

AKTIVITAS ANTIBAKTERI DAN KLT BIOAUTOGRAFI EKSTRAK ETANOL DAUN SISIK NAGA (*Drymoglossum piloselloides*) TERHADAP *Streptococcus mutans*

Evi Umayah Ulfa¹, Desi Sandra Sari², Dhani Wijaya¹

¹Fakultas Farmasi Universitas Jember

²Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

ABSTRACT

Sisik naga (Drymoglossum piloselloides) has been used empirically for dysentery and candidiasis. This diseases were caused by bacteria and fungi. The objective of this research was to evaluate the antibacterial effect and to find out the antimicrobial compound of sisik naga. Leaf of sisik naga was extracted with ethanol 90% by using maceration. This extract were tested for antibacterial activity against Streptococcus mutans using agar diffusion. TLC Bioautography methods was used to identify the active compound. Result of antibacterial test showed ethanol extract of sisik naga had antibacterial effect against S. mutans. Bioautography showed one spot on Rf =0 give clear zone.

Key words: *Drymoglossum piloselloides, antibacterial effect, TLC bioautography*

Kasus kerusakan gigi, terutama karies gigi pada masyarakat Indonesia cukup tinggi yaitu mencapai 80 % dari total jumlah penduduk. Karies gigi terjadi karena pembentukan plak pada email yang keras dan halus. Plak ini terdiri atas endapan gelatin dari glukosa yang mempunyai berat molekul besar sehingga bakteri penghasil asam dapat melekat pada email. Salah satu bakteri penghasil glukosa adalah *Streptococcus mutans*¹. *S. mutans* merupakan bakteri flora normal rongga mulut yang melekat pada permukaan gigi dan hidup dari berbagai gugus karbohidrat. *S. mutans* memproduksi asam sehingga gigi kehilangan mineral dan menyebabkan terbentuknya lubang pada gigi saat terjadi metabolisme gula. *S. mutans* juga dapat menghasilkan enzim glukosil transferase yang dapat memicu produksi glukosa dari sukrosa sehingga mempengaruhi perlekatan plak gigi².

Upaya untuk menangani kasus karies gigi di antaranya dengan cara : (1) menghambat aktivitas glukosil transferase dengan enzim penghambat yang spesifik (*specific enzyme inhibitor*), (2) menghambat perlekatan *S. mutans* dengan antibodi poliklonal ataupun monoklonal, (3) Menghambat pertumbuhan *S. mutans* dengan menggunakan senyawa antibakteri³. Penghambatan pertumbuhan *S. mutans* merupakan salah satu cara yang efektif untuk mencegah karies gigi dan berbagai penyakit periodontal⁴. Penghambatan pertumbuhan *S. mutans* dapat dilakukan dengan menggunakan tanaman yang memiliki efek antibakteri.

Indonesia memiliki hutan tropis yang cukup luas, mencapai 75% dari total luas daratan Indonesia, dengan flora yang beraneka ragam yaitu ± 4000 jenis pohon⁵. Sebanyak 17 % dari flora tersebut dapat dimanfaatkan untuk pengobatan. Masyarakat Indonesia menggunakan tanaman sebagai obat berdasarkan

pengalaman empiris. Daun, akar dan umbi-umbian dari tanaman dianggap berkhasiat karena mengandung bahan-bahan kimia yang bermanfaat untuk menyembuhkan penyakit.

Drymoglossum piloselloides atau yang lebih dikenal dengan sisik naga merupakan tanaman epifit dengan daun berbentuk bulat sampai jorong dan banyak ditemukan di Indonesia, terutama pada daerah yang lembab. Tanaman ini biasa digunakan masyarakat untuk mengobati penyakit gondongan, disentri, rematik dan keputihan. Ekstrak alkohol daun sisik naga mengandung senyawa terpenoid, fenol, flavonoid, tanin dan gula⁶. Senyawa terpenoid, fenol dan tanin yang terdapat di dalam sisik naga yang diduga memberikan efek antibakteri. Beberapa turunan senyawa flavonoid, sterol/triterpen dan tanin pada tumbuhan dapat memiliki aktivitas antibakteri⁷. Adanya aktivitas antibakteri diakibatkan oleh gugus -OH yang terkandung dalam rumus struktur kimia masing masing senyawa yang dapat menyebabkan terjadinya denaturasi protein sel bakteri.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek antibakteri sisik naga terhadap bakteri penyebab karies gigi yaitu *S. mutans*, dan mengetahui golongan senyawa pada ekstrak yang memberikan efek antibakteri. Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan metode difusi agar sedangkan identifikasi golongan senyawa antibakteri dilakukan dengan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) bioautografi.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat Yang Digunakan

