

Isolasi Senyawa Antibakteri Dari Daun Jengkol (*Pithecolobium lobatum* Benth) dan Penentuan Nilai KHM-nya

SALNI, HANIFA MARISA, DAN RATNA WEDYA MUKTI

Jurusan Biologi FMIPA, Universitas Sriwijaya, Sumatera Selatan, Indonesia

INTISARI: Telah dilakukan penelitian mengenai isolasi senyawa antibakteri dari daun Jengkol (*Pithecolobium lobatum* Benth) dan penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)-nya terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Penelitian dilakukan di laboratorium Genetika dan Bioteknologi jurusan Biologi FMIPA Universitas Sriwijaya. Pengujian aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi agar. Bakteri uji yang digunakan adalah *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Hasil penelitian menunjukkan senyawa antibakteri terdapat didalam fraksi etilasetat, Senyawa antibakteri dalam daun jengkol merupakan senyawa terpenoid mempunyai nilai R_f 0,75 dengan eluen etilasetat *n*-heksana 8:2. Isolat hasil isolasi disebut dengan isolat E18. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) isolat E18 terhadap *Staphylococcus aureus* adalah 160 $\mu\text{g/ml}$ dan terhadap *Escherichia coli* 200 $\mu\text{g/ml}$.

KATA KUNCI: antibakteri, jengkol, *Pithecolobium lobatum* Benth

ABSTRACT: Isolation of antibacterial compound from Jengkol (*Pithecolobium lobatum* Benth) leaves and determined the Minimum Inhibition Concentration (MIC) for *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* has been conducted. The antibacterial activity test and isolation has been done in Genetica and Biotechnology Laboratory of Biology Department, Math and Science Faculty, Sriwijaya University. Antibacterial activity has been tested by using the diffusion method. *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* were used as tested bacteria. The result of this research showed that the antibacterial compound was found from ethyl acetate fraction. The active compound was terpenoid with R_f 0,75. The result of isolation was called isolate E18. The Minimum Inhibition Concentration (MIC) value of isolate E18 for *Staphylococcus aureus* was 160 $\mu\text{g/ml}$ and *Escherichia coli* was 200 $\mu\text{g/ml}$.

KEYWORDS: antibacterial, jengkol, *Pithecolobium lobatum* Benth

Januari 2011

1 PENDAHULUAN

Infeksi merupakan masalah besar yang menyedot perhatian dunia. Penyakit infeksi telah menyebabkan kematian sebesar 13 juta orang di seluruh dunia setiap tahun, terutama di negara-negara yang sedang berkembang seperti Indonesia. Pemakaian antibiotika merupakan keharusan dalam penanggulangan penyakit infeksi. Dalam beberapa tahun terakhir terdapat peningkatan angka resistensi terhadap antibiotika.

Penelitian-penelitian pencarian bahan antibakteri telah banyak dilakukan terutama dari berbagai jenis tumbuhan rempah-rempah. Namun para ilmuwan terus berusaha untuk mencari sumber antibakteri baru, terutama yang mudah tumbuh di Indonesia. Tumbuhan yang digunakan untuk obat tradisional dapat dijadikan alternatif pencarian zat anti bakteri, karena pada umumnya memiliki senyawa aktif yang berperan dalam bidang kesehatan^[1].

Tumbuhan dikenal mengandung berbagai golongan

senyawa kimia tertentu sebagai bahan obat yang mempunyai efek fisiologis terhadap organisme lain, atau sering disebut sebagai senyawa bioaktif. Kurang lebih 80% obat-obatan yang digunakan oleh masyarakat Indonesia berasal dari tumbuhan obat. Telah banyak senyawa aktif asal tumbuhan yang memasuki aplikasi komersial untuk berbagai kegunaan. Senyawa alam hasil isolasi dari tumbuhan, juga digunakan sebagai bahan asal untuk sintesis bahan-bahan biologis aktif dan sebagai senyawa model untuk merancang senyawa baru yang lebih aktif dengan sifat toksik yang lebih rendah^[2].

