

# Penelusuran Aktivitas Antibakteri dari Kulit Akar Tumbuhan Medang Seluang (*Litsea spathulata*) terhadap Bakteri Uji *Escherichia coli* dan *Shigella dysenteriae*

Munawar<sup>1)</sup>, dan Elfita<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Jurusan Biologi, <sup>2)</sup>Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Sriwijaya  
Kampus Indralaya, Jl. Raya Palembang Prabumulih, Indralaya 30662  
Telp. +62-711-580306, E-mail: mu\_na\_war@yahoo.com

## Abstract

Screening for antibacterial activity from root bark of *Litsea spathulata* had been done. Antibacterial test on each fraction showed that hexane had the highest activity followed by ethyl acetate and methanol. Major compound from antibacterial active fraction had been isolated. Identification of this compound was carried out applying phytochemistry assay and spectroscopic methods, i.e. ultraviolet (UV), infrared (IR), and Gas Chromatography- Mass Spectroscopic (GC-MS). Minimum inhibiting concentration (MIC) value of the active fraction was 780  $\mu\text{g/mL}$  to *Escherichia coli* and 860  $\mu\text{g/mL}$  to *Shigella dysenteriae*.

**Key words:** antibacterial activity, *Litsea spathulata*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, spectroscopic methods

## Pendahuluan

Timbulnya berbagai penyakit infeksi oleh bakteri patogen masih memperlihatkan angka yang cukup tinggi dan terjadinya resistensi bakteri terhadap antibiotik yang selama ini diproduksi belum bisa dihindari. Hal tersebut menjadi salah satu faktor yang menuntut terus dilakukannya eksplorasi senyawa antibakteri baru, terutama yang berasal dari tumbuh-tumbuhan. Senyawa antibakteri dari tumbuhan tinggi yang telah diisolasi antara lain (24R)-24,25-epoksisikloartan-3-on dari bunga *Borrchia frutescens* yang bersifat antibakteri terhadap *Mycobacterium tuberculosis* (Cantrell *et al.*, 1996), 8-klorosimafilin, simafilin, dan 3-hidroksisimafilin dari *Moneses uniflora* yang bersifat antibakteri terhadap *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *B. subtilis*, dan *Candida albicans* (Saxena *et al.*, 1996), 7  $\alpha$ -hidroksi-6, 11-siklofarnes-3(15)-en-2-on dari *Premna oligotricha* yang bersifat antibakteri terhadap *B. pumilus*, *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus*, dan *Streptococcus faecalis* (Habtemariam *et al.*, 1993), 1,7-dihidroksixanton yang memperlihatkan aktivitas sebagai antimikroba (Dachriyanus *et al.*, 2004).

Tumbuhan lainnya yang telah banyak digunakan oleh kelompok masyarakat tertentu untuk mengobati berbagai macam penyakit infeksi adalah medang seluang (*Litsea spathulata*). Tumbuhan asli Nusantara bagian barat ini banyak dijumpai di Hutan Air Batuan, Kabupaten OKU, Sumatera Selatan. Tingginya mencapai 17 hingga 23 m, akar tunggang, kulit batang bersisik bulat berwarna kecoklatan, daun tunggal berwarna hijau berbentuk elips dan berujung runcing dengan panjang 8 hingga 10 cm dan lebar 3 hingga 5 cm. Bagian atas daun licin, bunga terletak di ujung tangkai, buah kecil berwarna merah (Gembong, 2000). Rebusan kulit akar medang seluang dikenal sangat ampuh untuk mengobati diare dan disentri.

Penyakit diare sangat berbahaya bila berlangsung dalam waktu yang cukup lama tanpa pengobatan yang cepat. Penyakit diare merupakan salah satu penyebab utama morbiditas dan mortalitas pada anak-anak di seluruh dunia dengan satu milyar kejadian sakit dan tiga hingga lima juta kematian setiap tahunnya (Pickering dan Snyder, 2000). Diare pada umumnya disebabkan oleh kelompok bakteri yang dapat hidup pada saluran

pencernaan manusia atau biasa disebut dengan *Enterobacteriaceae* (Misnadiarly, 1995). Dalam penelitian ini digunakan bakteri uji *Escherichia coli* dan *Shigella dysenteriae* untuk menelusuri aktivitas antibakteri dari kulit akar tumbuhan medang seluang.

