

AKTIVITAS ANTIMIKROBA EKSTRAK DAUN BELUNTAS (*Plucea indica* L.) DAN STABILITAS AKTIVITASNYA PADA BERBAGAI KONSENTRASI GARAM DAN TINGKAT pH

[Antimicrobial Activity of Beluntas (*Plucea indica* L.) Leaves Extract and Stability
of the Activity at Different Salt Concentrations and pHs]

Ardiansyah¹⁾, Lilis Nuraida²⁾, dan Nuri Andarwulan²⁾

¹⁾ Staf Pengajar Jurusan TPG, FATETA-UNIDA-Bogor Jl. Tol Ciawi No. 1 Ciawi Bogor 16720

²⁾ Staf Pengajar Jurusan TPG, FATETA-IPB, Kampus IPB Darmaga Bogor 16002

Diterima 4 Februari 2003/Disetujui 16 Mei 2003

ABSTRACT

Beluntas leaves are commonly used as traditional medical herb and fresh vegetable. The aim of the reseach was to examine the antimicrobial activity of beluntas leave extracts and the stability of activity in salt and pH condition. Non defatted polar extract had phenol hidroquinon, tanin, alkaloid, and steroid as bioactive compound. The most sensitive bacteria was B. cereus and the most resistant was S. typhi. The MICs of polar extract against, S. typhi, S. aureus, E. coli, P. fluorescens, B. subtilis, and B. cereus were 3,19, 2,94, 2,66, 2,64, 2,40, and 2,26% respectively. Antimicrobial activity was greater on protoplast of S. tyhphi sphaeroplast of S. aurues & Bacillus cereus than toward their whole cells, with the highest inhibition observed B. cereus protoplast. Addition of salt into the extract increased it's the antimicrobial activity. There was synergism between low pH with bioactive compound from non defatted polar extract.

Key words : *Beluntas, bioactive compound, MIC, protoplast, sphaeroplast, salt, pH*

PENDAHULUAN

Sejak lama manusia telah dihadapkan oleh kerusakan atau penurunan mutu bahan pangan terutama bahan pangan yang memiliki kandungan air dan nutrisi yang tinggi. Pengawet makanan digunakan untuk mencegah atau mengurangi kerusakan kimiawi dan biologi pangan. Pengawet untuk mencegah kerusakan biologi yang disebabkan mikroba disebut antimikroba.

Penelitian-penelitian antimikroba telah banyak dilakukan terutama terhadap berbagai jenis tanaman rempah-rempah. Rempah-rempah dan beberapa jenis tanaman secara empiris mempunyai aktivitas antimikroba dan secara tradisional banyak yang digunakan untuk pengobatan. Sediaan bentuk segar, ekstrak, dan minyak atsiri digunakan sebagai obat anti radang, analgesik, dan sebagai obat antidiare (Winarno dan Sundari, 1998). Beberapa penelitian mengenai aktivitas antimikroba dari tanaman, baik dalam bentuk ekstrak atau minyak atsirinya menunjukkan bahwa banyak tanaman yang mempunyai aktivitas antimikroba terhadap bakteri patogen dan penyebab kerusakan bahan pangan. Beberapa diantaranya adalah daun sereh, daun salam, daun poh-pohan, dan daun cariang (Nuraida dan Dewanti-Hariyadi, 2001), daun kemangi (Wan et al., 1998), dan daun sirih (Sukaminah,

1997). Usaha untuk mencari sumber antimikroba baru, terutama tanaman asli yang terdapat di Indonesia terus dilakukan. Tumbuhan yang digunakan secara tradisional dapat dijadikan sebuah alternatif pencarian senyawa antimikroba, karena pada umumnya memiliki senyawa aktif yang berperan sebagai senyawa antimikroba.

Tanaman beluntas (*Plucea indica* L.) digunakan sebagai tanaman pagar dan pembatas antar guludan di perkebunan. Secara tradisional daunnya digunakan sebagai obat untuk menghilangkan bau badan, obat turun panas, obat batuk, dan obat antidiare yang digunakan oleh masyarakat Aceh dan Madura. Daun beluntas yang telah direbus sangat baik untuk mengobati sakit kulit. Selain itu daun beluntas juga sering dikonsumsi oleh masyarakat sebagai lalapan (Winarno dan Sundari, 1998).

Informasi secara tradisional menunjukkan bahwa daun beluntas mempunyai potensi sebagai senyawa antimikroba. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian kajian aktivitas antimikroba daun beluntas dalam bentuk ekstrak, sehingga akan memperkaya pemanfaatan sumber hayati yang ada di Indonesia. Dengan demikian, penelitian ini bertujuan 1) mengidentifikasi golongan senyawa aktif dalam ekstrak, 2) mendapatkan konsentrasi penghambatan minimum (MIC), 3) mempelajari aktivitas antimikroba ekstrak daun beluntas terhadap sferoplas dan protoplas

untuk menduga mekanisme penghambatan senyawa antimikroba, dan 4) mengetahui stabilitas aktivitas antimikroba ekstrak daun beluntas pada berbagai konsentrasi garam dan tingkat pH.