Bahan-bahan yang digunakan untuk penelitian ini: daun sisik naga dari daerah Sumbersari Jember Jawa Timur, metanol, mikroba *S. mutans*, aluminium (III) klorida, anisaldehyd sulfat, asam asetat glasial, besi (III)

klorida, butanol, etanol, H₂SO₄, kloroform, Tetrasiklin, larutan NaCl 0,9 %.

Alat-alat yang diperlukan untuk penelitian ini adalah : alat-alat gelas, autoklaf, blender, *chamber*, *hot plate*, jangka sorong, *laminar air flow cabinet*, lempeng KLT Silika gel 60, mikro pipet, neraca analitik, pipa kapiler, *rotavapor*, spektrofotometer Hitachi U1800, ultrasonikator

Pembuatan Ekstrak Etanol daun sisik naga (*D. piloselloides*)

Ditimbang 500 g serbuk daun (simplisia) sisik naga. Serbuk dimaserasi dengan etanol sebanyak 3 kali. Maserat dikumpulkan, rendemen dipisahkan. Maserat yang diperoleh dipekatan dengan *rotavapor* dan dilanjutkan dengan penguapan menggunakan *waterbath* sampai didapatkan ekstrak kental. Ekstrak kental ditimbang dan dicatat sebagai ekstrak etanol.

Penyediaan Inokulum *S. mutans*

Secara aseptis, bakteri *S. mutans* umur 24 jam diambil dengan sengkeli steril dan dimasukkan dalam tabung yang berisi larutan NaCl fisiologis kemudian diencerkan sehingga diperoleh suspensi dengan transmittan 25 % yang dibandingkan terhadap blanko NaCl 0,9 % pada panjang gelombang 580 nm.

Penyediaan Media Pengujian

Media yang digunakan untuk pembenihan bakteri *S. mutans* adalah Nutrien Agar (NA). Sebanyak 0,27 g pepton ditambah dengan 0,18 g ekstrak daging kemudian dilarutkan dalam 45 ml aquades dan dididihkan selama 15 menit. Selanjutnya 0,9 g agar-agar ditambahkan sedikit demi sedikit sambil diaduk hingga homogen. Setelah disaring, media yang diperoleh disterilkan dalam autoklaf pada temperatur 121 °C selama 15 menit. Media yang telah disterilkan dituang dalam tabung tertutup. Jumlah media yang dimasukkan dalam tabung ada dua macam yaitu 15 ml untuk *base layer* dan 5 ml untuk *seed layer*. Suspensi inokulum bakteri dimasukkan dalam media *seed layer* sebesar 10 µl kemudian dikocok sampai homogen.

Skринing aktivitas antibakteri

Ekstrak etanol sisik naga kering dilarutkan ke dalam DMSO 10% hingga diperoleh kadar 10%, 20%, 30% (b/v). Tetrasiklin 2%, 3% dan 6% (b/v) dalam Aquadest steril digunakan sebagai kontrol positif, sedangkan kontrol negatif digunakan DMSO 10%. Aktivitas antibakteri ditentukan dengan menggunakan metode difusi agar dan bioautografi untuk mengetahui golongan senyawa yang memberikan efek sebagai antibakteri. Media NA steril dalam tabung *based layer* bersuhu 40-50 °C dituang ke dalam cawan petri, dan

didiamkan sampai padat. Sebanyak 10 µl inokulum dimasukkan ke dalam tabung yang berisi 5 mL media *seed layer* bersuhu 40-50 °C kemudian dituang ke dalam cawan petri di atas permukaan *based layer* yang telah padat dan didiamkan hingga dingin dan memadat. Silinder steril diletakkan di atas permukaan media *seed layer* dan diisi 250 µl larutan uji dan standar secara selang-seling. Seluruh cawan petri diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Diameter zona jernih atau zona hambatan diukur dan dianalisis dengan uji statistik. Pengujian dilakukan 3 kali replikasi.

