

AKTIVITAS ANTI BAKTERI SINGAWALANG (*Petiveria alliacea*) TERHADAP BAKTERI YANG RESISTEN DAN PEKA TERHADAP ANTIBIOTIK

Mulyani, Y., Sukandar, E.Y., dan Adyana, I.K

Sekolah Farmasi, Institut Teknologi Bandung, Jl. Ganesa No. 10 Bandung

E-mail: yani_m211178@yahoo.co.id; elin@fa.itb.ac.id

ABSTRAK

Tanaman singawalang (*Petiveria alliacea*) secara tradisional di Indonesia digunakan sebagai analgetik, anti inflamasi dan obat untuk batuk darah. Obat tradisional yang mengandung *Petiveria alliacea* telah digunakan di Karibia, Amerika Latin, Afrika Barat dan daerah lainnya selama ratusan tahun untuk mengobati rasa sakit, flu, inflamasi, tumor, infeksi bakteri, jamur, hiperlipidemia, diabetes dan penyakit lainnya. Penelitian ini bertujuan mengetahui aktivitas singawalang yang tumbuh di Indonesia terhadap bakteri yang resisten dan peka terhadap antibiotik. Pengujian dilakukan dengan menentukan konsentrasi hambat minimum (KHM) dan konsentrasi bakterisidal minimum dengan metode *broth microdilution* dan kajian tipe kerja dengan melihat kurva pertumbuhan. Daun singawalang diperoleh dari daerah Cilende Bogor. Pengujian aktivitas dilakukan terhadap daun kering, daun segar, batang segar dan akar segar yang diekstraksi secara maserasi dan daun kering secara refluks menggunakan etanol. Ekstrak etanol daun kering menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap sepuluh bakteri yaitu MSCNS (*Methicillin-Susceptible Coagulase-Negative Staphylococcus*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *B.cereus*, *Staphylococcus aureus*, MRSA (*Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*), *Escherichia coli*, MRCNS (*Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococcus*), MSSA (*Methicillin-Susceptible Staphylococcus aureus*), dan VRE (*Vancomycin-Resistant Enterococcus*) dengan nilai KHM berturut turut 256, 16, 32, 64, 16, 16, 32, 16, 128, dan 256 µg/ml dan aktivitas antibakteria ekstrak etanol daun segar pada bakteri yang sama dengan nilai KHM berturut turut 512, 64, 64, 512, 64, 256, 32, 256, 512, dan 512 µg/ml. Hasil penentuan dengan kurva pertumbuhan bakteri menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun kering dengan maserasi bersifat bakteriostatik terhadap MRSA, VRE dan MRCNS sampai konsentrasi 8 KHM.

Kata kunci: Singawalang, antibakteria, *broth microdilution*, kurva pertumbuhan.

ANTI BACTERIAL ACTIVITIES OF SINGAWALANG (*Petiveria alliacea*) AGAINST RESISTANT AND SENSITIVE BACTERIA TO ANTIBIOTICS

ABSTRACT

Singawalang (*Petiveria alliacea*) of Phytolaceae family, is traditionally used in Indonesia for analgesics, antiimplammation, and cough. In Caribbean, Latin America, West Africa and other regions the traditional medicines containing this plant have been used for hundreds of years to treat pain, colds, inflammation, tumor, bacterial and fungal infections, hyperlipidemia, diabetes and other diseases. This study was aimed to determine the antibacterial activity of singawalang grown in Indonesia against bacteria resistant and sensitive to antibiotics. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were determined by microdilution broth method and type of antibacterial action was determined by observing the profile of bacterial growth curve. Antibacterial activity assays were done on the ethanol extract of dried leaves, fresh leaves, fresh barks and fresh roots, prepared by maceration and on ethanol extract of dried leaves prepared by reflux. The leaves of singawalang were obtained from Cilende region, Bogor. The ethanol extract of dried leaves showed inhibitory activity against ten bacteria i.e. MSCNS (*Methicillin-susceptible Coagulase-Negative Staphylococci*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, MRSA (*Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*), *Escherichia coli*, MRCNS (*Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci*), MSSA (*Methicillin-susceptible Staphylococcus aureus*), VRE (*Vancomycin-Resistant Enterococcus*) with the

MIC value of 256, 16, 32, 64.16, 16, 32.16, and 128.256 µg/ml, respectively; and inhibitory activity of the fresh leaves ethanol extract using the same bacteria showed MIC values of 512, 64, 64, 512, 64, 256, 32, 256, 512, and 512 µg/ml respectively. According to bacterial growth curve profile, the ethanol extract of dried leaves prepared by maseration had bacteriostatic activity against MRSA, VRE and MRCNS at the MIC value of 8 µg/ml.

