Jurnal Sains dan Teknologi Farmasi , Vol. 9, No. 2, 2004, 55 - 57
Akreditasi DIKTI Depdiknas RI No. 49/DIKTI/Kep/2003

ISSN : 1410-0177

Isolasi Senyawa Antimikroba Dari Fraksi Semi Polar Ekstrak Metanol Limbah Kulit Batang Kayu Jati (*Tectona grandis* Linn. F)

Yohannes Alen, Eka Verawati Ningrum dan Rustini
Jurusan Farmasi Fakultas MIPA Universitas Andalas

Diterima tanggal : 22 Juli 2004; Disetujui tanggal : 16 Agustus 2004

Abstract

An antimicrobial component was successfully isolated from aethyl acetate fraction of *Tectona grandis* Linn. F (Bark) which was guided by antimicrobial dilution method. Separation and purification were done by chromatographic methods. The active compound namely EV-19-19 (35 mg, m.p 230-232 °C) showed antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (MIC 100 ppm), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (MIC 50 ppm), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 (MIC 50 ppm), *Escherichia coli* ATCC 8739 (MIC 50 ppm) and *Tricophyton mentagrophytes* ATCC 543 (MIC 50 ppm). While the compound showed no activity against *Candida albicans* ATCC 1023. Based on the spectral data (ultraviolet, infrared) and chemical reactions, the compound was identified as steroidal compound.

Keywords : *Tectona grandis* Linn. F., Antimicrobial, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Tricophyton mentagrophytes* ATCC 543, *Candida albicans* ATCC 10231, Metoda dilusi.

Pendahuluan

Tumbuhan *Tectona grandis* Linn. F dari famili Verbenaceae atau lebih dikenal sebagai kayu jati, merupakan tumbuhan hutan tropis yang banyak terdapat di Indonesia. Tumbuhan ini memiliki nilai ekonomis yang tinggi, karena harga jualnya yang mahal dan merupakan salah satu sumber penghasil devisa Negara. Tumbuhan ini berupa pohon dengan tinggi 30-45 m, diameter batang dapat mencapai 220 cm.

Disamping mempunyai nilai ekonomis, tumbuhan ini juga bernilai medis, dan digunakan sebagai obat tradisional. Bagian daun tanaman jati digunakan sebagai adstringent, pengobatan batuk darah, haid tidak tertur, kolera dan radang tenggorokan. Akar digunakan pada pengobatan anuria dan retensi urin, sedangkan kulit kayu jati digunakan pada pengobatan bronchitis (Rahman, 2002).

Penelitian ini merupakan penelitian lanjutan dari penelitian terdahulu tentang isolasi dua senyawa antimikroba triterpen dan steroid dari fraksi non polar (Alen, Y. *et al.*, 2004 b). Dari tumbuhan *Tectona grandis* Linn. F. telah banyak diisolasi senyawa kimia utama dengan berbagai aktivitas, antara lain betulin aldehid dari kulit batang kayu jati yang aktif sebagai antitumor (Pathak *et al.*,1988), asam betulinat dari suspensi kallus yang aktif terhadap bakteri (Marwani, 1997) dan beberapa senyawa lain dari bagian akar, yaitu tektokuinon, tektol, lapakol dan β-sitosterol (Dayal, 1979, dan Joshi, K 1977).

Mengingat potensi dan aktivitas yang ada pada kulit batang kayu jati yang banyak terdapat sebagai limbah pada *sawmill-sawmill* dan industri perabot yang selama ini belum dimanfaatkan, maka dicoba untuk mengisolasi senyawa antimikroba dari fraksi semi polar. Pemisahan senyawa aktif dilakukan menggunakan kromatografi kolom dengan fasa diam silika wakogel® (C-100 dan C-300) dan fase gerak kombinasi *n*-heksan, eter asetat, metanol diikuti dengan *bioassay guided* dengan metoda dilusi (Alen, Y. *et al.*, 2004 a). Karakterisasi senyawa hasil isolasi dilakukan dengan cara penentuan titik leleh dan pemeriksaan spektroskopi yang meliputi ultraviolet dan inframerah.

Metodologi Penelitian

Alat dan bahan

Alat yang digunakan untuk isolasi senyawa aktif: seperangkat alat destilasi, rotari evaporator, kolom kromatografi dengan berbagai ukuran, analisis kromatografi lapis tipis (KLT) menggunakan plat silica gel PF_{254}, lampu UV λ 254 nm, dan "Fisher John melting point

Penulis untuk korespondensi: Telp.62-751-71682,Fax.62-751-7311
E-mail : farmasi_unand@telkom.net

apparatus", spektroskopi UV-VIS dan spektoroskopi inframerah. Sebagai penampak noda digunakan $FeCl_3$, Liebermann-Burchard, Vanilin asam sulfat.

