (2015) bahwa ekstrak etanol kulit kentang memiliki nilai KHM sebesar 5% terhadap pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acne*.<sup>27</sup> Menurut Fauzi (2017) fraksi teraktif dari ekstrak daun Jawer Kotok terhadap bakteri *Propionibacterium acne* adalah fraksi *n-heksan* dengan nilai KHM berkisar antara 0,78% - 0,0487% b/v dan nilai KBM 1,56% b/v.<sup>28</sup> Menurut Marselia (2015) fraksi teraktif dari daun Soma (*Ploiarium alternifolium*) dalam

menghambat pertumbuhan bakteri penyebab jerawat, *Propionibacterium acne* adalah fraksi metanol dengan nilai KHM 9,45mg/mL.<sup>29</sup>

### Aktivitas Antibakteri

Aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol dan fraksi daun mengkudu terhadap bakteri *Propionibacterium acne* menggunakan metode difusi cakram. Penentuan aktivitas ini dilihat dari besarnya zona hambat yang terbentuk dari masing-masing sampel uji dengan *klindamisin* sebagai kontrol positif dan akuades steril sebagai kontrol negatif.

Hasil pengujian aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol, fraksi etil asetat, *klorofom* dan *n-heksan* dengan konsentrasi masing-masing 100 mg/mL diketahui bahwa fraksi *klorofom* adalah fraksi yang memiliki aktivitas penghambatan paling besar terhadap pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acne* yang ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening berdiameter  $24,13 \pm 0,12$ mm. Jika dibandingkan dengan aktivitas dari kontrol positif *klindamisin*, aktivitas fraksi *klorofom* ini tidak berbeda jauh dan masih berada dalam kategori yang sama yaitu kategori penghambatan sangat kuat karena memiliki zona hambat lebih dari 20 mm.<sup>30</sup> Berdasarkan klasifikasi aktivitas antibakteri menurut Davis dan Shout (1971) ekstrak etanol dengan zona hambat  $7,20 \pm 0,08$  dan fraksi etil asetat  $9,15 \pm 0,12$  tergolong dalam kategori sedang, sedangkan fraksi *n-heksan* dengan zona hambat  $16,45 \pm 0,11$  tergolong dalam kategori kuat.<sup>30</sup>

Perbedaan sensitivitas bakteri terhadap antibakteri ini dipengaruhi oleh banyak faktor dengan salah satunya adalah struktur dinding sel bakteri. Bakteri *Gram* positif cenderung lebih sensitif terhadap antibakteri, karena struktur dinding sel bakteri *Gram* positif lebih sederhana dibandingkan struktur dinding sel bakteri *Gram* negatif sehingga memudahkan senyawa antibakteri untuk masuk ke dalam sel bakteri *Gram* positif.<sup>31</sup>

Menurut hasil penelitian Sogandi (2019), ekstrak buah mengkudu juga memiliki aktivitas penghambatan terhadap bakteri *Gram* positif *Streptococcus mutans* dengan nilai KHM sebesar 10% dan fraksi teraktif adalah fraksi etil asetat yang aktivitas penghambatannya tergolong kuat. Selain itu, metabolit sekunder dari bakteri

endofit yang diisolasi dari buah mengkudu juga memiliki aktivitas penghambatan terhadap bakteri *Gram* positif (*Streptococcus mutans* dan *Staphylococcus aureus*) maupun bakteri *Gram* negatif (*Escherichia coli* dan *Shigella dysenteriae*).<sup>10</sup> Ekstrak daun tanaman *Psidium guajava* L. juga diketahui dapat menghambat pertumbuhan bakteri *P. acne* dan *Staphylococcus epidermis* dengan nilai KHM 0,321 mg/mL dan 0,486 mg/mL.<sup>32</sup>