Key words : Singawalang, antibacteria, broth microdilution, growth curve

PENDAHULUAN

Salah satu masalah kesehatan masyarakat yang paling serius pada dekade terakhir adalah adanya pengembangan resistensi mikroba terhadap antibiotika dan antimikroba sintetik. Dengan demikian, penemuan anti bakteri baru merupakan kebutuhan yang sangat mendesak (Amer. *et. all*, 2008). Penyakit infeksi masih merupakan penyumbang tertinggi angka kesakitan dan angka kematian di negara berkembang termasuk di Indonesia. Sesuai kebijakan kesehatan dari Departemen Kesehatan, arah kebijakan umum riset dengan bidang fokus pembangunan kesehatan dan obat tahun 2010-2014 adalah peningkatan ketersediaan obat dan agenda Riset Nasional memfokuskan pada pencarian senyawa baru yang berkhasiat sebagai obat (Departemen Riset dan Teknologi, 2010). Sementara itu, informasi penggunaan tumbuhan dalam pengobatan tradisional merupakan salah satu pendekatan untuk menemukan obat baru (Fabricant & Farnsworth, 2001), sehingga pemanfaatan ketersediaan obat dapat dipenuhi dari tanaman yang tumbuh di Indonesia. Pengembangan antimikroba dari tumbuhan mempunyai prospek yang baik untuk mengatasi resistensi mikroba. Oleh karena itu pada penelitian pendahuluan dilakukan seleksi tumbuhan yang secara tradisional digunakan untuk obat kulit, luka dan gatal dan dicari yang aktif terhadap bakteri yang resisten, hasilnya daun singawalang unggul dibandingkan dengan yang lain.

Petiveria alliaceae termasuk ke dalam famili Phytolaceae dan di Indonesia dikenal dengan nama singawalang. Hingga sekarang, penggunaan singawalang belum banyak dimanfaatkan di Indonesia, sedangkan di Karibia, Amerika Latin, Afrika Barat dan daerah lainnya sudah ratusan tahun

digunakan sebagai pereda rasa sakit, flu, anti inflamasi, antitumor, antibakteri, antijamur, antihi perlipidemia, antidiabetes dan untuk menangani penyakit lainnya (Tropical Plant Database-Anamu, 2010).

P. alliacea secara tradisional di Indonesia digunakan sebagai analgetik antiinflamasi dan sebagai tanaman obat untuk batuk berdarah. Pengujian etnobotani dilakukan di salah satu daerah di Bogor, yang menunjukkan penggunaan *P. alliaceae* dapat mengurangi lama terapi pada penderita tuberculosis. Mengingat cara ekstraksi menentukan aktivitas antibakteri maka dilakukan ekstraksi daun singawalang segar dan kering, akar dan batang kering secara maserasi dan ekstraksi panas (refluks) selanjutnya semua ekstrak diuji terhadap bakteri peka dan resisten. Tujuan penelitian ini menentukan aktivitas ekstrak singawalang terhadap bakteri peka dan resisten terhadap beberapa antibiotika.

BAHAN DAN METODE

Metodologi Penelitian

Metode penelitian meliputi pengumpulan bahan segar, pembuatan ekstrak, karakterisasi ekstrak, dan pengujian pengaruh ekstrak bahan uji terhadap aktivitas *M. tuberculosis* dan mikroba lain. Pembuatan ekstrak diawali dengan pengumpulan bahan segar dan determinasi. Tumbuhan yang digunakan pada penelitian ini adalah singawalang dari bagian daun, batang dan akar diuji aktivitasnya. Tumbuhan-tumbuhan tersebut dirajang kemudian dikeringkan dan diekstraksi secara refluks dan maserasi menggunakan pelarut etanol. Ekstrak etanol yang diperoleh dipekatkan sampai diperoleh ekstrak kental menggunakan evaporator. Pengujian aktivitas antibakteri terhadap mikroba lainnya dilakukan dengan menggunakan metode *broth microdilution*. (NCCLS, 2003).

Bahan

Daun, batang dan akar singawalang, etanol, *aquades*, dimetilsulfoksida, *Mueller-Hinton Broth*, *Mueller-Hinton Agar*, *nutrient broth*, *nutrient agar*, siprofloksasin, tetrasiklin HCl, Ampicillin, asam asetat glasial, asam sulfat, toluena, etil asetat, pereaksi *Dragendroff*, pereaksi Mayer, serbuk Mg, amil alkohol, natrium asetat, besi (III) klorida, larutan gelatin, natrium hidroksida, larutan amonia, eter, pereaksi *Liebermann-Burchard*, dan kertas saring

Mikroba Uji

Bacillus cereus KTCC 1021, *Escherichia coli* ATCC 8934, MSSA (*Methicillin-Susceptible Staphylococcus aureus*) 2, MSCNS (*Methicillin-Susceptible Coagulase-Negative Staphylococcus*) 5, MRCNS (*Methicillin-Resistant Coagulase-Negative Staphylococcus*) 24, MRSA (*Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*) 25, *Pseudomonas aeruginosa*, dan VRE (*Vancomycin-Resistant Enterococcus*) 8-5, diperoleh dari laboratorium Farmakologi-Toksikologi Sekolah Farmasi, ITB.

