

TIME-KILL ASSAY ANTIBAKTERI EKSTRAK METANOL TERMAS TERHADAP *Bacillus subtilis*

SRI MULYANINGSIH^{1*}, SYARIFATUL MUFIDAH², ZESTRI NURRAHMI³, WIDYASARI PUTRANTI⁴

Fakultas Farmasi, Universitas Ahmad Dahlan¹

Fakultas Farmasi, Universitas Ahmad Dahlan²

Fakultas Farmasi, Universitas Ahmad Dahlan³

Fakultas Farmasi, Universitas Ahmad Dahlan⁴

*Penulis korespondensi, e-mail: sri.mulyaningsih@pharm.uad.ac.id

ABSTRAK

Latar belakang:

Tujuan: Penelitian ini untuk meneliti aktivitas antibakteri dari ekstrak metanol daun dan batang termas terhadap *B. subtilis*, serta melakukan uji time-kill untuk mengetahui sifat bakterisidal ekstrak metanol batang termas terhadap *B. subtilis*.

Metode: Daun dan batang termas diekstraksi dengan maserasi menggunakan metanol. Ekstrak diuji aktivitas antibakteri dengan menggunakan metode mikrobroth dilution pada media MHA. Berikutnya ditentukan kadar hambat minimum (KHM) dan kadar bunuh minimum (KBM). Time kill assay dilakukan penghitungan jumlah bakteri setelah perlakuan ekstrak pada jam ke-0, 1, 2, 4, 6, 8 dan 24 jam.

Hasil: KHM dan KBM ekstrak batang termas sebesar 40 mg/ml, sementara ekstrak daun sampai konsentrasi 160 mg/ml tidak menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *B. subtilis*. Studi time kill assay menunjukkan ekstrak 40 mg/ml dan 80 mg/ml menunjukkan pengurangan jumlah bakteri lebih dari $3 \log_{10}$ cfu/ml terhadap kontrol negatif pada perlakuan 8 jam.

Kesimpulan: Ekstrak metanol batang termas memiliki aktivitas antibakteri terhadap *B. subtilis* yang lebih baik dibandingkan ekstrak daunnya. Ekstrak batang termas bersifat bakterisidal setelah perlakuan 8 jam.

Kata kunci: antibakteri, bakterisidal, termas, time-kill assay

PENDAHULUAN

Bacillus subtilis merupakan jenis bakteri yang dikaitkan dengan bakteremia/septikemia, endokarditis, meningitis, infeksi luka, telinga, mata, saluran pernapasan, saluran kemih, dan saluran pencernaan. Bakteri *B. subtilis* mampu menyebabkan penyakit yang mengganggu fungsi imun pada tubuh manusia diantaranya meningitis dan gastroenteritis akut (1). *Bacillus subtilis* mampu membentuk endospora dan tersebar luas dalam tanah, tumbuh-tumbuhan dan air dan mampu terbawa oleh partikel debu di udara. Endospora dari bakteri ini mampu bertahan hidup lama karena resistensinya tinggi terhadap panas (2).

Termas merupakan tumbuhan merambat yang banyak ditemukan di hutan, rawa, pinggir sungai di beberapa daerah di Indonesia seperti di Kalimantan, Sulawesi, Sumatera, dan Jawa. Tumbuhan ini banyak dimanfaatkan oleh masyarakat sekitar sebagai obat tradisional. Studi etnobotani dan etnofarmakologi menunjukkan bahwa masyarakat pada umumnya memanfaatkan termas sebagai obat tradisional untuk mengobati sakit asma, batuk, diare, gastritis, melancarkan haid, sariawan, sakit

mata, demam, malaria, dan gatal-gatal dan kanker (3–9). Khasiat termasuk sebagai obat tradisional