METODOLOGI

Bahan dan alat

Bahan yang digunakan adalah daun beluntas, kultur bakteri (*B. subtilis*, *B. cereus*, *S. aureus*, *S. typhi*, *E. coli*, dan *P. fluorescens*) yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Pangan Pusat Studi Pangan dan Gizi IPB, media untuk analisis mikrobiologi, bufer tris-HCl (PA Merck), EDTA (PA Merck), enzim lisozim (Sigma), dan bahan kimia lainnya kualitas pro-analisa. Daun beluntas diperoleh di daerah Loji Bogor Jawa Barat. Peralatan yang digunakan adalah unit ekstraksi berpendingin balik, rotavapor (Buchi Waterbath R-3000), mikro pipet 100 μ l dan 1000 μ l (Eppendorf), tips berukuran 100 μ l dan 1000 μ l, pelubang sumur dengan diameter 6 milimeter, hemasitometer (Assisten), spektrofotometer (Shimadzu), mikroskop (Nikon YS₂-T dan Olympus BH-2), dan peralatan gelas yang lain.

Metode penelitian

Metode ekstraksi

Ekstraksi dilakukan menggunakan pelarut heksan untuk mendapatkan ekstrak non polar dengan metode sokhlet (Houghton dan Raman, 1998) dilanjutkan dengan pelarut etanol untuk mendapatkan ekstrak polar *defatted* dengan metode refluks (Houghton dan Raman, 1998). Selain itu dilakukan ekstraksi langsung menggunakan pelarut etanol untuk mendapatkan ekstrak polar *non defatted* menggunakan metode refluks (Houghton dan Raman, 1998).

Identifikasi golongan komponen ekstrak secara kualitatif

Identifikasi dilakukan terhadap ekstrak daun beluntas yang memiliki aktivitas antimikroba tertinggi. Pengujian dilakukan secara kualitatif untuk mengetahui golongan komponen yang terdapat di dalam ekstrak. Analisis dilakukan terhadap alkaloid, flavonoid, steroid, triterpenoid, fenol hidrokuinon, saponin, dan tanin (Harborne, 1987).

Penentuan nilai MIC

Konsentrasi ekstrak polar yang diuji adalah 10, 20, 30, 40, 50, 60, dan 70% dengan mikroba uji *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. aureus*, *S. typhi*, *E. coli*, dan *P. fluorescens*. Metode pengujian yang digunakan adalah metode difusi

sumur. Penghitungan nilai MIC dilakukan berdasarkan metode Bloomfield (1991), yaitu dengan memplotkan nilai $\ln Mo$ (konsentrasi ekstrak) pada sumbu X terhadap nilai kuadrat zona penghambatan (X^2) pada sumbu Y. Perpotongan antara kurva linier dengan sumbu X merupakan nilai Mt (diperoleh dengan regresi linear). Besarnya nilai MIC ditetapkan sebagai $\frac{1}{4} X Mt$.

Pengujian aktivitas antimikroba ekstrak daun beluntas terhadap sferoplas dan sel utuh *S. typhi*

Pembuatan kultur sferoplas (*S. typhi*) dilakukan menurut metode William dan Gledhill (1991). *S. typhi* ditumbuhkan ke dalam media NA dengan goresan kuadran, kemudian dilakukan inkubasi selama 48 jam. Koloni yang terbentuk diambil dengan ose dan disuspensikan ke dalam buffer tris-HCl steril 10 mmol yang berisi EDTA 1 mmol, sukrosa 0,5 mol/l, dan enzim lisozim sebanyak 50 μ g/ml sampai mencapai absorbansi 1,0 pada panjang gelombang 650 nm. Selanjutnya dilakukan inkubasi selama 30 menit sehingga hampir seluruh sel membentuk sferoplas, yang diamati menggunakan mikroskop. Selanjutnya sferoplas dipanen dengan sentrifugasi pada 6000 rpm selama 15 menit pada suhu ruang. Sferoplas disuspensikan kembali dalam 1 ml buffer tris-HCl steril tanpa EDTA dan enzim lisozim. Sel utuh sebagai kontrol disuspensikan dalam buffer tris-HCl steril 10 mmol. Pengujian aktivitas antimikroba dilakukan dengan menggunakan metode difusi sumur. Konsentrasi ekstrak yang digunakan adalah 30%.