Pengumpulan, Determinasi, dan Pengolahan Tumbuhan Uji

Herba tanaman singawalang diperoleh dari satu tempat tumbuh yaitu di daerah Cilendek, Bogor. Determinasi tumbuhan uji dilakukan di Herbarium Bandungense, Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, ITB.

Pengolahan tumbuhan meliputi sortasi basah, pencucian, perajangan, pengeringan, dan penggilingan menjadi serbuk simplisia. Serbuk simplisia ditimbang sebanyak 200 mg, diekstraksi dengan 1000 mL etanol 96% menggunakan alat reluks selama 2 jam kemudian disaring. Residu diekstraksi kembali dua kali dengan etanol 96%. Filtrat yang diperoleh disatukan kemudian dipekatkan dengan alat penguap hampa udara berputar. Ekstrak dipekatkan dengan penagan air bersuhu 50°C-60°C sampai diperoleh ekstrak kental. Untuk Proses maserasi, dilakukan dengan merendam seluruh bagian bahan segar singawalang dan serbuk simplisia selama 24 jam. Hasilnya disaring dan residu diekstraksi kembali dua

kali dengan etanol 96% setiap 24 jam.

Penetapan Karakteristik Ekstrak

Penetapan karakteristik ekstrak meliputi pemeriksaan kandungan kimia ekstrak etanol kental, penetapan kadar air, kadar sari larut air, kadar sari larut etanol.

Penetapan Kadar Air

Penetapan kadar air dilakukan dengan cara destilasi. Tabung penerima pendingin dibersihkan dengan asam, dibilas dengan air, lalu dikeringkan. Ke dalam labu kering dituangkan 200 mL toluena dan 2 mL air, disuling selama 2 jam, didinginkan selama 30 menit, kemudian volume dibaca dengan ketelitian 0,05 mL. Hasil yang diperoleh disebut sebagai volume distilat pertama.

Ekstrak yang diperkirakan mengandung 2 sampai 4 ml air dan batu didih dimasukkan kedalam labu destilasi kemudian dipanaskan perlahan hingga mendidih. Kecepatan penyulingan diatur lebih kurang 2 tetes tiap detik, setelah sebagian besar air tersuling, kecepatan penyulingan dinaikkan hingga 4 tetes tiap detik. Setelah semua air tersuling, bagian dalam pendingin dicuci dengan toluena, penyulingan dilanjutkan selama 5 menit. Tabung penerima dibiarkan mendingin hingga suhu kamar dan air yang menempel pada tabung penerima dilepaskan dengan mengetuk-ngetuk tabung. Lapisan air dan toluena dibiarkan memisah, kemudian dibaca volume airnya. Volume yang terbaca disebut sebagai volume distilat kedua. Kadar air dinyatakan dalam persen dengan persamaan.

Dengan W sebagai berat ekstrak (g), n_1 sebagai volume distilat kedua atau volume total air dan n sebagai volume distilat pertama atau volume air setelah penyulingan pertama (Departemen Kesehatan RI, 2000).

Penetapan Kadar Sari Larut Air

Sebanyak 5 g ekstrak dimaserasi dengan 100 ml air-kloroform (larutan 1ml kloroform P dengan air hingga 100 ml) selama 24 jam menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. Setelah selesai, disaring dengan kertas

saring dan 20 ml filtratnya diuapkan hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara. Kemudian cawan tersebut dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Kadar sari larut air dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Departemen Kesehatan RI, 2000).

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{100(n1 - n)}{W}$$

Penetapan Kadar Sari Larut Etanol

Sebanyak 5 g ekstrak dimaserasi dengan 100 ml etanol 95% selama 24 jam menggunakan labu bersumbat sambil berkali-kali dikocok selama 6 jam pertama kemudian dibiarkan selama 18 jam. Hasil maserasi disaring cepat dan 20 ml filtratnya diuapkan hingga kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara. Kemudian cawan tersebut dipanaskan pada suhu 105°C hingga bobot tetap. Kadar sari larut etanol dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes RI, 2000).

Pemeriksaan Kandungan Kimia Ekstrak

Penetapan kandungan ekstrak meliputi pemeriksaan alkaloid, flavonoid, saponin, kuinon, tanin dan triterpenoid.

