

Antibacterial Activity of Lichen (*Parmotrema tinctoruma*) n-Hexane and Ethyl Acetate Fraction Against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*

Hamdayani LA^{1,2}, Subehan¹, Natsir Djide¹

Faculty of Pharmacy, Hasanuddin University

Artikel info

Diterima : 11 Nov 2019
Direvisi : 20 Nov 2019
Disetujui : 15 Dec 2019

Keyword

Antibacterial
Fraction ethyl acetate
Fraction n-hexane,
Parmotrema tinctoruma

ABSTRACT

Empirically, lichen (*Parmotrema tinctoruma*) has been used as antibacterial against diarrhea, cholera and typhus. In this research, the fraction was obtained from the liquids partitioning of *P. tinctoruma* ethanol extract which had gone through a maceration stage with 70% ethanol extraction tested against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The liquids partitioning process is carried out using n-hexane and ethyl acetate. Antibacterial activity testing was carried out by agar diffusion method. Chemical components in active fractions are identified through phytochemical screening by thin layer chromatography (TLC). The antibacterial activity showed that n-hexane and ethyl acetate fractions lichen were able to inhibit the growth of the bacteria *S. aureus* and *E. coli*. The bacteria *S. aureus* inhibits zone diameter obtained by n-hexane fraction 14.50 mm and ethyl acetate fraction 10.01 mm. The bacteria *E. coli* inhibit zone diameter obtained by n-hexane fraction 11.37 mm and ethyl acetate fraction 9.67 mm. Identification of compounds in the most active fraction through thin layer chromatography showed the presence of flavonoid compounds.

Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi n-Heksana dan Etil Asetat (*Parmotrema tinctoruma* terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*)

ABSTRAK

Kata kunci

Antibakteri
Fraksi etil asetat
Fraksi n-heksana
Parmotrema tinctorum

Secara empiris, lumut (*Parmotrema tinctoruma*) telah digunakan sebagai antibakteri terhadap diare, kolera dan tipus. Dalam penelitian ini, fraksi diperoleh dari partisi cair-cair terhadap ekstrak etanol lichen yang telah melalui tahap maserasi dengan ekstraksi etanol 70% diuji terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Proses partisi dilakukan dengan menggunakan n-heksana dan etil asetat. Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi agar. Komponen kimia dalam fraksi aktif diidentifikasi melalui skrining fitokimia dengan kromatografi lapis tipis (KLT). Aktivitas antibakteri menunjukkan bahwa fraksi n-heksana dan etil asetat lichen mampu menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* dan *E. coli*. Pada bakteri *S. aureus* diameter zona hambat yang diperoleh fraksi n-heksana 14,50 dan fraksi etil asetat 10,01 mm. Pada bakteri *E. coli* diameter zona hambat yang diperoleh fraksi n-heksana 11,37 dan fraksi etil asetat 9,67 mm. Identifikasi senyawa dalam fraksi paling aktif melalui kromatografi lapis tipis menunjukkan adanya senyawa flavonoid.

Koresponden author

Hamdayani LA
Sekolah Tinggi Ilmu Farmasi Makassar, Jl. Perintis Kemerdekaan Km 13.7 Daya, Sulawesi Selatan, 90242, Indonesia
Email: hamdayani.lance@gmail.com

PENDAHULUAN

Lichen (*Parmotrema tinctorum*) merupakan suatu bentuk kehidupan bersama yang sangat erat (simbiosis) antara dua organisme yang berbeda melalui kehidupan bersama yang saling menguntungkan (simbiosis mutualisme) yaitu antara ganggang (alga) dan fungi (jamur). Simbiosis mutualisme terjadi karena ganggang memproduksi gula atau karbohidrat melalui proses fotosintesis, sedangkan fungi sebagai penyedia air dan mineral yang dibutuhkan untuk kehidupan bersama. Bentuk lichen disebut talus karena antara akar, batang dan daunnya sulit dibedakan (Hawksworth, 2015; Rajan *et al.*, 2015).