Perbedaan aktivitas antibakteri juga dipengaruhi oleh jenis bakteri uji, karena bakteri *Gram* positif dan negatif memiliki penyusun membran sel yang berbeda. Membran sel bakteri *Gram* positif terdiri atas beberapa lapisan peptidoglikan yang membentuk struktur tebal dan kaku serta mengandung substansi asam teikoat, sedangkan dinding sel bakteri *Gram* negatif terdiri atas satu atau lebih 20 lapisan *peptidoglikan* yang tipis dan membran di bagian luar lapisan *peptidoglikan*. Dinding sel bakteri *Gram* negatif lebih rentan terhadap guncangan fisik, seperti pemberian antibiotik atau bahan antibakteri lainnya karena hanya mengandung sedikit lapisan *peptidoglikan* dan tidak mengandung asam teikoat.<sup>33</sup>

Berdasarkan hasil penelitian ini, terlihat aktivitas dari setiap fraksi berbeda-beda dan fraksi yang memiliki daya hambat paling besar adalah fraksi *klorofom*, sehingga fraksi *klorofom* dari daun mengkudu ini dilanjutkan ke tahap identifikasi senyawa bioaktif menggunakan GCMS.

Perbedaan diameter zona hambat ini kemungkinan disebabkan oleh kandungan senyawa antibakteri yang berbeda dan adanya zat-zat aktif yang mengandung senyawa antibakteri. Fraksi *klorofom* dari ekstrak daun mengkudu mengandung senyawa *antrakuinon*, *alkaloid*, *flavonoid*, *steroid*, *triterpenoid*, *saponin*, dan *fenolik*.

### Identifikasi Senyawa Bioaktif

Hasil identifikasi senyawa metabolit sekunder dari fraksi *klorofom* daun mengkudu menggunakan instrumen GCMS memperlihatkan bahwa golongan senyawa utamanya adalah asam lemak dengan kelimpahan terbanyak adalah senyawa *n-Hexadecanoic acid* sebanyak 57,04%. Kandungan terbanyak berikutnya adalah

*Squalene* yang merupakan golongan *triterpenoid* dan merupakan senyawa intermediet dalam biosintesis senyawa sterol sebanyak 26,18%, senyawa *Pyridin-3-carboxamide, oxime, N-(2-trifluoromethylphenyl)* yang merupakan golongan alkaloid sebanyak 14,61% dan terakhir senyawa Beta sitosterol merupakan golongan sterol atau steroid sebanyak 2,17%.

Senyawa *n-hexadecanoic acid* merupakan turunan lemak yaitu senyawa asam lemak jenuh yang memiliki formula  $C_{16}H_{32}O_2$ . Senyawa ini juga pernah diisolasi dari daun tanaman *Canthium parviflorum* dan diketahui mempunyai aktivitas antimikrobal terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* dan fungi jenis *Candida albicans*.<sup>34</sup> Fraksi *n-heksan* dan klorofom dari ekstrak tanaman *Albizia adianthifolia* juga mengandung senyawa *hexadecanoic acid* dan memiliki aktivitas penghambatan yang kuat terhadap bakteri *Escherichia coli* dengan KHM 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .<sup>35</sup> Senyawa *n-hexadecanoic acid* diketahui tidak hanya terdapat pada ekstrak daunnya saja, namun juga terdapat pada ekstrak buah mengkudu dan memiliki aktivitas lain yaitu sebagai antioksidan.<sup>25</sup> Selain memiliki aktivitas antimikrobal dan antioksidan, senyawa *n-hexadecanoic acid* juga diketahui dapat dimanfaatkan sebagai pestisida, 5-alpha reductase inhibitor, antifibrinolitik, hemolitik, pelumas, dan nematocida.<sup>36</sup>

Senyawa *squalene* termasuk ke dalam golongan *triterpenoid* dan merupakan senyawa intermediet dalam biosintesis senyawa sterol dengan rumus formula  $C_{30}H_{50}$  dan bobot molekul 410g/mol.<sup>37</sup> Ekstrak dari daun *Melaleuca cajuputi* diketahui mengandung senyawa *squalene* dan aktif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *B. cereus*, *S. aureus*, dan *Staphylococcus epidermidis*. Namun tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram negatif.<sup>37</sup> Ekstrak petroleum eter daun *Justicia gendarussa* Burm F juga mengandung senyawa *squalen* dengan kelimpahan sebanyak 8.06% dan memiliki aktivitas terhadap bakteri *Pseudomonas vulgaris* dan *Pseudomonas pneumonia*.<sup>38</sup>