Pengujian aktivitas antimikroba ekstrak daun beluntas terhadap protoplas dan sel utuh *S. aureus* dan *B. cereus*

Pembuatan kultur protoplas (*S. aureus* dan *B. cereus*) dilakukan menurut metode William dan Gledhill (1991). *S. aureus* dan *B. cereus* ditumbuhkan ke dalam media NA dengan goresan kuadran, kemudian dilakukan inkubasi selama 48 jam. Koloni yang terbentuk diambil dengan ose dan disuspensikan ke dalam buffer tris-HCl steril 10 mmol yang berisi $MgCl_2$ 0,01 mol/l, sukrosa 0,5 mol/l, dan enzim lisozim sebanyak 50 μ g/ml sampai mencapai absorbansi 1,0 pada panjang gelombang 650 nm. Selanjutnya dilakukan inkubasi selama 30 menit sehingga hampir seluruh sel membentuk protoplas, yang diamati menggunakan mikroskop. Selanjutnya protoplas dipanen dengan sentrifugasi pada 6000 rpm selama 15 menit, pada suhu ruang, protoplas disuspensikan kembali dalam 1 ml buffer tris-HCl steril 10 mmol tanpa enzim lisozim. Sel utuh sebagai kontrol disuspensikan dalam buffer tris-HCl steril 10 mmol. Pengujian aktivitas antimikroba dilakukan dengan menggunakan metode difusi sumur. Konsentrasi ekstrak yang digunakan adalah 30%.

Pengaruh garam NaCl terhadap stabilitas aktivitas antimikroba ekstrak daun beluntas

Pengaruh garam NaCl diberikan dengan konsentrasi (1, 2, 3, 4, dan 5 persen). Sebelum digunakan sebagai medium ekstrak, larutan garam tersebut disterilisasi terlebih dahulu. Konsentrasi ekstrak yang digunakan adalah 30 persen (w/v). Pengujian dilakukan dengan menggunakan metode difusi sumur.

Pengaruh pH terhadap stabilitas aktivitas antimikroba ekstrak daun beluntas

Ekstrak dilarutkan dalam larutan KH_2PO_4 dengan berbagai nilai pH yang telah dipersiapkan terlebih dahulu. Metode persiapan larutan KH_2PO_4 adalah sebagai berikut : sebanyak 17 gram KH_2PO_4 murni dilarutkan terlebih dahulu dengan air destilata sebanyak 250 ml. Selanjutnya pH larutan ditetapkan pada nilai 7,2. Larutan ditera menggunakan labu ukur 500 ml. Kemudian nilai pH ditetapkan pada nilai 4, 5, 6, dan 7 menggunakan larutan HCl dan NaOH 1 M. Sebelum digunakan sebagai medium ekstrak, larutan KH_2PO_4 disterilisasi terlebih dahulu. Konsentrasi ekstrak yang digunakan adalah 30 persen. Pengujian dilakukan dengan menggunakan metode difusi sumur.

Pengujian aktivitas antimikroba dengan metode sumur

Pengujian aktivitas antimikroba dilakukan dengan menggunakan metode difusi sumur dengan diameter 6 mm (Carson dan Riley, 1995). Kultur yang telah disiapkan, dipindahkan secara aseptik sebanyak 2 μl ke dalam NA 20 ml Media dibiarkan membeku (kira-kira 20 menit). Selanjutnya pada media tersebut dibuat sumur dengan diameter 6 mm. Setelah itu ke dalam sumur dimasukkan ekstrak sebanyak 60 μl . Cawan petri kemudian disimpan di dalam refrigerator (selama dua jam) dengan tujuan agar ekstrak terdistribusi secara merata di sekitar sumur. Kemudian dilakukan inkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Zona penghambatan diukur berdasarkan diameter areal bening (milimeter) di sekitar sumur.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi golongan senyawa aktif dalam ekstrak

Identifikasi golongan senyawa aktif dilakukan terhadap ekstrak polar *non defatted*, karena berdasarkan penelitian pendahuluan ekstrak polar *non defatted* mempunyai aktivitas antibakteri yang lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak non polar dan ekstrak polar *defatted* (Ardiansyah et al., 2002). Hasil analisis disajikan pada Tabel 1. Golongan senyawa aktif yang teridentifikasi di dalam ekstrak polar *non defatted* adalah fenol hidrokuinon, tanin, alkaloid, dan steroid.

