

Uji Aktivitas Antimikroba Ekstrak n-Butanol Madu Hutan (*Apis nigrocincta*) dari Kabupaten Selayar dengan Metode KLT-Bioautografi.

A. Suparlan Isya Samsu^{1*}, Mirfaidah Najamuddin^{1*}, Nurfitri Junita^{1*}, Suhra Febrina Karim^{1*}

¹ Program Studi DIII Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Megarezky, Makassar, Indonesia

DOI : <https://doi.org/10.29303/sjp.v1i2.34>

Article Info

Received : 2020-07-26

Revised : 2020-09-28

Accepted : 2020-09-28

Abstrak: Preliminary research has been conducted on the antimicrobial activity of n-Butanol extract of forest honey (*Apis nigrocincta*). This study aims to determine the antimicrobial activity of forest honey from Selayar Regency on the growth of test microbes, using the method of solid dilution with the test microbial *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Vibrio sp*, *Staphylococcus epidermidis*, and *Candida albicans* against n-butanol extract from forest honey (*Apis nigrocincta*) at 1 mg / ml. The results obtained showed that n-butanol extract inhibited the growth of bacteria *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, and *Staphylococcus aureus*. To estimate the compounds that provide antimicrobial activity, TLC-Bioautography test is performed. Obtained the best results from the separation of compounds by TLC using Chlorophorom eluate: Acetone (3: 1). The TLC-Bioautographic test results showed that the spots with an Rf value of 0.29 gave activity to *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus epidermidis*, and gave positive results on the appearance of flavanoid compounds.

Keywords: Forest honey (*Apis nigrocincta*), antimicrobial, n-Butanol extract

Citation : Samsu, ASI., Najamuddin, M., Junita, N., Karim, SF., (2020). Uji Aktivitas Antimikroba Ekstrak n-Butanol Madu Hitam (*Apis nigrocincta*) dari Kabupaten Selayar dengan Metode KLT-Bioautografi. Sasambo Journal of Pharmacy, 1(2), 41-45. doi : <https://doi.org/10.29303/sjp.v1i2.34>

Pendahuluan

Indonesia memiliki hutan alam sangat luas, sekitar 200 juta hektar, dengan berbagai jenis pohon. Pohon-pohon tersebut merupakan habitat ideal untuk kehidupan, berkembang biak, dan berproduksinya lebah madu. Lebah telah dikenal oleh masyarakat, terutama di pedesaan, sebagian masyarakat sudah melakukan budidaya lebah madu untuk meningkatkan produksi. Namun, minat masyarakat masih sangat rendah karena kurangnya pengetahuan dan anggapan bahwa usaha tersebut tidak menguntungkan. (Dewi, 2018). Indonesia memiliki spesies lebah madu yang paling beragam didunia, yaitu lima dari sembilan spesies lebah madu diantaranya madu hutan (*Apis*

nigrocincta) yang diklaim sebagai spesies asli Indonesia (Hadisoesilo, 2001)

Madu murni merupakan kumpulan dari sari bunga yang dihasilkan dari lebah. Madu biasanya terdapat dalam sarang lebah yang berbentuk heksagon (segi enam). Untuk mendapatkan madu dari sarang lebah, biasanya para peternak memakai alat kondensor. Madu juga dapat diperoleh dengan cara diperas sarangnya hingga didapatkan madu yang jernih dan murni (Wineri, Rasyid, & Alioes, 2014).

Pemanfaatan obat tradisional dewasa ini semakin meningkat mengikuti perkembangan tradisional sosial dan budanya masyarakat. Hal ini dapat dilihat dengan adanya berbagai bentuk obat tradisional yang beredar di masyarakat. Perkembangan tersebut menunjukkan bahwa penggunaan obat

Email: parlan.pance@gmail.com (*Corresponding Author)

tradisional dari masa ke masa tidaklah menurun, tetapi meningkat terus (Wiriyowidagdo, 1990).

Secara tradisional madu dipakai antara lain sebagai obat untuk antibakteri, meningkatkan stamina tubuh, merawat kulit, mengatasi kejang otot, sumber vitamin yang baik, memperkuat fungsi ginjal, menyembuhkan sakit malaria (Murtidjo, 1991).