## Materi dan Metode

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain bubuk kering kulit akar medang seluang, pelarut n-heksan, etilasetat, metanol, silika gel G60 70-230 mesh, KLT silika gel G60 F254, media uji antibakteri, bakteri *E. coli* dan *S. dysenteriae*. Adapun alat yang digunakan antara lain alat-alat gelas yang biasa digunakan di laboratorium, peralatan uji antibakteri, timbangan analitis, evaporator vakum, alat spektroskopi ultraviolet (UV), infrared (IR), dan *Gas Chromatography- Mass Spectroscopic* (GC-MS).

Sebanyak 1 kg bubuk kering kulit akar medang seluang diekstraksi dengan cara maserasi berturut-turut menggunakan pelarut n-heksan, etilasetat, dan metanol. Selanjutnya, dilakukan uji antibakteri pada masing-masing fraksi untuk mengetahui fraksi yang mempunyai aktivitas paling tinggi.

Media Nutrient Agar (NA) dan media Mueller Hinton Broth (MHB) dibuat sesuai dengan prosedur Oxoid (1998). Bakteri *E. coli* dan *S. dysenteriae* diremajakan dengan menginokulasikan biakan murni tersebut ke dalam media NA miring secara aseptik. Selanjutnya, dilakukan inkubasi biakan selama 24 jam pada temperatur 37°C (Jutono, 1973)

Pembuatan suspensi biakan *E. coli* dilakukan dengan cara mengambil satu ose biakan *E. coli* dari media NA, kemudian dimasukkan ke dalam 10 ml media uji secara aseptik dan dihomogenkan. Kemudian, jumlah sel yang ada dalam suspensi dihitung menggunakan *counting chamber E. coli* hingga mencapai jumlah  $\pm 10^5$  sel/ml. Sementara itu, pembuatan suspensi *S. dysenteriae* dilakukan dengan cara yang sama, tetapi jumlah sel untuk *S. dysenteriae* adalah  $10^3$  sel/ml (Hadioetomo, 1993).

Penentuan zone hambat dilakukan dengan metode difusi cakram. Uji antibakteri untuk fraksi yang diperoleh dilakukan dengan metode Kirby-Bauer atau metode difusi cakram (Cappucino dan Sherman, 1992). Media NA dicairkan hingga mencapai suhu 45°C. Suspensi *E. coli*/*S. dysenteriae* masing-masing sebanyak  $10^5$  sel/ml dan  $10^3$  sel/ml diinokulasikan ke dalam cawan petri dan dituangkan media NA, kemudian dihomogenkan dan dibiarkan hingga padat. Dengan menggunakan pinset, dicelupkan dua kertas cakram ke dalam masing-masing konsentrasi sampel. Kertas cakram diletakkan pada permukaan cakram yang berisi suspensi bakteri uji. Dilakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam, kemudian diukur zone hambatnya (Cappucino dan Sherman, 1992).

Fraksi yang memiliki aktivitas paling tinggi dipisahkan dengan teknik kromatografi. Sejumlah ekstrak aktif pekat dilarutkan, kemudian dianalisis dengan kromatografi lapis tipis (KLT) untuk memilih eluen yang sesuai, yang selanjutnya dipisahkan dengan kromatografi kolom terbuka menggunakan fase diam silika gel 60. Fraksi kolom dengan faktor retensi sama digabungkan, diuapkan, dan diuji aktivitas antibakterinya. Fraksi kolom yang memiliki aktivitas paling tinggi direkromatografi kolom dan direkristalisasi hingga diperoleh senyawa aktif dengan noda tunggal pada KLT.

Uji kemurnian dilakukan menggunakan KLT dengan beberapa variasi eluen dan KLT dua dimensi. Jika senyawa aktif tetap menunjukkan noda tunggal, maka dilakukan pengukuran sifat fisika, yaitu dengan mengukur titik leleh menggunakan alat Fischer John Melting Point. Selanjutnya, senyawa tersebut ditentukan konsentrasi hambat minimum atau *minimum inhibiting concentration* (MIC)-nya terhadap *E. coli* dan *S. dysenteriae*.

