

Skrining Senyawa Antibakteri dari Minyak Atsiri Rimpang Temu Kunci (*Boesenbergia pandurata*) terhadap *Staphylococcus aureus* dengan Metode Bioautografi Kontak

Indah Christiana dan Lisa Soegianto*
Fakultas Farmasi, Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya, Indonesia

Rimpang temu kunci di masyarakat umumnya digunakan sebagai obat rematik, radang lambung, radang selaput lendir, peluruh air seni, malaria, gangguan usus besar, perut kembung, penyakit kulit, diare, sariawan, dan cacingan. Minyak atsiri yang terdapat pada rimpang temu kunci umumnya digunakan sebagai antibakteri. Tujuan dari penelitian ini adalah menentukan ada daya antibakteri minyak atsiri rimpang temu kunci terhadap *Staphylococcus aureus* dan golongan senyawa dalam minyak atsiri rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata*) yang mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dengan metode bioautografi kontak. Minyak atsiri rimpang temu kunci diperoleh dengan metode destilasi Stahl. Penentuan golongan senyawa berkhasiat dilakukan dengan uji bioautografi kontak dan dianalisa menggunakan skrining fitokimia *anisaldehid asam sulfat* dan *vanillin sulfat*. Hasil penetapan kadar minyak atsiri dengan destilasi Stahl diperoleh kadar minyak atsiri rimpang temu kunci segar sebesar 0,38%. Hasil pengujian bioautografi kontak menunjukkan golongan monoterpen yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*.

Kata kunci: Temu kunci (*Boesenbergia pandurata*), minyak atsiri, aktivitas antibakteri, *Staphylococcus aureus*, bioautografi kontak

Antibacteria Compound Screening of Fingerroot (*Boesenbergia pandurata*) Essential Oil against *Staphylococcus aureus* with The Contact Bioautography Method

Fingerroot are generally used as a remedy for rheumatism, gastroenteritis, mucositis, diuretic, malaria, bowel disorders, flatulence, skin diseases, diarrhea, mouth sores, and intestinal worms. Essential oils found in Fingerroot are generally used as antibacterial. The purpose of this study is to determine the antibacterial activity of Fingerroot essential oils against *Staphylococcus aureus* and to determine the antibacterial compound of Fingerroot essential oils (*Boesenbergia pandurata*) using contact bioautography methods. Fingerroot essential oil was obtained by the Stahl distillation method. Determination of the class of efficacious compounds was carried out by contact bioautography method and anisaldehyde-sulfuric acid and vanillin sulfate were used as spray reagent. The Fingerroot essential oil yields 0.38% and monoterpenes was determined as an antibacterial agent against *Staphylococcus aureus*.

Keywords: Fingerroot (*Boesenbergia pandurata*), essential oil, antibacterial activity, *Staphylococcus aureus*, contact bioautography.

*Corresponding author: Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya, Jl. Raya Kalisari Selatan No. 1 Surabaya, e-mail: lisa.soegianto@yahoo.com

PENDAHULUAN

Sumber utama infeksi *Staphylococcus aureus* adalah pada luka - luka yang terbuka, benda - benda yang terkontaminasi luka tersebut, serta saluran napas dan kulit manusia (Jawetz, Melnick dan Adelburg, 2001). Indonesia kaya akan sumber bahan obat alam dan obat tradisional yang telah digunakan oleh sebagian besar rakyat Indonesia secara turun temurun. Pada umumnya minyak atsiri yang terdapat dalam rimpang temu kunci adalah yang berkhasiat sebagai antimikroba (Heyne, 2006). Temu kunci di masyarakat digunakan sebagai obat, yaitu untuk mengobati rematik, radang lambung, radang selaput lendir, untuk peluruh air seni, untuk mengobati malaria, gangguan usus besar, perut kembung, penyakit kulit, diare, sariawan, dan cacingan (Rukmana, 2008). Penggunaan minyak atsiri dari bahan alam sebagai obat semakin diminati masyarakat, seiring dengan gerakan kembali ke alam (*back to nature*) yang dilakukan masyarakat. Minyak atsiri dikenal dengan nama minyak eteris atau minyak terbang (*essential oil, volatile*) yang merupakan salah satu hasil metabolisme sekunder pada tanaman. Minyak atsiri bersifat mudah menguap pada suhu kamar, mempunyai rasa getir, berbau wangi sesuai dengan bau tanaman penghasilnya dan larut dalam pelarut organik dan tidak larut dalam air (Sudaryani dan Sugiharti, 1990).

