



UJI DAYA HAMBAT EKSTRAK ETIL ASETAT DAUN KAMBOJA (*Plumeria rubra var. acutifolia*) TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI *METHICILLIN RESISTANT Staphylococcus aureus* SECARA IN VITRO

Ni Luh Made Rasmawati¹, Ni Nengah Dwi Fatmawati²

¹Mahasiswa Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Udayana

²Bagian/SMF Mikrobiologi Klinik, Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Udayana, Jl. PB. Sudirman, Denpasar, Bali, Indonesia

Corresponding Author : Ni Luh Made Rasmawati

rasmawati1210@gmail.com

ABSTRAK

Penggunaan antibiotik yang kurang bijaksana dapat memicu terjadinya resistensi bakteri terhadap antibiotik. Salah satu bakteri yang kini mengalami resistensi terhadap berbagai macam antibiotik adalah *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). Kandungan flavonoid dan alkaloid yang dilaporkan pada daun tanaman kamboja (*Plumeria rubra var. acutifolia*) memiliki aktivitas anti bakteri sehingga penelitian lebih mendalam terkait efikasi senyawa tersebut akan menarik untuk dikaji. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui apakah ekstrak etil asetat daun kamboja (*Plumeria rubra var. acutifolia*) dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) secara in vitro. Metode yang digunakan adalah metode difusi agar. Rerata diameter zona hambat kontrol negatif dengan etil asetat (K1) = 0 mm, konsentrasi 10% (P1) = 0 mm, 20% (P2) = 0 mm, 40% (P3) = 7,25 mm, dan 60% (P4) = 7,75 mm. Secara statistik ekstrak etil asetat daun kamboja (*Plumeria rubra var. acutifolia*) konsentrasi 40% dan 60% mampu menghambat pertumbuhan bakteri MRSA jika dibandingkan dengan kontrol negatif. Perlunya dilakukan penelitian lebih lanjut untuk fraksinasi ekstrak sehingga dapat diketahui senyawa manakah yang paling berperan sebagai antibakteri.

Kata Kunci: MRSA, daun kamboja, fitokimia

ABSTRACT

Imprudent use of antibiotics can lead to bacterial resistance to antibiotics. One of the bacteria that have showed resistance to antibiotic is *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). Flavonoid and alkaloid were reported on frangipani leaves (*Plumeria rubra var. acutifolia*) contribute as an anti-bacterial agent. This finding leads an research to know deeper related to the efficacy of these compounds. This research aimed to know the anti-bacterial effect of ethyl acetate extract of *Plumeria rubra var. acutifolia* leaves on MRSA. The method used is agar diffusion method. The average of inhibition zones of negative control with ethyl acetate (K1) = 0 mm, concentration 10% (P1) = 0 mm, 20% (P2) = 0 mm, 40% (P3) = 7.25 mm, and 60% (P4) = 7.75 mm. This study showed that ethyl asetatate extract of frangipani leaves (*Plumeria rubra var. acutifolia*) at concentration of 40% and 60% could inhibit the growth of MRSA bacteria. It is necessary to do fractination to the extract to know which secondary metabolite that have the most potential antibacterial activity.

Keywords: MRSA, Frangipani leaves, phytochemical

PENDAHULUAN

Bakteri *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) merupakan salah satu penyebab tersering infeksi nosokomial baik di negara maju maupun berkembang.^{1,2} Sampai saat ini antibiotik golongan glikopeptida seperti vankomisin dan teikoplanin masih menjadi pilihan terapi untuk infeksi sistemik oleh bakteri ini.³ Setelah ditemukannya kasus MRSA yang menunjukkan resistensi terhadap vankomisin atau disebut *Vancomycin Intermediate-Resistant Staphylococcus aureus* (VISA), membuat pengobatan infeksi MRSA menjadi semakin sulit.⁴

Oleh karena itu perlu dikembangkan alternatif terapi zat antibakteri baru yang dapat digunakan untuk pengobatan infeksi MRSA dan tentunya memiliki efek samping yang lebih minimal. Salah satu caranya adalah dengan pemanfaatan keanekaragaman hayati Indonesia berupa tanaman herbal yang memiliki kandungan fitokimia yang dapat berperan sebagai antibakteri. Kandungan fitokimia pada tanaman yang dapat memberikan aktivitas antibakteri adalah fenolik.^{5,6}

