

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek ekstrak daun *rosemary* (*Rosmarinus officinalis*) sebagai antimikroba terhadap bakteri *Escherichia coli* secara *in vitro*. Selain untuk mengetahui hubungan antara ekstrak daun *rosemary* dengan pertumbuhan *E. coli*, penelitian ini juga bertujuan untuk mengetahui Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM) ekstrak daun *rosemary* terhadap *E. coli*. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah *tube dilution test* untuk mengetahui KHM dan dengan menggunakan media *Nutrient Agar Plate* (NAP) untuk menentukan KBM.

Ekstrak yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dengan cara ekstraksi metode *macerasi* pada 120 gram daun *rosemary* kering. Ekstraksi dilakukan di Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang. Ekstraksi daun *rosemary* ini menggunakan pelarut etanol 96%, karena etanol relatif tidak merusak senyawa kimia aktif yang terdapat dalam daun *rosemary*. Dari hasil ekstraksi diperoleh campuran zat padat dan cair yang berwarna coklat gelap. Untuk menentukan bahwa ekstrak merupakan ekstrak yang steril maka pada penelitian pendahuluan dilakukan uji terhadap bahan ekstrak. Hasil uji tersebut menunjukkan ekstrak tersebut steril.

Isolat bakteri yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Sebelum digunakan untuk penelitian, *E. coli* diidentifikasi terlebih dahulu dengan pewarnaan Gram, penanaman pada media Eosin-Methylen Blue (EMB), dan *Microbact System test*. Hasil identifikasi bakteri dari pewarnaan Gram,

didapatkan gambaran bentuk basil Gram negatif, yang ditandai dengan bakteri berbentuk batang berwarna merah.

Sebelum melakukan penelitian ini, peneliti melakukan penelitian pendahuluan terlebih dahulu untuk menentukan konsentrasi ekstrak yang akan digunakan dalam penelitian ini. Pada eksplorasi dosis pertama, digunakan konsentrasi serial ekstrak 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, dan 1,56% yang kemudian ditambahkan biakkan bakteri sejumlah 1ml sehingga didapatkan konsentrasi akhir 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, 1,56% dan 0,78%. Pada eksplorasi ini didapatkan hasil masih didapatkan pertumbuhan bakteri pada semua konsentrasi, namun pada konsentrasi 25% sudah tampak penghambatan pertumbuhan ditandai dengan berkurangnya pertumbuhan bakteri secara signifikan antara konsentrasi 25% dan 12,5%. Oleh karena itu, pada eksplorasi dosis kedua digunakan konsentrasi yang berkisar di konsentrasi akhir 25%, yaitu 24%, 24,5%, 25%, 25,5%, dan 26%. Dari eksplorasi dosis kedua didapatkan hasil penghambatan pada semua konsentrasi, ditandai dengan sedikitnya koloni bakteri yang tumbuh pada setiap konsentrasi. Karena perbedaan jumlah koloni yang kurang signifikan (hanya terdapat sedikit perbedaan jumlah koloni pada setiap konsentrasi, pada eksplorasi dosis ketiga, rentang konsentrasi dinaikkan menjadi 23%, 24%, 25%, 26%, dan 27%. Pada ekplorasi dosis ketiga, didapatkan hasil dengan perbedaan koloni yang lebih signifikan, yaitu 281 koloni pada konsentrasi 23%, 54 koloni pada konsentrasi 24%, 32 koloni pada konsentrasi 25%, 6 koloni pada konsentrasi 26%, dan 0 koloni pada konsentrasi 27%. Oleh karena hasil eksplorasi ketiga yang signifikan, maka ditentukan konsentrasi yang tepat pada penelitian ini yaitu 23%; 24%; 25%; 26% dan 27%. Dalam penelitian ini menggunakan 6 macam perlakuan (konsentrasi 0%, 23%;

24%; 25%; 26% dan 27%), sehingga pengulangan yang dibutuhkan adalah empat kali pengulangan (Solimun, 2001).

Kadar Hambat Minimum (KHM) pada penelitian ini diperoleh secara kualitatif dengan melihat kejernihan dari tabung reaksi yang berisi campuran antara kultur bakteri dan ekstrak dengan berbagai konsentrasi setelah diinkubasikan selama 24 jam. Pada penelitian ini didapatkan Kadar Hambat Minimum pada kisaran konsentrasi ekstrak 26%. Hal tersebut ditandai dengan warna cairan dalam tabung reaksi dengan konsentrasi 26% yang tampak jernih. Hal ini menunjukkan adanya aktivitas hambatan pertumbuhan bakteri oleh ekstrak daun *rosemary* yang mulai muncul pada konsentrasi 26% dengan cara menghambat sintesis protein, adhesi bakteri, sintesa asam nukleat, metabolisme energi, dan meningkatkan permeabilitas membran.

