

**Skrining Fitokimia dan Uji Aktivitas Antibakteri Tumbuhan Jelutong Pipit
(*Kibatalia arborea* (Blume) G.Don) terhadap *Escherichia coli***

**Phytochemical Screening and Antibacterial Activity of *Kibatalia
arborea* (Blume) G.Don against *Escherichia coli***

Ita Husnul Chotimah, Bawon Triatmoko, Ari Satia Nugraha*

Drug Utilization and Discovery Research Group (DUDRG), Universitas Jember
Jl Kalimantan No.37, Jember 68121, Indonesia

*Corresponding author email: arisatia@unej.ac.id

Received 13-07-2019 **Accepted** 07-03-2021 **Available online** 07-03-2021

ABSTRAK

Infeksi menjadi masalah kesehatan yang serius terutama di negara berkembang seperti di Indonesia. Sejumlah agen antibakteri baru yang berasal dari metabolit sekunder tumbuhan telah banyak diteliti salah satunya adalah *Kibatalia arborea* (Bl) G.Don. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas dan kandungan golongan senyawa yang ada pada daun *K. arborea*. Daun *K. arborea* diekstraksi dengan menggunakan metanol. Ekstrak dari daun *K. arborea* kemudian difraksinasi dengan metode fraksinasi bertingkat menggunakan pelarut n- heksana, diklorometana dan etil asetat. Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode mikrodilusi untuk mendapatkan nilai IC_{50} ekstrak dan fraksi daun *K. arborea* terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922. Skrining fitokimia dilakukan untuk melihat adanya kandungan golongan senyawa alkaloid, terpenoid, polifenol dan flavonoid. Uji aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi daun *K. arborea* terhadap *E. coli* menunjukkan bahwa fraksi etil asetat ($516,458 \pm 12,073$ $\mu\text{g/ml}$) memiliki aktivitas yang paling besar, diikuti ekstrak ($590,665 \pm 24,157$ $\mu\text{g/ml}$) dan dua fraksi dengan nilai IC_{50} yang tidak berbeda secara signifikan yaitu fraksi n-heksana ($880,667 \pm 22,587$ $\mu\text{g/ml}$) dan fraksi diklorometana ($848,616 \pm 37,029$ $\mu\text{g/ml}$). Hasil skrining fitokimia ekstrak metanol daun *K. arborea* menunjukkan bahwa ekstrak mengandung senyawa dari golongan flavonoid, polifenol, terpenoid. Fraksi heksana mengandung alkaloid dan terpenoid. Fraksi diklorometana mengandung alkaloid, terpenoid dan polifenol. Fraksi etil asetat mengandung terpenoid, polifenol dan flavonoid. Sedangkan residu tidak mengandung golongan senyawa flavonoid, polifenol, terpenoid dan alkaloid.

Kata kunci: antibakteri, *Escherichia coli*, *Kibatalia arborea* (Blume) G.Don, skrining fitokimia

ABSTRACT

Infection is one of the most serious health problem especially in development country such as Indonesia. Some of new antibacterial agent are isolated from plant. Kibatalia arborea (Blume) G.Don is one of the species from Apocynaceae that suspected to possess antibacterial activity. The purpose of this research was to find the antibacterial activity and class of hytochemical compound of K. arborea. The leaves of K. arborea were extracted using methanol. Then, the extract was fractionated by n-hexane, dichloromethane, and ethyl acetate using liquid partition methode. Broth microdilution methode was used to determine the IC_{50} of extract and fractions againts Escherichia coli ATCC 25922. Phytochemical screening was conducted to find whether extract and fractions contain alkaloid, terpenoid, polyphenol and flavonoid. The antibacterial assay recorded that ethyl acetate fraction has the biggest activity againts E.coli, followed by methanol extract, and two fractions that has IC_{50} with unsignificant value which is hexana fraction and dicholoromethane fraction. Extract contained alkaloid, terpenoid, polyphenol and flavonoid. N-hexana fraction was positive for alkaloid and terpenoid. Dichloromethane fraction was positive for alkaloid, terpenoid and polyphenol. Ethyl acetate was positive containing terpenoid, polyphenol, and flavonoid, while the residue did not contain the four class of the compounds.