Kandungan fenolik (seperti flavonoid dan tannin) ini ternyata juga terdapat pada tanaman kamboja (*Plumeria rubra*)⁷. Beberapa penelitian telah menguji efektivitas ekstrak daun kamboja untuk menghambat pertumbuhan berbagai jenis bakteri, salah satunya adalah *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) dan menunjukkan zona hambatan yang signifikan.^{7,8} Namun belum ada data ilmiah terkait penelitian ekstrak daun kamboja pada bakteri MRSA. Sehingga penelitian uji daya hambat ekstrak daun kamboja (*Plumeria rubra var. acutifolia*) untuk menghambat pertumbuhan bakteri MRSA secara *in vitro* perlu untuk dilakukan yang nantinya dapat dijadikan sebagai dasar penelitian secara *in vivo* selanjutnya.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Udayana (FK UNUD) pada bulan Juli hingga Desember tahun 2016. Penelitian telah mendapatkan kelayakan etik dari Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Udayana/ Rumah Sakit Umum Pusat Sanglah dengan nomor 575/UN.14.2/Litbang/2016 tertanggal 29 Maret 2016. Rancangan penelitian yang digunakan adalah *True Experimental Post Test Only Group Design* untuk mengetahui pengaruh ekstrak etil asetat daun kamboja (*P. rubra var. acutifolia*) dalam menghambat pertumbuhan MRSA secara *in vitro*. Pengujian dilakukan dengan metode difusi agar (*Kirby-Bauer*) dengan menggunakan empat jenis konsentrasi ekstrak yaitu 10% (P1), 20% (P2), 40% (P3), dan 60% (P4),

serta menggunakan pembanding kontrol negatif etil asetat (K1) dan kontrol positif linezolid (K2).

Daun kamboja spesies *P. rubra var. acutifolia* dipetik dari tanaman yang tumbuh di daerah Waturenggong, Denpasar, Bali dengan memilih daun yang berwarna hijau, sudah dewasa, dan tidak terserang hama penyakit. Pembuatan ekstrak dilakukan di Laboratorium Sumberdaya Genetika dan Biologi Molekuler Universitas Udayana dengan memakai teknik maserasi dengan menggunakan pelarut etil asetat. Daun kamboja yang sudah dibersihkan dengan air bersih kemudian dipotong-potong kecil menggunakan pisau, kemudian dikeringkan tanpa sinar matahari atau dengan menggunakan oven dengan suhu 40°C. Setelah kering, daun kamboja dihaluskan dengan *blender*. Sesudah itu, hasil ayakan ditimbang sebanyak 250 g kemudian dimasukkan ke dalam gelas erlemeyer kemudian direndam dengan etil asetat 650 ml. Campuran larutan tersebut diaduk selama 15-30 menit dan didiamkan selama 2 malam sampai mengendap. Setelah itu filtrat (lapisan atas yang berupa campuran etil asetat dengan zat aktif) diambil dan residu dimaserasi kembali dengan 500 ml etil asetat selama semalam. Selanjutnya filtrat diambil lagi dan residu dimaserasi kembali sampai empat kali pengulangan.

Setelah semua filtrat ekstrak daun kamboja diperoleh lalu difiltrasi menggunakan kertas *Whatmann 0,1* dan dievaporasi dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C sehingga diperoleh ekstrak kering. Ekstrak etil asetat daun kamboja 100% diencerkan dengan etil asetat bila akan digunakan untuk membuat larutan dengan konsentrasi ekstrak 10%, 20%, 40%, dan 60%.

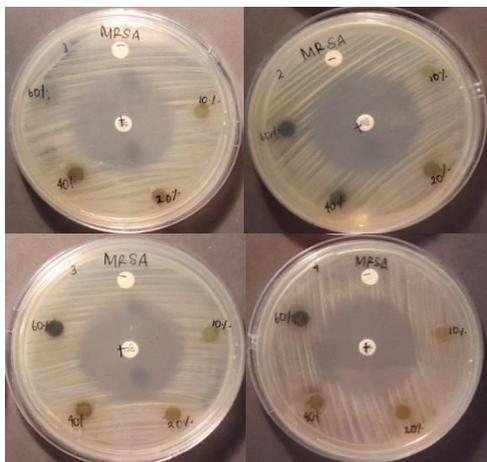
Media yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri MRSA adalah media agar *Mueller-Hinton* (MH). Bakteri MRSA yang dipakai adalah MRSA ATCC 3351 yang didapat dari Laboratorium Mikrobiologi FK UNUD yang direjuvenasi terlebih dahulu sebelum digunakan. Biakan bakteri yang berumur 24 jam disuspensi sehingga kekeruhannya setara 0,5 Mc Farland dengan konsentrasi bakteri 1×10^8 CFU/ml. Suspensi bakteri kemudian dioleskan ke media agar kemudian diletakkan 6 disk yang masing-masing berisi kontrol negatif, kontrol positif, dan empat macam konsentrasi ekstrak. Jumlah pengulangan yang dilakukan dalam penelitian ini adalah sebanyak 4 kali sesuai perhitungan rumus *Federer*.