Setelah menentukan KHM, dilanjutkan dengan menentukan Kadar Bunuh Minimum (KBM) secara kuantitatif dengan penghitungan koloni *E.coli* pada NAP. Hasil dilusi tabung digoreskan pada NAP dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. KBM ditentukan dengan melihat pertumbuhan koloni pada media NAP. Dari penanaman pada NAP, didapatkan kadar bunuh pada penelitian ini berkisar pada konsentrasi 27% di mana tidak didapatkan pertumbuhan koloni sama sekali. Sebelum menentukan KBM, telah dilakukan perhitungan jumlah koloni pada masing-masing konsentrasi.

Pada konsentrasi 23% pertumbuhan koloni hampir sama dengan konsentrasi 0% (KK). Pada konsentrasi 24% dan 25% pertumbuhan koloni mulai menurun, sedangkan konsentrasi 26% jumlah koloni menurun secara signifikan. Hal ini dikarenakan pada konsentrasi 26% ekstrak *rosemary* mulai bekerja dengan baik pada dinding sel yang mengakibatkan lisisnya dinding sel dan

berakhir pada lisisnya bakteri itu sendiri, dengan kata lain pada konsentrasi 26%, pertumbuhan bakteri mulai terhambat, sedangkan pada konsentrasi 27% sudah tidak ada lagi pertumbuhan bakteri dengan ditandai tidak adanya koloni bakteri sama sekali.

Penelitian lain yang menggunakan ekstrak *rosemary* seperti yang dilakukan Klancnik,dkk (2009) menyebutkan bahwa ekstrak etanol 96% daun *rosemary* memiliki aktivitas antimikroba terhadap bakteri Gram positif *Staphylococcus aureus* dan *Bacillus cereus* pada konsentrasi 0,078 sampai 5,0 mg/ml. Dari penelitian yang sama, didapatkan pula hasil aktivitas antimikroba ekstrak etanol 96% daun *rosemary* pada bakteri Gram negatif *Salmonella sp.* pada konsentrasi 5,0 sampai 10,0 mg/ml, sedangkan pada bakteri Gram negatif *Campylobacter* didapatkan resistensi terhadap ekstrak daun *rosemary*.

Pada penelitian oleh Massih, dkk (2010) yang meneliti pengaruh ekstrak daun *rosemary* pada bakteri Gram negatif *Escherichia coli* dan *Klebsiella Pneumoniae* dengan pelarut ekstraksi *ethyl-acetate* dan ethanol 80% menunjukkan bahwa aktivitas antimikroba pada ekstrak daun *rosemary* dengan pelarut *ethyl-acetate* berkisar pada konsentrasi 2,5-5,0 μ g/ μ L, sedangkan dengan pelarut ethanol 80% pada konsentrasi diatas 40 μ g/ μ L.

Pola yang sama juga didapatkan pada hasil penelitian oleh Witkowska, dkk (2013), dimana pada penelitiannya, Witkowska, dkk meneliti tentang aktivitas antimikroba ekstrak beberapa bumbu masakan, diantaranya *rosemary* dengan berbagai pelarut seperti ethanol, *hexane*, dan air. Kemudian ekstrak tersebut dicobakan pada beberapa bakteri Gram positif (*Staphylococcus aureus*, *Listeria innocua*) dan Gram negatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*). Dari penelitian tersebut didapatkan hasil bahwa ekstrak daun *rosemary* dengan

pelarut ethanol memiliki aktivitas antimikroba terhadap bakteri Gram positif pada konsentrasi 1,25-2,5 mg/ml dan terhadap bakteri Gram negatif pada konsentrasi 5,0-10,0 mg/ml.

Dari pemaparan di atas, dapat dikatakan ekstrak daun rosemary memiliki efek antibakteri terhadap bakteri Gram positif maupun Gram negatif. Jika dilihat baik pada penelitian ini maupun penelitian lain yang menggunakan ekstrak daun *rosemary* dapat ditemukan pola bahwa bakteri Gram positif tampak lebih sensitif terhadap ekstrak daun *rosemary*, sedangkan bakteri Gram negatif tampak lebih resisten (diperlukan dosis lebih besar untuk memberi efek antimikroba). Resistensi pada bakteri Gram negatif bisa diakibatkan oleh adanya lapisan lipopolisakarida pada sekeliling dinding sel bakteri sehingga menghambat perlekatan zat aktif ekstrak pada dinding sel. Sedangkan pada bakteri Gram positif hanya didapatkan lapisan tunggal dinding sel sehingga mempermudah kerja zat antimikroba (Inouye *et al.*,2001).