diduga berkaitan erat dengan kandungan senyawa aktif yang terkandung pada tumbuhan termas. Namun, penelitian ilmiah yang membuktikan tumbuhan termas dapat digunakan sebagai alternatif pengobatan penyakit belum banyak dilakukan. Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa ekstrak etanol daun termas menghambat *Salmonella typhi* dengan KHM 0,5 mg/ml. Adapun beberapa kandungan golongan senyawa pada ekstrak tumbuhan termas yang dilaporkan diantaranya flavonoid, tanin, saponin, dan triterpenoid (10,11).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari ekstrak metanol daun dan batang termas terhadap *B. subtilis*, serta mengetahui sifat bakterisidal ekstrak metanol batang termas terhadap *B. subtilis* dengan metode *time kill assay*.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan analitik (Ohaus), blender (Philips), oven (Binder), *electric stirrer*, rotary evaporator (Heidolph), autoklaf (Shenan), mikropipet (Soccorex), sonikasi, vorteks (Velp), hot plate (Ika C-MAG), inkubator (Binder), *Biosafety Cabinet* (Monmouth), mikropelat 96-sumuran, dan alat-alat gelas (Iwaki)

Adapun bahan yang digunakan adalah daun dan batang termas diambil dari Nglegi, Kecamatan Pathok, Kabupaten Gunung Kidul pada bulan Agustus 2021., metanol, aquades (Jaya Santosa), media Mueller Hinton Agar/MHA (Himedia), Mueller Hinton Broth/MHB (Oxoid), dan Nutrien Agar/NA (Oxoid), isolat *B. subtilis* (FNCC 0059), alkohol 70% (Jaya Santosa), Vankomisin, Dimetil Sulfoksida/DMSO (Merck), dan MTT (Sigma Aldrich).

PROSEDUR PENELITIAN

1. Identifikasi Tumbuhan

Identifikasi tumbuhan dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional, Tawangmangu, Karanganyar. Sampel tumbuhan segar dikirim dan dilakukan determinasi berdasarkan pada morfologi tanaman meliputi daun, batang, dan akar.

2. Pengambilan Sampel

Pengambilan sampel akan dilakukan di Desa Nglegi, Kecamatan Pathuk, Gunung Kidul. Sampel daun dan batang dengan memotong bagian daun dan batang tumbuhan termas. Selanjutnya dicuci, dipotong-potong dan dikeringkan dalam oven. Setelah dikeringkan kemudian dilakukan penyerbukan.

3. Ekstraksi

Serbuk daun dan batang termas dimaserasi menggunakan etanol 95% dengan perbandingan 200 gram serbuk kering daun murbei untuk 2 L pelarut. Maserasi dilakukan selama 3 x 24 jam. Setelah 3 hari, maserat yang diperoleh disaring dengan corong Buchner. Kemudian dievaporasi menggunakan rotary evaporator untuk menguapkan pelarut. Selanjutnya dipanaskan di atas waterbath pada suhu 40-50°C hingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak kental yang diperoleh dilakukan uji organoleptis (warna, bau, dan kekentalan. Uji organoleptis ekstrak dilakukan dengan melihat warna, bau, dan konsistensinya. Rendemen ekstrak termas dihitung dengan membandingkan bobot ekstrak yang diperoleh terhadap bobot awal simplisia.

4. Penentuan Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM)

KHM ditentukan dengan menggunakan metode mikrodilusi cair. Ekstrak daun dan batang dimasukkan ke dalam pelat mikroliter 96 sumuran dan dilakukan pengenceran bertingkat untuk mendapatkan konsentrasi akhir 160, 80, 40, 20, 10,5, 2,5 dst. Kemudian ditambah dengan suspensi bakteri dengan kerapatan akhir diperoleh sekitar 5×10^5 CFU/mL. Kontrol positif yang digunakan adalah Vankomisin dengan konsentrasi terbesar 1 mg/mL. Setelah itu mikropelat diinkubasi pada suhu 37°C dalam inkubator selama 24 jam (12). Penentuan nilai KHM ditentukan dengan penambahan MTT. KHM ditentukan dari kadar terkecil ekstrak yang mana warna MTT tetap berwarna kuning, tidak berubah menjadi ungu. Sedangkan penentuan nilai KBM dilakukan dengan mengamati ada tidaknya pertumbuhan koloni setelah digoreskan pada media agar yang baru. Konsentrasi terkecil ekstrak yang mana tidak ada pertumbuhan koloni pada permukaan bakteri ditentukan sebagai KBM.