Lempeng agar yang sudah berisi bakteri MRSA, bahan uji, dan kontrol diinkubasi selama

18-24 jam pada suhu 35-37⁰C. Data yang diambil dan dikumpulkan, berupa data kuantitatif diameter zona hambat ekstrak daun kamboja yang diukur menggunakan jangka sorong, kemudian dilakukan analisis data.

HASIL

Pengukuran diameter zona hambat dilakukan dengan jangka sorong pada zona bening di sekitar disk bahan uji dan kontrol. Pengukuran dilakukan dari beberapa sisi lingkaran disk. Hasil yang didapatkan dari empat kali pengulangan kemudian dihitung reratanya sehingga diperoleh rerata K1 = 0 mm, K2 = 32,50 P1 = 0,00 mm, P2 = 0,00 mm, P3 = 7,25 mm, dan P4 = 7,75 mm.



Gambar 1. Hasil Uji Ekstrak Etil Asetat Daun Kamboja (*Plumeria rubra var. acutifolia*) konsentrasi 10%, 20%, 40%, dan 60%, dibandingkan dengan kontrol negatif (larutan etil asetat) dan kontrol positif (antibiotik linezolid) pada Bakteri MRSA. Daya hambat ditunjukkan sebagai zona bening disekitar ekstrak atau antibiotik.

Tabel 1. Data Hasil Pengukuran Diameter Zona Hambat Ekstrak Etil Asetat Daun Kamboja pada Bakteri MRSA

No	K1 (mm)	K2 (mm)	P1 (mm)	P2 (mm)	P3 (mm)	P4 (mm)
1	0,00	33,00	0,00	0,00	7,00	7,00
2	0,00	32,00	0,00	0,00	7,00	8,00
3	0,00	33,00	0,00	0,00	7,00	7,00
4	0,00	32,00	0,00	0,00	8,00	9,00

Uji fitokimia dilakukan untuk mengetahui jenis senyawa metabolit sekunder yang terdapat didalam ekstrak etil asetat daun kamboja (*Plumeria rubra var. acutifolia*). Penulis melakukan uji terhadap beberapa senyawa seperti alkaloid, saponin, flavonoid, steroid, triterpenoid, fenol, dan glikosida di Laboratorium Fitokimia Farmasi Udayana.

Tabel 2. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Etil Asetat Daun Kamboja (*Plumeria rubra var. acutifolia*)

Identifikasi Golongan Senyawa	Metode Pengujian	Pengamatan	Hasil
Alkaloid	Meyer	Terbentuk endapan putih	+
	Bouchardat	Terbentuk endapan hitam	+
	Wagner	Terbentuk endapan coklat	+
Saponin	Foam	Terbentuk busa yang stabil	+
Flavonoid	Pew	Terbentuk warna kuning intensif	+
Steroid	Lieberman-Burchard	Terbentuk cincin warna biru kehijauan	+
Triterpenoid	Lieberman-Burchard	Terbentuk cincin kecoklatan	+
Fenol	FeCl ₃ 2%	Terbentuk warna biru kehitaman	+
Glikosida	Lieberman-Burchard	Terbentuk warna Hijau kebiruan	+

PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan terjadinya efek menghambat ekstrak terhadap bakteri MRSA pada konsentrasi 40% dan 60%. Efek menghambat terjadi karena ekstrak etil asetat daun kamboja mengandung

beberapa zat anti bakteri aktif seperti triterpenoid, flavonoid, alkaloid, saponin dan fenol yang menunjukkan hasil yang positif dari hasil uji fitokimia.