Penduduk Indonesia mengenal lichen sebagai lumut kerak. Umumnya hidup di berbagai habitat yaitu pada batang, cabang dan ranting pohon, kayu yang membusuk, batu-batuan dan tanah. Lichen hidup sebagai epifit pada pohon, seperti tanaman anggrek dan batang pohon. Hal ini dapat diartikan bahwa lichen hidup hanya menempel pada pohon inangnya, tidak mengambil makanan pada pohon inangnya dan dapat ditemukan dari tepi pantai hingga pegunungan (Hawksworth, 2015).

Berdasarkan penelitian sebelumnya tentang aktivitas antibakteri ekstrak tumbuhan lumut hati (*Hepaticae* sp.) terhadap bakteri patogen menunjukkan bahwa ekstrak metanol dengan aktivitas yang paling baik berdasarkan pengukuran terhadap zona hambat dari bakteri *Staphylococcus aureus* (Fadhilla *et al.*, 2012).

Thippeswamy *et al.*, 2011 melaporkan bahwa spesies *Parmotrema tinctorum* dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhi*, namun tidak menghambat *Escherichia coli*.

Tujuan dari penelitian ini untuk mengeksplorasi lichen sebagai penghasil senyawa antibakteri dari fraksi dengan kepolaran yang berbeda.

METODE PENELITIAN

Bahan

Akuades, amonia (Merck®), DMSO (dimethyl sulfoxide) (Merck®), etanol 70% (Brataco®), etil asetat (Merck®), H₂SO₄ (Merck®), FeCl₃ (Merck®), n-heksana (Merck®), silica gel KLT 60 F₂₅₄ (20 x 20 cm), nutrisi agar (NA) (Oxoid®), pereaksi Mayer, pereaksi Dragendorff, pereaksi Wagner, dan silica gel 60 (0,063-0,200 mm).

Sampel penelitian

Lichen sebanyak 1000 g diperoleh dari Kelurahan Pakala, Kecamatan Mengkendek, Kabupaten Tana Toraja, Provinsi Sulawesi Selatan. Determinasi lichen dilakukan di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) dengan nomor Determinasi 1962/IPH.1.01/If.07/VIII/2017.

Ekstraksi dan partisi

Ekstrak etanol diperoleh melalui metode maserasi dengan merendam bahan dalam etanol 70% selama 3 hari diikuti dengan filtrasi. Proses diulang tiga kali dan ekstrak digabungkan. Pelarut diuapkan pada *rotary evaporator* (Rotavapor II Buchi®) untuk mendapatkan ekstrak etanol kental. Ekstrak etanol kemudian disuspensikan dalam air suling dalam corong pisah dan

dipartisi secara berturut-turut dengan n-heksana dan etil asetat untuk mendapatkan fraksi dalam pelarut ini. Proses ini meninggalkan sisa fraksi air pada akhirnya. Pelarut dihilangkan pada *rotary evaporator* pada tekanan rendah untuk mendapatkan fraksi kental.

Skrining fitokimia ekstrak

Uji alkaloid

Ekstrak dilarutkan dengan 5 mL akuades lalu ditambahkan 5 tetes HCl 2 N kemudian dipanaskan. Dipisahkan menjadi 3 bagian, masing-masing bagian ditetaskan dengan pereaksi Dragendorff (hasil positif menghasilkan endapan jingga), Mayer (hasil positif menghasilkan endapan putih) dan Wagner (hasil positif menghasilkan endapan coklat) (Syukur *et al.*, 2014).

Uji flavonoid

Ekstrak dilarutkan dengan 5 mL aquadest, kemudian ditambahkan 0,1 g bubuk magnesium dan 2 tetes HCl p. Hasil positif mengandung flavonoid jika terjadi perubahan warna oranye, merah atau kuning (Alves *et al.*, 2017).

Uji saponin

Ekstrak dilarutkan dengan 5 mL air hangat, kemudian dikocok kuat-kuat selama ± 60 detik. Positif mengandung saponin jika busa yang terbentuk setinggi 1 cm (bertahan selama ± 10 menit) dan setelah menambahkan 1 tetes HCl 2 N busa tidak hilang (Kielbasa *et al.*, 2019).

Uji tanin

Ekstrak dilarutkan dengan 5 mL akuades kemudian ditambahkan 3 tetes FeCl₃. Positif mengandung senyawa tanin jika terjadi perubahan warna pada larutan menjadi hijau kehitaman (Tahmourespour *et al.*, 2016).