5. Time Kill Assay

Time kill assay dilakukan dengan mengacu pada Ojo et al (2013) dengan sedikit modifikasi (13). Kadar ekstrak yang diuji adalah 1 KHM dan 2 KHM. Inokulum yang mengandung kira-kira 1×10^6 cfu/ml dimasukkan ke dalam tabung yang mengandung ekstrak dengan kadar 1KHM dan 2 KHM. Selanjutnya tabung diinkubasi pada suhu 37°C . Sampel dicuplik dari kultur pada 1,2,4, 6, 8 dan 24 jam, dan diencerkan. Sebanyak 100 μ l sampel yang diencerkan diinokulasi pada agar Mueller Hinton dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kontrol negatif (DMSO 10%) dan kontrol positif (Vankomisin) diperlakukan serupa. Koloni yang tumbuh pada media dihitung dan ditentukan jumlah bakteri (CFU/ml). Setiap perlakuan dilakukan rangkap dua dan dihitung rata-ratanya.

Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif berdasarkan referensi/acuan yang terkait dibandingkan dengan kontrol negatif dan kontrol positif.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil maserasi ekstrak metanol daun dan batang termasuk menghasilkan ekstrak menghasilkan ekstrak yang berwarna hijau, dan mempunyai konsistensi kental dengan rendemen berturut-turut sebesar 8,48% dan 5,09% seperti pada Tabel I. Rendemen ekstrak metanol dalam penelitian ini lebih kecil jika dibandingkan dengan rendemen ekstrak etanol termasuk yang dilaporkan Hartati (2021) sebesar 21.69% (9).

Tabel I. Hasil rendemen ekstrak metanol daun dan batang termasuk

Ekstrak metanol	Rendemen(%)
Daun	8,48
Metanol	5,09

Hasil uji antibakteri ekstrak metanol daun dan termasuk terhadap *B.subtilis* dapat dilihat pada Tabel II. Ekstrak batang mempunyai aktivitas antibakteri yang lebih besar jika dibandingkan dengan ekstrak daun. Untuk KHM dan KBM yang diperoleh dari ekstrak metanol batang termasuk sebesar 40 mg/ml, sedangkan daun termasuk seperti dapat dilihat pada Gambar 2. Menurut Compean & Ynalvez (2014) bahwa perbedaan bagian tumbuhan dapat menyebabkan perbedaan aktivitas antimikroba

karena kadar kandungan senyawa metabolit sekunder yang aktif dalam ekstrak bagian tumbuhan tersebut kemungkinan berbeda.(14). Untuk kontrol negatif (DMSO 10%) tidak menunjukkan aktivitas antibakteri. Sementara Vankomisin sebagai kontrol positif menunjukkan KHM dan KBM yang sama yaitu pada 1 µg/ml.

Tabel II. Nilai KHM ekstrak metanol termas terhadap *B. subtilis*

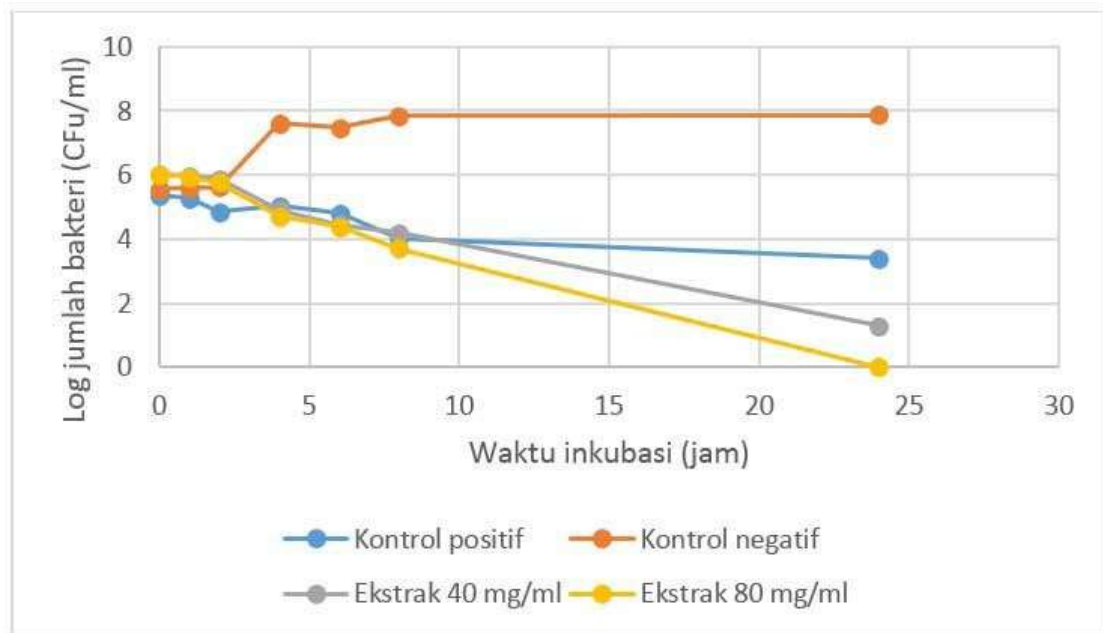
Ekstrak metanol	<i>B. subtilis</i>	
	KHM (mg/ml)	KBM (mg/ml)
Daun termas	>160	>160
Batang termas	40	40
Vankomisin	0,001	0,001
DMSO 5%	-	-