KLT Bioautografi dan Identifikasi

Sebanyak 60 µl larutan uji (ekstrak etanol sisik naga 12,5% dalam etanol) ditotolkan pada 2 lempeng silika gel (7,5 mg ekstrak/totolan). Kedua lempeng tersebut dieluasi menggunakan fase gerak kloroform: metanol: air (97: 2: 1). Hasil KLT dikeringkan hingga semua pelarut menguap. Lempeng pertama diletakkan diatas media *base layer* yang telah memadat dengan posisi lempeng menghadap keatas, kemudian media *seed layer* yang telah mengandung bakteri uji dituangkan di atasnya. Lempeng kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C. Adanya zona bening yang timbul pada lempeng menunjukkan adanya aktivitas antibakteri pada golongan senyawa tersebut. Lempeng kedua hasil KLT digunakan untuk mengidentifikasi golongan senyawa dengan mengamati dibawah lampu UV 254 dan memberikan penampak noda uap amoniak untuk identifikasi flavonoid dan anisaldehyd asam sulfat untuk steroid dan terpenoid.

HASIL DAN PEMBAHASAN.

Rendemen hasil maserasi simplisia serbuk daun sisik naga (*D. piloselloides*) sebanyak 500 gram menggunakan pelarut etanol 96 % adalah 4,08 % (b/b). Ekstrak kental yang diperoleh diuji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi agar dengan hasil dapat dilihat pada Tabel 1 dan Gambar 1.

Hasil skrining aktivitas antibakteri menunjukkan ekstrak etanol daun sisik naga mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *S. mutans*. Aktivitas antibakteri terus meningkat sesuai dengan kenaikan konsentrasi ekstrak. Peningkatan konsentrasi menyebabkan semakin pekat komposisi zat aktif sehingga kemampuan membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri juga semakin kuat.

Penapisan fitokimia yang dilakukan oleh Susilawati menunjukkan ekstrak alkohol daun sisik naga mengandung senyawa terpenoid, fenol, flavonoid, tanin dan gula⁴. Senyawa terpenoid, fenol dan flavonoid diduga yang bertanggungjawab untuk memberikan aktivitas antibakteri. Pengujian bioautografi dilakukan untuk mengetahui golongan senyawa yang memberikan aktivitas antibakteri. Metode ini dengan cepat akan mendeteksi noda pada lempeng

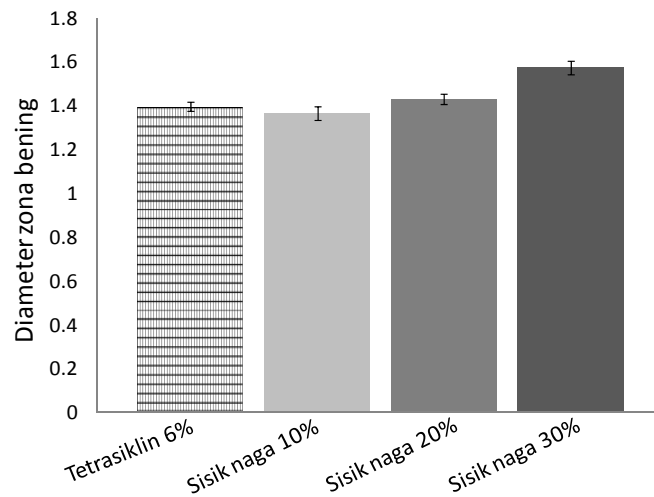
yang memberikan aktivitas antibakteri. Adanya aktivitas antibakteri ditunjukkan dengan adanya zona bening pada media dengan latar belakang keruh akibat pertumbuhan bakteri. Sebagai pembandingan untuk mengetahui golongan senyawa dilakukan identifikasi lempeng menggunakan penampak noda tertentu.