Dari hasil penetapan kadar minyak atsiri dengan alat *Stahl* diperoleh kadar minyak atsiri rimpang temu kunci segar sebesar 0,19% v/b dan dianalisis menggunakan GC-MS hasil menunjukkan minyak atsiri temu kunci (*Boesenbergia pandurata*) yang diperoleh dari rimpang temu kunci segar menunjukkan 31 komponen dan terdapat 11 senyawa sebagai komponen utama yaitu: kamfor 21,20%, 1,8-sineol 14,83%, nerol 10,48%, metil sinamat 8,28%, trans- β -osimen 8,22%, kamfen 6,83%, sitral 5,12%, limonen 4,39%, kamfen hidrat 4,18%, linalool 3,91%, z-sitral 2,39% (Simbolon, 2014). Fraksi etanol rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata*) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Salmonella typhi* menghasilkan harga KBM 2% sedangkan terhadap *Streptococcus hemolytic a - non pneumoniae* menghasilkan harga KBM 3% (Harlianti, Kuswandi dan Irvati, 2011). Nurhayati (2015) menyatakan bahwa ekstrak metanolik *Boesenbergia rotunda* memperlihatkan potensi aktivitas antibakteri dan antisporea terhadap sel vegetatif serta spora *Bacillus cereus* dan *Bacillus subtilis*.

Bioautografi adalah suatu cara untuk mengetahui aktivitas senyawa antimikroba dan antifungi dengan menggunakan kromatografi planar (Kusumaningtyas, Astuti dan Darmono, 2008). Menurut Mardiyah *et al.* (2011) menggunakan metode bioautografi kontak setelah 30 menit dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, terbentuk zona hambatan

pada lempengan KLT yang dikontakkan pada lempengan agar. Pada penelitian ini akan ditentukan ada atau tidaknya daya antibakteri minyak atsiri dari rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata*) terhadap *Staphylococcus aureus* dan golongan senyawa dalam minyak atsiri Temu kunci (*Boesenbergia pandurata*) yang mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dengan metode bioautografi kontak.

METODE PENELITIAN

Alat

Alat destilasi Stahl, inkubator (*Memmert, Germany*), autoclave (*All American, model 25X*), lemari es (*Hitachi R-528H, Japan*), penangas air, oven (*Memmert, Germany*), timbangan analitik (*Shimadzu Electronic Balance Ex-200A, Kyoto, Japan*), mikroskop monokuler dan perlengkapannya (*Carlton, Jerman*), lemari aseptis, lemari asam, mikropipet (*Eppendorf pipette 20 μ l & Socorex, No.381.05, Switzerland*), termometer, jangka sorong (*Tricle Brand, China*), Bunsen, spiritus brander, cawan petri (*Iwaki, Japan*) diameter 15 cm, kawat inokulasi, perforator, pinset, pipa kapiler 5 μ l, Bejana kromatografi (*Camag, Swiss*), refraktometer Abbe, lampu UV 254 nm dan 366 nm.

Bahan

Media *Mueller Hinton Agar* (MHA) (*Merck, Germany*), Media *Mueller Hinton Broth* (MHB) (*Merck, Germany*), tetrasiklin HCl, DMSO (*Merck, Germany*), Plat silika gel 60 F254 (*Merck, Germany*), anisaldehyd asam sulfat dan vanillin sulfat.

Bakteri Uji

Staphylococcus aureus ATCC 6538 yang didapat dari Laboratorium Mikrobiologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya.

Tahapan Penelitian

Pengamatan Makroskopik Dan Mikroskopik Temu kunci (Boesenbergia pandurata)

Rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata*) yang digunakan diperoleh dari perkebunan desa Kalisari, kecamatan Randublatung Kabupaten Blora, Jawa Tengah. Pemeriksaan makroskopis dilakukan dengan cara temu kunci diperiksa secara organoleptis terdiri dari pengamatan terhadap warna, bau, rasa, serta ciri - ciri morfologisnya. Pengamatan mikroskopik dilakukan melalui pengamatan penampang melintang dari temu kunci dan diamati bagian-bagian yang spesifik.