Dapat ditemukan perbedaan KHM dan KBM pada penelitian-penelitian yang telah disebutkan. Perbedaan-perbedaan tersebut dapat disebabkan oleh faktor tanah, iklim di mana *rosemary* itu tumbuh, serta nutrisi yang diperoleh. Hal lain yang dapat menimbulk perbedaan KHM dan KBM adalah metode dan pelarut yang digunakan dalam membuat ekstrak daun *rosemary*. Dapat disimpulkan bahwa pelarut etil asetat lebih efektif sebagai pelarut dalam proses ekstraksi dibanding pelarut n-heksana dan pelarut yang digunakan pada penelitian ini yaitu etanol. Hal ini mungkin disebabkan oleh perbedaan polaritas dan titik didih dari masing-masing pelarut. Etil asetat yang bersifat semi-polar menarik senyawa organik lebih banyak dibanding n-heksana yang bersifat non-

polar. Sehingga semakin polar suatu pelarut, semakin tinggi pula sifat antimikroba dari hasil ekstraksinya (Markom, 2007).

Data jumlah koloni yang diperoleh dengan 4 kali pengulangan kemudian dianalisis dengan uji statistik menggunakan *software* SPSS 17,0. Pada tiap pengulangan didapatkan jumlah koloni yang berbeda-beda. Hal ini mungkin saja terjadi pada saat pemindahan bakteri dari tabung ke *plate* untuk ditanam atau mungkin saja konsentrasi ekstraknya kurang tepat. Untuk menghindari atau memperkecil bias tersebut, maka dilakukan pengulangan. Uji statistik yang digunakan meliputi uji beda non-parametrik Kruskal Wallis, uji multikomparasi Mann Whitney, dan uji korelasi non-parametrik Spearman. Semua analisis dihitung berdasarkan batas kepercayaan 95%, artinya kemungkinan kesalahan hasil penelitian berkisar 5%. Berdasarkan uji Kruskal Wallis didapatkan nilai signifikansi yaitu $p = 0,000$ ($p < 0,05$), menunjukkan bahwa perbedaan konsentrasi ekstrak mengakibatkan perbedaan jumlah koloni bakteri.

Uji multi-komparasi Mann Whitney dilakukan untuk melihat apakah terdapat perbedaan jumlah koloni bakteri antara dua macam dosis yang berbeda. Hasilnya didapatkan *p-values* yang signifikan ($p < 0,05$) pada hampir semua perbandingan antar masing-masing konsentrasi. Hal tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan jumlah koloni yang bermakna pada semua kelompok perlakuan jika dibandingkan antar kelompok perlakuan.

Uji korelasi non-parametrik Spearman dilakukan untuk melihat korelasi antara konsentrasi ekstrak dengan jumlah koloni bakteri. Hasil uji menunjukkan nilai signifikansi (*p-value*) 0,010, sehingga konsentrasi ekstrak memiliki korelasi dengan jumlah koloni bakteri ($0,010 < 0,050$). Selain menghasilkan nilai

signifikansi korelasi antara kedua variabel, uji korelasi non-parametrik Spearman juga menunjukkan *Spearman correlation coefficient* (r) yang menunjukkan kekuatan korelasi antara dua variabel. Korelasi lemah ditunjukkan jika $r < 0,500$, korelasi sedang jika $r = 0,500-0,599$, korelasi kuat jika $r = 0,600-0,799$, dan korelasi sangat kuat jika $r > 0,799$. Pada penelitian ini didapatkan hasil uji $r = -0.982$, hal tersebut menunjukkan terdapat korelasi yang sangat kuat antara kedua variabel ($0.982 > 0.799$). Tanda negatif pada *Spearman correlation coefficient* penelitian ini menunjukkan korelasi di antara kedua variabel adalah berbanding terbalik, dimana semakin tinggi konsentrasi ekstrak, maka semakin rendah jumlah koloni bakteri.

Uji regresi linier memberikan nilai R^2 80,9% ($0,809 \times 100\%$) yang menunjukkan bahwa sebanyak 80,9% jumlah koloni bakteri dipengaruhi oleh paparan ekstrak, sedangkan 19,1% dipengaruhi oleh faktor lain, seperti waktu penyimpanan ekstrak yang lama sehingga menurunkan potensinya, resistensi bakteri terhadap ekstrak, suhu pada saat penyimpanan ekstrak, atau adanya kesalahan lain yang dapat terjadi selama penelitian. Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun *rosemary* dengan kandungan flavonoid, tanin, dan *phenolic diterpenes* mempunyai efek antimikroba terhadap bakteri, khususnya *E.coli*.

Fakta penurunan jumlah koloni *E. coli* dalam penelitian ini diduga karena efek dari senyawa-senyawa kimia aktif yang berasal dari ekstrak daun *rosemary*. Daun *rosemary* mengandung beberapa senyawa-senyawa kimia aktif misalnya *phenolic diterpenes* (*Carnosol*, *Carnosic acid*, *Rosmarinic acid*), flavonoid yang terekspresi dalam bentuk genkwanin, dan tannin dalam bentuk gallotanin.