Keywords: antibacterial activity, Escherichia coli, Kibatalia arborea (Bl.) G.Don, phytochemical screening

Pendahuluan

Infeksi menjadi masalah kesehatan yang serius terutama di negara berkembang. WHO melaporkan tiga dari sepuluh penyebab kematian tertinggi di dunia tersebut disebabkan oleh infeksi pada tahun 2016 diantaranya infeksi saluran pernapasan bawah mencapai 3 juta kematian, diare mencapai 1,4 juta kematian, dan TBC mencapai 1,3 juta kematian (WHO EMRO, 2019). Antibiotik hingga saat ini menjadi andalan dalam terapi penyakit infeksi. Akan tetapi, terapi antibiotik yang tidak tepat dan penggunaan yang berlebihan menjadi penyebab terjadinya resistensi (Hashemi dkk., 2013).

Escherichia coli merupakan flora normal di dalam usus manusia. Tetapi

beberapa strain *E.coli* mampu menyebabkan penyakit. *E.coli* yang bersifat patogen umumnya menyebabkan infeksi enterik. *E.coli* juga dapat menyebabkan infeksi ekstraintestinal seperti infeksi saluran kemih, meningitis dan sepsis (Clements dkk., 2012). Kematian akibat diare yang disebabkan *E.coli* diperkirakan mencapai 51185 jiwa pada tahun 2016 (Khalil dkk., 2018).

Penelitian terhadap senyawa metabolit sekunder telah menghasilkan berbagai senyawa yang memiliki aktivitas obat. Salah satu bahan alam yang diduga memiliki aktivitas antimikroba adalah *Kibatalia arborea* (Blume) G. Don. Tumbuhan ini termasuk dalam keluarga Apocynaceae yang sangat dikenal sebagai sumber

penghasil senyawa yang banyak digunakan pada terapi obat manusia (Dey dkk., 2017). Penelitian ini ditujukan untuk mengetahui potensi *K. arborea* dalam menghambat pertumbuhan *E. coli* sebagai dasar penemuan obat berbasis bahan alam.

Metode Penelitian

Alat dan bahan

Alat yang diperlukan dalam penelitian ini antara lain seperangkat alat gelas, blender, cawan porselen, spatula logam, corong pisah (Pyrex), vortex (Heidolph), *TLC chamber* (Duran), *yellow tip*, *blue tip*, mikropipet (Socorex), *petri disk disposable*, jarum ose, pembakar spirtus, spreader, *orbital incubator* (Stuart SI600), *microplateflatt 96 well* (iwaki), *Laminar Air Flow* (LabGard AIR), Autoklaf (TOMY ES-315), *microplate reader* (Corona SH-1000), neraca analitik (ES 225SM-DR), *hot plate* (UC152), *orbital shaker* (Stuart SSL1).

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah simplisia daun *K. arborea* yang didapat dari Materia Medika Batu, *Escherichia coli* ATCC 25922, metanol pa (Merck), heksana pa (Merck), diklorometana pa (Merck), etil asetat pa (Merck), butanol, asam asetat glasial, kloroform, reagen Dragendorff, KOH, anisaldehyd asam sulfat, FeCl₃, vanilin, H₂SO₄, silika gel F₂₅₄, DMSO (Merck), akuades demineralisata (Hydrobatt), parafilm (M parafilm), *Mueller Hinton Agar* (Merck), *Mueller Hinton Broth* (Merck), CaCl₂, MgCl₂, dan gentamisin sediaan injeksi 40 mg/ml.

Jalannya penelitian

1. Ekstraksi

Simplisia yang didapat dari Materia Medika Batu dihaluskan dengan menggunakan blender. Serbuk diayak supaya memiliki ukuran yang seragam. Serbuk kemudian dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer. Pelarut metanol ditambahkan ke dalam serbuk dengan perbandingan 1:5 (b/v). Ekstraksi dibantu dengan *orbital shaker* dan didiamkan selama sehari semalam. Ekstrak disaring dan dikumpulkan filtratnya kemudian filtrat dikeringkan.

2. Fraksinasi

Ekstrak yang diperoleh selanjutnya difraksinasi dengan n-heksana, diklorometana dan etil asetat secara bertingkat sehingga didapat fraksi heksana, fraksi diklorometana, fraksi etil asetat dan residu.

3. Skrining fitokimia

Skrining fitokimia dilakukan dengan metode KLT secara kualitatif. Kandungan senyawa yang ingin diketahui adalah alkaloid, flavonoid, polifenol, serta terpenoid. Skrining alkaloid dilakukan dengan melarutkan ekstrak dan fraksi dalam metanol. Sejumlah larutan ditotolkan ke atas lempeng KLT kemudian dielusi dalam fase gerak toluen : etil asetat : metanol (7:2:1). Plat KLT yang telah dielusi kemudian dikeringkan dan disemprot dengan pereksi Dragendorff. Noda berwarna jingga menunjukkan adanya alkaloid di dalam ekstrak.