Bioassay dilakukan dengan metoda dilusi terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 15442, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 543 dan *Candida albicans* ATCC 10231 yang diperoleh dari PT. Biofarma Bandung, menggunakan media cair Nutrient Broth (Merck®), dan media padat Nutrient Agar (Merck®). "Laminar Air Flow" (Esco®), pipet mikro (Pepetman®), dan plat 96-well microtiterplate.

Pengambilan sampel

Sampel berupa kulit batang *Tectona grandis* Linn. F diambil di kompleks industri perabot jati Rawamangun, Jakarta Timur, April 2003.

Ekstraksi dan isolasi

Kulit batang *Tectona grandis* Linn. F sebanyak 20 kg dihaluskan menjadi serbuk, dan dimaserasi dengan metanol-air (6-4) 35 L 4 x 5 hari, saring. Gabungan maserat metanol di uapkan *in vacuo*. Selanjutnya difraksinasi dengan corong pisah menggunakan pelarut berturut-turut *n*-heksan, etil asetat dan butanol. Masing-masing fraksi ini diuapkan *in vacuo* sehingga diperoleh fraksi kental *n*-heksan 10,60 g, fraksi kental etil asetat 15,50 g dan fraksi butanol 20,3 g. Selanjutnya masing-masing fraksi diuji aktivitas antibakterinya. Fraksi aktif etil asetat (0,4 g, MIC 500 ppm), dikromatografi kolom dengan silica wakogel® C-100 (150-425 µm) dengan fase gerak kombiansi pelarut *n*-heksan dan etil asetat dengan peningkatan kepolaran secara step gradient polarity (SGP) sehingga diperoleh beberapa fraksi. Fraksi aktif EV-13-3 (0,5 g, MIC 50 ppm) dikromatografi kolom menggunakan silica wakogel® C-300 (45-75 µm) sebanyak 20 g, dengan kombinasi pelarut *n*-heksan, kloroform dan metanol, didapatkan senyawa EV-19-19 (35 mg, MIC 50 ppm). Kemurnian senyawa dikonfirmasikan degan kromatografi lapis tipis dengan metoda multiple development system. (Touchstone *et al*., 1978) dan di Karakterisasi senyawa hasil isolasi dilakukan dengan cara penentuan titik leleh, dan pemeriksaan spektroskopi meliputi ultraviolet dan inframerah.

Uji Aktivitas Antibakteri

Aktivitas antimikroba diuji dengan metoda dilusi menggunakan "96-well microtiterplate". Sampel Uji sebanyak 20 µl dimasukkan kedalam lobang pertama pada mikrotiterplat, kemudian ditambahkan 180 µl suspensi kultur mikroba dan homogenkan dengan cara mengaduk suspensi dengan pipet mikro. Selanjutnya dipipet 100 µl suspensi pada lobang pertama, pindahkan ke lobang kedua. Pada lobang kedua, ditambahkan 100 µl suspensi kultur bakteri sehingga konsentrasinya menjadi setengah dari konsentrasi awal. Begitu seterusnya sampai lobang ke enam. Untuk kontrol negatif, digunakan lobang ke-7, yaitu 10 µl metanol ditambah 90 µl suspensi kultur mikroba. Sedangkan kontrol positif sebagai standar aktivitas digunakan tetrasiklin untuk bakteri (1,6 mg/ml) pada lobang ke-8, dan klotrimazol (3 µg/ml) untuk jamur. Mikrotiterplat diinkubasi pada suhu optimum pertumbuhan mikroba, yaitu 37 °C selama 24 jam untuk bakteri, dan 27°C selama 24 jam untuk jamur. Daya hambat pertumbuhan mikroba ditunjukkan dengan munculnya suspensi bening pada masing-masing lubang mikrotiterplate yang dapat diamati secara visual. Konsentrasi terendah dari sample uji pada lobang yang terlihat bening menunjukkan tidak adanya pertumbuhan mikroba. Ini merupakan angka Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) atau Minimum Inhibitory Concentration (MIC).

Hasil dan Pembahasan

Dari pemeriksaan pendahuluan antibakteri terhadap ekstrak metanol dan fraksi-fraksi awal ekstrak metanol kulit batang kayu jati, diketahui bahwa fraksi heksan dan fraksi etil asetat memperlihatkan aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 15442, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 6538 dan *Escherichia coli* ATCC 8739 dengan MIC masing-masing 500, 500, 1000, 1000 ppm. Sedangkan fraksi butanol dan fraksi sisa tidak menunjukkan aktivitas. Dari fraksi heksan telah berhasil diisolasi dua senyawa aktif antibakteri dengan MIC hingga 25 ppm (Alen Y. *et al*., 2004 b).