Pemeriksaan Alkaloid

Sebanyak 2 g ekstrak dilembabkan dengan 5 mL amonia 25%, digerus dalam mortir, kemudian ditambah 20 ml kloroform dan digerus kuat-kuat. Campuran disaring, filtrat diteteskan pada kertas saring kemudian ditetesi pereaksi Dragendorff. Hasil uji dinyatakan positif jika terbentuk warna merah / jingga. Filtrat yang sama diekstraksi dua kali dengan larutan asam klorida 10%, dimasukkan ke dalam dua tabung masing-masing 5 mL. Diuji dengan pereaksi Mayer dan Dragendorff. Hasil positif jika terbentuk endapan jingga/ merah bata dengan pereaksi Dragendorff atau endapan putih dengan pereaksi Mayer.

Pemeriksaan Flavonoid

Sebanyak 1 g ekstrak ditambah 100 mL air panas kemudian dididihkan selama 5 menit dan disaring. Sebanyak 5 ml filtrat (filtrat A) ditambah dengan serbuk 1 ml

HCl pekat, dan 5 ml amil alkohol kemudian dikocok kuat. Terbentuknya lapisan berwarna pada lapisan amil alkohol menunjukkan adanya flavonoid.

Pemeriksaan Saponin

Sebanyak 10 ml filtrat A dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dikocok vertikal selama 10 detik. Jika busa yang terbentuk stabil selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm dan busa tidak hilang pada penambahan asam klorida 2 N menunjukkan adanya saponin.

Pemeriksaan Kuinon

Sebanyak 5 ml filtrat A ditambahkan dengan beberapa tetes larutan natrium hidroksida 1N. Terbentuknya warna merah menunjukkan adanya golongan senyawa kuinon.

Pemeriksaan Tanin

Filtrat A dimasukkan ke dalam tiga tabung reaksi masing-masing 5 ml. Tabung pertama ditambahkan beberapa tetes larutan besi (III) klorida 1%. Jika terbentuk warna biru tua atau hitam, maka ekstrak positif mengandung tanin. Tabung kedua ditambah beberapa tetes larutan gelatin. Jika terbentuk endapan putih, maka ekstrak positif mengandung tanin. Tabung ketiga ditambah dengan beberapa tetes pereaksi Steasny dan dipanaskan dalam penangas air bersuhu 90°C. Terbentuknya endapan warna merah muda menunjukkan adanya tanin katekat. Kemudian endapan dipisahkan dan filtrat dijenuhkan dengan natrium asetat, ditambahkan beberapa tetes larutan besi (III) klorida 1%. Terbentuknya warna biru tinta menunjukkan adanya tanin galat.

Pemeriksaan Steroid/Triterpenoid

Sebanyak 1 g ekstrak dimaserasi dengan 20 ml eter selama 2 jam. Hasil maserasi disaring dan diambil filtratnya. Jarak Sebanyak 5 ml filtrat diuapkan dalam cawan penguap hingga diperoleh residu. Residu tersebut ditambahkan 2 tetes asam asetat anhidrida dan 1 tetes asam sulfat pekat. Terbentuknya warna biru-hijau menunjukkan adanya golongan senyawa steroid dan warna

merah-ungu menunjukkan adanya golongan senyawa triterpenoid.

Uji Aktivitas Antimikroba Pembuatan Media

Nutrient broth sebanyak 8 g dilarutkan dalam 1 l aquadest. *Nutrient agar* sebanyak 23 g dilarutkan dalam 1 l aquadest dan dipanaskan sampai larut sempurna. Sebelum digunakan, semua media disterilisasi terlebih dulu dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit. *Muehler Hilton broth* sebanyak 23gr dilarutkan dalam 1 l aquadest, dan *Muehler Hilton agar* sebanyak 38 g dalam 1 l aquadest dan dipanaskan sampai terlarut sempurna.

Pembuatan Suspensi Mikroba

Mikroba disuspensikan ke dalam media cair dan diinkubasi 18-24 jam pada suhu 37°C. Suspensi dikocok dan diatur kekeruhannya hingga setara dengan standar kekeruhan 0,5 McF. Standar kekeruhan 0,5 McF sama dengan mengandung bakteri sejumlah 10^8 CFU/ml, menghasilkan absorbansi pada panjang gelombang 625 nm sebesar 0,08-0,10 (NCCLS, 2003).

