

UJI AKTIVITAS ANTIMIKROBA HASIL FRAKSINASI EKSTRAK ETANOL DAUN PATIKALA (*ETLINGERA ELATIOR*) TERHADAP BEBERAPA MIKROBA UJI

Faridha Yenny Nonci, A. Tenriugi Daeng Pine, Hasnia A.

Jurusan Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Alauddin Makassar

ABSTRACT

The purpose of this study was to determine the activity of ethanol extract of leaves patikala fraction (*Etlintera elatior*) as an antimicrobial in some microbes and identify the components of compounds in the leaves patikala which acts as an inhibitor of the microbes. The research was done by using KLT-Bioautografi. Simplicia leaves patikala macerated with maceration method stratified by using solvent n-hexane and ethanol 96%, then the test screening of bacteria which then extract fractionation actively performed by the method of KCV (Vacuum Liquid Chromatography), chromatographic separation of compounds results then carried TLC -Bioautografi are placed on the surface of the solidified medium. After 15-30 minutes plates (chromatogram) is appointed and removed from the medium, were incubated for 1 x 24 hours at 37 ° C for bacteria and 3 x 24 hours at room temperature for mushrooms. Results showed that the microbes could be reversed after tested KLT-Bioautografi there are 5 bacterium is *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, and *Pseudomonas aeruginosa*. Further quantitative research to determine the level of effectiveness of the results of the leaf fraction patikala to determine the value of MIC (Minimum Inhibitory Concentration) and the sensitivity of the most active fraction against microbes *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, and *Pseudomonas aeruginosa*.

Keywords: Antimicrobial, Fractionation results, KLT-Bioautografi, Flavonoids

PENDAHULUAN

Penggunaan bahan alam sebagai salah satu terapi pengobatan telah diterima secara luas di seluruh dunia. Menurut WHO, negara-negara di Afrika, Asia, dan Amerika Latin menggunakan obat herbal sebagai pelengkap pengobatan primer. Secara umum, kini masyarakat dunia semakin banyak yang memilih menggunakan bahan alami untuk mengatasi masalah kesehatan. Obat herbal dinilai lebih aman karena efek sampingnya yang relatif rendah dan harganya juga dapat dijangkau oleh masyarakat luas (Katno, 2008: 4).

Tingginya daya tarik masyarakat terhadap pengobatan alami merupakan konsep gaya hidup "*Back to Nature*" atau kembali ke alam dengan memanfaatkan potensi bahan-bahan alam yang memiliki khasiat farmakologis (Katno, 2008: 2).

Pengobatan yang dilakukan secara tradisional umumnya berasal dari warisan turun-temurun dan telah menyatu dengan kultur atau tradisi masyarakat setempat. Patikala atau biasa disebut kecombrang merupakan tumbuhan yang tersebar cukup luas di Indonesia. Penggunaan patikala atau kecombrang sebagai bahan obat sangat banyak

ragamnya. Tumbuhan ini digunakan sebagai bahan pangan dan juga dapat digunakan untuk pengobatan (Antoro, 1995).

Bagian tanaman patikala yang umum digunakan adalah bunga dan batangnya. Pemanfaatannya adalah sebagai pemberi cita rasa pada masakan, seperti urab, pecel, sambal, dan masakan lain. Batangnya dipakai sebagai pemberi cita rasa pada masakan daging. Patikala juga dimanfaatkan sebagai obat-obatan berkaitan dengan khasiatnya yaitu sebagai penghilang bau badan dan bau mulut (Hidayat dan Hutapea, 1991).

McKeen dkk (1997) menguji ekstrak etanol dari daun tanaman patikala dalam kemampuannya untuk membunuh mikroba baik secara kualitatif dengan metode *tube dilution* terhadap bakteri gram positif (*Bacillus cereus* dan *Bacillus megatrium*) dan gram negatif (*Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa*). Hasil pengujian menunjukkan adanya aktivitas antibakteri dengan konsentrasi hambatan minimum berkisar 100-800 g/ml dan konsentrasi lethal minimum berkisar 400-800 µg/ml. Hal ini menunjukkan adanya potensi pemakaian daun tanaman sebagai pengawet makanan.