Hasil KLT bioautografi dan identifikasi ekstrak etanol daun sisik naga (*D. piloselloides*) terhadap *S. mutans* menunjukkan adanya zona bening di tempat penotolan dan bukan di noda KLT seperti tampak pada Tabel 2 dan Gambar 2.

Tabel 1. Data diameter zona bening ekstrak etanol daun sisik naga

Ekstrak etanol (rerata±SD)			Kontrol positif	Kontrol negatif
10%	20%	30%		
1,36±0,03	1,43±0,02	1,57±0,03	1,49±0,02	-

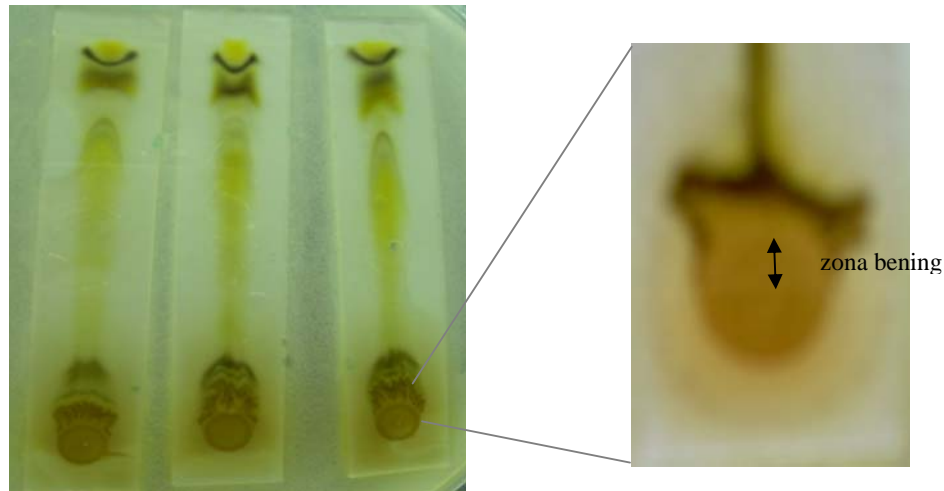
Kontrol Positif : Tetrasiklin 6 % b/v
 Kontrol Negatif : DMSO 10%
 Tanda (-) : Tidak ada hambatan pertumbuhan mikroba



Gambar 1. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun sisik naga terhadap *S. mutans* (data dalam mm).

Tabel 2 Identifikasi senyawa aktif antibakteri ekstrak etanol daun sisik naga terhadap *S. mutans*

Warna noda	Penampak noda	Warna noda	Rf (cm)	Diameter zona hambat (mm)
Hijau kehitaman	Uap amoniak	Kuning	0,96	Tidak ada
Hijau kekuningan	Anisaldehyd sulfat	Ungu	0,92	Tidak ada
Kuning kecokelatan	Anisaldehyd sulfat	Ungu	0,85	Tidak ada
Kuning	Uap amoniak	Kuning	0,79	Tidak ada
Hijau kecokelatan	Uap amoniak	Kuning	0,59	Tidak ada
Cokelat	FeCl ₃	Hitam	0,20	Tidak ada
	FeCl ₃	Hitam	0	16,4



Gambar 2. KLT Bioautografi ekstrak etanol daun sisik naga terhadap *S. Mutans*. Fase diam silika gel F254, fase gerak kloroform: metanol: air (97: 2: 1)

Hasil perbandingan lempeng untuk identifikasi senyawa aktif antibakteri dengan lempeng kromatogram pembandingan, diperoleh hasil bahwa noda-noda kromatogram dari ekstrak etanol daun sisik naga yang mewakili senyawa flavonoid, terpenoid dan tanin pada pengujian secara KLT bioautografi tidak menunjukkan adanya zona hambat. Adanya daerah hambat terhadap *S. mutans* yang ditandai oleh daerah bening dengan diameter rata-rata 16,5 mm justru terlihat pada titik penotolan ekstrak. Hal ini dapat diakibatkan karena adanya senyawa lain dalam ekstrak etanol daun sisik naga yang tidak dapat teridentifikasi sebagai flavonoid, terpenoid dan tanin yang merupakan senyawa aktif antibakteri terhadap *S. mutans*. Senyawa tersebut tidak bermigrasi ketika elusi dengan eluen kloroform, metanol, dan air dengan perbandingan 97: 2: 1.