Pengujian Aktivitas Antimikroba Dengan Metode *Broth Microdilution*

Sebanyak 100 µL *nutrient broth* dimasukkan dalam pelat mikro pada kolom pertama (sebagai kontrol negatif). Suspensi mikroba sebanyak 5 µl ditambahkan ke dalam 10 ml *nutrient broth* kemudian diaduk dengan alat vortex. Sebanyak 100 µl campuran tersebut dimasukkan dalam pelat mikro pada kolom kedua sampai kedua belas. Pada kolom kedua belas, ditambahkan 100 µl larutan antibiotik/ ekstrak kemudian dihomogenkan. Dari kolom kedua belas, diambil 100 µl kemudian dipindahkan ke kolom kesebelas. Pengenceran terus dilakukan sampai pada kolom ketiga yang akan memiliki konsentrasi terkecil. Pelat diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam kemudian diamati bagian yang jernih (tidak ada pertumbuhan mikroba). Konsentrasi terkecil di mana tidak terlihat pertumbuhan mikroba ditetapkan sebagai KHM (NCCLS, 2003). Sebanyak 5 µl aliquot dari setiap

bagian yang jernih dipindahkan dalam nutrient agar dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam kemudian diamati. Konsentrasi terendah di mana tidak terlihat adanya pertumbuhan mikroba ditetapkan sebagai KBM.

Penentuan *Killing Curve*

Penentuan *killing curve* dilakukan dengan menyiapkan inokulum awal mikroba dengan konsentrasi sekitar 10^6 CFU/ml. Pada inokulum, ditambahkan antimikroba dengan konsentrasi akhir 1, 2, 4, dan 8 MIC kemudian diinkubasi pada 37°C. Pada 0, 1, 2, 3, 5 dan 24 jam setelah inkubasi, 100 µl aliquot dari tiap konsentrasi antimikroba diambil dan diencerkan secara bertahap kemudian diinokulasikan pada media agar. Setelah diinkubasi selama 24 jam pada 37°C, koloni mikroba pada agar dihitung dan dibuat grafik log CFU/ml terhadap waktu. Semua dilakukan sebanyak dua hingga tiga kali percobaan (Sambatakou, H., *et. al.*, 1998; Betriu, Carmen, *et. al.* 1994).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pada awal penelitian, tumbuhan yang digunakan dideterminasi untuk mengetahui kebenaran identitas botani tumbuhan tersebut. Hasil determinasi tumbuhan menunjukkan bahwa jenis tumbuhan adalah *Petiveria alliaceae*. Ekstraksi dilakukan dengan menggunakan etanol. Etanol merupakan pelarut universal yang dapat menarik sebagian besar senyawa polar, sebagian kecil senyawa semi polar, dan sebagian kecil senyawa non-polar sehingga diharapkan dapat menarik berbagai senyawa dalam simplisia. Dari hasil ekstraksi, diperoleh rendemen ekstrak seperti tertera pada Tabel 1.

Tabel 1. Rendemen ekstrak singawalang

Jenis	Rendemen(%)
Daun segar maserasi	7.31
Daun kering maserasi	10.68
Daun kering refluks	8.94
Batang segar maserasi	3.53
Akar segar maserasi	3.86

Pemeriksaan kandungan kimia ekstrak dilakukan untuk mengetahui golongan senyawa yang terdapat di dalam ekstrak. Hasil pemeriksaan kandungan kimia ekstrak dapat dilihat pada Tabel 2. Karakterisasi ekstrak bertujuan untuk mengetahui spesifikasi ekstrak yang digunakan. Spesifikasi ekstrak ini penting dalam penggunaan ekstrak sebagai bahan baku obat. Karakterisasi ekstrak yang dilakukan meliputi penetapan kadar abu total, kadar abu larut air, kadar abu tidak larut asam, kadar air, kadar sari larut air, kadar sari larut etanol, dan susut pengeringan ekstrak. Hasil karakterisasi ekstrak dapat dilihat pada Tabel 3. Ekstrak yang dilakukan karakterisasi terbatas hanya kepada ekstrak yang memberikan aktivitas antibakteri yang baik.

Tabel 2. Hasil penapisan fitokimia ekstrak

Golongan senyawa	Ekstrak				
	DSM	DKM	DKR	BSM	ASM
Alkaloid	+	+	+	+	+
Saponin	-	-	-	-	-
Fla-vonoid	+	+	+	+	+
Steroid	-	-	-	-	-
Kuinon	-	-	-	-	-
Tanin	+	+	+	+	+

Keterangan: DSM, Daun segar maserasi; DKM, daun kering maserasi; DKR, daun kering refluks; BSM, batang segar Maserasi; ASM, Akar segar maserasi
 + = ekstrak mengandung golongan senyawa tersebut
 - = ekstrak tidak mengandung golongan senyawa tersebut