Adapun madu hutan yang digunakan sebagai sampel penelitian ini berasal dari Kabupaten Kepulauan Selayar, Kecamatan Bontoharu dengan ketinggian 0-500 meter dari permukaan laut, sehingga jenis tanaman yang dibutuhkan oleh lebah, untuk menghasilkan madu sangatlah banyak antara lain mangga, kelapa, jagung, lengkung, pisang, durian kenari dan lain sebagainya. Bahkan tidak menutup kemungkinan juga lebah mengambil makanan dari pohon tempat sarangnya berada.

Berdasarkan penelitian sebelumnya, Srinani, 2008 yaitu aktivitas antimikroba madu murni asal maros terhadap beberapa mikroba uji bahwa madu dengan konsentrasi 5% aktif menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis*, *Salmonella thyposa*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, dan *Staphylococcus aureus*. Fathiyah pasisingi, 2008 yaitu aktivitas antimikroba madu lebah ternak (*Apis mellifera*) bunga kaliandra (*Calliandra calothyrsus*) terhadap beberapa bakteri uji, menunjukkan bahwa madu lebah ternak pada konsentrasi 2,5% aktivitas menghambat pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis*, *Salmonella thyposa*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Vibrio sp.* Selanjutnya penelitian (Wineri et al., 2014) membandingkan daya hambat madu alami dengan madu buatan secara In Vitro terhadap bakteri, menunjukkan madu alami memiliki daya hambat lebih tinggi. Hal inilah yang mendasari perlu dilakukannya penelitian aktivitas antimikroba dengan metode KLT-Bioautografi pada madu hutan yang berasal dari selayar.

Metode

Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah cawan petri (Normax), chamber (Camag), corong pisah (Iwaki Pyrex), enkas, inkubator (Memmert), Laminar Air Flow (LAF), Lampu UV 254 nm dan 366 nm (Philips), mikropipet (Huawei), ose bulat, otoklaf (Smic), oven (Memmert), dan timbangan analitik (AND).

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah alkohol 70%, aquadest, almunium foil, biakan murni (*Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus*

epidermidis, *Streptococcus mutans*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio sp.*), DMSO (Dimetil Sulfoksida), lempeng TLC G60 F254, metanol, kloroform, n-butanol, medium GNA (Glukosa Nutrient Agar), sampel madu hutan (*Apis nigrocincta*) dari Kabupaten Selayar.

Sterilisasi Alat

Alat-alat yang digunakan dicuci hingga bersih dengan air suling, kemudian alat-alat gelas dikeringkan lalu dibungkus dengan kertas dan disterilkan dengan menggunakan oven pada suhu 180°C selama 2 jam. Alat-alat gelas yang berskala dan tidak tahan terhadap pemanasan dan yang terbuat dari plastik disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit. Ose disterilkan dengan cara dipijarkan pada lampu spiritus.

Ekstraksi dan partisi.

Sampel madu hutan (*Apis nigrocincta*) yang telah ditimbang sebanyak 61,71 gram madu hutan kemudian dipartisi cair-cair dengan pelarut n-butanol sebanyak 50 ml, kemudian diaduk sampai merata dengan sekali-kali membuka kran corong pisah kemudian diamkan sampai terjadi pemisahan dari fase air dan fase n-butanol, pisahkan fase air dan fase n-butanol. Kemudian fase air dimasukkan kembali ke dalam corong pisah dan diekstraksi lagi dengan n-butanol sebanyak 50 ml dan diaduk sampai merata dengan sekali-kali membuka kran corong pisah kemudian diamkan sampai terjadi pemisahan dari fase air dan fase n-butanol, pisahkan fase air dan fase n-butanol. Hal ini diberi perlakuan yang sama hingga fase n-butanol terlihat jernih. Ekstrak n-butanol yang diperoleh dari beberapa kali penyarian disatukan kemudian diuapkan sampai mendapatkan ekstrak kental.

Penyiapan Mikroba Uji.

a. Peremajaan mikroba uji.

Bakteri uji diambil dari biakan murni masing-masing 1 ose. Kemudian diinokulasi dengan cara digoreskan pada medium agar miring Glukosa Nutrient Agar kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam untuk bakteri, dan pada suhu kamar selama 3 x 24 jam untuk jamur.

b. Pembuatan suspensi mikroba uji.