*Pyridin-3-carboxamide, oxime, N-(2-trifluoromethylphenyl)* yang merupakan golongan alkaloid diketahui dapat menghambat

pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* serta aktif dalam menghambat pertumbuhan fungi jenis *Candida albicans* dan *Aspergillus niger*.<sup>39</sup> Senyawa ini juga terdapat dalam ekstrak buah tin (*Ficus carica*) yang dapat menghambat bakteri *Proteus mirabilis* dan *Bacillus subtilis*, selain itu juga memiliki aktivitas antioksidan.<sup>40</sup>

*Beta sitosterol* merupakan golongan steroid yang diketahui memiliki aktivitas antibakteri. *Beta sitosterol* diketahui dapat diekstraksi dari tanaman *Malva parviflora* dengan fraksi teraktif adalah fraksi klorofom yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.<sup>41</sup> Beta sitosterol juga terdapat dalam madu propolis dan memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococci pyrogene*, *Klebsiella pneumonia*, *Shigella dysenteriae* dan fungi *Candida krusei* dengan nilai KHM berkisar 12,5 – 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .<sup>42</sup> Ekstrak etanol dari daun dan bunga tanaman semak (*Chromolaena hirsuta*) juga diketahui memiliki senyawa steroid sitosterol dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif *Staphylococcus* dan *Streptococcus*.<sup>43</sup>

## KESIMPULAN

Penelitian ini mengungkapkan bahwa ekstrak daun mengkudu (*Morinda citrifolia* L) dapat menjadi sumber alternatif untuk mengatasi jerawat karena dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Propionibacterium acne* dengan fraksi teraktif adalah fraksi klorofom dengan nilai KHM 4% dan zona hambat sebesar 24,13 mm. Penelitian ini juga mengungkapkan bahwa fraksi klorofom daun mengkudu mengandung senyawa bioaktif *n-Hexadecanoic acid*, *Squalene*, *Pyridin-3-carboxamide, oxime, N-(2-trifluoromethylphenyl)*, dan *Betasitosterol*.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Program Studi Ilmu Farmasi, Fakultas Farmasi, dan LPPM Universitas 17 Agustus 1945 Jakarta yang telah mendukung dan memfasilitasi penelitian ini.