Tumbuhan jengkol (*Pithecolobium lobatum* Benth) merupakan salah satu tumbuhan yang digunakan oleh masyarakat Indonesia sebagai obat tradisional. Daun jengkol berkasiat sebagai obat eksim, kudis, luka dan bisul, kulit buahnya digunakan sebagai obat borok. Biji, kortek daun jengkol mengandung saponin, flavonoid dan tanin^[3]. Secara tradisional daun jengkol sudah digunakan untuk mengobati penyakit infeksi, diduga tumbuhan jengkol mengandung senyawa an-

tibakteri. Untuk itu perlu dilakukan penelitian isolasi senyawa antibakteri dari daun jengkol (*Pithecolobium lobatum* [Benth]).

2 METODOLOGI PENELITIAN

2.1 Ekstraksi Serbuk Simplisia

Ekstraksi menggunakan alat Soxhlet dengan pelarut metanol. Serbuk simplisia sebanyak 200 gram dibungkus dengan kertas saring dimasukkan kedalam alat Soxhlet, diberi larutan metanol 2 liter kemudian dipanaskan dalam tangas air. Ekstraksi dilakukan selama 5 hari. Ekstrak metanol cair diuapkan dengan alat penguap vakum putar sampai didapatkan ekstrak kental. Ekstrak kental dikeringkan dengan penangas air sehingga didapatkan ekstrak metanol kering.

2.2 Fraksinasi Ekstrak

Fraksinasi dilakukan dengan metode FCC (Fraksinasi Cair-Cair) dengan pelarut *n*-heksan, etilasetat dan metanol secara sinambung dengan sifat kepolaran pelarut yang berbeda-beda. Fraksinasi dilakukan sebagai berikut: Ekstrak metanol dilarut dalam metanol dan air dengan perbandingan 1:1 sebanyak 200 ml. Selanjutnya dimasukkan kedalam labu pisah, ditambahkan 200 ml *n*-heksan, dikocok secara perlahan-lahan, setelah didiamkan terjadi pemisahan antara fraksi *n*-heksan dan metanol-air. Fraksi *n*-heksan dipisahkan, kemudian diulangi beberapa kali sampai larutan berwarna bening. Fraksinasi dilanjutkan menggunakan etilasetat dengan proses yang sama dengan *n*-heksan. Fraksi *n*-heksan cair, fraksi etilasetat cair dan fraksi metanol-air diuapkan dengan alat vakum putar, sehingga diperoleh fraksi kental. Fraksi kental diuapkan dengan penangas air sampai diperoleh fraksi kering. Ketiga fraksi yang diperoleh diujikan aktivitas antibakterinya.

2.3 Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi

Uji aktivitas antibakteri dilakukan terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* dengan metode difusi agar, sebagai berikut ; Bakteri uji diinokulasikan kedalam media NB (*Nutrient Broth*) sebanyak 3 jarum Ose, diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Suspensi bakteri hasil inkubasi dikocok dengan alat pemutar kemudian diukur transmisinya pada panjang gelombang 580 nm. Transmisi diatur sebesar 25% dengan cara penambahan bakteri atau medium cair. Suspensi bakteri T 25% dimasukkan kedalam cawan Petri sebanyak 0,1 mL, kemudian ditambahkan medium NA (*Nutrient Agar*) 10 mL yang belum membeku, dengan suhu sekitar 40°C. Selanjutnya digoyang-goyang sampai membeku. Kedalam medium yang berisi bakteri dimasukkan kertas cakram

6 mm dan ditetesi dengan larutan ekstrak 10 L dengan konsentrasi 1% (10 mg/mL). Ekstrak dilarutkan dalam DMSO (dimetilsulfoksida). Setelah disimpan selama 24 jam pada suhu 37°C diukur diameter hambatan yang terbentuk.