Tabel 4. Hasil penentuan nilai KHM dan KBM pada berbagai mikroba

Mikroba	T($\mu\text{g/mL}$)		S($\mu\text{g/mL}$)		A($\mu\text{g/mL}$)		DK($\mu\text{g/mL}$)		DS($\mu\text{g/mL}$)		DR($\mu\text{g/mL}$)		AS($\mu\text{g/mL}$)		BS($\mu\text{g/mL}$)	
	KHM	KBM	KHM	KBM	KHM	KBM	KHM	KBM	KHM	KBM	KHM	KBM	KHM	KBM	KHM	KBM
MSCNS 5	1	4	1	2	8	32	256	512	512	-	256	-	256	-	256	-
PA	64	256	1	8	-	-	16	256	64	256	-	-	256	512	128	512
BS	1	4	1	2	64	-	32	256	64	512	64	256	256	-	256	-
BC																
KCCM 40152	1	4	1	2	512	-	54	-	512	-	-	-	-	-	-	-
S. A																
KKCM 11764	1	2	1	4	4	16	16	128	64	512	256	-	512	-	512	-
MRSA 25	8	64	1	16	256	-	16	-	256	-	-	-	512	-	-	-
<i>E. coli</i>																
ATCC 8934	4	16	1	4	32	32	32	512	32	256	64	-	256	-	256	-
MRCNS 24	1	4	2	6	64	512	16	256	256	-	128	-	256	-	-	-
MSSA 2	1	4	1	4	1	8	128	512	512	-	512	-	-	-	-	-
VRE 8-5	1	32	32	-	128	-	256	-	512	-	512	-	512	-	512	-

Keterangan: KHM = Konsentrasi Hambat Minimum, KBM= Konsentrasi Hambat Maksimum, S= siprofloksasin, T= tetrasiklin, A= Ampisilin, DS= Ekstrak Daun segar maserasi, DK= Ekstrak Daun kering maserasi, DR= Ekstrak Daun kering refluks, AS= Ekstrak akar segar maserasi, BS= ekstrak batang segar maserasi, MSSA= Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus*, MSCNS= Methicillin-Susceptible Coagulase-Negative *Staphylococcus*, MRCNS= Methicillin-Resistant Coagulase-Negative *Staphylococcus*, MRSA= Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, VRE= Vancomycin-Resistant *Enterococcus*, PA= *Pseudomonas aeruginosa*, BS= *Bacillus subtilis*, BC= *Bacillus cereus*, SA= *Staphylococcus aureus*, EC= *Escherichia coli*, - = nilai > 512 $\mu\text{g/mL}$

Tabel 3. Hasil karakterisasi ekstrak

Jenis Pengujian	Daun Segar Maserasi(%)	Daun Kering Maserasi(%)
Kadar abu total	2,40	9,20
Kadar abu larut air	1,90	4,00
Kadar abu tidak larut asam	1,44	0,83
Kadar sari larut etanol	10,60	9,50
Kadar sari larut air	6,10	6,54
Kadar air	26,00	20,00
Susut pengeringan	28,00	37

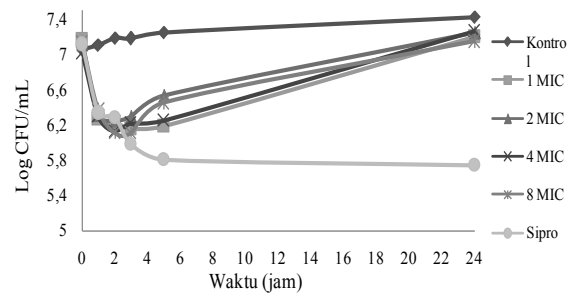
Pada pengujian aktivitas antimikroba dengan metode *broth microdilution*, diperoleh hasil seperti yang tertera pada Tabel 4. Dari pengujian tersebut, terlihat bahwa ekstrak yang memiliki aktivitas cukup baik adalah ekstrak etanol daun kering maserasi terhadap sepuluh bakteri yaitu MSCNS, *P.aeruginosa*, *B.subtilis*, *B.cereus*, *S.aureus*, MRSA, *E.coli*, MRCNS, MSSA, dan VRE dengan nilai KHM berturut turut 256, 16, 32, 64, 16, 16, 32, 16, 128, 256 µg/ml.

Pada penentuan KHM dan KBM diperoleh bahwa pada penyiapan singawalang daun kering yang diekstraksi dengan metode maserasi memiliki aktivitas yang lebih baik dari semua sampel uji. Pada daun, akar dan batang segarpun memiliki aktivitas antibakteri terhadap hampir semua mikroba uji, namun memiliki konsentrasi hambat yang lebih besar jika dibandingkan terhadap ekstrak daun kering maserasi. Hal ini dimungkinkan karena senyawa yang terkandung lebih banyak tertarik dalam keadaan kering, serta bahan yang berkhasiat sebagai antibakteri memiliki sifat tidak tahan panas.