Penentuan MIC dilakukan dengan metode dilusi kaldu (Edberg dan Berger, 1986). Senyawa murni dilarutkan ke dalam medium MHB dengan gerak maju geometrik (interval antarkonsentrasi sama), dimulai dari konsentrasi tinggi ke konsentrasi rendah sebagai berikut (%): 0,9; 0,8; 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; dan 0,1. Selanjutnya, bakteri uji (dengan kerapatan  $10^5$  sel/ml untuk *E. coli* dan  $10^3$  untuk *S. dysenteriae*) diinokulasikan ke dalam masing-masing konsentrasi senyawa yang telah dibuat. Kontrol positif dibuat dengan cara memasukkan medium MHB ke dalam dua tabung reaksi, yaitu A1 dan A2, yang masing-

masing diinokulasi dengan *E. coli* dan *S. dysenteriae* tanpa ditambah dengan ekstrak kulit akar medang seluang. Semua tabung pengenceran serta tabung A1 dan A2 diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 48 jam. Setelah inkubasi, dari masing-masing tabung reaksi dilakukan seri pengenceran untuk mengetahui jumlah sel pada tiap konsentrasi. Pengenceran dilakukan hingga  $10^{-7}$  baik untuk masing-masing konsentrasi senyawa maupun untuk kontrol positif. Secara aseptik dituangkan media NA yang bersuhu 48 °C ke dalam tiap cawan petri dan dihomogenkan untuk memastikan sel-sel terdistribusi merata. Setelah agak padat, dilakukan inkubasi dengan posisi terbalik selama 48 jam pada suhu 37°C.

Setelah inkubasi selama 48 jam, dihitung jumlah sel pada tiap cawan pada masing-masing seri pengenceran yang berada pada interval 30-300 sel. Kemudian, dihitung jumlah sel pada masing-masing konsentrasi sampel. Jika jumlah sel pada konsentrasi perlakuan kurang dari kontrol positif, maka cawan diberi tanda negatif (-), dan jika sama atau lebih besar diberi tanda positif (+). Konsentrasi terkecil yang menunjukkan jumlah sel lebih besar daripada kontrol positif merupakan MIC senyawa murni terhadap bakteri uji. Jika semua seri konsentrasi senyawa yang dibuat menunjukkan jumlah sel kurang dari kontrol, maka dibuat seri konsentrasi yang lebih rendah dari yang ada hingga diperoleh MIC senyawa murni tersebut. Pada setiap pembuatan seri konsentrasi digunakan kontrol positif yang baru. Setelah ditentukan MIC-nya, senyawa murni diidentifikasi berdasarkan atas uji fitokimia dan data spektroskopi UV, IR, dan GC-MS hingga diperoleh suatu usulan struktur molekul.

## Hasil dan Pembahasan

Dari hasil maserasi 1 kg bubuk kering kulit akar medang seluang diperoleh 22,74 g ekstrak pekat n-heksana, 20,12 g ekstrak pekat etil asetat, dan 12,21 g ekstrak pekat metanol. Masing-masing ekstrak diuji aktivitas antibakterinya. Hasil yang diperoleh tertera pada Tabel 1.

Tabel 1. Uji aktivitas antibakteri fraksi-fraksi kulit akar *Litsea spathulata* (diameter daerah hambat dalam mm)

Table 1. Test of antibacterial activities of root bark fractions of *Litsea spathulata* (diameters of inhibiting areas are in mm)

Fraksi	Bakteri uji	Konsentrasi sampel % (b/v)		
		kontrol	5	10
Heksan	<i>E. coli</i>	0,0	10,2	10,8
	<i>S. dysenteriae</i>	0,0	9,8	10,1
Etil asetat	<i>E. coli</i>	0,0	8,1	8,4
	<i>S. dysenteriae</i>	0,0	7,8	8,0
Metanol	<i>E. coli</i>	0,0	7,5	8,4
	<i>S. dysenteriae</i>	0,0	7,2	7,3

Pada Tabel 1 terlihat bahwa fraksi heksan memiliki aktivitas antibakteri paling tinggi yang diikuti oleh fraksi etil asetat dan fraksi methanol. Selanjutnya, dipilih fraksi heksan untuk penelusuran senyawa antibakteri.

Sebanyak 3 g ekstrak heksan dipisahkan dengan kromatografi kolom menggunakan fase diam silika gel 70-230 mesh sebanyak 60 g dan eluen n-heksan : etil asetat secara bergradien, yang dilanjutkan dengan eluen etil asetat : metanol secara bergradien. Didapatkan empat fraksi kolom yang masing-masing diuji aktivitas antibakterinya dengan hasil seperti tertera pada Tabel 2.