2.4 Uji bioautografi

Uji bioautografi dilakukan untuk mengetahui harga R_f senyawa aktif antibakteri dengan menggunakan kromatografi lapis tipis. Prosedur uji bioautografi adalah sebagai berikut: Fraksi aktif dengan konsentrasi 1% ditotolkan pada plat silika gel GF254, kemudian dikembangkan dengan fase gerak yang sesuai untuk pemisahan senyawa-senyawa yang terdapat dalam fraksi, dalam penelitian ini digunakan fasegerak metilenklorida. Kromatogram diletakkan dalam cawan petri yang telah berisi biakan bakteri, bercak-bercak pada kromatogram dicitrak ke cawan Petri, kromatogram dibiarkan menempel pada medium agar selama 30 menit supaya senyawa aktif berdifusi kedalam medium agar, kemudian diangkat dengan hati-hati. Setelah 24 jam diinkubasi dapat dilihat bercak atau daerah yang berwarna bening merupakan daerah senyawa aktif berada^[4].

Uji penentuan nilai KHM

Penentuan nilai konsentrasi hambat minimum dilakukan dengan metode difusi agar dengan menggunakan kertas cakram dengan diameter 6 mm. Prosedur kerja penentuan KHM adalah sebagai berikut: fraksi aktif dibuat dengan konsentrasi 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25 g/mL. Pelarut yang digunakan adalah DMSO. Suspensi bakteri dengan transmisi 25% pada panjang gelombang 580 nm dimasukkan kedalam cawan Petri sebanyak 0,1 mL, kemudian ditambahkan medium NA 10 mL yang belum membeku, cawan Petri digoyang-goyang sampai membeku. Ke dalam medium dimasukkan kertas cakram berdiameter 6 mm dan ditetesi dengan larutan ekstrak sebanyak 10 μ L dengan menggunakan mikropipet, konsentrasi isolat adalah 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25 μ g/mL. Setelah diinkubasi selama 24 jam pada inkubator dengan suhu 37°C diukur diameter hambatan yang terbentuk.

3 HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1 Ekstraksi, Fraksinasi dan Uji Aktivitas Antibakteri

Ekstraksi dilakukan menggunakan alat Soxhlet dengan pelarut metanol selama 5 hari. Dari 200 gram simplisia diperoleh ekstrak metanol sebanyak 70,3 gram. Ekstrak yang diperoleh selanjutnya di fraksinasi dengan metode FCC (fraksinasi cair-cair). Hasil fraksinasi dengan menggunakan pelarut *n*-heksana, etilasetat dan metanol; didapatkan fraksi *n*-heksana se-

banyak 4,5 g (18%), fraksi etil asetat sebanyak 12,3 g (49,2%) dan fraksi metanol sebanyak 8,2 g (32,8%). fraksi yang diperoleh kemudian diuji aktivitas antibakteri untuk menentukan jenis ekstrak yang aktif. Dari hasil pengujian aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksana, etilasetat dan metanol aktif terhadap bakteri uji yang ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambat di sekitar kertas cakram pada medium agar yang ditumbuhi bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Hal ini menunjukkan bahwa ketiga fraksi daun jengkol memiliki senyawa antibakteri sehingga mempunyai aktivitas dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*.

TABEL 1: Hasil uji aktivitas antibakteri fraksi terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

No	Jenis Ekstrak	Diameter Zona Hambat (mm)	
		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
1	<i>n</i> -heksana	7,96 ± 0,6	7,01 ± 0,19
2	etil asetat	11,75 ± 0,5	9,81 ± 0,57
3	etanol	7,7 ± 0,5	7,03 ± 0,5

Diameter zona hambat yang terbentuk pada ekstrak etil asetat lebih besar bila dibandingkan dengan diameter zona hambat pada ekstrak *n*-heksana dan etanol, menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat lebih aktif dibandingkan dengan ekstrak *n*-heksana maupun ekstrak etanol. Bakteri *Staphylococcus aureus* ternyata relatif lebih sensitif terhadap bahan bioaktif dibandingkan dengan bakteri *Escherichia coli*. Hal ini disebabkan karena adanya perbedaan komposisi dan struktur dinding sel yang dimiliki oleh masing-masing bakteri uji. Perbedaan bakteri gram positif dan bakteri negatif terdapat pada komposisi dan struktur dinding selnya. Struktur dinding sel bakteri gram positif lebih sederhana, yaitu berlapis tunggal dengan kandungan lipid yang rendah (1-4%) sehingga memudahkan bahan bioaktif masuk ke dalam sel. Struktur dinding sel bakteri gram negative lebih kompleks, berlapis tiga, yaitu lapisan luar lipoprotein, lapisan tengah lipopolisakarida yang berperan sebagai penghalang masuknya bahan bioaktif antibakteri, dan lapisan dalam berupa peptidoglikan dengan kandungan lipid tinggi (11-12%).