Skrining flavonoid dilakukan dengan melarutkan ekstrak dan fraksi dalam metanol. Larutan kemudian ditotolkan di atas plat KLT dan dielusi pada lapisan atas dari campuran butanol : asam asetat glasial : air (4:1:5). Setelah dielusi, plat KLT dikeringkan dan diberi penampak noda uap amonia. Keberadaan flavonoid ditunjukkan dengan timbulkan noda kuning.

Skrining senyawa polifenol dilakukan dengan melarutkan ekstrak dan fraksi dalam metanol. Larutan ditotolkan di atas plat KLT dan dielusi dengan menggunakan fase gerak kloroform : etil asetat : metanol (1:5:4). Setelah plat KLT dielusi dan dikeringkan, penampak noda berupa FeCl_3 disemprotkan kemudian dipanaskan selama 1-2 menit. Polifenol diindikasikan dengan timbulnya warna hitam.

Skrining terpenoid dilakukan dengan melarutkan ekstrak dan fraksi dilarutkan dalam metanol. Sampel ditotolkan di atas lempeng KLT dan dielusi dengan fase gerak n-heksana : etil asetat (4:1). Plat KLT yang telah dielusi, kemudian dikeringkan lalu disemprot dengan reagen anisaldehyd asam sulfat. Plat KLT dipanaskan, jika timbul warna merah-ungu atau ungu maka sampel mengandung triterpenoid.

4. Uji aktivitas antibakteri

Media CAMHB dibuat dengan campuran *Mueller Hinton Broth* ditambah dengan larutan MgCl_2 dan CaCl_2 . Media disterilisasi dengan

menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan 1 atm. Volume yang ditambahkan ke dalam 80 ml media yaitu 80 μL untuk larutan $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ dan 160 μL untuk larutan induk $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Larutan standar 0,5 McFarland disiapkan dengan melarutkan BaCl 1,175% sebanyak 0,05 mL ditambahkan ke dalam larutan H_2SO_4 1% sebanyak 9,95 mL.

Larutan uji dibuat dalam konsentrasi 2048, 1024, 512, 256, dan 128 $\mu\text{g/mL}$ dalam DMSO 1%. Kontrol positif yang digunakan adalah sediaan injeksi gentamisin dengan konsentrasi 4; 2; 1; dan 0,5 $\mu\text{g/mL}$. DMSO 1% digunakan sebagai kontrol negatif.

Bakteri *E. coli* diambil dari kultur peremajaan dengan menggunakan jarum ose suspensi bakteri kemudian dinilai kekeruhannya dengan cara membandingkan nilai absorbansi suspensi bakteri dengan absorbansi 0,5 McFarland pada panjang gelombang 625 nm. Absorbansi yang didapat berkisar antara 0,08 sampai 0,13 sehingga didapat jumlah bakteri sekitar 1×10^8 CFU/mL. Suspensi bakteri diencerkan 100 kali sehingga didapat konsentrasi bakteri 1×10^6 CFU/mL. Perlakuan terdiri dari campuran 50 μL ekstrak dan fraksi (pada konsentrasi 2048, 1024, 512, 256, atau 128 $\mu\text{g/mL}$), dan 50 μL bakteri dalam media CAMHB. Kontrol ekstrak terdiri dari campuran 50 μL ekstrak dan fraksi tiap

konsentrasi 2048, 1024, 512, 256, atau 128 µg/mL dengan 50 µL media CAMHB. Kontrol negatif terdiri dari campuran 50 µL DMSO 1% dalam media CAMHB dan 50 µL bakteri dalam media CAMHB. Kontrol DMSO 1% terdiri dari 50 µL media CAMHB dan 50 µL DMSO 1% dalam media CAMHB. Kontrol positif terdiri dari 50 µL gentamisin dengan konsentrasi 4; 2; 1; dan 0,5 µg/mL dan 50 µL bakteri dalam media CAMHB. Kontrol gentamisin terdiri dari 50 µL gentamisin dengan konsentrasi 4 µg/mL; 2 µg/mL; 1 µg/mL; 0,5 µg/mL dan 50 µL media CAMHB. Kontrol negatif gentamisin terdiri dari 50 µL media CAMHB dan 50 µL bakteri dalam media CAMHB. Kontrol media terdiri dari 100 µL CAMHB. Sampel dan kontrol diinkubasi selama 20 jam pada suhu 37°C dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 625 nm.

$$\% \text{ Penghambatan} = 1 - \frac{(AbsR - AbsS)}{(AbsP - AbsQ)} \times 100\%$$

Dengan Abs = absorbansi, P = kontrol negatif (DMSO 1% atau media + suspensi bakteri), Q = kontrol media (DMSO 1% atau

media), R = uji ekstrak/fraksi/gentamisin + suspensi bakteri), S = kontrol uji (ekstrak/fraksi/gentamisin + media).