Uji aktivitas antibakteri

Fraksi dilarutkan dengan DMSO untuk mendapatkan larutan stok (50 mg/mL). Perlakuan yang sama dilakukan untuk larutan standar untuk tetrasiklin (kontrol positif). NA 20 g dilarutkan dengan 500 mL akuades dalam Erlenmeyer, kemudian diaduk dan di homogenisasi dengan bantuan pemanasan menggunakan *microwave* (Sharp®) hingga semua bahan larut. Setelah itu pH diukur pada 7,2 dan dicukupkan volume hingga 1000 mL. Kemudian disterilkan menjadi *autoclave* (HL 36Ae®) dengan suhu 121°C atm selama 15 menit.

Medium NA dimasukkan ke dalam cawan Petri 15 mL dan dibiarkan memadat, kemudian suspensi bakteri *S. aureus* diambil dengan menggunakan swab steril dan digores pada media. Kemudian masing-masing fraksi dilarutkan dengan DMSO 10%, lalu ditetaskan pada *paperdisk* masing-masing 20 µl. Semua fraksi ditempatkan pada permukaan media, untuk kontrol positif (+) menggunakan *paperdisk* tetrasiklin 30 µg dan kontrol negatif (-) menggunakan DMSO 10%. Selanjutnya, diinkubasi pada suhu 37°C selama 1 x 24 jam yang lalu diamati zona hambat yang terbentuk dan diukur diameternya menggunakan jangka sorong (*Kenmaster*®). Hal yang sama dilakukan untuk pengujian menggunakan bakteri *E. coli*.

Uji kromatografi lapis tipis (KLT)

Plat KLT diaktifkan menggunakan oven (*Memmert*®)

Tabel 1 Diameter zona hambat (mm) aktivitas antibakteri fraksi n-heksana dan etil asetat

| Bakteri | Diameter zona hambat (mm) | | | | |
|------------------|---------------------------|-------------|-------------|-------------|-----------------|
| | n-heksan | Etil asetat | Tidak larut | Tetrasiklin | Kontrol negatif |
| <i>S. aureus</i> | 14,50 | 10,01 | 6,67 | 19,12 | 6 |
| <i>E. coli</i> | 11,37 | 9,67 | 7,02 | 18,00 | 6 |

pada suhu 115°C kemudian dipotong menjadi 7x1 cm. Fraksi teraktif diaplikasikan pada plat KLT kemudian dielusi menggunakan eluen n-heksana : etil asetat (9: 1). Identifikasi flavonoid menggunakan amonia. Diuapkan menggunakan uap amonia selama 30 menit. Tampak bercak berpendar kuning dalam sinar UV 366 nm.

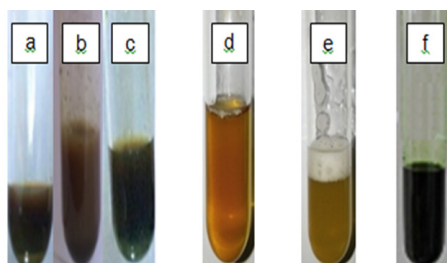
HASIL DAN PEMBAHASAN

Kandungan kimia

Hasil skrining fitokimia pada ekstrak etanol 70% lichen menunjukkan bahwa ekstrak tersebut mengandung senyawa flavonoid, alkaloid dan tanin (Gambar 1). Kelompok senyawa aktif seperti flavonoid, alkaloid dan tanin yang terkandung dalam 70% ekstrak etanol Lichen, adalah kelompok senyawa yang memiliki sifat antibakteri (Millot *et al.*, 2017).

Pemanfaatan etanol 70% sebagai penyari dalam proses ekstraksi senyawa bioaktif banyak digunakan karena etanol baik untuk mengekstraksi senyawa antibakteri seperti flavonoid dan alkaloid. Etanol lebih mudah menembus membran sel ketika mengekstraksi bahan intraseluler dari bahan tanaman (Baümler *et al.*, 2016; Karou *et al.*, 2005).