Tabel 2. Uji aktivitas antibakteri fraksi-fraksi kolom heksan (diameter daerah hambat dalam mm)

Table 2. Test of antibacterial activities of hexane column fractions (diameters of inhibiting areas are in mm)

Fraksi kolom heksan	Bakteri uji	Konsentrasi sampel % (b/v)		
		kontrol	5	10
F1	<i>E. coli</i>	0,0	7,5	8,0
	<i>S. dysenteriae</i>	0,0	7,6	7,8
F2	<i>E. coli</i>	0,0	10,4	10,7
	<i>S. dysenteriae</i>	0,0	10,1	10,7
F3	<i>E. coli</i>	0,0	7,8	7,9
	<i>S. dysenteriae</i>	0,0	7,6	7,6
F4	<i>E. coli</i>	0,0	6,5	6,7
	<i>S. dysenteriae</i>	0,0	6,6	6,5

Pada Tabel 2 terlihat bahwa F2 memiliki aktivitas antibakteri paling tinggi terhadap kedua bakteri uji, sedangkan F1, F3, dan F4 memiliki aktivitas antibakteri yang rendah. Selanjutnya, F2 dimurnikan dengan rekristalisasi hingga diperoleh senyawa murni dengan noda tunggal pada KLT yang memiliki titik leleh 210-211°C. Uji fitokimia senyawa F2 menunjukkan hasil positif turunan fenolat. Oleh karena F2 memiliki aktivitas antibakteri paling tinggi dan berada dalam jumlah paling besar, maka penentuan MIC dilakukan terhadap senyawa yang terdapat di dalam F2 fraksi heksan. Hasilnya dapat dilihat pada Tabel 3. Berdasarkan atas data pada Tabel 3, dapat ditentukan bahwa konsentrasi hambat minimum F2 terhadap bakteri *E. coli* adalah 0,078% atau 780 µg/mL.

Tabel 3. Konsentrasi hambat minimum F2 fraksi heksan terhadap *E. coli* (seri pengenceran tahap III)Table 3. Minimum inhibiting concentrations of F2 hexane fraction on *E. coli* (3<sup>rd</sup> dilution series)

Nomor tabung reaksi	Konsentrasi F2 dalam medium MHB (%)	Hasil pengamatan terhadap <i>E. coli</i>
1	0,079	-
2	0,078	-
3	0,077	+
4	0,076	+
5	0,075	+
6	0,074	+
7	0,073	+
8	0,072	+
9	0,071	+

Keterangan: (-) : jumlah sel kurang dari kontrol positif

(+) : jumlah sel sama atau lebih dari kontrol positif

Note: (-) : cell number less than that of positive control

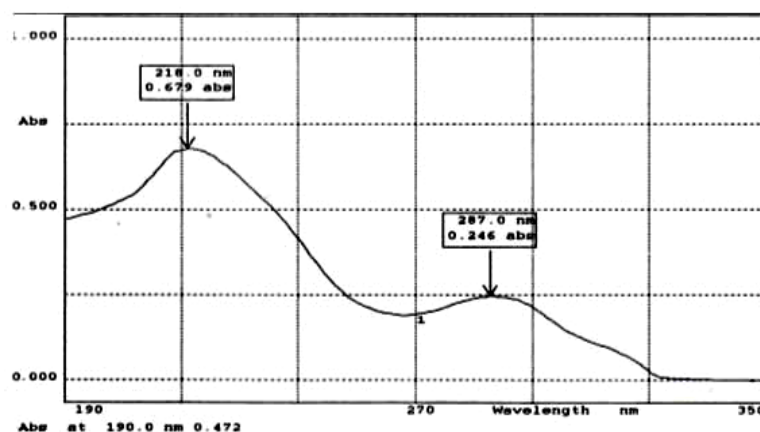
(+) : cell number equal to or more than that of positive control

Berdasarkan atas data pada Tabel 4, dapat ditentukan bahwa konsentrasi hambat F2 terhadap bakteri *S. dysenteriae* adalah 0,086% atau 860 µg/mL. Pada identifikasi senyawa murni F2 fraksi heksan, terlihat bahwa spektrum UV memberikan puncak pada panjang gelombang ( $\lambda$  maks) 218 nm. Pada daerah panjang gelombang ini terjadi transisi elektron  $\pi \rightarrow \pi^*$  untuk ikatan C = C terisolasi dan pada  $\lambda$  maks 287 nm terjadi transisi elektron  $\pi \rightarrow \pi^*$  untuk ikatan C = C terkonjugasi aromatik (Gambar 1).