Tabel 1. Hasil analisis kualitatif ekstrak daun beluntas

Komponen	Hasil analisis*
Fenol hidrokuinon	+
Tanin	+
Alkaloid	+
Steroid	+
Flavonoid	-
Triterpenoid	-
Saponin	-

*Keterangan :

(+) Teridentifikasi ; (-) Tidak teridentifikasi

Senyawa-senyawa fenolik tanaman yang telah terbukti memiliki aktivitas antibakteri, diantaranya adalah turunan dari *p*-benzokuinon seperti : 2,3-dimetoksi-5-metil-*p*-benzokuinon, 2,6-difenil-*p*-benzokuinon, dan 2,6-dimetoksi-*p*-benzokuinon (Nishina et al., 1991). Ekstrak metanol dari tanaman *Mitracarpus scaber* yang mempunyai komponen asam galat dan asam 3,4,5-trimetoksi asam benzoat, dapat menghambat pertumbuhan *S. aureus* (MIC 3,90 dan 0,97 $\mu\text{g ml}^{-1}$), 4-metoksiasetophenon, dan 3,4,5-trimetoksiasetophenon yang sangat efektif menghambat *Candida albicans* (MIC 1,95 $\mu\text{g ml}^{-1}$) (Bisignano et al., 2000).

Senyawa-senyawa tanin yang telah terbukti memiliki aktivitas antibakteri, adalah senyawa-senyawa pada ekstrak teh hijau yang mempunyai kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*. Senyawa aktif dari tanin tersebut adalah galokatekin, epigalokatekin, dan epigalokatekin galat. Diantara ketiga senyawa aktif tersebut galokatekin mempunyai aktivitas paling tinggi dengan nilai MIC 250 $\mu\text{g/ml}$ (Sakanaka et al., 1989).

Senyawa antimikroba alkaloid karbazol yang terbukti memiliki aktivitas antimikroba, diantaranya adalah senyawa 3-metil-6,7-metilenadioksikarbazol ($\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{NO}_2$). Senyawa tersebut bersifat antibakteri kuat, dengan nilai MIC ($\mu\text{g/ml}$) terhadap *B. subtilis* (15), *E. coli* (25), dan *S. aureus* (33). Senyawa ini diisolasi dari fraksi netral ekstrak dietil eter kulit kayu tanaman *Clausena heptaphylla* (Bhattacharyya et al., 1993).

Penelitian yang dilakukan oleh Kokpol et al., (1993) mengidentifikasi kandungan steroid pada ekstrak tanaman *Rhizophora apicula*. Ekstrak metilen diklorida tanaman *R. apicula* mengandung tiga komponen steroid, yaitu kampesterol (4,61%), stigmasterol (18,47%), dan sitosterol (76,92%). Ketiga komponen steroid yang teridentifikasi sebagai senyawa aktif tidak memiliki aktivitas antimikroba. Keller et al., (1996) melaporkan bahwa kandungan steroid yang mempunyai aktivitas antimikroba merupakan senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada kapang *Fomitopsis pinicola*.

Nilai MIC

Daya antimikroba dinyatakan dengan nilai MIC yaitu konsentrasi terendah dari suatu komponen antimikroba dimana tidak terjadi pertumbuhan mikroba pada masa inkubasi 24 jam. Nilai MIC ekstrak daun beluntas disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Nilai MIC ekstrak daun beluntas

Jenis bakteri	MIC (%) daun beluntas ¹
<i>Salmonella typhi</i>	3,19
<i>Staphylococcus aureus</i>	2,94
<i>Escherichia coli</i>	2,66
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2,64
<i>Bacillus subtilis (sel vegetatif)</i>	2,40
<i>B. cereus (sel vegetatif)</i>	2,26

Keterangan :

¹ Jumlah bakteri awal 10⁴.

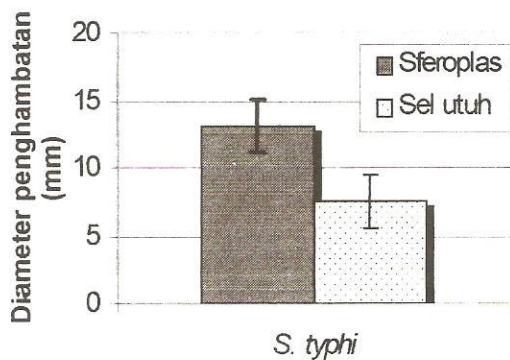
Tabel 2 menunjukkan bahwa nilai MIC ekstrak daun berbeda untuk setiap spesies bakteri. Nilai MIC berkisar antara 2,26 – 3,19 persen. *S. typhi* adalah bakteri yang paling resisten dibandingkan bakteri lainnya, karena untuk menghambat pertumbuhan bakteri tersebut diperlukan konsentrasi ekstrak sebesar 3,19 persen. Hal ini sesuai dengan pernyataan Nuraida et al., (1999) bahwa *S. typhi* merupakan salah satu bakteri Gram negatif yang sangat resisten. Ketahanan ini karena *S. typhi* merupakan bakteri Gram negatif yang memiliki struktur dinding sel yang lebih kompleks (Cano dan Colome, 1986). Resistensi *S. typhi* kemudian diikuti berturut-turut oleh *S. aureus*, *E. coli*, *P. fluorescens*, dan *B. subtilis*. *B. cereus* merupakan bakteri yang paling sensitif terhadap ekstrak daun beluntas.