Ekstrak etanol lichen mengandung golongan senyawa flavonoid. Flavonoid adalah senyawa pigmen alami



Gambar 1 Skrining fitokimia ekstrak etanol 70%: Uji alkaloid (a,b,c) dengan pereaksi Dragendorf (endapan jingga), Mayer (endapan putih) dan Wagner (endapan coklat), uji flavonoid (d), uji Saponin (e), dan uji tanin (f)

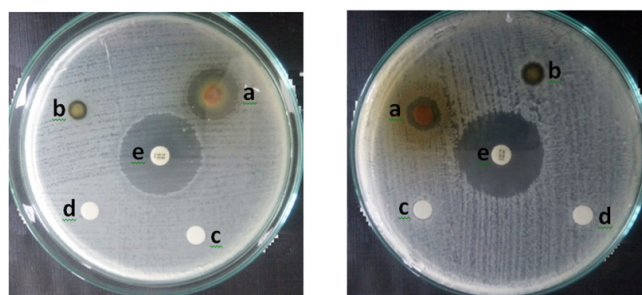
yang memiliki warna kuning, dapat larut dalam air dan tahan terhadap panas (Thadhani dan Karunaratne, 2017). Golongan senyawa berikutnya yang terkandung dalam ekstrak etanol lichen adalah tanin. Tanin adalah metabolit sekunder pada tanaman yang bersifat antibakteri dan memiliki kemampuan untuk menyamak kulit yang juga dikenal sebagai astringensia (Dong *et al.*, 2018; Maisetta *et al.*, 2019; Redondo *et al.*, 2014).

Aktivitas anti mikroba

Diameter zona hambat fraksi n-heksana dan fraksi etil asetat ditentukan dalam menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Berdasarkan pengukuran zona hambat terhadap *S. aureus* dan *E. coli* menunjukkan

bahwa fraksi n-heksana memiliki diameter zona hambat yang lebih besar daripada fraksi lain 14,50 mm pada bakteri *S. aureus* yang merupakan bakteri gram positif (Tabel 1).

Skrining fitokimia terhadap fraksi teraktif



Gambar 2 Uji daya hambat terhadap fraksi n-heksana (a), etil asetat (b), tidak larut (c), kontrol negatif (d), dan tetrasiklin (e)

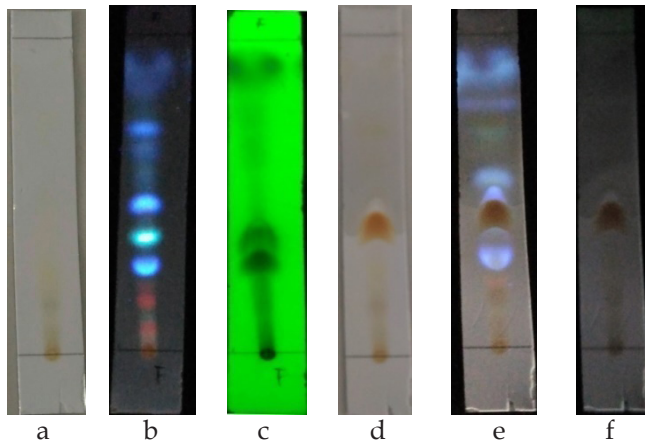
Hasil yang diperoleh dalam uji aktivitas antibakteri diikuti dengan metode identifikasi senyawa menggunakan KLT. Sampel yang digunakan dalam tes ini adalah fraksi n-heksana yang memiliki zona hambatan yang lebih besar dalam uji aktivitas antibakteri sebelumnya. Berdasarkan hasil pengujian ditemukan bahwa senyawa positif adalah flavonoid (Gambar 3).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan terhadap lichen dapat disimpulkan bahwa hasil uji aktivitas antibakteri fraksi n-heksana terhadap bakteri *S. aureus* dengan diameter hambatan 14,50 mm dan pada *E. coli* dengan diameter hambatan 11,37 mm; sedangkan aktivitas antibakteri fraksi etil asetat secara berturut-turut adalah 10,01 mm dan 9,67 mm. Hasil skrining fitokimia pada ekstrak etanol 70% lichen mengandung golongan senyawa alkaloid, flavonoid dan tanin. Sedangkan hasil skrining KLT pada fraksi n-heksana mengandung golongan senyawa flavonoid.