Penelitian dan pengembangan bahan alami utamanya tanaman patikala sangat diperlukan karena kurangnya pengetahuan dan informasi yang memadai mengenai metabolit sekunder patikala atau kecombrang sebagai

antibakteri. Informasi ini diharapkan dapat menghilangkan keraguan banyak kalangan dan secara otomatis akan meningkatkan kepercayaan masyarakat terhadap obat herbal.

METODE PENELITIAN

1. Pengambilan sampel

Sampel daun patikala diperoleh di Desa Erelembang (Malino), Kabupaten Gowa, Provinsi Sulawesi Selatan.

2. Pengolahan sampel

Daun patikala yang telah dipetik disortasi basah. Setelah proses pencucian, kemudian daun diangin-anginkan di dalam ruangan yang terlindung oleh cahaya matahari langsung karena dapat merusak kandungan kimia yang terkandung dalam daun patikala.

3. Ekstraksi sampel

Sampel diekstraksi dengan pelarut n-heksan dan etanol 96%. Sampel daun patikala yang telah kering ditimbang sebanyak 400 gram dimasukkan ke dalam wadah maserasi, kemudian ditambahkan pelarut n-heksan hingga terendam seluruhnya. Wadah maserasi ditutup dan disimpan selama 24 jam ditempat yang terlindung dari sinar matahari langsung sambil sesekali diaduk. Selanjutnya disaring, dipisahkan antara ampas dan filtrat. Ampas diekstraksi kembali dengan n-heksan yang baru dengan jumlah yang sama. Hal ini dilakukan selama 3 x 24 jam. Filtrat n-heksan yang diperoleh kemudian dikumpulkan dan diuapkan cairan

penyarinya dengan *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak n-heksan kental. Dengan cara yang sama, ampas yang telah diperoleh dari proses ekstraksi pertama digunakan pada ekstraksi dimaserasi kembali dengan etanol 96% dengan cara yang sama seperti n-heksan hingga diperoleh ekstrak etanol kental.

4. Penyiapan mikroba uji

Mikroba uji yang digunakan dalam penelitian ini meliputi *Escherchia coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeroginosa*, *Vibrio colera*, *Salmonella thypi*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, dan *Candida albicans*.

5. Pembuatan suspensi bakteri

Mikroba uji yang telah diremajakan dalam medium Nutrient Agar (NA) miring dan medium Potato Dekstrosa Agar (PDA) miring disuspensikan dalam 10 ml larutan NaCl fisiologis (NaCl 0,9%) kemudian diukur serapannya 25% T untuk bakteri dan 75% T untuk jamur pada spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 580 nm untuk bakteri dan 580 nm untuk jamur.

6. Skrining aktivitas antibakteri

a. Pembuatan larutan stok

Sebanyak 200 mg ekstrak n-heksan dan ekstrak etanol 96% masing-masing dilarutkan dalam 0,2 ml DMSO, kemudian dicampurkan dengan 9,8 ml air steril kemudian di campur medium NA untuk bakteri dan medium PDA untuk jamur hingga diperoleh volume akhir 10 ml. Dari larutan stok kemudian dibuat

dalam konsentrasi 0,5%, 1%, 1,5%, 2%.

b. Uji aktivitas ekstrak

Sebanyak 20 µl mikroba uji ditambahkan 10 ml medium NA untuk bakteri dan medium PDA untuk jamur. Campuran dibuat dalam botol coklat lalu dituangkan ke dalam cawan petri secara aseptis dengan digoyang-goyangkan agar merata dan dibiarkan memadat. Penanaman bakteri dilakukan menggunakan paper disk dengan konsentrasi 0,5%, 1%, 1,5%, 2% sebanyak 20 µl kedalam medium yang sudah dibuat kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam untuk bakteri dan pada suhu kamar selama 3 x 24 jam untuk jamur.