Senyawa yang belum teridentifikasi tersebut diperkirakan merupakan senyawa golongan polifenol karena menunjukkan warna hitam ketika dideteksi dengan $FeCl_3$. Polifenol merupakan senyawa tumbuhan yang mengandung cincin aromatis dengan satu atau lebih gugus hidroksil dan dengan penambahan $FeCl_3$ akan memberikan warna hitam⁹. Aktivitas antibakteri polifenol dikarenakan adanya gugus hidroksil yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan mekanisme denaturasi protein bakteri. Polifenol terdiri atas golongan fenol sederhana dan asam fenolat; kuinin; flavonin, flavonoid dan flavonols; tanin serta kumarin⁷. Dalam penelitian ini, flavonoid, terpenoid dan tanin dari ekstrak etanol daun sisik naga yang berupa noda kromatogram tidak menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *S. mutans* karena kurangnya jumlah golongan senyawa tersebut pada bercak yang disebabkan oleh keterbatasan kemampuan

lempeng dalam menampung ekstrak etanol daun sisik naga dan golongan senyawa senyawa (flavonoid, terpenoid dan tanin) yang terkandung dalam ekstrak etanol daun sisik naga tidak memiliki aktivitas antibakteri. Menurut Harborne, beberapa turunan flavonoid, terpenoid dan tanin tidak menunjukkan aktivitas antibakteri. Contoh turunan flavonoid, terpenoid dan tanin yang tidak memiliki aktivitas antibakteri adalah baicalein 5,6,7-trimethyl ether (turunan flavonoid), androstenediane (turunan terpenoid) dan cincona 1.a (turunan tanin)⁸.

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian dapat ditarik kesimpulan yaitu:

1. Ekstrak etanol daun sisik naga (*D. piloselloides*) mempunyai aktivitas sebagai antibakteri terhadap *S. mutans*.
2. Senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri pada titik penotolan diperkirakan golongan polifenol selain flavonoid dan tanin, karena menunjukkan warna hitam saat identifikasi dengan $FeCl_3$.

DAFTAR PUSTAKA

1. Jawetz, E,J,L. Melnik dan Adelberg, E. 1995, *Mikrobiologi untuk Profesi Kesehatan*. Alih bahasa: H Tonang. Judul asli; *Review of Medical Microbiology*, 1984. Jakarta : EGC.
2. Azizah, N. 2004. Pengaruh Larutan Air Garam Hangat Hidrogen Peroksida (H_2O_2) 3% dan Triclosan 0,3% terhadap Pertumbuhan *Streptococcus mutans*. *Skripsi*. FKG UNEJ.

3. Kidd, E. dan Bechal. 1991. *Dasar-Dasar Karies, Penyakit dan Penanggulangannya*. Jakarta : EGC.
4. Arief, A. 1994. *Hutan Hakikat dan Pengaruhnya terhadap Lingkungan*. Yayasan Obat Indonesia. Jakarta.
5. Katsura, H. 2001. *In Vitro Antimicrobial Activities of Bakuchiol against Oral Microorganisms*. American Society for Microbiology.
6. Susilawati, N. 1988. Daya Antibakteri Daun *Drymoglossum Heterophyllum* C. Chr (Pakis Duwitan) terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* serta Skrining Fitokimianya. *Skripsi*. Fakultas Farmasi UGM. Yogyakarta.
7. Cowan. 1999. *Plant Product as Antimicrobial Agents*. American Society for Microbiology.
8. Harborne, J.B. 1999. *Phytochemical Dictionary A Handbook of Bioactive Compounds From Plants*. Second Edition. Taylor & Francis Ltd.