3.2 Uji Bioautografi dan Penentuan Golongan Senyawa Aktif

Hasil uji bioautografi dan penentuan golongan senyawa aktif dari fraksi etilasetat dengan menggunakan metode kromatografi lapis tipis (KLT) dengan fase gerak etilasetat : *n*-heksana (8:2) menunjukkan bahwa fraksi aktif mengandung senyawa antibakteri dengan R_f 0,75. Setelah disemprot dengan penampak bercak H_2SO_4 10% berwarna ungu yang mengindikasikan se-

nyawa antibakteri tersebut termasuk kedalam golongan senyawa terpenoid (Tabel 2).

TABEL 2: Hasil uji bioautografi dari fraksi terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*

No	Fraksi	R_f (cm)	Warna Terbentuk	Golongan Senyawa
1	etilasetat	0,75	Ungu	terpenoid

Terpenoid merupakan suatu golongan hidrokarbon yang banyak dihasilkan oleh tumbuhan dan terutama terkandung pada getah dan vakuola selnya. Pada tumbuhan senyawa-senyawa golongan terpen dan turunannya merupakan hasil metabolisme sekunder. Naim^[5] menyatakan bahwa terpen atau terpenoid aktif terhadap bakteri, virus dan protozoa. Terpenoid yang terdapat dalam minyak esensial tanaman telah bermanfaat untuk mengontrol *Listeria monocytogenes* pada makanan. Terpenoid yang terdapat pada cabai yang dikenal dengan Capsaicin memiliki sejumlah aktivitas biologis pada manusia seperti mempengaruhi sistem saraf, kardiovaskular dan digestif, membunuh bakteri.

Mekanisme penghambatan pertumbuhan bakteri oleh senyawa terpenoid diduga senyawa terpenoid akan bereaksi dengan porin (protein transmembran) pada membran luar dinding sel bakteri membentuk ikatan polimer yang kuat sehingga mengakibatkan rusaknya porin. Rusaknya porin yang merupakan pintu keluar masuknya substansi, akan mengurangi permeabilitas dinding sel bakteri yang akan mengakibatkan sel bakteri akan kekurangan nutrisi sehingga pertumbuhan bakteri terhambat atau mati^[6].

3.3 Pemurnian senyawa antibakteri

Pemurnian dilakukan untuk memisahkan senyawa antibakteri dari senyawa yang lainnya dengan menggunakan metode kromatografi gravitasi. Silica gel digunakan sebagai fase diam dan sebagai fase gerak digunakan pelarut *n*-heksana, etil asetat (8:2). Dengan laju elusi 17 tetes permenit dengan volume 5 ml. Senyawa antibakteri diperoleh pada botol ke 18. senyawa antibakteri yang diperoleh disebut dengan isolat E18.

3.4 Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)

Isolat E18 yang diperoleh ditentukan nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) nya. Hasil uji penentuan nilai Konsentrasi Hambat Minimum ditunjukkan pada Tabel 3.

Hasil uji penentuan nilai KHM menunjukkan bahwa isolat E18 memiliki nilai KHM 160 $\mu\text{g/ml}$ pada bakteri *Staphylococcus aureus* dan 200 $\mu\text{g/ml}$ terhadap bakteri *Escherichia coli*. Ini berarti bahwa isolat E18