Mikroba hasil peremajaan masing-masing disuspensikan dengan larutan NaCl fisiologi 0,9 % steril kemudian diukur serapan suspensi biakan itu dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 580 nm dan dengan transmittan 25% untuk bakteri dan 75% untuk jamur sebagai blanko digunakan larutan NaCl fisiologi 0,9% steril.

Uji Skrining antiikroba.

Ekstrak yang larut dan tidak larut dengan pelarut n-butanol yang digunakan pada madu hutan ditimbang 10 mg lalu dilarutkan dengan DMSO sebanyak 0,2 ml. Setelah larut ekstrak ditambahkan medium GNA 9,8 ml sehingga diperoleh konsentrasi 1 mg/ml. Campuran tersebut dituang ke dalam cawan petri lalu dihomogenkan dan dibiarkan memadat. Suspensi bakteri digoreskan pada medium GNA yang telah memadat lalu diinkubasi selama 1 x 24 jam pada suhu 37°C untuk bakteri dan 3 x 24 jam pada suhu kamar 27°C untuk jamur.

Identifikasi secara Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

Lempeng KLT diaktifkan dengan pemanasan dalam oven pada suhu 100°C selama 30 menit sebelum digunakan. Ekstrak n-butanol ditotolkan pada lempeng KLT ukuran 7 x 1 cm menggunakan pipa kapiler. Lalu dielusi dengan menggunakan eluen kloroform : aseton (3 : 1) di dalam chamber. Lempeng dikeluarkan dari chamber dan diangin-anginkan hingga cairan pengelusnya menguap. Kemudian kromatogram yang dihasilkan diamati nodanya di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm, serta penampakan noda pada penyemprotan H₂SO₄ 10%, diberi tanda yang menghasilkan fluoresensi dan dihitung nilai Rf-nya.

Pengujian secara KLT-Bioautografi

Hasil identifikasi KLT dilanjutkan dengan uji KLT-Bioautografi dengan cara medium GNA steril sebanyak 10 ml dituang ke dalam cawan petri yang telah berisi suspensi mikroba, lempeng KLT yang telah dielusi dengan eluen kloroform : aseton (3 : 1) diletakkan di atas permukaan medium agar yang agak memadat, dibiarkan selama 60 menit kemudian lempeng tersebut diangkat dan dikeluarkan. Selanjutnya media diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam untuk bakteri dan pada suhu 27°C selama 3 x 24 jam untuk jamur.

Identifikasi Komponen Kimi

Kromatogram disemprotkan dengan menggunakan beberapa pereaksi golongan komponen kimia yaitu :

a. Pereaksi flavanoid (Sutrisno, 1993)

1. Aluminium klorida
Lempeng disemprot dengan pereaksi AlCl₃ dan diamati noda yang berfluoresensi pada lampu UV 366, noda yang berfluoresensi kuning atau hijau.
2. Antimon (III) klorida
Lempeng disemprot dengan pereaksi SbCl₃ dan akan tampak bercak yang berpendar dalam sinar UV 366 nm.

3. Tembaga sulfat-sitrat (Benedict)
Lempeng disemprot dengan pereaksi benedict, dan akan tampak bercak berpendar dalam sinar UV 366 nm.

b. Pereaksi alkaloid (Sutrisno, 1993)

1. Dragendroff - HCl
Lempeng disemprot dengan banyak pereaksi sampai penampakan warna noda orange.
2. Yodium - KI
Lempeng disemprot dengan banyak pereaksi sampai tampak tembus cahaya dengan warna noda orange kecoklatan.
3. Bauchardat
Setelah lempeng disemprot kemudian dikeringkan di udara sehingga menghasilkan tampak bercak berwarna coklat.

c. Pereaksi steroid (Sutrisno, 1993)

1. Liebermann-Burchard
Dipanaskan kromatogram dengan suhu 110°C selama 10 menit dan diamati noda yang berfluoresensi pada lampu UV, noda yang berfluoresensi biru adalah senyawa golongan steroid.
2. Vanilin-asam fosfat
Kromatogram disemprot dengan menggunakan pereaksi, kemudian dipanaskan kromatogram pada suhu 120°C sampai penampak bercak berwarna ungu.
3. Asam perklorat
Kromatogram disemprot dengan menggunakan pereaksi asam perklorat, kemudian lempeng disemprot dengan konsentrasi tinggi sampai tembus cahaya, kemudian dipanaskan pada suhu 120°C selama 15-30 menit. Masing-masing jenis steroid memerlukan tempo pemanasan yang berbeda-beda untuk mencapai intensitas warna yang maksimal atau pendaran yang maksimal. Semua senyawa dari kelompok ini berpendar dalam sinar UV 366 nm.