7. Fraksinasi ekstrak aktif dengan kromatografi cair vakum (KCV)

Ekstrak aktif yang memiliki aktivitas antimikroba yang paling besar ditimbang sebanyak 3 gram dan ditambahkan silika gel sebanyak 20 gram. Dilarutkan ekstrak aktif dengan pelarut yang sesuai secukupnya, lalu ditambahkan sedikit demi sedikit silika gel sehingga ekstrak mengering seperti serbuk. Dimasukkan silika gel dan ekstrak ke dalam gelas kromatografi cair vakum (KCV) dan dimampatkan dengan pompa vakum kemudian di elusi dengan eluen yang pertama kali digunakan. Cairan pengelusi dibuat dengan gradient kepolaran (tingkat kepolaran) yang meningkat berdasarkan profil KLT. Fraksi-fraksi yang diperoleh diuapkan kemudian

dilihat profil KLT-nya. Fraksi yang memiliki kromatogram dan warna bercak yang sama digabung menjadi satu dan diuji aktivitas antibakteri dengan metode KLT-bioautografi.

8. Pengujian secara KLT-bioautografi dan uji aktivitas fraksi terakhir

Sebanyak 20 µl mikroba uji ditambahkan 10 ml medium NA untuk bakteri dan medium PDA untuk jamur. Campuran dibuat dalam botol coklat lalu dituangkan ke dalam cawan petri secara aseptis dengan digoyang-goyangkan agar merata dan dibiarkan memadat. Kromatogram hasil pemisahan senyawa secara KLT kemudian diletakkan di atas permukaan medium yang memadat. Setelah 15-30 menit lempeng (kromatogram) diangkat dan dikeluarkan dari medium. Selanjutnya diinkubasi selama 1 x 24 jam pada suhu 37°C untuk bakteri dan 3 x 24 jam pada suhu kamar untuk jamur.

9. Identifikasi bercak aktif dengan beberapa penampakan noda

Kromatogram disemprot dengan menggunakan pereaksi semprot sebagai berikut :

a. Alkaloid

Pereaksi yang digunakan yaitu Dragendorf, jika sampel positif mengandung alkaloid, maka timbul warna jingga dengan latar belakang kuning.

b. Steroid

Pereaksi yang digunakan, yaitu Liebermann-Buchard sampel terlebih

dahulu dipanaskan setelah disemprot pereaksi, jika sampel positif mengandung steroid, maka timbul noda berfluoresensi coklat atau biru menunjukkan senyawa triterpen. Kromatogram diamati pada lampu UV 254 nm dan 366 nm.

c. Flavonoid

Pereaksi yang digunakan yaitu Aluminium Klorida diamati di lampu UV 254 nm dan 366 nm, jika sampel mengandung senyawa flavanoid maka noda akan berfluoresensi hijau.

d. Fenol

Pereaksi yang digunakan yaitu Besi (III) Klorida, sampel terlebih dahulu dipanaskan setelah disemprot pereaksi diamati di UV 254 nm dan UV 366 nm, jika sampel positif mengandung senyawa fenol maka akan dihasilkan warna hijau atau biru.

e. Kumarin

Pereaksi yang digunakan yaitu Kalium Hidroksida (KOH) etanolik, jika sampel positif mengandung senyawa kumarin maka akan dihasilkan warna merah terang.

f. Penampakan bercak H₂SO₄

Kromatogram disemprotkan pereaksi H₂SO₄ 10 % dipanaskan pada suhu 105°C selama 5 menit dan diamati. Kebanyakan senyawa organik memberikan warna kuning, coklat, dan hitam (Sutrisno, R.B : 4-78).