Ket: - (tidak ada hambatan)



Gambar 2. Hasil pengamatan KBM ekstrak metanol termas terhadap *B. subtilis*. Tampak pada gambar ekstrak metanol daun (A1, A2, A3), ekstrak metanol batang (D1, D2, D3). kontrol negatif (A11), kontrol media (A12), kontrol positif (H9, H10).

Sehubungan lemahnya aktivitas antibakteri dari ekstrak daun termas, maka untuk *time kill assay* dilakukan untuk pengujian ekstrak metanol batang termas. *Time kill assay* dapat digunakan untuk menentukan efek bakterisidal dari zat yang diuji, akan tetapi agak berbeda dengan penentuan KHM dan KBM. Studi *time kill* juga memungkinkan untuk mengetahui kecepatan bakterisidal dari zat yang diuji karena pengujian penghitungan jumlah bakteri yang tumbuh dilakukan pada beberapa periode waktu perlakuan. Studi *time-kill* pada tumbuhan termas merupakan yang pertama dilaporkan. Gambar 1 merupakan kurva *time kill assay* dengan peningkatan konsentrasi ekstrak dengan ketergantungan waktu terhadap *B. subtilis*. Kurva *time kill* menunjukkan bahwa bakteri *B. subtilis* yang diberi perlakuan DMSO 5% (kontrol negatif) menunjukkan pertumbuhan yang meningkat seiring dengan penambahan waktu perlakuan. Sebaliknya bakteri yang diberi vankomisin menunjukkan penurunan kepadatan bakteri seiring dengan penambahan waktu inkubasi. Demikian juga halnya dengan *B. subtilis* yang mendapat perlakuan ekstrak metanol termas konsentrasi 40 mg/ml dan 80 mg/ml menunjukkan penurunan jumlah bakteri.



Gambar 1. Kurva penghambatan ekstrak metanol termas terhadap *B. subtilis*

Kemampuan baktisidal dari ekstrak dapat dikonfirmasi dari hasil studi *time kill* dimana standar aktivitas bakterisida adalah pengurangan jumlah bakteri paling sedikit $3 \log_{10}$ cfu/ml terhadap kontrol negatif (15,16). Pengurangan jumlah bakteri akibat perlakuan ekstrak termas 40 mg/ml dan 80 mg/ml setelah perlakuan 8 jam sebanyak sebanyak $3 \log_{10}$ cfu/ml. Penurunan jumlah bakteri yang paling besar ditunjukkan akibat perlakuan ekstrak 80 mg/ml setelah perlakuan 24 jam yaitu lebih dari $4 \log_{10}$ cfu/ml..