Aktivitas antimikroba ekstrak daun beluntas terhadap sferoplas dan protoplas

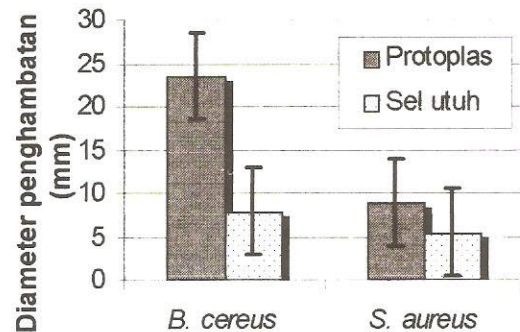
Pengujian aktivitas antimikroba terhadap sferoplas dan proroplas dilakukan dengan tujuan untuk menduga mekanisme penghambatan antimikroba ekstrak daun beluntas. Hasil pengujian aktivitas antimikroba ekstrak daun beluntas terhadap sferoplas dan protoplas disajikan pada Gambar 1.

Sferoplas *S. typhi* lebih sensitif dibandingkan dengan bentuk sel utuhnya, demikian pula protoplas *B. cereus* dan *S. aureus*. Adanya penurunan resistensi disebabkan karena dinding sel bakteri telah terhidrolisis dengan adanya aktivitas enzim lisozim yang ditambahkan pada saat preparasi sferoplas dan protoplas. Dengan terhidrolisisnya dinding sel bakteri menyebabkan ekstrak daun beluntas lebih mudah berpenetrasi ke dalam sel. Diduga mekanisme penghambatan mikroba oleh ekstrak daun beluntas disebabkan karena bereaksi terhadap membran sel atau komponen-komponen di dalam sitoplasma, bukan terhadap dinding sel bakteri.

Hugo dan Russel (1987) menyebutkan bahwa, *ethylene diamine tetra acetic acid* (EDTA) bereaksi dengan dinding sel bakteri. EDTA akan mengikat ion Ca²⁺ dan Mg²⁺ pada membran luar yang akan mengakibatkan hidrolisis komponen LPS. Senyawa fenol dapat bereaksi dengan membran sel bakteri, mengganggu proses transport, pada konsentrasi tinggi dapat menyebabkan koagulasi komponen sitoplasma sel, dan mengganggu sistem *proton motive force* yang berperan dalam produksi energi pada sel. Diduga senyawa aktif yang terdapat pada ekstrak daun beluntas seperti fenol hidrokuinon dan tanin sebagai senyawa aktif yang memiliki aktivitas senyawa antimikroba. Kemampuan senyawa fenol hidrokuinon sebagai senyawa antimikroba karena adanya gugus hidroksil (OH), gugus keton (CO), dan gugus metoksi (OCH₃) (Nishina et al., 1991; Bisignano et al., 2000),



(a)



(b)

Gambar 1. Aktivitas antimikroba ekstrak daun beluntas terhadap ; (a) sferoplas ; (b) protoplas.

sedangkan tanin sebagai senyawa antimikroba karena mempunyai gugus hidroksil (Sakanaka et al., 1989).

Senyawa lain yang juga berperan dalam mekanisme penghambatan sel bakteri diantaranya adalah paraben yang dapat mengganggu proses transport dan mengganggu sistem *proton motive force*, klorheksidin yang dapat mengganggu sistem kerja enzim ATPase dan dapat mempengaruhi komponen sitoplasma, akrudin menyebabkan inaktivasi fungsi materi genetik, formaldehid mampu mempengaruhi enzim-enzim yang terdapat pada membran dan sitoplasma sel (Hugo dan Russel, 1987).

Pengaruh garam terhadap stabilitas aktivitas antimikroba ekstrak daun beluntas

Pengujian pengaruh perlakuan garam atau NaCl bertujuan untuk mengetahui kestabilan aktivitas antimikroba ekstrak daun beluntas. Aktivitas antimikroba ekstrak daun beluntas dengan berbagai konsentrasi garam disajikan pada Tabel 3. Tabel 3 menunjukkan bahwa aktivitas antimikroba ekstrak daun beluntas bervariasi untuk setiap bakteri uji baik dalam bentuk sel vegetatif maupun sporanya.