## DAFTAR RUJUKAN

- Lynn DD, Umari T, Dunnick CA, Dellavalle RP. The epidemiology of acne vulgaris in late adolescence. *Adolesc. Healt. Med. Ther.* 2016; (Jan): 13-25.
- Narayenah M, Suryawati N. Karakteristik profil jerawat berdasarkan indeks glikemik makanan pada mahasiswa semester III fakultas kedokteran Universitas Udayana tahun 2014, *Intisari Sains Medis.* 2017; (8): 139-143.
- Khan ZZ, Maha AMD, Thomas AMMD. Recurrent Epidural Abscess Caused by Propionibacterium acnes, *Kansas J. Med.* 2009; 2(4): 92-95.
- Sinnot S, Bhate K, Margolis D, Langan S. Antibiotics and acne: an emerging iceberg of antibiotic resistance. *J. Dermatol.* 2016; (175): 1127-1128.
- Fernández J et al. Multidrug-resistant bacterial infections in patients with decompensated cirrhosis and with acute-on-chronic liver failure in Europe, *J. Hepatol.* 2019; 70(3): 398-411.
- Sogandi dan Putu N. Identifikasi Senyawa Aktif Ekstrak Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L) dan Potensinya sebagai Inhibitor Karies Gigi, *Jurnal Kefarmasian Indonesia.* 2019; 9(2): 73-81.
- Usha R, Sangeetha S, Palaniswamy M. Antimicrobial Activity of a Rarely Known Species, *Morinda citrifolia* L. *Ethnobotanical. Leaflets.* 2010; 14: 306-311.
- Kameswari MS, Mahatmi H, Besung INK. Perasan Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia*) Menghambat Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli* secara In Vitro, *Indones. Med. Veternicus.* 2013; 2: 216-224.
- Simatupang OC, Abidjulu J, Siagian KV. Uji daya hambat ekstrak daun mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) terhadap pertumbuhan *Candida albicans* secara in vitro, *J. e-Gigi.* 2017; 5: 1-6.
- Sogandi dan P Nilasari. Isolation and molecular identification of endophytic bacteria from Noni fruits (*Morinda citrifolia* l) and their antibacterial activity. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* 2019; 299: 012020.
- Nugraheni ER, Nurrakhman M, Munawaroh H, Saputri. Antibacterial Activity of The Isolation Ethyl Acetate-Soluble Extract Noni Fruit (*Morinda citrifolia* L) Against Meat Bacterial Decay. *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* 2016; 176.
- Halimah H, Suci DM, Wijayanti I. Studi Potensi Penggunaan Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia* L) sebagai Bahan Antibakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella typhimurium*, *J. Ilmu Pertan. Indones.* 2019; 24: 58-64.
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat. Jakarta : Kementerian Kesehatan RI; 2000.
- Sogandi, Fransiska A, Lilih RK. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol 96% Daun Rambai (*Sonneratia caseolaris*, (L) Engl) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli*. *Indonesia Natural Research Pharmaceutical Journal.* 2017; 2: 73-80.
- Sogandi, Darma WST, Jannah R. Potensi Senyawa Antibakteri dari Ekstrak Akar Manis (*Glycyrrhiza glabra* L) terhadap *Bacillus cereus*. *J. Kim. Sains Dan Apl.* 2019; 22(4): 105-111.
- Harvey D. Chapter 8 Gravimetric Methods. 1959: 1-55.
- Sogandi S, Rabima R. Identifikasi Senyawa Aktif Ekstrak Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) dan Potensinya sebagai Antioksidan, *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi.* 2019; 22(5): 206-212.
- Ayoola GA, Coker HAB, Adesegun SA, Adepoju-bello, Obaweya K, Ezennia EC, Atangbayila. Phytochemical Screening and Antioxidant Activities of Some Selected Medicinal Plants Used for Malaria Therapy in Southwestern Nigeria. *Trop. J. Pharm. Res.* 2008; 7: 1019-1024.
- Tiwari P, Kumar B, Kaur M, Kaur G. Phytochemical screening and Extraction: A Review. *Int. Pharm. Sci.* 2011; 1.
- Elgailani IEH, Ishak CY. Methods for Extraction and Characterization of Tannins from Some Acacia Species of Sudan. *Pak. J. Anal. Environ. Chem.* 2016; 17: 43-49.
- Norman RF. Biological and Phytochemical Screening of Plants. *Journal of Pharmaceutical Science.* 1966:225-276. <https://doi.org/10.1002/jps.2600550302>
- Banu KS, Cathrine L. General Techniques Involved in Phytochemical Analysis. *Int. J. Adv. Res. Chem. Sci.* 2015; 2: 25-32.
- Suhendar U, Fathurrahman M, Sogandi. Antibacterial Activity and Mechanism of

