

**PENENTUAN KONSENTRASI HAMBAT MINIMUM SENYAWA ANTIBAKTERI
N-2¹4¹-DIMETIL PENTAN-20- AMINOPREGN-5-ENE-3-OL DARI KULIT
AKAR *Rhizophora apiculata* Blum**

Elfita

Jurusan Kimia FMIPA Universitas Sriwijaya

ABSTRAK

*Senyawa N-2¹4¹-dimetil pentan-20-aminopregn-5-ene-3-ol diisolasi dari fraksi heksan kulit akar *Rhizophora apiculata* Blum melalui teknik-teknik kromatografi kolom. Uji aktivitas antibakteri senyawa ini dilakukan dengan penentuan harga konsentrasi hambat minimum (MIC) menggunakan metoda dilusi kaldu. Diperoleh harga MIC 370 µg/ml terhadap *Escherichia coli* dan 440 µg/ml terhadap *Bacillus subtilis*.*

PENDAHULUAN

Salah satu penggunaan senyawa antibakteri dalam dunia kesehatan adalah sebagai bahan obat-obatan untuk menyembuhkan penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri patogen. Akan tetapi penggunaan obat secara terus-menerus yang tidak sesuai dengan ketentuan dapat menyebabkan munculnya sifat resisten pada bakteri patogen tersebut. Munculnya sifat resisten ini disebabkan karena bakteri patogen yang secara terus menerus dikenai senyawa antibakteri dengan

dosis yang kurang memadai tidak mati, tetapi beradaptasi dengan lingkungannya. Proses adaptasi yang terus menerus menyebabkan terjadinya perubahan genetik yang mengarah pada terbentuknya gen yang menyebabkan bakteri patogen resisten terhadap obat yang digunakan, sehingga obat yang sama tidak dapat dipakai lagi. Dengan demikian, maka pencarian antibakteri baru atau memodifikasi yang sudah ada harus terus dilakukan, sehingga didapatkan senyawa antibakteri yang aktivitas antibakterinya lebih efektif, yang akhirnya dapat dibuat sebagai bahan aktif obat dan dapat menyembuhkan penyakit

yang disebabkan bakteri patogen yang telah resisten (Pelczar dan Chan, 1981).

Salah satu upaya pencarian senyawa antibakteri baru adalah dari informasi masyarakat yang menggunakan tumbuh-tumbuhan tertentu secara tradisional untuk menyembuhkan penyakit-penyakit yang disebabkan oleh bakteri patogen seperti tumbuhan *Rhizophora apiculata* Blum. Penelitian kandungan kimia *R. apiculata* Blum. telah dilakukan pada daun dan hati kayu. Kokpol *et al.* (1990) telah berhasil mengisolasi senyawa tarakseril dan turunannya (tarakseril trans-p-hidroksisinamat dan tarakseril cis-p-hidroksisinamat) dari daun. Senyawa-senyawa ini termasuk golongan triterpenoid. Kokpol *et al.* (1993) kembali mengisolasi lima senyawa alkohol alifatik rantai panjang, 11 senyawa asam karboksilat alifatik jenuh rantai panjang, empat senyawa steroid (kampesterol, stigmasterol, sitosterol, dan sitosteril 3-glukosida), 2,6 dimetoksi-p-benzokuinon dan siringaldehid dari hati kayu.

Melalui tehnik-tehnik kromatografi kolom dengan eluen yang sesuai diperoleh senyawa murni N-2¹4¹-dimetil pentan-20-aminopregn-5-ene-3-ol. Penentuan

konsentrasi hambat minimum (MIC) terhadap senyawa murni ini dilakukan dengan metoda dilusi kaldu.

METODOLOGI

Sampel penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit akar *R. apiculata* Blum. yang diperoleh dari hutan bakau daerah Donan Cilacap pada bulan April 1998. Sampel diambil dan dipilih dari kulit akar *R. apiculata* Blum. yang sudah tua, keras dan berwarna coklat tua. Sebelum dilakukan ekstraksi, sampel dikeringkan pada suhu kamar dan digiling haluskan.

Isolasi senyawa N-2¹4¹-dimetil pentan-20-aminopregn-5-ene-3-ol

Isolasi senyawa N-2¹4¹-dimetil pentan-20-aminopregn-5-ene-3-ol dilakukan dengan tehnik-tehnik kromatografi kolom dengan eluen yang sesuai.