Cara kerja dari masing-masing senyawa tersebut sebagai agen antibakteri sebenarnya masih belum jelas namun pada beberapa penelitian menyebutkan adalah dengan mempengaruhi dinding sel bakteri baik dengan cara meningkatkan atau merusak permeabilitas membran maupun dengan mengganggu sintesis salah satu komponen dinding sel bakteri yaitu peptidoglikan. Peningkatan permeabilitas pada membran dan dinding sel bakteri akan memicu terjadinya kebocoran sehingga menyebabkan komponen intraseluler akan keluar atau terjadinya lisis pada sel bakteri. Metabolit sekunder yang dilaporkan berperan dalam mekanisme tersebut adalah flavonoid dan saponin. Sementara senyawa yang dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri dengan mengganggu sintesis komponen peptidoglikan adalah alkaloid.⁹ Sementara data terkait aktivitas senyawa lainnya sebagai antibakteri belum dilaporkan.

Keefektifan penyerapan senyawa antibakteri dan senyawa aktif lainnya yang terkandung dalam daun kamboja juga tidak terlepas dari pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi. Penelitian mengenai ekstrak daun kamboja (*Plumeria rubra*) sebelumnya pernah dilakukan oleh Lawal U dkk⁷ pada tahun 2014 di Kaduna, Nigeria. Pada penelitian tersebut dilakukan perbandingan potensi ekstrak daun kamboja sebagai antibakteri dengan menggunakan beberapa jenis pelarut yang berbeda seperti etil asetat, heksana, dan metanol untuk proses ekstraksi. Ekstrak yang dibuat dengan pelarut etil asetat menunjukkan kemampuan menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) NCIB8588 yang paling besar yaitu 21 mm pada konsentrasi 20 mg/ml. Hal yang sama juga ditunjukkan oleh penelitian Baghel dkk¹⁰ yang membandingkan efektifitas ekstrak etanol, klorofom, etil asetat, dan air daun kamboja (*Plumeria rubra*, Linn) dalam menghambat bakteri *S. epidermidis* dan *E. coli*. Ekstrak yang paling efektif dalam menghambat kedua jenis bakteri tersebut adalah ekstrak yang dibuat dengan pelarut etil asetat.

Perbandingan keefektifan ekstrak etil asetat dan etanol daun kamboja (*Plumeria rubra* var. *acutifolia*) juga dapat ditunjukkan dari hasil pengujian penulis sebelumnya. Pada pengujian ekstrak etanol daun kamboja terhadap bakteri *S. aureus* dan MRSA diperoleh hasil yang negatif pada semua konsentrasi yang dicoba (20%, 30%, 40%, dan 50%). Sementara, pada penelitian penulis yang menggunakan ekstrak etil asetat daun kamboja menunjukkan daya hambat sebesar 7 mm pada konsentrasi 40% dan 7-8 mm pada konsentrasi 60% bakteri *Staphylococcus aureus* (data tidak ditampilkan).

Kandungan dan jumlah senyawa aktif dapat dipengaruhi oleh lokasi pengambilan sampel daun. Hal ini terjadi karena kadar dan jenis metabolit sekunder dari ekstrak dalam suatu tanaman akan sangat dipengaruhi oleh faktor biotik dan abiotik lingkungan hidupnya. Fungsi ekologis dari metabolit sekunder tanaman salah satunya adalah untuk melindungi diri dari mamalia herbivora dan mikroorganisme penyebab infeksi. Senyawa metabolit sekunder ini akan sangat mempengaruhi kemampuan dari suatu tanaman untuk beradaptasi di suatu lingkungan.¹¹ Dengan kata lain semakin mengancamnya kondisi suatu lingkungan hidup maka tanaman akan memproduksi senyawa metabolit sekunder yang lebih banyak untuk pertahanan diri. Selain itu beberapa faktor abiotik seperti suhu, intensitas radiasi cahaya, air, ketinggian, paparan sinar UV, dan komposisi udara juga mempengaruhi produksi senyawa metabolit sekunder. Seperti sintesis derivat fenolik dan alkaloid akan banyak terbentuk pada paparan cahaya yang tinggi. Flavonoid akan melindungi tanaman dari paparan sinar UV, sehingga pada kondisi dimana paparan sinar UV tinggi, maka tanaman akan memproduksi flavonoid yang lebih banyak. Begitupula pada kondisi stres air akan memicu biosintesis alkaloid purin.¹²