Dari hasil pengujian KHM, dilakukan penentuan kurva aktivitas terhadap waktu ekstrak daun kering maserasi terhadap MRCNS (Gambar 1), MRSA (Gambar 2), VRE (Gambar 3), pada konsentrasi 1, 2, 4, dan 8 KHM.

Pada Gambar 1 kurva aktivitas terhadap waktu untuk bakteri MRCNS menandakan aktivitas antibakteri bakteri-

osatik, dimana pertumbuhan bakteri dihambat pada jam ke 1, 2 dan 3, kemudian bakteri tumbuh kembali di jam ke 5 hingga jam ke 24. Hal ini menandakan khasiat antibakteri dari ekstrak sudah kurang sehingga perlu penambahan lagi senyawa ekstraknya. Untuk antibiotika pembanding siprofloksasin, memberikan aktivitas anti bakteri bakterisid, dimana pertumbuhan bakteri terus menurun dan stabil hingga jam ke 24.

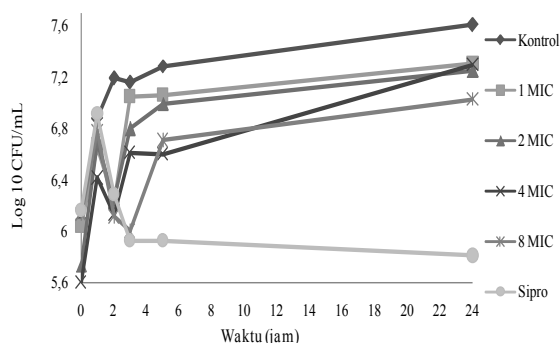


Gambar 1. Kurva aktivitas terhadap waktu bakteri MRCNS, dengan pemberian ekstrak etanol daun singawalang kering maserasi, pada berbagai konsentrasi dan pembanding sipro- foksasin Keterangan: 1 KHM= 16 µg/ml, 2 KHM= 32 µg/ml, 4 KHM= 64µg/ml, 8 KHM= 128 µg/ml, Sipro= Siprofloksasin 2 µg/ml

Kekuatan aktivitas antibakteri ekstrak pada pengujian antibakteri dengan *Broth Microdilution Method* memiliki 4 kategori, dimana KHM kurang dari 100 µg /ml dinyatakan memiliki aktivitas anti mikroba yang baik; 100 hingga 500 µg/ml Laktivitas antimikroba adalah sedang; dan 500-1000 µg/ml Laktivitas anti mikroba lemah; lebih dari 1000 µg/ml Lekstrak itu dianggap tidak aktif (Holetz *et all*, 2002). Maka Singawalang memiliki aktivitas antimikroba yang cukup baik untuk bisa dikembangkan lebih lanjut.

Pada Gambar 2 kurva aktivitas terhadap waktu untuk bakteri MRSA menandakan aktivitas antibakteri bakteri osatik. Pertumbuhan bakteri mulai dihambat pada jam ke 2 dan 3, kemudian bakteri tumbuh kembali pada jam ke 5 hingga jam ke 24. Hal ini menandakan khasiat antibakteri dari ekstrak sudah kurang sehingga perlu penambahan lagi senyawa ekstraknya. Untuk antibiotika

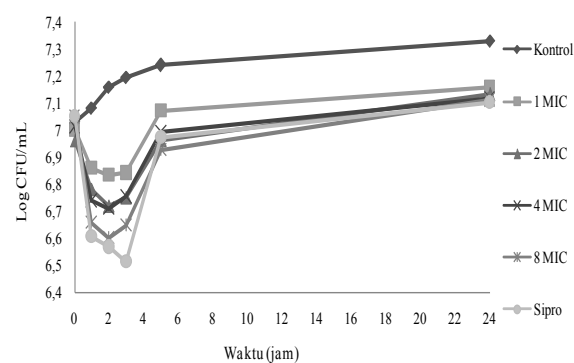
pembandingan siprofloksasin, memberikan aktivitas anti bakteri bakterisid, dimana pertumbuhan bakteri terus menurun pada jam ke 2 dan stabil hingga jam ke 24.



Gambar 2. Kurva aktivitas terhadap waktu bakteri MRSA, dengan pemberian ekstrak etanol daun singawalang kering maserasi, pada berbagai konsentrasi dan pembandingan siprofloksasin Keterangan: 1 KHM= 16 µg/ml, 2 KHM= 32 µg/ml, 4 KHM= 64 µg/ml, 8 KHM= 128 µg/ml, Sipro= Siprofloksasin 2 µg/ml

Pada Gambar 3 kurva aktivitas terhadap waktu untuk bakteri VRE menandakan aktivitas anti bakteri bakteriosatik. Pertumbuhan bakteri dihambat pada jam ke 1, 2 dan 3, kemudian bakteri tumbuh kembali di jam ke 5 hingga jam ke 24. Hal ini menandakan khasiat anti bakteri dari ekstrak sudah kurang sehingga perlu penambahan lagi senyawa ekstrak. Untuk anti biotika pembandingan siprofloksasin, memberikan aktivitas anti bakteri bakteriosatik dengan daya hambat sama dengan konsentrasi ekstrak di 4 dan 8 KHM.