Tabel 4. Konsentrasi hambat minimum F2 fraksi heksan terhadap *S. dysenteriae* (seri pengenceran tahap III)Table 4. Minimum inhibiting concentrations of F2 hexane fraction on *S. dysenteriae* (3<sup>rd</sup> dilution series)

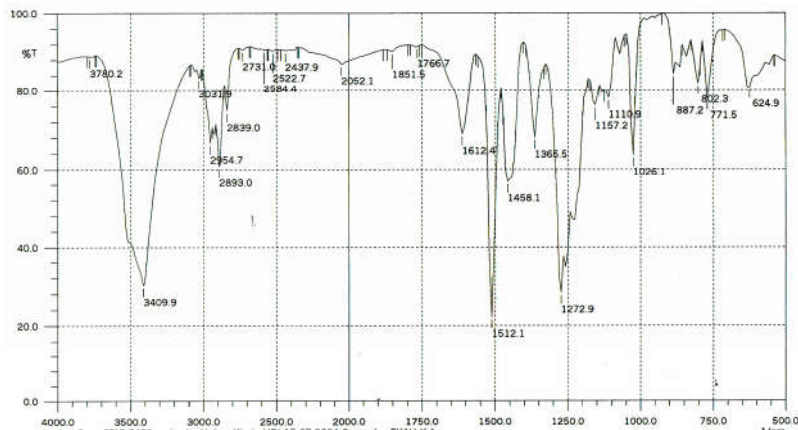
Nomor tabung reaksi	Konsentrasi F2 dalam medium MHB (%)	Hasil pengamatan terhadap <i>S. dysenteriae</i>
1	0,089	-
2	0,088	-
3	0,087	-
4	0,086	-
5	0,085	+
6	0,084	+
7	0,083	+
8	0,082	+
9	0,081	+

Keterangan: (-) : jumlah sel kurang dari kontrol positif  
 (+) : jumlah sel sama atau lebih dari kontrol positif  
 Note: (-) : cell number less than that of positive control  
 (+) : cell number equal to or more than that of positive control



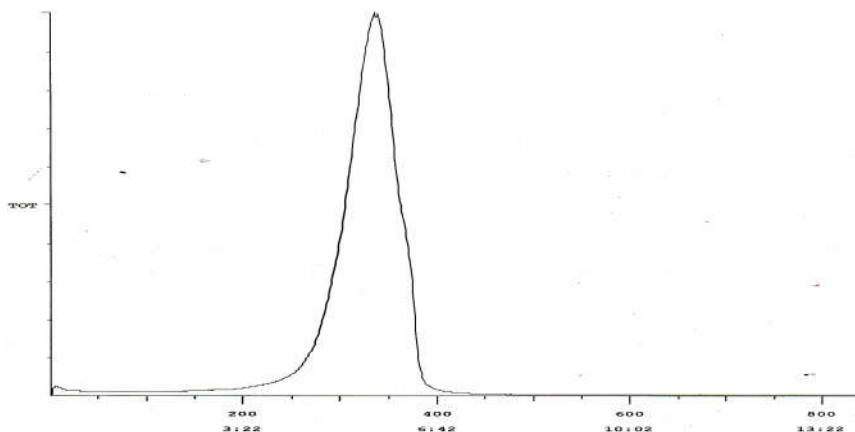
Gambar 1. Spektrum UV senyawa hasil isolasi fraksi heksan F2  
 Figure 1. UV spectrum of isolated compound of hexane fraction F2

Pengukuran dengan spektrum IR (Gambar 2) memberikan informasi adanya puncak serapan OH pada bilangan gelombang  $3409,9\text{ cm}^{-1}$  yang diperkuat dengan adanya tekuk OH pada  $1365,5\text{ cm}^{-1}$ . Ulur C – H aromatik dapat dilihat dengan adanya pita serapan pada bilangan gelombang  $3031,9\text{ cm}^{-1}$  yang didukung oleh pita serapan pada bilangan gelombang  $887,2\text{-}802,3\text{ cm}^{-1}$  untuk C-H aromatik. Ulur C-H alifatik dilihat dari bilangan gelombang  $2954,7\text{-}2839,0\text{ cm}^{-1}$ . Pita serapan akibat adanya C = C terkonjugasi terlihat pada bilangan gelombang  $1612,4\text{ cm}^{-1}$ . Gugus C = C terkonjugasi diperkuat dengan spektrum UV yang memberikan  $\lambda_{\text{maks}}$  287 nm. Adanya gugus C-O-C didasarkan atas serapan pada  $1157,2\text{-}1110,9\text{ cm}^{-1}$ . CH<sub>3</sub>-O terlihat pada bilangan gelombang  $1458,1\text{ cm}^{-1}$ .