Ekstraksi Minyak Atsiri Temu Kunci

Temu kunci yang masih segar diekstraksi dengan menggunakan destilasi stahl, sebanyak 300 gram temu kunci yang telah dipotong kecil -

kecil dimasukkan ke dalam labu destilasi. Setelah semua bahan masuk, tambahkan akuades 2/3 volume labu alas bulat 1000 ml atau hingga seluruh bahan terendam kemudian labu dipanaskan. Selama 6 jam alat destilasi dijalankan hingga seluruh minyak atsiri dalam temu kunci terdestilasi. Minyak atsiri kemudian ditampung dan dipisahkan dari air. Tambahkan natrium sulfat anhidrat untuk mengikat sisa-sisa air pada minyak atsiri temu kunci. Setelah terpisah dari air, volume minyak diukur dan ditentukan persentase rendemennya.

Spesifikasi Minyak Atsiri Temu kunci

a. Pengamatan organoleptis

Pengamatan organoleptis minyak atsiri Temu kunci meliputi warna, bau dan rasa (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2000).

b. Penetapan indeks bias

Penentuan indeks bias dilakukan dengan menggunakan alat refraktometer Abbe (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2000).

$$N_D^{20} = N'_d + 0,00041 (t - 20)$$

Dimana : N_D^{20} = indeks bias pada suhu 20⁰ C.

N'_d = indeks bias yang teramat
pada t (suhu ruang).

c. Pemeriksaan kelarutan

Hasil pemeriksaan kelarutan minyak atsiri rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata*) dalam alkohol 70% adalah 1:2 dan dalam alkohol 96% adalah 1:1 (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2000; Guenther,1952).

Pembuatan Suspensi Bakteri *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus yang telah mencapai pertumbuhan optimal, berumur 24 jam pada media MHA miring dibuat suspensi pada media cair steril MHB sebanyak 5 ml dengan mengambil sedikit dari koloni mikroorganisme uji dengan kawat ose steril, kemudian diinokulasi pada media cair steril, divortex sampai homogen, dilakukan penyetaraan kekeruhan bakteri dengan larutan 1/2 Mc Farland I. Suspensi bakteri yang mempunyai kekeruhan setara dengan larutan 1/2 Mc Farland I diperkirakan memiliki populasi 1,5 x 10⁸ CFU/ml (Lorian, 1991).

Pelaksanaan Metode Bioautografi kontak

Lempengan agar dibuat dari 25 ml media MHA diinokulasi dengan 0,25 ml suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* yang setara dengan 1/2 McFarland I (1,5 x 10⁸ CFU/ml) dan di prainkubasi selama 1,5-2 jam. Minyak atsiri rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata*) dilakukan kromatografi lapis tipis dengan fase diam plat silika gel 60 F254 dan fase gerak n-

heksan : etil asetat (8:2) kemudian plat KLT dihilangkan fase geraknya dan dikontakkan ke ke lempengan agar selama 30 menit. Inkubasi lempengan agar pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Amati zona bening yang ada pada lempengan agar tempat dimana plat KLT di kontakkan.