Hasil dan Pembahasan

Hasil uji aktivitas antibakteri *K. arborea* ditunjukkan oleh Tabel 1. Hasil uji aktivitas antibakteri *K. arborea* ini dapat diterima karena memenuhi syarat keterulangan metode yang ditetapkan oleh The Commission of The European Communities (2005), untuk pengujian berbasis sel dimana nilai CV yaitu $\leq 30\%$.

Hasil skrining fitokimia ekstrak daun *K. arborea* ditunjukkan oleh Tabel 2. Ekstrak metanol daun *K. arborea* mengandung senyawa flavonoid, polifenol, terpenoid dan alkaloid.

Fraksi n-heksana mengandung alkaloid dan terpenoid; fraksi diklorometana mengandung alkaloid, terpenoid dan polifenol; fraksi etil asetat mengandung terpenoid, polifenol dan flavonoid. Sedangkan residu tidak mengandung metabolit sekunder flavonoid, polifenol, terpenoid dan alkaloid (Tabel 3).

Tabel 1. Nilai IC₅₀ ekstrak dan fraksi *K. arborea* (Bl.) G. Don terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922

Kelompok	IC ₅₀ ± SD (µg/ml)	CV (%)
Ekstrak	590,665±24,157 ^a	4,090
Fraksi heksana	880,667±22,587 ^b	2,565
Fraksi diklorometana	848.616±37,029 ^b	4,363
Fraksi etil asetat	516,458±12,073 ^c	2,338

(a, b, c) Notasi huruf yang sama menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan ($p > 0,05$) antar kelompok uji berdasarkan uji *one way Anova*

Tabel 2. Hasil skrining fitokimia ekstrak metanol daun *K. arborea*

Golongan senyawa	Hasil	Keterangan
Terpenoid	+	Timbul noda berwarna kuning
Alkaloid	+	Timbul noda berwarna jingga
Polifenol	+	Timbul noda berwarna hitam
Flavonoid	+	Timbul noda berwarna ungu

Tabel 3. Hasil skrining fitokimia fraksi *K. arborea*

Golongan senyawa	Fraksi			
	Heksana	Diklorometana	Etil asetat	Residu
Terpenoid	+	+	+	-
Alkaloid	+	+	-	-
Polifenol	-	+	+	-
Flavonoid	-	-	+	-

Keterangan: (+) ada, (-) tidak ada

Semakin kecil nilai IC_{50} maka semakin besar aktivitas antibakteri yang dimiliki sampel. Berdasarkan hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak metanol dan fraksi daun *K. arborea* menunjukkan urutan aktivitas yang paling besar yaitu fraksi etil asetat, ekstrak metanol, dan dua kelompok yang tidak berbeda signifikan fraksi heksana dan fraksi diklorometana. Pengujian aktivitas antibakteri terhadap residu tidak dilakukan karena rendemen yang kecil dan hasil uji orientasi menunjukkan penghambatan pada konsentrasi 2048 ppm dibawah 50 %. Nilai IC_{50} pada fraksi n-heksana dan fraksi diklorometana lebih rendah dibandingkan dengan fraksi etil asetat. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa di dalam fraksi etil asetat memiliki aktivitas antibakteri yang paling besar. Aktivitas antibakteri pada ekstrak lebih rendah dibandingkan fraksi etil asetat yang dapat disebabkan karena perbedaan konsentrasi senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri.