Penentuan konsentrasi hambat minimum (MIC) senyawa murni

Penentuan konsentrasi hambat minimum (MIC) senyawa murni dilakukan dengan menggunakan metode dilusi kaldu,

untuk menentukan Konsentrasi Hambat Minimum atau Minimum Inhibition Concentration (MIC) dari senyawa murni tersebut (Edberg dan Berger, 1986). MIC senyawa murni ditentukan terhadap dua bakteri uji yaitu *E. coli* dan *B. subtilis* dan dilakukan dengan prosedur berikut: senyawa murni dilarutkan di dalam medium Mueller-Hinton Broth (MHB) dengan gerak maju geometrik (interval antar konsentrasi sama) dimulai dari konsentrasi tinggi ke konsentrasi rendah. Masing-masing medium MHB dengan seri pengenceran konsentrasi isolat murni dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 2,5 – 5 mL, sehingga diperoleh konsentrasi senyawa murni dalam medium MHB sebagai berikut: 0,9%, 0,8%, 0,7%, 0,6%, 0,5%, 0,4%, 0,3%, 0,2%, 0,1%.

Selanjutnya bakteri uji (dengan kerapatan $10^6 - 10^7$ sel/mL) diinokulasikan sebanyak 10% dari volume medium ke dalam masing-masing tabung reaksi. Kontrol dibuat dengan cara memasukkan 2,5 – 5 mL medium MHB ke dalam tiga tabung reaksi lain yaitu tabung A, B dan C. Tabung A diinokulasi bakteri uji (sebagai kontrol pertumbuhan positif), tabung B diisi senyawa murni (sebagai kontrol pertumbuhan negatif)

dan tabung C hanya berisi medium MHB saja (untuk mengontrol sterilitas medium). Semua tabung dari nomor satu sampai sembilan dan ketiga tabung A, B dan C diinkubasi pada suhu 35°C selama 18 jam. Diamati tiga tabung terakhir terlebih dahulu, jika tabung C tetap jernih berarti mediumnya steril, jika tabung B tetap jernih berarti isolat murni steril, dan tabung A harus keruh jika dibandingkan dengan tabung B dan C, karena adanya pertumbuhan positif. Selanjutnya tabung nomor satu sampai sembilan dibandingkan terhadap tabung A (kontrol pertumbuhan positif). Jika kekeruhan tabung yang dibandingkan kurang dari tabung A diberi tanda (-) dan jika sama dengan tabung A diberi tanda (+). Konsentrasi terkecil yang menunjukkan kekeruhan kurang dari kontrol pertumbuhan positif merupakan konsentrasi hambat minimum atau MIC. Jika semua seri konsentrasi senyawa murni yang dibuat menunjukkan kekeruhan kurang dari kontrol, maka dibuat seri pengenceran konsentrasi yang lebih rendah dari seri konsentrasi yang ada, sampai diperoleh konsentrasi hambat minimum senyawa murni tersebut. Setiap kali membuat seri pengenceran konsentrasi, dibuat kontrol baru.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pemisahan senyawa N-2¹4¹-dimetil pentan-20-aminopregn-5-ene-3-ol dari fraksi heksan kulit akar *Rhizophora apiculata* Blum melalui tehnik-tehnik kromatografi kolom terbuka menggunakan fase diam silika gel 70 – 230 mesh, perbandingan silika gel dengan sampel adalah 75 : 1. Kolom ke I-IV menggunakan eluen masing-masing: heksan - aseton (5,5 : 2), heksan – aseton (6:1), heksan-aseton (7:1), dan heksan-aseton (8:1), yang selanjutnya direkristalisasi dalam metanol. Penentuan MIC nya adalah sebagai berikut:

Tabel 1. Hasil penentuan konsentrasi hambat minimum senyawa murni terhadap bakteri uji *E. coli* dan *B. subtilis* pada seri pengenceran konsentrasi tahap I

Nomor tabung reaksi	Konsentrasi isolat murni dalam medium MHB (%)	Hasil pengamatan pada:	
		<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>
1	0,9	-	-
2	0,8	-	-
3	0,7	-	-
4	0,6	-	-
5	0,5	-	-
6	0,4	-	-
7	0,3	-	-
8	0,2	-	-
9	0,1	-	-

Keterangan: (-) : kekeruhan kurang dari kontrol pertumbuhan positif
 (+) : kekeruhan sama dengan kontrol pertumbuhan positif

Berdasarkan data dari seri pengenceran konsentrasi tahap I belum dapat ditentukan konsentrasi hambat minimum senyawa murni baik terhadap bakteri uji *E. coli* maupun *B. subtilis*.