Larutan garam satu persen merupakan konsentrasi yang dapat meningkatkan aktivitas antimikroba ekstrak daun beluntas terhadap *B. cereus* (spora) dan *B. subtilis* (sel vegetatif dan spora). Peningkatan konsentrasi garam dari 2-5 persen mengakibatkan terjadi penurunan aktivitas antimikroba ekstrak daun beluntas.

Aktivitas antimikroba terhadap *S. aureus* dan *E. coli* menunjukkan kecenderungan bahwa peningkatan konsentrasi larutan garam 4 dan 5 persen akan menyebabkan penurunan aktivitas antimikroba ekstrak daun beluntas.

Beuchat et al., (1994) melaporkan bahwa NaCl pada konsentrasi 5 persen dapat memberikan efek perlindungan pada proses inaktivasi *L. monocytogenes* pada ekstrak jus wortel. Disebutkan lebih lanjut bahwa efek perlindungan ini disebabkan oleh adanya penghambatan mekanisme senyawa atau bahan yang dapat menyebabkan inaktivasi *L. monocytogenes*.

Tabel 3. Pengaruh garam terhadap aktivitas antimikroba ekstrak daun beluntas*

Bakteri	Konsentrasi	Diameter penghambatan
<i>B. subtilis</i>	1	6,98 ± 1,34
	2	6,37 ± 0,99
	3	5,33 ± 0,65
	4	5,38 ± 0,56
	5	4,85 ± 0,86
<i>B. subtilis</i> (spora)	1	5,40 ± 0,53
	2	3,35 ± 0,71
	3	3,25 ± 0,56
	4	3,07 ± 0,33
	5	2,90 ± 0,73
<i>B. cereus</i> (sel vegetatif)	1	5,12 ± 0,64
	2	4,92 ± 0,76
	3	5,35 ± 1,15
	4	5,75 ± 0,36
	5	4,87 ± 0,66
<i>B. cereus</i> (spora)	1	3,50 ± 0,54
	2	3,20 ± 0,15
	3	2,95 ± 0,40
	4	2,40 ± 0,15
	5	2,05 ± 0,27
<i>E. coli</i>	1	7,82 ± 1,01
	2	6,95 ± 0,67
	3	7,50 ± 1,02
	4	6,50 ± 0,32
	5	5,62 ± 0,79
<i>S. aureus</i>	1	5,68 ± 0,79
	2	5,90 ± 0,88
	3	6,37 ± 0,64
	4	6,05 ± 0,79
	5	5,45 ± 0,67
<i>S. typhi</i>	1	5,73 ± 1,15
	2	6,43 ± 0,74
	3	6,00 ± 0,80
	4	6,47 ± 1,15
	5	5,67 ± 0,49
<i>P. fluorescens</i>	1	6,80 ± 1,22
	2	6,47 ± 0,52
	3	6,32 ± 1,34
	4	6,50 ± 0,80
	5	6,67 ± 1,39

* Pengukuran dari dua ulangan dan duplo

Penelitian yang dilakukan oleh Casey dan Condon (2002), menunjukkan bahwa NaCl pada konsentrasi 4 persen dapat menurunkan efek bakterisidal asam laktat terhadap pertumbuhan *E. coli* O157:H45 sebanyak 3 log. Pengaruh ini disebabkan karena adanya peningkatan pH sitoplasma (pHi) sel sebanyak 0,56 unit dengan adanya penambahan NaCl. Nuraida et al., (2002), menunjukkan bahwa larutan garam dengan konsentrasi 1-5 persen

terhadap aktivitas antimikroba daun salam berpengaruh nyata pada pertumbuhan *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhi*, dan *P. fluorescens* dengan kecenderungan semakin tinggi konsentrasi garam yang ditambahkan pada ekstrak akan menyebabkan penurunan aktivitas antimikroba.

Pengaruh pH terhadap stabilitas aktivitas antimikroba ekstrak daun beluntas

Pengaruh pH terhadap aktivitas antimikroba ekstrak daun beluntas disajikan pada Tabel 4. Pengaruh pH menunjukkan bahwa semakin rendah pH ekstrak daun beluntas semakin tinggi sifat antimikrobanya, kecuali terhadap *P. fluorescens*. Hal ini disebabkan karena pH dapat mempengaruhi komponen aktif yang terdapat pada ekstrak daun beluntas.