HASIL PENELITIAN

1. Hasil Ekstraksi

Daun patikala kering sebanyak 400 gram diekstraksi menggunakan metode maserasi bertingkat. Hasil ekstraksi yang diperoleh dengan pelarut n-Heksan sebanyak 2,093 gr dan % rendamen yang diperoleh 0,523% , sedangkan hasil yang diperoleh dengan pelarut etanol 96% sebanyak 10,676 gr dan % rendamen yang diperoleh 2,669% atau 2,67%.

2. Pengujian Skrining Antibakteri Ekstrak Polar Dan Non Polar

Pengujian skrining aktivitas antibakteri ekstrak polar dan non polar daun patikala terhadap mikroba uji (*Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Streptococcus mutans*, *Vibrio sp* dan *candida albicans*) memberikan hasil yang positif pada ekstrak etanol 96% dimana ekstrak pada konsentrasi (0,5%, 1%, 1,5%, dan 2%) mampu menghambat *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa* yang ditandai dengan adanya zona bening yang mengelilingi paper disc. Sedangkan ekstrak n-heksan tidak memiliki aktivitas antimikroba.

3. Pemisahan Senyawa Menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Pemisahan senyawa ekstrak larut etanol 96% daun patikala dengan metode KLT menggunakan perbandingan eluen

etil asetat : metanol (1:4). Dari hasil penotolan pada lempeng yang diamati penampakan bercaknya pada lampu UV 254 dan 366, menunjukkan jumlah bercak yang timbul.

4. Hasil Fraksi Ekstrak Etanol 96% Daun Patikala Melalui Kromatografi Cair Vakum (KCV)

Fraksi Gabungan	Fraksi
A	1, 2, 3,4
B	5,6,7,8
C	9,10
D	11, 12, 13,14,15,16

Keterangan:

Fase gerak : etil asetat:metanol (1:5)

Fase diam : silika gel F₂₅₄

5. Hasil Uji KLT-Bioautografi

Fraksi	Rf	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S.aureus</i>	<i>S. mutans</i>	<i>P.aeruginosa</i>
A	0,63	+	+	+	+	+
B	0,72	-	+	-	+	-
C	0,63	-	-	+	-	-
D	0,72	+	-	-	-	-

Keterangan:

+ : menghambat pertumbuhan mikroba

- : tidak menghambat pertumbuhan mikroba

6. Hasil Identifikasi Komponen Senyawa Fraksi Teraktif Menggunakan Pereaksi Identifikasi

Fraksi paling aktif kemudian diidentifikasi komponen senyawanya menggunakan pereaksi warna semprot Lieberman Buchardat, Dragendorf, Besi (III) Klorida, Aluminium Klorida, KOH Etanolik dan penampak bercak H₂SO₄. Hasil dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil Identifikasi Komponen Senyawa Fraksi A Daun Patikala

Fraksi	Pereaksi warna	Senyawa	Perlakuan	Ket
A	Dragendorf	Alkaloid	Diamati langsung	-
	Besi (III) klorida	Fenolik	Diamati langsung	-
	Aluminium klorida	Flavonoid	Dipanaskan, UV 254 nm dan 366 nm	+
	Lieberman bouchart	Steroid Triterpenoid	Dipanaskan, UV 254 nm dan 366 nm	-
	KOH etanolik	Kumarin	Diamati langsung	-
	H ₂ SO ₄	Senyawa organik	Dipanaskan	+

Keterangan:

+ : mengandung senyawa

- : tidak mengandung senyawa

PEMBAHASAN

Pengolahan sampel kering yang telah diserbukkan mula-mula diekstraksi dengan metode maserasi yang merupakan metode dingin. Metode ini cocok untuk sampel yang tidak tahan terhadap pemanasan sehingga tidak merusak komponen senyawanya. Pada tahap penelitian, digunakan metode maserasi bertingkat. Maserasi bertingkat merupakan suatu proses penyarian simplisia dengan menggunakan lebih dari satu jenis larutan penyari berdasarkan tingkat kepolaran. Larutan penyari atau pelarut yang digunakan adalah n-Heksan dan etanol 96%, dimana saat proses ekstraksi dilakukan untuk menarik senyawa yang memiliki sifat non-polar kemudian menarik senyawa polarnya. Masing-masing pelarut yang berbeda sifat