Tabel 2. Hasil penentuan konsentrasi hambat minimum senyawa murni terhadap bakteri uji *E. coli* dan *B. subtilis* pada seri pengenceran konsentrasi tahap II

Nomor tabung reaksi	Konsentrasi isolat murni dalam medium MHB (%)	Hasil pengamatan:	
		<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>
10	0,09	-	-
11	0,08	-	-
12	0,07	-	-
13	0,06	-	-
14	0,05	-	-
15	0,04	-	+
16	0,03	+	+
17	0,02	+	+
18	0,01	+	+

Keterangan: (-) : kekeruhan kurang dari kontrol pertumbuhan positif
 (+) : kekeruhan sama dengan kontrol pertumbuhan positif

Berdasarkan data dari seri pengenceran konsentrasi tahap II, secara kasar diketahui bahwa konsentrasi hambat minimum senyawa murni terhadap bakteri uji *E. coli* adalah 0,04 % (400 µg/mL) dan terhadap bakteri uji *B. subtilis* adalah 0,05% (500 µg/mL).

Tabel 3. Hasil penentuan konsentrasi hambat minimum isolat murni terhadap bakteri uji *E. coli* pada seri pengenceran konsentrasi tahap III

Nomor tabung reaksi	Konsentrasi isolat murni dalam medium MHB (%)	Hasil pengamatan terhadap bakteri uji <i>E. coli</i>
19	0,039	-
20	0,038	-
21	0,037	-
22	0,036	+
23	0,035	+
24	0,034	+
25	0,033	+
26	0,032	+
27	0,031	+

Keterangan: (-) : kekeruhan kurang dari kontrol pertumbuhan positif
 (+) : kekeruhan sama dengan kontrol pertumbuhan positif

Berdasarkan data dari seri pengenceran konsentrasi tahap III untuk bakteri uji *E. coli*, dapat ditentukan bahwa konsentrasi hambat

minimum isolat senyawa antibakteri terhadap bakteri *E. coli* adalah 0,037% atau 370 µg/mL.

Tabel 4. Hasil penentuan konsentrasi hambat minimum isolat murni terhadap bakteri uji *B. subtilis* pada seri pengenceran konsentrasi tahap III

Nomor tabung reaksi	Konsentrasi isolat murni dalam medium MHB (%)	Hasil pengamatan Terhadap bakteri uji <i>B. subtilis</i>
19	0,049	-
20	0,048	-
21	0,047	-
22	0,046	-
23	0,045	-
24	0,044	-
25	0,043	+
26	0,042	+
27	0,041	+

Keterangan: (-) : kekeruhan kurang dari kontrol pertumbuhan positif
 (+) : kekeruhan sama dengan kontrol pertumbuhan positif

Berdasarkan data dari seri pengenceran konsentrasi tahap III untuk bakteri uji *B. subtilis*, dapat ditentukan bahwa konsentrasi hambat minimum isolat senyawa antibakteri terhadap bakteri *B. subtilis* adalah 0,044% atau 440 µg/mL.

KESIMPULAN

Kesimpulan yang dapat diperoleh dari hasil penelitian tersebut adalah : senyawa N-2¹4¹-dimetil pentan-20-aminopregn-5-ene-3-ol memiliki aktivitas antibakteri dengan harga konsentrasi hambat minimum 370 µg/ml terhadap *Escherichia coli* dan 440 µg/ml terhadap *Bacillus subtilis*.

DAFTAR PUSTAKA

- Edberg, S.C. dan Berger (1986) Tes Kerentanan Antimikroba In Vitro, Penerbit Buku Kedokteran, 199 - 211.
- Kokpol, U., Chavasiri, W., Chittawong, V., Bruce, M., Cunningham, G.N., Miles, D.H. (1993) Long Chain Aliphatic Alcohols and Saturated Carboxylic Acid from Heartwood of *R. apiculata*, *J. Phytochemistry*, 33, 5 : 1129 - 1131.
- Kokpol, U., Chavasiri, W., Chittawong, V., Miles, D.H. (1990) Taraxeryl cis-p-Hydroxycinamate, a Novel Taraxeryl from *R. apiculata*, *J. Nat. Pro.*, 53, 4 : 953 - 955.
- Pelczar, M.J. dan Chan, E.C.S. (1981) Elements of Microbiology. Mac Graw Hill Inc., 68 - 93.