Penentuan Golongan Senyawa Antibakteri pada Minyak Atsiri

Larutan minyak atsiri dengan konsentrasi 20000 ppm (2%) dan eugenol 10000 ppm (1%), ditotolkan dengan volume 5 µl pada lempeng Silika 60 F254 berukuran 10 cm × 4 cm dan diekspansi dengan fase gerak adalah n-heksana : etil asetat dengan perbandingan masing-masing 8 : 2. Noda yang dihasilkan diamati dengan sinar UV 254 nm dan 366 nm. Penentuan golongan senyawa minyak atsiri yang memiliki aktivitas antibakteri *Staphylococcus aureus* dilakukan dengan menggunakan skrining fitokimia penampak noda *anisaldehid asam sulfat* dan *vanilin sulfat* berdasarkan warna yang ditimbulkan. Penampak noda disemprotkan pada plat KLT hasil eluasi, kemudian diamati perubahan warna dan dibandingkan harga R_f (*Retention factor*) nya dengan Daerah Hambatan Pertumbuhan (DHP) hasil bioautografi kontak terhadap *Staphylococcus aureus*, bila terdapat noda senyawa yang sama harga R_fnya dengan hasil bioautografi kontak maka senyawa tersebut dapat diduga memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri uji. Penentuan jenis senyawa yang berkhasiat ditinjau dari harga R_f dan perubahan warna pada hasil penyemprotan penampak noda *anisaldehid asam sulfat* dan *vanilin sulfat*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Minyak atsiri yang diperoleh dari destilasi Stahl ditentukan karakteristiknya dengan pengamatan sifat fisika minyak atsiri untuk mengetahui mutu dari minyak atsiri hasil isolasi menggunakan alat destilasi Stahl (*steam - water destilation*). Standarisasi spesifik sifat fisika kimia minyak atsiri meliputi pengamatan organoleptis, penetapan indeks bias, dan kelarutan. Secara organoleptis minyak atsiri temu kunci berwarna jernih kekuningan, berbau khas temu kunci, memiliki rasa getir. Penetapan kelarutan diperoleh hasil dalam alkohol 70% kelarutan 1 : 2 dan dalam alkohol 96% kelarutan 1 : 1 pada penetapan kelarutan minyak atsiri temu kunci sesuai dengan pustaka (Standar Nasional Indonesia, 2001) yaitu dalam alkohol 70% kelarutan 1 : 2 dan dalam alkohol 96% kelarutan 1 : 1. Hasil indeks minyak atsiri temu kunci yaitu 1,4806 yang dihasilkan dari penentuan dengan menggunakan alat refraktometer Abbe.

Pada pengujian bioautografi dapat dilihat adanya penghambatan pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* oleh minyak atsiri temu kunci. Hal tersebut diamati dengan terbentuknya Daerah hambatan pertumbuhan

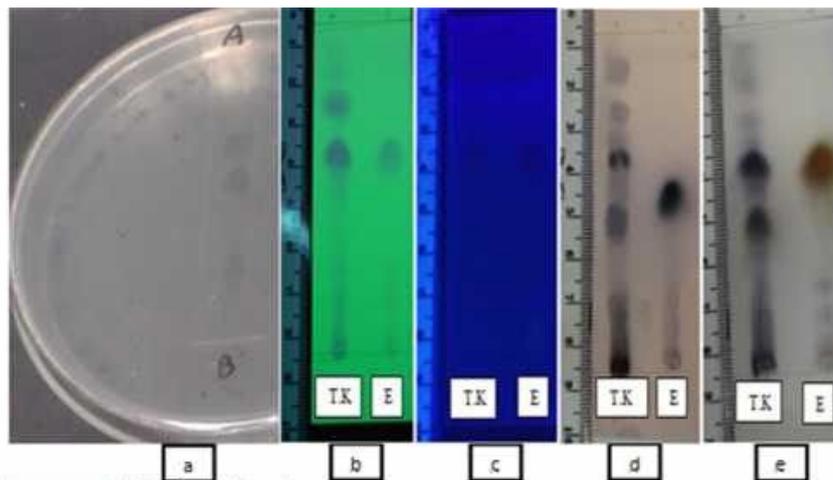
(DHP) yang ditandai adanya zona jernih pada media MHA yang kontak dengan noda hasil eluasi minyak atsiri rimpang temu kunci, terdapat tiga Daerah Hambatan Pertumbuhan (DHP) yang terbentuk pada kromatogram bioautografi (gambar 1). Penentuan golongan senyawa aktif dari minyak atsiri temu kunci yang dilakukan dengan menggunakan penampak noda, yaitu *anisaldehid asam sulfat* dan *vanillin sulfat*. Menurut Wagner dan Bladt (1996), *anisaldehid asam sulfat* dan *vanilin sulfat* merupakan salah satu pereaksi yang universal yang digunakan untuk identifikasi golongan senyawa kimia komponen minyak atsiri. Noda minyak atsiri temu kunci yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* yang di semprot dengan *anisaldehid asam sulfat* pada *Rf* 0,18, *Rf* 0,61 dan *Rf* 0,73 menunjukkan penampak noda berwarna ungu yang menunjukkan golongan monoterpen (gambar 1, tabel 1). Pereaksi semprot *anisaldehid asam sulfat* akan menunjukkan perubahan warna senyawa monoterpen alkohol dan esternya, sineol, sitral, aldehyd, sitronelal menjadi biru atau biru – ungu pada sinar tampak (Wagner dan Bladt, 1996; Wagner, Bladt dan Zgainski, 1984). Noda minyak atsiri temu kunci yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* setelah disemprot dengan penampak noda *Vanillin sulfat* dengan harga *Rf* 0,18, *Rf* 0,61, dan *Rf* 0,73 menunjukkan noda yang berwarna ungu yang berarti terdapat adanya golongan monoterpen (gambar 1, tabel 1).