Tabel 4. Pengaruh pH terhadap aktivitas antimikroba ekstrak daun beluntas*

Bakteri	pH	Diameter penghambatan (mm) + Standar deviasi
<i>B. subtilis</i> (sel vegetatif)	4	9,62 ± 1,55
	5	9,15 ± 1,87
	6	7,63 ± 2,71
	7	3,55 ± 0,77
<i>B. subtilis</i> (spora)	4	2,72 ± 0,40
	5	2,92 ± 0,43
	6	0
	7	0
<i>B. cereus</i> (sel vegetatif)	4	6,87 ± 0,66
	5	5,70 ± 0,31
	6	5,13 ± 0,51
	7	4,30 ± 0,31
<i>B. cereus</i> (spora)	4	2,15 ± 0,65
	5	2,23 ± 0,28
	6	0
	7	0
<i>E. coli</i>	4	5,60 ± 0,67
	5	4,60 ± 0,47
	6	3,60 ± 0,10
	7	3,57 ± 0,35
<i>S. aureus</i>	4	5,77 ± 1,45
	5	5,07 ± 0,74
	6	4,27 ± 0,56
	7	4,10 ± 0,38
<i>S. typhi</i>	4	8,70 ± 1,89
	5	9,05 ± 1,47
	6	7,60 ± 2,13
	7	4,73 ± 1,08
<i>P. fluorescens</i>	4	4,70 ± 0,44
	5	5,18 ± 0,80
	6	6,53 ± 0,79
	7	7,27 ± 0,80

* Pengukuran dari dua ulangan dan duplo

Mekanisme penghambatan ekstrak beluntas lebih efektif pada pH rendah, hal ini disebabkan oleh kemampuan ekstrak sebagai bahan pengawet yang lebih aktif pada pH rendah, karena berhubungan dengan bentuk tak terdisosiasi. Komponen fenolik yang terdapat di dalam ekstrak tanaman semakin efektif pada pH rendah berhubungan dengan kenyataan bahwa komponen fenolik bersifat lebih hidrofobik dan mempunyai kelarutan yang baik pada fase lipid pada membran sel (Tassou et al., 1995).

Keefektifan senyawa antimikroba alami pada pH rendah dalam menghambat beberapa bakteri telah dilaporkan oleh Ultee et al., (1998) dan Beuchat et al. (1994). Ultee et al., (1998) melaporkan bahwa karvakrol efektif menghambat *B. cereus* pada pH 5 sampai 6, bila dibandingkan pada pH 7. Beuchat et al., (1994), menyebutkan bahwa pada pH 5,0 dan 6,4 efek penghambatan jus wortel dapat mengakibatkan kematian pada *L. monocytogenes*.

KESIMPULAN

Senyawa aktif yang diduga berperan sebagai senyawa antimikroba pada ekstrak daun beluntas adalah fenol hidrokuinon, tanin, dan alkaloid. Bakteri yang paling sensitif adalah *B. cereus*., diikuti oleh *B. subtilis*, *P. fluorescens*, *E. coli*, *S. aureus*, dan yang paling resisten adalah *S. typhi*. Sensitivitas sferoplas dan protoplas jauh lebih besar dibandingkan dengan sel utuhnya. Diduga ekstrak daun beluntas mampu bereaksi dengan membran sel bakteri.

Pengaruh garam terhadap aktivitas antimikroba ekstrak daun beluntas bervariasi tergantung pada konsentrasi dan bakteri uji. Konsentrasi garam satu persen pada ekstrak daun beluntas dapat meningkatkan penghambatan pada *B. cereus* (spora) dan *B. subtilis* (sel vegetatif dan spora). Aktivitas antimikroba ekstrak daun beluntas dipengaruhi pH. Semakin rendah pH, semakin meningkat aktivitas antimikrobanya kecuali terhadap *P. fluorescens*.