Berdasarkan hasil skrining fitokimia yang telah dilakukan, kandungan fitokimia yang ada di dalam fraksi etil asetat adalah senyawa flavonoid dan senyawa polifenol. Flavonoid merupakan senyawa yang disintesis tumbuhan yang sangat dikenal sebagai respon terhadap infeksi bakteri. Mekanisme aksi dari flavonoid sebagai antibakteri yaitu dengan menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi membran sitoplasma, atau dengan menghambat metabolisme energi (Cushnie dan Lamb, 2005). Menurut beberapa literatur, tanaman dari famili Apocynaceae seperti *Adenium obesum* memiliki kandungan flavonoid 3,5,7,3', 4', 5'-heksahidroksiflavon yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Proteus vulgaris* pada konsentrasi 200 µg/ml (Hossain dkk., 2017). Selain itu, tanaman *Alstonia macrophylla* juga memiliki kandungan senyawa flavonoid tricin-4'-O-L-arabinoside yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia*

coli (Parveen dkk., 2010). Tanaman lain, yaitu *Solenostemma argel* mengandung kaempferol, kaempferol-3-O- β -D-glucopiranosil(1 $\rightarrow$ 2) β -Dpsiklopiranosida dan kaempferol-3-O- α -L-arabinopiranosil(1 $\rightarrow$ 2) β -D-galactopiranosida yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli*, *Brodetella brochiseptica*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, dan *Bacillus pumilus* (Shafek dkk., 2012).

Kesimpulan

Ekstrak metanol daun *K. arborea* dan fraksinya memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E. coli*. Fraksi etil asetat memiliki aktivitas terbaik dengan nilai IC₅₀ terkecil yaitu sebesar 516,458 $\pm$ 12,073 μ g/ml. Ekstrak memiliki aktivitas dibawah fraksi etil asetat dengan nilai IC₅₀ sebesar 590,655 $\pm$ 24,157 μ g/ml. Aktivitas terendah dimiliki oleh fraksi heksana dan fraksi diklorometana dengan nilai IC₅₀ sebesar 880,667 $\pm$ 22,587 μ g/ml dan 848,616 $\pm$ 37,029 μ g/ml. Ekstrak metanol daun *K. arborea* mengandung senyawa flavonoid, polifenol, terpenoid dan alkaloid. Fraksi heksana mengandung alkaloid dan terpenoid; fraksi diklorometana mengandung alkaloid, terpenoid dan polifenol; fraksi etil asetat mengandung terpenoid, polifenol dan flavonoid. Sedangkan residu tidak mengandung metabolit sekunder flavonoid, polifenol, terpenoid dan alkaloid.

Daftar Pustaka

Anonim. 2005. Requirements for the determination of levels of dioxins

and dioxin-like pcbs in feedingstuffs rules. *Official Journal of the European Communities*. 15–21.

Clements, A., J. C. Young, N. Constantinou, dan G. Frankel. 2012. Infection strategies of enteric pathogenic escherichia coli. *Gut Microbe*. 3(2):71–87.

Cushnie, T. P. T. dan A. J. Lamb. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 26(5):343–356.

Dey, A., A. Mukherjee, dan M. Chaudhury. 2017. *Alkaloids From Apocynaceae*. Dalam *Studies in Natural Products Chemistry*

Hashemi, S., A. Nasrollah, dan M. Rajabi. 2013. Irrational antibiotic prescribing: a local issue or global concern? *EXCLI Journal*. 12:384–395.

Hossain, M. A., M. Sohail Akhtar, S. Said, dan T. H. A. Al-Abri. 2017. Two new flavonoids from adenium obesum grown in oman. *Journal of King Saud University - Science*. 29(1):62–69.

Khalil, I. A., C. Troeger, B. F. Blacker, P. C. Rao, A. Brown, D. E. Atherly, T. G. Brewer, C. M. Engmann, J. A. Plattsmills, F. Qadri, M. S. Riddle, E. T. Ryan, D. A. Shoultz, A. D. Steele, J. L. Walson, J. W. Sanders, A. H. Mokdad, C. J. L. Murray, S. I. Hay, R. C. R. Jr, F. Bill, dan M. G. Foundation. 2018. Morbidity and mortality due to shigella and enterotoxigenic escherichia coli diarrhoea : the global burden of disease study 1990 – 2016. *The*

- Lancet Infectious Diseases*. 3099(18):1–12.
- Parveen, M., Z. Khanam, A. Ali, dan S. M. Ahmad. 2010. A novel antimicrobial flavonoidic glycoside from the leaves of *Alstonia macrophylla* Wall. ex A. DC (Apocynaceae). *Chinese Chemical Letters*. 21(5):593–595.
- Shafek, R. E., N. H. Shafik, dan H. N. Michael. 2012. Antibacterial and antioxidant activities of two new kaempferol glycosides isolated from *Solenostemma argel* stem extract. *Asian Journal of Plant Sciences*. 11(3):143–147.
- WHO EMRO. 2019. Infectious Diseases | Health Topics. <http://www.emro.who.int/health-topics/infectious-diseases/index.html> [Diakses pada February 5, 2019].