PUSTAKA

- Alves DR, Maia de Moraes S, Tomiotto-Pellissier F, Miranda-Sapla MM, Vasconcelos F, Vasconcelos FR, Silva INGd, Araujo de Sousa H, Assolini JP, Conchon-Costa I, Pavanelli WR, Freire FdCO. Flavonoid Composition and Biological Activities of Ethanol Extracts of *Caryocar coriaceum* Wittm., a Native Plant from Caatinga Biome. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2017;2017; e6834218
- Baümler E, Carrín M, Carelli A. Extraction of sunflower



Gambar 3 Profil KLT identifikasi senyawa golongan flavonoid pada fraksi n-heksana dengan pengamatan pada: sinar tampak (a), sinar UV 366 nm (b), sinar UV 254 nm (c), sinar tampak setelah diuapkan amonia (d), sinar UV 366 nm setelah diuapkan amonia (e), sinar UV 254 nm setelah diuapkan amonia (f)

oil using ethanol as solvent. *J Food Engineering*. 2016;178; 190-97

Dong G, Liu H, Yu X, Zhang X, Lu H, Zhou T, Cao J. Antimicrobial and anti-biofilm activity of tannic acid against *Staphylococcus aureus*. *Nat Prod Res*. 2018;32(18); 2225-28

Fadhilla R, Iskandar EA, Kusumaningrum HD. Antibacterial activity of liverwort (*Marchantiapaleacea*) extract on pathogenic and food spoilage bacteria. *Jurnal Teknol dan Industri Pangan*. 2012;23(2); 126-31

Hawksworth DL. Lichenization: The origins of a fungal life-style, in: Upreti, DK, Divakar, PK, Shukla, V, Bajpai, R (Eds.), *Recent advances in lichenology: Modern methods and approaches in lichen systematics and culture techniques*, volume 2. 2015. Springer India, New Delhi; 1-10

Karou D, Dicko MH, Simpore J, Traore AS. Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from

ethnomedicinal plants of Burkina Faso. *African J Biotechnology*. 2005;4(8); 823-28

Kielbasa A, Krakowska A, Rafinska K, Buszewski B. Isolation and determination of saponin hydrolysis products from *Medicago sativa* using supercritical fluid extraction, solid-phase extraction and liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *J Sep Sci*. 2019;42(2); 465-74

Maisetta G, Batoni G, Caboni P, Esin S, Rinaldi AC, Zucca P. Tannin profile, antioxidant properties, and antimicrobial activity of extracts from two Mediterranean species of parasitic plant *Cytinus*. *BMC Complement Altern Med* 2019;19(1); e82

Millot M, Girardot M, Dutreix L, Mambu L, Imbert C. Antifungal and anti-biofilm activities of acetone lichen extracts against *Candida albicans*. *Molecules*. 2017;22(4); e651

Rajan VP, Gunasekaran S, Ramanathan S, Murugaiyah V, Samsudin MW, Din LB. Antibacterial activity of extracts of *Parmotrema praesorediosum*, *Parmotrema rampoddense*, *Parmotrema tinctorum* and *Parmotrema reticulatum*. *AIP Conference Proceedings*. 2015;1678(1); e050015

Redondo LM, Chacana PA, Dominguez JE, Fernandez Miyakawa ME. Perspectives in the use of tannins as alternative to antimicrobial growth promoter factors in poultry. *Front Microbiol*. 2014;5; e118

Syukur R, Wahyudin E, Alam G, Lukman M. Physicochemical and phytochemical evaluation of the aqueous extract of safflower (*Carthamus tinctorius* Linn.). *J Chem Pharm Res*. 2014;6(12); 100-04

Tahmourespour A, Tabatabaee N, Khalkhali H, Amini I. Tannic acid degradation by *Klebsiella* strains isolated from goat feces. *Iran J Microbiol*. 2016;8(1); 14-20

Thadhani VM, Karunaratne V. Potential of lichen compounds as antidiabetic agents with antioxidative properties: A review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017;2017; e2079697

Thippeswamy B, Naveenkumar KJ, Bodharthi JG, Shivaprasad SR. Antimicrobial activity of ethanolic extract of *Usnea longissima*. *J Experiment Sci*. 2011;2(12); 1-3