Hasil uji fitokimia ekstrak etil asetat daun kamboja yang penulis lakukan menunjukkan hasil yang positif pada tujuh jenis senyawa metabolit sekunder yang diuji yaitu alkaloid, saponin, steroid, flavonoid, triterpenoid, fenol, dan glikosida. Sementara pada penelitian Lawal U dkk hasil uji fitokimia ekstrak etil asetat daun kamboja menunjukkan hasil positif terhadap senyawa tannin, saponin, steroid, dan glikosida. Hasil yang berbeda ini salah satunya dapat dipengaruhi oleh lokasi pengambilan daun.⁷

Penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat daun kamboja (*Plumeria rubra* var. *acutifolia*) memiliki potensi sebagai anti bakteri terhadap bakteri MRSA. Namun, perlu untuk dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder yang paling berperan sebagai antibakteri dengan melakukan fraksinasi kandungan ekstrak. Pembaharuan atau inovasi metode ekstraksi daun kamboja juga diperlukan sebagai salah satu pendekatan untuk mendapatkan konsentrasi senyawa antibakteri yang terkandung didalamnya.

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Adapun simpulan dari penelitian ini adalah ekstrak etil asetat daun kamboja (*Plumeria rubra* var. *acutifolia*) konsentrasi 40% dan 60% dapat

menghambat pertumbuhan bakteri MRSA secara *in vitro*.

Saran

Beberapa saran yang dapat diberikan melalui penelitian ini antara lain:

- a. Penelitian lebih lanjut untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder yang paling berperan sebagai antibakteri dengan melakukan fraksinasi kandungan ekstrak, kemudian diuji cobakan lagi pada bakteri MRSA secara *in vitro*.
- b. Pembaharuan atau inovasi metode ekstraksi daun kamboja juga diperlukan sebagai salah satu pendekatan untuk mendapatkan konsentrasi senyawa antibakteri yang terkandung didalamnya.

DAFTAR PUSTAKA

1. Kock, R., Mellmann, A., Schaumburg, F., W. Friedrich, A., Kipp, F. and Becker, K. The Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Germany. *Deutsches Ärzteblatt International*. 2011;108(45):763.
2. Huang H, Flynn N, King J, Monchaud C, Morita M, Cohen S. Comparisons of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Hospital-Associated MRSA Infections in Sacramento, California. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006; 44(7): 2423-2427.
3. WHO. Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance. WHO Library Cataloguing in Publication Data. 2014:20
4. Kurosu M, Siricilla S, Mitachi K. Advances in MRSA drug discovery: where are we and where do we need to be?. *Expert Opinion on Drug Discovery*. 2013; 8(9): 1095-1116.
5. Nohynek L, Alakomi H, Kähkönen M, Heinonen M, Helander I, Oksman-Caldentey K dkk. Berry Phenolics: Antimicrobial Properties and Mechanisms of Action Against Severe Human Pathogens. *Nutrition and Cancer*. 2006;54(1): 18-32.
6. Huang W, Zhang H, Liu W, Li C. Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing. *J Zhejiang Univ Sci B*.13(2). 2012: 94-102.
7. Lawal U., Egwaikhide P. A., and Longbap D.B. Preliminary Phytochemical and Anti-Bacterial Studies on the Leaf Extracts of *Plumeria Rubra* Linn. *Journal of Natural Sciences Research*. 2014; 4(14): 74-76.
8. Kumar, N and Kr. Sharma, S. Antimicrobial potential of *Plumeria rubra* Syn *Plumeria acutifolia* bark. *Scholars Research Library*. 2012; 4(4):1592.
9. Lusi, D. and Widya, L. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Kelor (*Moringa Oleifera* L.) Terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Pharmakon Jurnal Ilmiah Farmasi-UNSRAT*. 2016; 5(2): 288.
10. Baghel S. A., Mishra K. C., Rani, A., Sasmal, D., Nema K. R. Antibacterial activity of *Plumeria rubra* Linn. plant extract. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 2010; 2(6): 435-44.
11. Vince, Ö. and Zoltán, M. (2011). *Plant Physiology/Digital Textbook Library*. [online] Tankonyvtar.hu. Diunduh dari: http://www.tankonyvtar.hu/en/tartalom/tamop425/0010_1A_Book_angol_01_novenyelettan/ch03s05.html [Diakses 6 Nov. 2016].
12. Pavarini, D., Pavarini, S., Niehues, M. and Lopes, N. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. *Animal Feed Science and Technology* 2012;176(1-4): 5-16.