Pengujian aktiitas antimikroba dilakukan dengan metoda dilusi. Metoda dilusi menggunakan mikrotiterplat ini dipilih karena mempunyai beberapa keuntungan dibandingkan metoda lainnya, yaitu: dapat langsung menetukan harga Konsentrasi Hambat Minimum (KHM), menjamin homogenitas yang lebih besar antara media, larutan ekstrak, dan mikroba dibandingkan dengan metoda difusi dan bioautografi, tidak dipengaruhi oleh factor-faktor difusibilitas ekstrak, keadaan media, maupun ukuran molekul senyawa. Sampel dan media yang digunakan relative sedikit (µl), pelaksanaan lebih cepat dan sederhana dan dapat digunakan untuk uji aktivitas terhadap beberapa senyawa atau lebih dalam satu mikrotiterplate. Metoda ini lebih rentan terhadap kontaminasi.

Hasil pemisahan dan pemurnian fraksi etil asetat dengan kromatografi, didapatkan senyawa EV-19-19 (kristal kuning, 35 mg, TL. 230-232 °C, MIC 50 ppm).

Dari hasil pemeriksaan ultraviolet senyawa EV-19-19 dalam pelarut metanol memberikan serapan pada panjang gelombang 385,0 (abs = 0,0992); 276,0 (abs = 1,0607); 238,0 (abs = 0,6665); 210,5 (abs = 1,1459). Pemeriksaan spektrum inframerah (Pellet KBr) menunjukkan adanya pita-pita serapan gugus OH pada Vmaks 3400 cm^{-1}, regangan CH pada 3100 cm^{-1}, gugus C=O pada 1720 cm^{-1}, CH pada 1430 cm^{-1}.

Kesimpulan

Dari 20 kg kulit batang *tectona grandis* Linn. F didapatkan senyawa EV-19-19 (kristal kuning, Tl 230-232 °C, 35 mg, MIC 50 ppm).

Dari data spectrum dan uji kimia dengan Liebermann Burchard dan penampak noda H_2SO_4 10 % dalam metanol terhadap noda senyawa ini pada plat KLT, diduga bahwa senyawa ini termasuk kedalam golongan senyawa steroid. Senyawa ini mengandung gugus fungsi OH, C-H, dan C=O. Elusidasi struktur senyawa ini sedang berlangsung.

Ucapan Terimakasih

Seiring publikasi hasil penelitian ini, kami mengucapkan terima kasih kepada Unand, cq. Lembaga Penelitian dalam bantuan dana.

Daftar Pustaka

Alen, Y., Ammirawati., Dian H., dan Dayar A., Isolasi Senyawa Antibakteri dari Fraksi Non Polar Ekstrak Metanol Daun *Glycosmis Malayana* Ridl, *Jurnal Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam*, 12 (1), 2004 a, Hal 33-36

Alen, Y., Wiwik, F., dan Deddi P., Isolasi Senyawa Antibakteri dari Fraksi Non Polar Ekstrak Metanol *Tectona grandis* Linn. F, *J. Sains dan Teknologi Farmasi*, 9 (1), 2004 b, Hal 24-27.

Dayal, R., Seshadri, T. R. Chemical Investigation of *Tectona grandis* (Roots). *J. Indian Chem. Soc.*, 6, 1979, P 940-941.

Joshi, K. C., Singh, P., and Pardasani, R. T., Chemical components of the roots of *Tectona grandis* and *Gmelina arborea*. *Planta Medica*, **32**, 1977, P 71-75.

Marwani, E., "Identification of Antibacterial Triterpene Acid Occuring in *Tectona grandis* Callus and Their Production by Cell Suspension Culture". *Thesis*, The Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University, Japan, 1997.

Pathak, N.K.R., Neogi, P.Biswas, M., Tripati, Y.C., and Pandey, V.B., Betulin aldehyde, an Antitumor agent from the bark of *Tectona grandis*, *J. Indian of Pharmaceutical Sci*, 1988, P 124-125.

Rahman, M.L., and M.K. Hossain., "Distribution Pattern of Medicinal Tree Species in Chunati Wildlife Sanctuary of Chittagong", *J Trop Med.Plants* 3(1), Juni, 2002, P 65-71.

Touchstone, J.C., and Murrell, F. Dobbin., *Practice of Thin Layer Chromatography*, A Wiley Interscience Publication, University of Pensylvania School of Medicine, Pensylvania, 1978.