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis berterimakasih kepada Pusat Kajian Makanan Tradisional (PKMT) IPB dan Proyek Penelitian Dosen Muda Dikti-Depdiknas tahun anggaran 2002, atas pendanaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Ardiansyah, Nuraida, L., dan Andarwulan, N. 2002.** Aktivitas antibakteri ekstrak daun beluntas (*Plucea indica* L.). Malang: Prosiding Seminar Tahunan PATPI.
- Bisignano, G., Sanogo, R., Marino, A., Aquino, R., D'Angelo, V., Germano, M.P., De Pasquale, R., and Pizza C. 2000.** Antimicrobial activity of *Mitracarpus scaber* extract and isolated constituents. *Letter Appl. Microb.* 30:105-108.
- Beuchat, L.R., Brackett, R.E., dan Doyle, M.P. 1994.** Lethality of Carrot juice to *Listeria monocytogenes* as affected by pH, sodium chloride and temperature. *J Food Protect.* 57 (6):470-474.
- Bhattacharyya, P., Biswas, G.K., Barua, A.K., Saha, C., Roy, I.B., and Chowdhury, B.K. 1993.** Clausenolene, a carbazol alkaloid from *Clausena heptaphylla*. *Phyto-chem.* 33 (1):248-250.
- Bloomfield, S.F. 1991.** Assessing antimicrobial activity. Di dalam: Denyer, S.P. and Hugo, W.B, editor. *Mechanism of Action of Chemical Biocides.* Oxford: Blackwell Scientific Publication. hlm 1-22.
- Cano, R.J. and Colome, J.S. 1986.** *Microbiology.* New York: West Publishing.
- Carson, C.F. and Riley, T.V. 1995.** Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *J Appl Bactriol* 78:264-269.
- Casey, P.G. and Condon, S. 2002.** Sodium chloride decreases the bacteriocidal effect of acid pH on *Escherichia coli* O157:H45 [abstract]. *Int. J Food Microbiol* 76 (3) : 199-206 [serial on line]. <http://www.elsevier.com/publication/store>. [4 Juli 2002).
- Harborne, J.B. 1987.** Metode Fitokimia. Di dalam Padmawinata, K., dan Soediro, I, penerjemah. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Houghton, P.J. and Raman, A. 1998.** *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extract.* London: Thomson Science.
- Hugo, W.B. and Russel, A.D editor 1987.** *Pharmaceutical Microbiology.* Oxford: Blackwell Scientific Publication.
- Keller, A.C., Maillard, M.P., and Hostettmann, K. 1996.** Antimicrobial steroids from the fungus *Fomitopsis pinicola*. *Phytochem.* 41 (4): 1041-1046.
- Kokpol, U., Chavasiri, W., Chittawong, V., and Bruce M, Cunningham GN, Miles DH. 1993.** Long chain aliphatic alcohols and saturated carboxylic acids from heartwood of *Rhizophora apiculata*. *Phytochem.* 33 (5): 1129-1131.
- Nishina, A.K., Kinaichi, H., Uchibori, T., Seino, H., and Osawa T. 1991.** 2,6-dimethoxy-p-benzequinone as an antimicrobial substance in the bark of *Phyllostachys heterocycla* var. Pubscens a species of thick-stemmed bamboo. *J Agric Food Chem* 39: 266-269.
- Nuraida, L., Andarwulan, N., dan Kristikasari, E. 1999.** Aktifitas antimikroba biji picung (*Pangium edule* Reinw.) segar dan terfermentasi terhadap bakteri patogen dan perusak makanan. *J Ilmu dan Tek Pangan* 4 (2): 118-122.
- Nuraida, L. dan Dewanti-Hariyadi, R. 2001.** Sifat antimikroba beberapa tanaman indigenus terhadap bakteri patogen dan pembusuk serta kapang. Prosiding Seminar Nasional Pangan Tradisional Basis Industri Pangan Fungsional dan Suplemen. Bogor: Institut Pertanian Bogor Pusat Kajian Makanan Tradisional.
- Nuraida, L., Setiawan, C.P., dan Dewanti-Hariyadi, R. 2002.** Pengaruh perlakuan kimia dan fisik terhadap aktivitas antimikroba daun salam (*Syzygium polyanthum* (Wight) Walp) [abstrak]. Di dalam Seminar Nasional Isu Mutakhir Dalam Keamanan Pangan; Bogor 27 Juni 2002. Bogor Yayasan Srikandi untuk Keamanan Pangan dan Forum Mahasiswa Ilmu Pangan. hlm 43-45. abstr P-10.
- Sakanaka, S., Kim, M., Taniguchi, M., and Yamamoto, T. 1989.** Antibacterial substances in Japanese green tea extract against *Streptococcus mutan*, a cariogenic bacterium. *Agric Biol Chem* 53 (9):2307-2311.
- Sukarminah, E. 1997.** Kajian sifat antimikroba ekstrak daun sirih (*Piper battle* L.) terhadap pertumbuhan mikroba perusak dan patogen makanan [thesis]. Bogor: Institut Pertanian Bogor, Program Pascasarjana.
- Tassou, C.C., Drosinos, E.H., and Nychas, G.J.E. 1995.** Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteridis* and *Listeria monocytogenes* in model food system at 4 °C and 10 °C. *J Appl Bacteriol* 78: 593-600.

Ultee, A., Gorris, L.G.M., and Smid E.J. 1998. Bacterial activity of carvacrol toward the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *J Appl Microbiol* 85: 213-218.

Wan, J., Wilcock, A., and Coventry, M.J. 1998. The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. *J Appl Microbiol* 84: 152-158.

William, P. and Gledhill L. 1991. Fractionation of bacterial cell and isolation of membranes and macromolecules. Di dalam: Denyer, S.P. and Hugo, W.B. editor. *Mechanism of Action of Chemical Biocides*. Oxford: Blackwell Scientific Publication. hlm 87-108.

Winarno, M.W. dan Sundari, D. 1998. Pemanfaatan tumbuhan sebagai obat diare di Indonesia. *Cermin Dunia Kedokteran* 109: 25-32.