TABEL 3: Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) isolat E18

Isolat	KHM ($\mu\text{g/ml}$)	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
Isolat E18	160	200

yang berasal dari daun jengkol memiliki tingkat aktivitas antibakteri cukup kuat dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*, sehingga tanaman jengkol (*Pithecolobium lobatum* [Benth]) sangat potensial untuk dijadikan sebagai sumber senyawa obat. Hal ini sesuai dengan pendapat yang dikemukakan oleh Holetz dkk. [7] bahwa berdasarkan nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) yang dimilikinya, maka senyawa antibakteri dibedakan menjadi 4, yaitu ; senyawa aktif yang memiliki nilai KHM kurang dari 100 $\mu\text{g/ml}$. Digolongkan sebagai senyawa yang memiliki tingkat aktivitas antibakteri yang sangat kuat. Senyawa ini sangat baik untuk dijadikan sebagai senyawa obat. Senyawa aktif yang memiliki nilai KHM antara 100-500 $\mu\text{g/ml}$, maka digolongkan sebagai senyawa yang memiliki tingkat aktivitas antibakteri yang cukup kuat. Senyawa aktif yang memiliki nilai KHM antara 500-1000 $\mu\text{g/ml}$ digolongkan sebagai senyawa yang memiliki tingkat aktivitas antibakteri yang lemah, dan senyawa aktif yang memiliki nilai KHM lebih dari 1000 $\mu\text{g/ml}$ digolongkan sebagai senyawa yang tidak memiliki aktivitas antibakteri.

Pemberian antibakteri dalam jumlah yang berlebihan dan secara terus menerus akan menyebabkan sel bakteri menjadi resisten. Pengujian yang dilakukan untuk mengetahui nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dari suatu senyawa antibakteri sangat penting karena selain bertujuan untuk meningkatkan efektifitas dari senyawa antibakteri tersebut juga bertujuan untuk mencegah timbulnya masalah resistensi bakteri karena penggunaan dosis yang berlebihan sehingga sel bakteri lama kelamaan akan menjadi kebal [8].

4 KESIMPULAN DAN SARAN

4.1 Kesimpulan

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

1. Senyawa antibakteri pada daun jengkol (*Pithecolobium lobatum* [Benth]) terdapat didalam fraksi etilasetat.
2. Senyawa antibakteri pada daun jenkol golongan senyawa terpenoid dengan nilai R_f 0,75, senyawa antibakteri yang diperoleh disebut dengan isolat E18.

3. Nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) isolat E18 terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* adalah 160 $\mu\text{g/ml}$ dan *Escherichia coli* adalah 200 $\mu\text{g/ml}$.

4.2 Saran

Perlu dilakukan isolasi dan identifikasi secara spesifik untuk mengetahui jenis senyawa terpenoid yang berfungsi sebagai senyawa aktif antibakteri yang terdapat dalam ekstrak daun jengkol (*Pithecolobium lobatum* [Benth]).

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Zuhud, 2001, Aktivitas antimikroba ekstrak kedaung (*Parkia roxburghii* G Don) terhadap bakteri pathogen, *Tekno & Industri Pangan*, XII(1): hal. 6-12
- [2] Sasongko, H & W. Asmara, 2002, Pengaruh Minyak Atsiri Dlingo (*Acorus calamus* L.) terhadap Profil Protein Bakteri Gram Positif dan Gram Negatif, *Teknosains*, 15 (3): 527-543
- [3] Whitmore, T.C., 1978, Tree Flora of malaya: *Chapter I A Manual for Forestters*, Vol 1, Forest Departement Ministry of Primary industries Malaysia Longman Publishing, Kuala Lumpur, Malaysia
- [4] Betina, V., 1973, Bioautography in paper and thin layer chromatography and its scope in the antibiotic field, *J. Chromatography*, (78), 41-51
- [5] Naim, R., 2004, Senyawa antibakteri dari tanaman, [Http://www.kompas.com.](http://www.kompas.com), Diakses pada tanggal 8 juli 2008
- [6] Gunawan, 2008, Antibakteri pada herba Meniran (*Phyllanthus niruri* Linn), *Jurnal Kimia*, Vol II (22), hal. 31-39
- [7] Holetz, F.B., G. L. Pessini, N.R. Sanchez, D. Aparicio, G. Cortez, C.V. Nakamura, & B.P.D. Filho, 2002, Screening of Some Plants Used in The Brazillian Folk Medicine for The Treatment of Infectious I, *Journal of Bioline International*, <http://www.bioline-org.br/request?02229>
- [8] Diarti, M.W., 2004, Penemu Senyawa Antimikroba dari Rumput Laut, *Harian Umum Kompas*: 1-3, <http://www.kompas.com/harian/10202/htm>