kepolarannya tersebut melarutkan komponen-komponen bioaktif yang berbeda. Menurut Houghton dan Raman (1998), ekstrak heksan (non polar) mengandung komponen yang bersifat nonpolar seperti lilin, lemak, dan minyak atsiri, sedangkan ekstrak etanol dapat mengekstrak fenolik, steroid, terpenoid, alkaloid, dan glikosida. Pada maserasi pertama, sebanyak 400 gr daun patikala kering dimaserasi menggunakan pelarut n-heksan berturut-turut selama 3 hari kemudian selanjutnya dimaserasi menggunakan pelarut etanol 96% selama 3x24 jam. Filtrat dari kedua pelarut yang digunakan, dipekatkan menggunakan rotavapor dan diuapkan hingga membentuk ekstrak kental. Dari hasil maserasi yang dilakukan diperoleh 2,093 gram dan rendamennya 0,523% sedangkan hasil yang diperoleh dengan pelarut etanol 96% sebanyak 10,676 gr dan rendamen yang diperoleh 2,669%.

Pada tahap selanjutnya dilakukan uji skrining aktivitas antibakteri ekstrak n-heksan dan ekstrak etanol 96% terhadap bakteri uji *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Streptococcus mutans*, *Vibrio sp* dan *Candida albicans*, digunakan beberapa mikroba uji ini karena mikroba uji ini merupakan flora normal yang ada pada tubuh manusia, dan apabila berlebih akan meginfeksi manusia itu sendiri. Pengujian skrining ini dilakukan untuk mengetahui

ekstrak yang aktif sebagai inhibitor pada pertumbuhan bakteri dengan cara mengamati zona hambat bening di sekitar paper disc pada konsentrasi yang berbeda-beda yaitu 2%, 1,5%, 1%, dan 0,5%. Perbedaan konsentrasi dibuat untuk mengetahui tingkat efektivitas ekstrak menghambat pertumbuhan bakteri. DMSO merupakan salah satu pelarut sampel yang dapat melarutkan hampir semua senyawa baik polar maupun non-polar. Selain itu, DMSO tidak memberikan daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri sehingga tidak mengganggu hasil pengamatan. Medium yang digunakan adalah Nutrient Agar (NA) merupakan medium agar yang digunakan sebagai media untuk menumbuhkan biakan bakteri. Berdasarkan hasil pengujian, diketahui ekstrak etanol 96% merupakan ekstrak paling aktif yang mampu memberikan aktivitas penghambatan pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa* pada konsentrasi 1,5% dan 2%.

Menurut Naufalin (2005), ekstrak heksan mengandung minyak atsiri yang bersifat antimikroba, namun kontak antara senyawa antimikroba dan minyak atsiri dengan sel bakteri terhalang oleh adanya minyak dan lemak dalam ekstrak heksan. Minyak dan lemak lainnya mengganggu proses difusi dan melindungi bakteri dari senyawa antibakteri. Etanol merupakan pelarut yang bersifat polar. Menurut

Naidu dan Davidson (2000), komponen yang banyak terdapat pada tumbuh-tumbuhan dan bersifat polar antara lain senyawa dari golongan fenolik. Mekanisme komponen antibakteri fenolik umumnya akan berinteraksi dengan protein yang ada pada dinding sel atau sitoplasma melalui ikatan hidrogen dan interaksi hidrofobik. Mekanisme lain kemungkinan adalah dengan mengganggu aktivitas enzim dalam sel.