- Action of Methanol Extract from Kasturi Mango Fruit (*Mangifera casturi*) on Caries-Causing Bacterium *Streptococcus mutans*. *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*. 2019; 22 (6): 235-241.
24. Sogandi, Mustopa AZ, Artika IM, Budiarto BR. Inhibitory Activity of *Lactobacillus plantarum* U10 Isolated from Tempoyak (Fermented Durian) Made in Indonesia against *Salmonella typhi*. *Microbiology Indonesia*. 2015; 9: 73–81.
  25. Rabima, Harlim L, Sogandi. Bioactive compound analysis and antioxidant activity of endophytic bacterial extract from Noni fruits (*Morinda citrifolia* L.). *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 2020; 475: 012077.
  26. Ehiem JC, Ndirika VIO, Onwuka UN. Effect of moisture content on some physical properties of *Canarium schweinfurthii* Engl fruits. *Res. Agr. Eng.* 2016; 62: 162–169.
  27. Miratunnisa, Mulqie L, Hajar S. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Kulit Kentang (*Solanum tuberosum* L) terhadap *Propionibacterium*. *Pros. Penelit. Spes. Unisba*. 2015: 510–516.
  28. Fauzi NP, Sulistiyarningsih, Runadi D. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol dan Fraksi Daun Jawer Kotok (*Coleus atropurpureus* (L.) Benth.) Terhadap Bakteri *Propionibacterium acnes* ATTC 1223 dan *Staphylococcus epidermidis* ATTC 12228. *Farmaka*. 2017; 15: 45–55.
  29. Marselia S, Wibowo MA, Arreneuz A. Aktivitas antibakteri Ekstrak Daun Soma (*Ploiarium alternifolium* Melch) terhadap *Propionibacterium acnes*. *JKK*. 2015; 4: 72–82.
  30. Davis, Stout. Disc Plate Method of Microbiological Antibiotic Assay, *Appl. Microbiol.* 1971; 22: 666–670.
  31. Madduluri S, Babu K, Sitram B. In vitro evaluation of antibacterial activity of five indigenous plants extract against five bacterial pathogens of human. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2013; 5: 679–684.
  32. Pandey M, Qidwai A, Kumar R, Pandey A, Shukla SK, Pathak A, Dikshit A. Pharmacological and Antibacterial Aspect of *Psidium guajava* L Against *Acne Vulgaris*. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 2017; 8: 145–150.
  33. Nwokocha CR, Owu DU, McLaren M, Murray J, Delgoda R, Thaxter K, Mccalla G, Young L, Nwokocha CR, Owu UD, McLaren M. Possible mechanisms of action of the aqueous extract of *Artocarpus altilis* (breadfruit) leaves in producing hypotension in normotensive Sprague Dawley rats. *Pharm. Biol.* 2012; 0209.
  34. Krishnan KR, James F, Mohan A. Isolation and characterization of n-hexadecanoic acid from *Canthium parviflorum* leaves. *J. Chem. Pharm. Res.* 2016; 8: 614–617.
  35. Abubakar MN, Majinda RRT. GC-MS Analysis and Preliminary Antimicrobial Activity of *Albizia adianthifolia* (Schumach) and *Pterocarpus angolensis* (DC). *Medicines*. 2016; 3: 1–9.
  36. Guerrero RV, Abarca-vargas R, Petricevich VL. Chemical Compounds and Biological Activity of an Extract from *Bougainvillea buttiana* (Var Rose) Holtum and Stand. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 2017; 9: 42–46.
  37. Al-abd NM, Nor ZM, Mansor M, Azhar F, Hasan MS, Kassim M. phytochemical characterization of *Melaleuca cajuputi* extract, *BMC Complement. Altern. Med.* 2015: 1–13.
  38. Murugesan S. Phytochemical Evaluation, GC-MS Analysis of Bioactive Compounds and Antibacterial Activity Studies from *Justicia gendarussa* Burm Leaf. *Int. J. Pharmacogn. Phytochem. Res.* 2017; 9: 400–406.
  39. Chandra JH, Gunasekaran H. Screening of phytochemical, antimicrobial and antioxidant activity of *Glycyrrhiza glabra* root extract. *J. Environ. Biol.* 2017; 38: 161–165.
  40. Soni N, Mehta S, Satpathy G, Gupta RK. Estimation of nutritional, phytochemical, antioxidant and antibacterial activity of dried fig (*Ficus carica*). *J. Pharmacogn. Phyther.* 2014; 3: 158–165.
  41. Ododo MM, Choudhury MK, Dekebo AH. Structure elucidation of  $\beta$ -sitosterol with antibacterial activity from the root bark of *Malva parviflora*. 2016: 1–11.
  42. Odiba JO, Musa AM, Hassan HS, Yahaya SM, Okolo EI. Antimicrobial activity of isolated Stigmast- 5-en-3  $\beta$  -ol (  $\beta$  -Sitosterol ) from Honeybee Propolis from North-Western, Nigeria. *International J. Pharma Sci. Res.* 2014; 5: 908–918.
  43. Taleb-contini SH, Salvador MJ, Watanabe E, Ito IY. Antimicrobial activity of flavonoids and steroids isolated from two *Chromolaena* species. *Brazilian J. Pharm. Sci.* 2003; 39.