Dari hasil penentuan kurva aktivitas terhadap waktu, terlihat bahwa ekstrak etanol daun kering maserasi bersifat bakteriosatik terhadap bakteri yang diujikan. Pada MRCNS dan MRSA, obat pembandingan memiliki sifat kerja bakterisidal, terlihat dari pertumbuhan bakteri yang stabil mendekati angka terkecil. Untuk VRE obat pembandingan menunjukkan sifat kerja yang sama dengan ekstrak singawalang yaitu bakteriosatika. Efek menghambat pertumbuhan bakteri untuk obat pembandingan pada VRE mendekati efeknya pada konsentrasi ekstrak 4 dan 8 KHM.



Gambar 3. Kurva aktivitas terhadap waktu bakteri VRE, dengan pemberian ekstrak etanol daun singawalang kering maserasi, pada berbagai konsentrasi dan pembandingan siprofloksasin Keterangan: 1 KHM= 256 µg/ml, 2 KHM= 512 µg/ml, 4 KHM= 1024 µg/ml, 8 KHM= 2048 µg/ml, Sipro= Siprofloksasin 64 µg/ml

SIMPULAN

Dari pengujian aktivitas antimikroba dengan metode *broth microdilution*, pengujian aktivitas dibedakan dari penyiapan tanaman, berupa daun kering, daun segar, batang segar dan akar segar yang diekstraksi secara maserasi dan daun kering secara refluks menggunakan etanol. Dari pengujian tersebut, ekstrak etanol daun kering maserasi cukup baik terhadap sepuluh bakteri MSCNS (*Methicillin-susceptible coagulase-negative Staphylococcus*), *P.aeruginosa*, *B.subtilis*, *B.cereus*, *S.aureus*, MRSA (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*), *E coli*, MRCNS (*Methicillin-resistant coagulase-negative Staphylococcus*), MSSA (*Methicillin-susceptible Staphylococcus aureus*), dan VRE (*Vancomycin-resistant Enterococcus*) dengan nilai *Minimum Inhibitory Concentration* (KHM) berturut turut 256, 16, 32, 64, 16, 16, 32, 16, 128, 256 µg/mL. Dengan demikian singawalang memiliki aktivitas antimikroba yang cukup baik untuk bisa dikembangkan lebih lanjut. Hasil penentuan kurva aktivitas terhadap waktu menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun kering maserasi bersifat bakteriosatik terhadap bakteri resisten MRSA, VRE dan MRCNS pada konsentrasi 1 KHM, 2 KHM, 4 KHM, dan 8 KHM.

DAFTAR PUSTAKA

- Amer. F.A., El-Behedy. E.M., & Mohtady, H. A. 2008. New Target for Antibacterial Agents. *Biotechnology and molecular Biology Reviews*; Jun; Vol.3(3), 46-57
- Betriu. C., Gomez. M., Sanchez. A., Cruceyra. A., J. Romero., & Picazo. J.J. 1994. Antibiotic Resistance and Penicillin Tolerance in Clinical Isolates of Group B Streptococci. *Antimicrobial Agents and Chemo- therapy*; **38(9)**: 2183.
- Departemen Riset dan Teknologi. 2010. Agenda Riset Nasional 2010-2014. Lampiran keputusan Menteri Riset dan Teknologi.
- Departemen Kesehatan RI. Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat. 2000. Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan Direktorat Pengawasan Obat Tradisional; Jakarta
- Fabricant. D.S., & Farnsworth, N.R. 2001. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives*; Mar: 109(Suppl 1), 69–75
- Holetz, F.B., 2002, Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases, *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 97: 000-000.
- Sambatakou. H., Giamarellos. B.E.J., Grecka. P., Chrysouli. Z., & Giamarellou, H. 1998. In-vitro activity and killing effect of quinupristin/dalfopristin (RP59500) on nosocomial *Staphylococcus aureus* and interactions with rifampicin and ciprofloxacin against methicillin-resistant isolates. *J Antimicrob Chemother*; 41:349-55
- NCCLS. 2003. Methods for Dillution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard; Sixth Edition
- Tropical Plant Database–Anamu (*Petiveria alliacea*), Rain tree. <http://www.rain-tree.com/anamu.htm>, Accessed on 12 January 2010