d. Pereaksi saponin (Sutrisno, 1993)

1. Komarowsky II
Campuran 1 ml larutan asam sulfat 50% (dalam etanol) dan 10 ml larutan 4-hidroksibenzaldehid 2% (dalam etanol). Penanganan setelah disemprot, lempeng dipanaskan pada suhu 100°C selama 5-10 menit kemudian diamati dalam sinar biasa.

Hasil dan Pembahasan

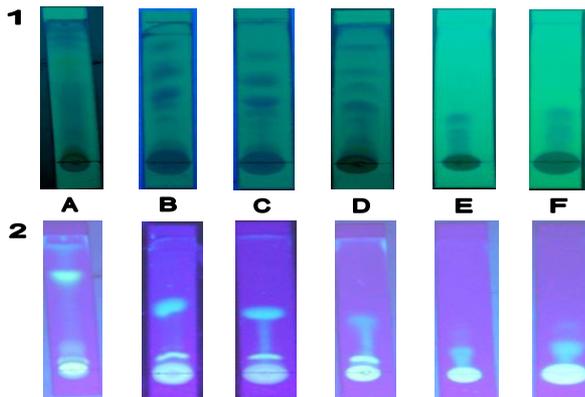
1. Pengujian skrining pelarut

Setelah dilakukan uji skrining pelarut dengan menggunakan beberapa cairan penyari

maka hasil yang didapatkan bahwa n-butanol yang paling banyak menghasilkan noda. Hasil uji skrining pelarut dapat dilihat pada tabel 1 dan gambar 2.

Tabel 1. Hasil Skrining pelarut

No	Cairan Penyari	Banyak Noda	
		UV 254	UV 366
1	Metanol	6	4
2	Aseton	6	3
3	Kloroform	6	2
4	N-butanol	7	2
5	Etil asetat	4	2
6	N-heksan	2	2



Gambar 2. Foto hasil pengujian skrining pelarut

Keterangan :

1 : UV 254

2 : UV 366

A : Metanol

B : Aseton

C : Kloroform

D : N-butanol

E : Etil asetat

F : N-heksan

Eluen : Kloroform : Metanol (1 : 1)

Dari hasil skrining pelarut didapatkan n-butanol yang memiliki noda yang paling banyak sehingga dilanjutkan proses ekstraksi dengan menggunakan metode partisi cair-cair. Dimana prinsip dari metode partisi cair-cair yaitu menggunakan dua pelarut yang tidak saling bercampur.

2. Hasil ekstraksi madu hutan (*Apis nigrocincta*)

Setelah dilakukan uji skrining pelarut ekstraksi madu hutan sebanyak 61,71 gram secara partisi menggunakan corong pisah dengan pelarut n-butanol maka diperoleh hasil 5,73 gram ekstrak n-butanol kental dan ekstrak fraksi air sebanyak 35,57 gram.

Tabel 2. Hasil Ekstraksi Madu Hutan (*Apis nigrocincta*)

No	Sampel	Bobot (gram)
1	Madu Hutan (<i>Apis nigrocincta</i>)	61,71gram
2	Ekstrak n-butanol	5,73 gram
3	Ekstrak air	35,57 gram

3. Pengujian skrining antimikroba

Setelah dilakukan uji skrining pada masing-masing ekstrak madu hutan (n-butanol) dan ekstrak air (residu) terhadap beberapa mikroba uji, yaitu *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholera*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus mutans*, *Salmonella typhi*, dan *Staphylococcus epidermidis*. Maka diperoleh hasil bahwa ekstrak n-butanol menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap bakteri uji *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, dan *Staphylococcus epidermidis*. Data selengkapnya dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil Pengujian Skrining Aktivitas Antimikroba Sampel Madu Hutan (*Apis nigrocincta*)