Gambar 2. Spektrum IR senyawa hasil isolasi fraksi heksan F2  
Figure 2. IR spectrum of isolated compound of hexane fraction F2

Kromatogram GC (Gambar 3) memperlihatkan munculnya satu puncak pada waktu retensi 7,00 menit yang menandakan bahwa senyawa hasil isolasi sudah murni. Spektrum massa senyawa hasil isolasi memberikan puncak ion molekul  $m/z$  328 yang sekaligus merupakan puncak dasar. Pola fragmentasi menunjukkan munculnya puncak pada  $m/z$  297 yang terbentuk dengan hilangnya molekul  $\text{CH}_3\text{O}$  (BM 31). Hilangnya molekul metoksi ini didukung oleh adanya gugus metoksi pada spektrum IR, yaitu pada bilangan gelombang  $1458,1 \text{ cm}^{-1}$ . Munculnya fragmentasi pada  $m/z$  78 menunjukkan adanya cincin aromatik dan munculnya fragmentasi pada  $m/z$  92 menunjukkan adanya gugus aromatik yang mengikat gugus metilen. Senyawa perbandingan yang terdapat pada pangkalan data memiliki persen kemiripan yang kecil. Persen kemiripan tertinggi hanya 76,0 % sehingga tidak dapat digunakan sebagai acuan.



Gambar 3. Kromatogram GC senyawa hasil isolasi fraksi heksan F2  
Figure 3. GC chromatogram of isolated compound of hexane fraction F2

Dengan demikian, usulan struktur untuk senyawa hasil isolasi fraksi F2 tersebut belum diperoleh karena tidak ada data lengkap yang menunjang. Dalam hal ini hanya dapat diusulkan bahwa senyawa hasil isolasi fraksi F2 merupakan senyawa aromatik yang memiliki substituen alifatik, gugus OH, dan gugus metoksi.

## Kesimpulan

Fraksi kulit akar medang seluang yang memiliki aktivitas antibakteri tertinggi adalah fraksi heksan, yang diikuti oleh fraksi etil asetat dan metanol. Dari fraksi F2 heksan

diperoleh senyawa murni berupa kristal putih dengan titik leleh 210-211°C. Senyawa murni hasil isolasi ini merupakan senyawa aromatik yang memiliki substituen alifatik, gugus OH, dan gugus metoksi. Nilai MIC F2 adalah 780 µg/mL terhadap bakteri *E. coli* dan 860 µg/mL terhadap bakteri *S. dysenteriae*.

### Daftar Pustaka

- Cantrell, C.L., L. Tiansheng, F.R. Froczek, N.H. Fischer. 1996. Antimycobacterial Cycloartanes from *Borrchia frutescen*. J. Nat. Pro. 59: 1131.
- Cappucino, J.G. and N. Sherman. 1992. Microbiology: a Laboratory Manual. The Benyamin/Cummings Publ. Co. Inc., New York.
- Dachriyanus, P. Amelia, and Rustini. 2004. Isolasi senyawa antimikroba dari kulit batang *Garcinia griffithii* T. Anders. Jurnal Matematika dan Pengetahuan Alam 13(2): 114
- Gembong, T.S. 2000. Taksonomi Tumbuhan Spermatophyta. Edisi ke-6. Gadjah Mada Univ. Press, Yogyakarta.
- Habtemariam, S. A.I. Gray, P.G. Waterman. 1993. A new antibacterial Sesquiterpene from *Premna oligotricha*. J. Nat. Prod. 56(1): 140.
- Hadioetomo, R.S. 1993. Mikrobiologi Dasar dalam Praktek. Penerbit PT Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Jutono. 1973. Pedoman Praktikum Mikrobiologi Umum untuk Perguruan Tinggi. Penerbit Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- Misnadiarly. 1995. Ekologi diare pada turis dan anak-anak sekolah di beberapa negara di dunia. Majalah Kesehatan Masyarakat Indonesia 23(2): 124-127.
- Oxoid. 1998. The Oxoid Manual 8<sup>th</sup> Ed. Oxoid Ltd., Wade Road Besingstoke Hampshire, England.
- Pickering, L.K. dan J.D. Snyder. 2000. Gastroentritis dalam W.E. Nelson, R.E. Behrman, R. Kliegman dan A.M. Ann. 2000. Ilmu Kesehatan Anak. Penerbit Buku Kedokteran, Jakarta.
- Saxena, G., S.W. Farmer, R.E.W. Hancock, and G.H.N. Towers. 1996. Chlorochimaphilin: a new antibiotic from *Moneses uniflora*. J. Nat. Prod. 59: 62.