Dari hasil fraksinasi, diperoleh 16 fraksi yang kemudian di KLT dengan fase gerak etil asetat : metanol 1:4. Kromatogram fraksi yang memiliki warna bercak dan nilai Rf yang sama digabungkan sehingga diperoleh empat gabungan fraksi. Nilai Rf dapat dijadikan [bukti](#) dalam mengidentifikasi [senyawa](#). Bila identifikasi nilai Rf memiliki nilai yang sama maka senyawa tersebut dapat dikatakan memiliki [karakteristik](#) yang sama atau mirip.

Empat gabungan fraksi yang diperoleh kemudian dilakukan uji aktivitas antibakteri dengan metode KLT-Bioautografi. Metode ini didasarkan pada difusi agar dimana senyawa antimikrobanya akan berdifusi dari lapisan lempeng kromatogram ke medium agar yang masing-masing telah diinokulasikan dengan bakteri uji yang peka, pada uji ini bakteri yang digunakan yaitu *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*. Senyawa antimikroba yang telah

berdifusi dari lempeng kromatogram kedalam media agar akan menghambat pertumbuhan bakteri dan membentuk zona bening pada medium agar. Berdasarkan hasil uji KLT-Bioautografi, hanya fraksi gabungan A yang paling aktif menghambat pertumbuhan kelima mikroba uji (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*). Hal ini ditandai adanya zona bening pada daerah lempeng kromatogram.

Profil KLT fraksi gabungan A menggunakan eluen etil asetat : metanol perbandingan 1:4 memberikan pemisahan senyawa yang tampak jelas terpisah dengan baik, sehingga dilakukan identifikasi komponen senyawa menggunakan pereaksi warna semprot Lieberman Buchard untuk identifikasi steroid, pereaksi Dragendorff untuk golongan senyawa alkaloid Besi (III) Klorida untuk identifikasi fenol, Aluminium Klorida untuk identifikasi flavanoid, dan penampak bercak H₂SO₄ untuk memperjelas bercak yang tampak. Hasil positif ditunjukkan pada identifikasi dengan pereaksi aluminium klorida yang diamati pada lampu UV 366 dengan memberikan fluoresensi hijau yang menandakan adanya kandungan senyawa flavanoid.

KESIMPULAN

1. Gabungan fraksi A memberikan efektivitas antimikroba paling besar

pada pertumbuhan mikroba *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa* dengan nilai Rf 0,63.

2. Komponen kimia daun patikala yang berperan sebagai antimikroba termasuk dalam golongan flavonoid.

KEPUSTAKAAN

- Antoro, E. D. *Skrining Fitokimia rimpang Nicolaia speciosa Horan. Secara mikrokimiawi kromatografi lapis tipis, dan spektrofotometri UV*. FF-UGM. 1995
- Hidayat, S.S dan Hutapea Jr,. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia, Edisi I: 440-441*, Badan Penelitian dan Pengembangan Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1991
- Houghton,P.J. dan Raman, A. 1998. *Laboratory Handbook for The Fractionation of Natural Extracts*. London : Thomson Science
- Katno. *Tingkat Manfaat Keamanan Dan Efektivitas Tanaman Obat Dan Obat Tradisional*. Jawa Tengah: Badan Penelitian Dan Pengembangan Kesehatan Departemen Kesehatan RI. 2008.
- Mckeen, M. M.,A. M. Ali, S.H. El-sharkawy. M.Y. Manap. K. M. Salleh, N. H. Lajis, dan K. Kamazu. *Antimicrobial and cytotoxic properties of some Malaysian Traditional Vegetables (Ulam)*. *Pharmaceutical Biology*, 35 (3): 174-178. 1997
- Naidu, A.S. dan Davidson P.M. 2000. *Phytophenols*. Di dalam Naidu, A.S. editor. *Natural Food Antimicrobial Systems*. New York CRC press.
- Naufalin, R. *Aktivitas Antibakteri Ekstrak Bunga Kecombrang (Nicolaria dpeciosa Horan) Terhadap Bakteri Patogen dan Perusak Pangan*. Bogor: Program Pascasarjana, Institut Pertanian Bogor. 2005