Pereaksi *vanillin sulfat* digunakan untuk deteksi senyawa terpenoid, steroid, komponen minyak atsiri seperti senyawa alkohol dan fenol,

hasil positif ditunjukkan dengan perubahan warna bercak menjadi biru, hijau, merah atau coklat di bawah sinar tampak (Wagner dan Bladt, 1996; Wagner, Bladt dan Zgainski, 1984). Berdasarkan penampak noda *anisaldehid asam sulfat* dan *vanillin sulfat* menunjukkan golongan senyawa monoterpen. Monoterpen merupakan senyawa yang kerangka karbonnya berasal dari dua satuan isoprena dan dengan rumus empiris $C_{10}H_{16}$. Monoterpen dapat berupa hidrokarbon tidak jenuh atau dapat mempunyai gugus fungsi, dan berupa alkohol, aldehid atau keton (Padmawinata, 1995). Menurut Mekanisme kerja minyak atsiri yang mengandung senyawa monoterpen dalam membunuh bakteri adalah dengan cara mengubah permeabilitas membran sel, menghilangkan ion - ion dalam sel, menghalangi proton - pump, dan menurunkan produksi adenosin trifosfat (ATP). Minyak atsiri bersifat lipofilik yang dapat melewati dinding bakteri karena dinding bakteri terdiri atas polisakarida, asam lemak, dan fosfolipid. Hal ini dapat mengakibatkan kerusakan dinding sel sehingga dapat membunuh bakteri. Mekanisme kerja minyak atsiri adalah dengan menghambat stabilitas membran sel bakteri dan menyebabkan material sitoplasma menghilang (Cowan, 1999).

KESIMPULAN

Kandungan dalam minyak atsiri rimpang temu kunci (*Boesenbergia pandurata*) yang mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* adalah golongan monoterpen.



Gambar 1. Hasil uji minyak atsiri temu kunci (*Boesenbergia pandurata*)

(a) pada KLT bioautografi (b) pada UV 254 nm, (c) pada UV 366 nm, (d) plat KLT yang disemprot dengan penampak bercak *anisaldehid-asam sulfat* dan (e) plat KLT yang disemprot dengan penampak bercak *vanilin sulfat*; TK: Temu Kunci; E: Eugenol

Tabel 1. Hasil pengamatan harga *Rf* pada Kromatografi Lapis Tipis minyak atsiti temu kunci (*Boesenbergia pandurata*)

| Harga <i>Rf</i> | Sebelum penyemprotan | | | | | Sesudah penyemprotan | | | |
|-----------------|------------------------|-----------|------|-----------|------|---|----------|--------------------------------|-----------|
| | DHP - KLT bioautografi | UV 254 nm | | UV 366 nm | | Penampak bercak anesaldehid asam sulfat | | Penampak bercak Vanilin sulfat | |
| | | T.K | E | T.K | E | T.K | E | T.K | E |
| 0,00 – 0,10 | | | | | | | 0,06 (u) | | 0,06 (u) |
| 0,11 – 0,20 | 0,18 | 0,18 | | | | 0,18 (u) | 0,12 (b) | 0,18 (u) | 0,15 (b) |
| 0,21 – 0,30 | | 0,25 | | | | | 0,21 (u) | | 0,25 (u) |
| 0,31 – 0,40 | | | | | | | | | |
| 0,41 – 0,50 | | | | | | 0,43 (u) | | 0,43 (h) | |
| 0,51 – 0,60 | | | | | | | 0,52 (h) | | 0,58 (ck) |
| 0,61 – 0,70 | 0,61 | 0,61 | 0,62 | 0,61 | 0,62 | 0,61 (u) | | 0,61 (u) | |
| 0,71 – 0,80 | 0,73 | 0,73 | | | | 0,73 (u) | | 0,73 (u) | |
| 0,81 – 0,90 | | 0,80 | | | | 0,87 (u) | | 0,87 (u) | |
| 0,91 – 1,00 | | 0,93 | | | | | | | |