Sampel	Mikroba Uji									
	B S S S E P S V C	S T M E C A A C A								
Ekstrak n-butanol	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-
Ekstrak air	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K(+) Antibakteri	+	+	+	+	+	+	+	+	+	#
K(+) Antijamur	#	#	#	#	#	#	#	#	#	+
K(-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Keterangan:

BS : *Bacillus subtilis*

ST : *Salmonella typhi*

SM : *Streptococcus mutans*

SE : *Staphylococcus epidermidis*

EC : *Escherichia coli*

PA : *Pseudomonas aeruginosa*

SA : *Staphylococcus aureus*

VC : *Vibrio cholera*

CA : *Candida albicans*

K (+) Antibakteri :Kontrol positif antibakteri (Kloramfenikol)

K (+) Antijamur	:Kontrol positif antibakteri (Ketokonazol)
K (-)	: Kontrol negative (DMSO)
(+)	: Menghambat pertumbuhan mikroba
(-)	: Tidak menghambat pertumbuhan mikroba

Dari hasil uji skrining aktivitas antimikroba menunjukkan bahwa ekstrak air dengan konsentrasi 1 mg/ml tidak menunjukkan adanya hambatan terhadap mikroorganisme yang diujikan, sedangkan ekstrak n-butanol madu hutan (*Apis nigrocincta*) memberikan hambatan terhadap pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, dan *Staphylococcus epidermidis*, sehingga potensial dari ekstrak n-butanol perlu diteliti lebih lanjut aktivitas antimikrobanya.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil yang diperoleh dari penelitian yang telah dilakukan terhadap madu hutan (*Apis nigrocincta*), maka dapat disimpulkan bahwa ;

1. Ekstrak n-butanol madu hutan (*Apis nigrocincta*), memberikan hambatan terhadap pertumbuhan mikroba.
2. Pada metode KLT-Bioautografi memperlihatkan 1 bercak aktif yang mempunyai efek sebagai antimikroba dengan nilai Rf 0,29.
3. Komponen kimia aktif antimikroba menunjukkan positif pada penampak bercak terhadap golongan senyawa flavonoid.

Untuk penelitian selanjutnya sebaiknya dilakukan isolasi dan identifikasi komponen kimia madu hutan (*Apis nigrocincta*) yang berkhasiat sebagai antimikroba.

Daftar Pustaka

- Dewi, i. S. (2018). Analisis kelayakan finansial budidaya lebah madu di desa kuapan kecamatan tambang kabupaten kampar (kasus usaha madu "mekar sari"). *Jurnal agribisnis*. <https://doi.org/10.31849/agr.v20i1.1495>
- Hadisoesilo, s. (2001). The Diversity of Indigenous Honey Bee Species of Indonesia. *Biodiversitas, Journal of Biological Diversity*. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d020107>.
- Murtidjo, B., 1991., Memelihara Lebah Madu., Kanisus, Yogyakarta.

- Rahalison, L., Hostcman. K, 1991., A Bioautographis Agar Overlay Method for The Detection of Antifungal Compounds for Higher Plants Phykochemical Analysis, Vol. 2 University de Lausanne Swteerland.
- Rostita., 2007., Madu Sehat Cantik dan Penuh Vitalis., PT Mizan Pustaka, Bandung.
- Sutrisno.R., 1993., Pereaksi KLT., Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, Jakarta.
- Tobo, F., Mufidah, Taebe, B dan Mahmud, I., 2001., Buku Pegangan Laboratorium Fitokimia I (Ekstraksi Komponen Kimia Bahan Alam). Laboratorium Fitokimia Jurusan Farmasi, FMIPA., Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Wiruwidagdo., S., 1990., Penelitian dan Pengembangan Obat Tradisional Dalam Pengobatan Modern., Penelitian Regional Peningkatan Peran Serta Masyarakat Bagi Petugas Dati II Dalam Pembinaan Upaya Kesehatan Tradisional. Ujung Pandang
- Wineri, E., Rasyid, R., & Alioes, Y. (2014). Perbandingan Daya Hambat Madu Alami dengan Madu Kemasan secara In Vitro terhadap *Streptococcus beta hemoliticus* Group A sebagai Penyebab Faringitis. *Jurnal Kesehatan Andalas*. <https://doi.org/10.25077/jka.v3i3.140>