KESIMPULAN

Ekstrak metanol batang termas mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *B. subtilis* dengan nilai KHM dan KBM sebesar 40 mg/ml. Ekstrak metanol batang termas memiliki efek bakterisidal setelah perlakuan 8 jam.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai dari Majelis Pendidikan Tinggi Penelitian dan Pengembangan (Diktilitbang) PP Muhammadiyah melalui “Hibah Riset Muhammadiyah Batch V 2021” dengan nomer kontrak: 0842.035/PP/I.3/C/2021. Terima kasih kepada Nabilla Devi Pratiwi dan Dina Rosita yang telah membantu dalam penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Jawetz, E., Melnick, J.L. & Adelberg EA. Mikrobiologi Kedokteran. XXII. Jakarta: Penerbit Salemba Medika; 2005. 327–335, 362–363 p.
2. Pelczar, Michael J dan Chan ECS. Dasar-Dasar Mikrobiologi Jilid I. Jakarta: UI Press; 2007.
3. Anonymous. Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat. Departemen Kesehatan RI Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan Direktorat Pengawasan Obat Tradisional.;

2000. 3–30 p.
4. Fabroa J, Mindac P, Quizon AAK, Pedro MCL, B., O. Y, Evangelista EM, et al. Genotoxicity Of Mentawan (*Poikilospermum Suaveolens*) Extracts Using The Allium Cepa Assay. In: the 4 International Scholars ' Conference. Universitas Klabat; 2016. p. 128.
 5. Wardah, Sundari S. Ethnobotany study of Dayak society medicinal plants utilization in Uut Murung District, Murung Raya Regency, Central Kalimantan. IOP Conf Ser Earth Environ Sci. 2019;298(1).
 6. Sudarmono S. Biodiversity of Medicinal Plants at Sambas Botanical Garden, West Kalimantan, Indonesia. J Trop Life Sci. 2018;8(2):116–22.
 7. Subeki, Matsuura H, Yamasaki M, Yamato O, Maede Y, Katakura K, et al. Effects of Central Kalimantan plant extracts on intraerythrocytic *Babesia gibsoni* in culture. J Vet Med Sci. 2004;66(7):871–4.
 8. Nugraha AS, Triatmoko B, Wangchuk P, Keller PA. Vascular epiphytic medicinal plants as sources of therapeutic agents: Their ethnopharmacological uses, chemical composition, and biological activities. Biomolecules. 2020;10(2).
 9. Hartati H, Habil M, Suryani AI, ... Analisis Fitokimia Ekstrak Tumbuhan *Poikilospermum suaveolens*. Semin Nas Biol [Internet]. 2020;365–70. Available from: <https://ojs.unm.ac.id/semnasbio/article/view/15304>
 10. Jumania, Sukmawaty E, Muthiadin C, Sari SR. Skrining Fitokimia Ekstrak Tanaman Tambalependan Pengaruh Penghambatannya Terhadap Bakteri *Salmonella thypi*. Pros Semin Nas Biot. 2020;347–54.
 11. Hartati, Ahmad MH, Ali A, Pagarra H, Salempa P, Salleh LM, et al. Evaluation of Antioxidant, Antimicrobial and Wound Healing Activity of *Poikilospermum Suaveolens*. J Teknol. 2022;84(1):41–8.
 12. Mulyaningsih S, Sporer F, Reichling J, Wink M. Antibacterial activity of essential oils from *Eucalyptus* and of selected components against multidrug-resistant bacterial pathogens. Vol. 49, Pharmaceutical Biology. 2011. p. 893–9.
 13. Ojo S, Ejims-E nukwe O, Esumeh F. In-Vitro Antibacterial Time-Kill Assay Of *Phyllanthus Amarus* And *Diodia Scandens* Crude Extracts On *Staphylococci* Isolated From Wounds And Burns Patients . Int J Pharm Sci Invent. 2013;2(8):9–13.
 14. Compean KL, Ynalvez RA. Antimicrobial activity of plant secondary metabolites: A review. Res J Med Plant. 2014;8(5):204–13.
 15. Aiyegoro OA, Afolayan AJ, Okoh AI. In vitro antibacterial time kill studies of leaves extracts of *Helichrysum longifolium*. J Med Plants Res. 2009;3(6):462–7.
 16. Pankey GA, Sabath LD. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal activity in the treatment of gram-positive bacterial infections [2]. Clin Infect Dis. 2004;39(5):755–6.