Keterangan: T.K : Temu kunci; E : Eugenol; b: biru; h : hijau; ck: coklat kekuningan ; u : ungu

DAFTAR PUSTAKA

Cowan, M.M. 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents, *Clinical Microbiology Reviews*. 12(4): 564-82.

Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*, cetakan I, Jakarta, hal. 11-12, 67.

Guenther, E. 1952. *The Essential Oil*, 5th ed, Krieger Publ. Co, Malabar. hal 130-131.

Harlianti, Mariska S., Kuswandi, dan Irvati, S. 2011. Aktivitas antibakteri fraksi etanol temu kunci (*Boesenbergia pandurata*) terhadap *Salmonella typhi* dan *Streptococcus hemolytic a non pneumonia*. *Jurnal pharmacon*. 12(2):65-68.

Heyne, K., 2006. *Tumbuhan Berguna Indonesia* Jilid I. Jakarta: Yayasan Sarana wana jaya.

Jawetz, E., Melnick, J. L., dan Adelberg, E. A. 2001, *Mikrobiologi Kedokteran*, (Bagian mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, penerjemah), Penerbit Salemda Medika, Jakarta, pp. 316-350.

Kusumaningtyas, E., Astuti, E., Darmono. 2008. Sensitivitas Metode Bioautografi Kontak dan *Overlay* dalam Penentuan Senyawa Antikapang, *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 6(2):75-79.

Lorian, V. 1991. *Antibiotics in Laboratory Medicine*, 3rd edition. The Williams & Wilkins Company, Baltimore, pp. 12, 18.

Mardiyah Mustary, M.Natsir Djide, Ilham Mahmud, Nursiah Hasyim. 2011, Uji aktivitas hambat dan analisis KLT bioautografi perasan buah sawo manila (*Achras zapota linn*)

terhadap bakteri uji *Salmonella thyposa*, *Jurnal MKMI*. 7(I): 3-4.

Nurhayati, P. 2015. Potensi aktivitas antibakteri ekstrak temukunci (*Boesenbergia rotunda*) terhadap sel vegetative serta spora *Bacillus cereus* dan *Bacillus subtilis*, *Jurnal Universitas Pendidikan Indonesia*. 11(2):7-9.

Padmawinata, K. 1995. *Pengantar Kromatografi*, Edisi ke-2, ITB, Bandung, Terjemahan: *Introduction to Chromatografi*, Gritter, R.J., Bobbitt, J.M., and Schwarting, A.E., 1985, Holden Day Inc, USA. hal. 109-175.

Rukmana, R. 2008. *Temu-temuan Apotik Hidup di Perkarangan*. Kanisius. Yogyakarta.

Standar Nasional Indonesia. 2001. Minyak daun cengkeh[online].http://Pasarargo.com. diakses pada 4 Januari 2017.

Simbolon, K. S. 2014. Isolasi dan analisis komponen minyak atsiri rimpang temu kunci (*Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf.) secara segar dan kering secara GC-MS, *Skripsi*, Sarjana Farmasi, Universitas Sumatra Utara.

Sudaryani, T. dan Sugiharti, E. 1990. *Budiaktivitas dan Penyulingan Nilam*. Penebar Swaaktivitas, Jakarta.

Wagner, H. dan Bladt, S. 1996. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas, Second edition*, Springer Science, Munchen.

Wagner, H., Bladt, S., dan Zgainski, E.M. 1984. *Plant Drug Analysis; A Thin Layer Chromatography Atlas*, Second edition, Springer-Verlag Berlin Hiedelberg, New York; 23-26.