Senyawa-senyawa tersebut memiliki sifat antimikroba dengan mekanisme yang berbeda-beda.

Phenolic diterpenes, carnosol dan *carnosic acid* merupakan zat bioaktif utama pada tanaman *rosemary*. Sebagai agen anti-bakteri, mekanisme *carnosol* dan *carnosic acid* dalam menghambat pertumbuhan bakteri adalah dengan merusak integritas dinding sel bakteri, sehingga terjadi kebocoran plasma. Jika dikombinasikan dengan antibiotik atau zat antimikroba lainnya, *carnosol* bekerja sinergis dengan menghambat *drug efflux pump* dan menaikkan permeabilitas sel bakteri sehingga memudahkan antibiotik masuk ke dalam sel bakteri (Horiuchi *et al.* 2007).

Flavonoid adalah polifenol yang hanya dapat disintesis dari tanaman. Senyawa flavonoid ini memiliki manfaat sebagai antioksidan sekaligus sebagai antimikroba. Senyawa flavonoid mempunyai kerja menghambat enzim topoisomerase II pada bakteri serta berikatan dengan protein bakteri. DNA gyrase termasuk salah satu dari enzim kelas topoisomerase II. DNA gyrase memilin untaian dari DNA, dengan menguraikan untaian DNA, sehingga asam nukleat tidak terbentuk. Flavonoid juga dapat bekerja dengan menurunkan fluiditas dari membran plasma, sehingga fungsinya menurun. Dalam menghambat sintesis DNA, flavonoid juga berlaku sebagai agen interkalasi dengan mengganggu ikatan hidrogen dengan deretan basa yang ada di DNA. Selain itu flavonoid dapat membentuk kompleks dengan protein ekstraseluler bakteri sehingga terjadi denaturasi protein (Robinson, 1991; Cowan, 1999; Melderer, 2002). Flavonoid dapat menghambat metabolisme energi bakteri dengan cara meninhibisi NADH sitokrom c pada proses transport elektron di

mitokondria, sehingga energi sel tidak terbentuk. Akibat tidak terbentuknya energi maka seluruh aktivitas sel akan terganggu (Chusnie dan Lamb, 2005).

Tannin adalah salah satu senyawa kimiawi yang termasuk dalam golongan polifenol yang diduga dapat mengikat salah satu protein yang dimiliki oleh bakteri yaitu adhesin dan apabila hal ini terjadi maka dapat merusak ketersediaan reseptor pada permukaan sel bakteri. Tannin telah dibuktikan dapat membentuk kompleks senyawa yang irreversibel dengan prolin, suatu protein lengkap, yang mana ikatan ini mempunyai efek penghambatan sintesis protein untuk pembentukan dinding sel (Agnol *et.al.*,2003). Selain itu, Chung *et al* melaporkan bahwa aktivitas antimikroba dari tannin terhadap bakteri intestinal diakibatkan karena kemamuan berikatan dengan besi (Fe). Tannin bertindak sebagai *siderophore* (zat pengikat besi/Fe) pada media sehingga ion Fe yang dibutuhkan bakteri tidak tersedia. Mikroorganisme anaerob membutuhkan ion Fe untuk berbagai macam aktifitas, seperti reduksi RNA dari DNA, pembentukan heme, dan fungsi penting lainnya. Sehingga tidak tersedianya ion Fe, maka kehidupan bakteri dapat terganggu (Chung *et al.*, 1998).

Selain ketiga senyawa diatas, senyawa aktif aromatik seperti *α -pinene*, *1,8-cineole*, *camphor*, *verbenone*, dan *borneol* pada ekstrak daun rosemary juga memegang peranan dalam aktivitas antimikroba, dimana *borneol* sebagai senyawa paling efektif untuk antibakteri diikuti *camphor* dan *verbenone*. (Isabeagloo *et al*, 2012). Mekanisme antibakteri dari senyawa aromatik ini adalah dengan merusak integritas membran sel (Fillipowicz, *et al.*, 2003).

Berdasarkan pemaparan di atas, dapat diketahui bahwa *rosemary* ternyata dapat bermanfaat sebagai zat antibakteri. Kandungan *phenolic diterpenes*, flavonoid,, dan tannin daun *rosemary* berpotensi sebagai antimikroba

terhadap *E.coli* secara *in vitro*. Penelitian ini memiliki validitas internal yang tinggi sebab menunjukkan korelasi yang sangat kuat antar variabel saat dilakukan uji statistik. Namun penelitian ini masih rendah dalam validitas eksternal karena hanya menggunakan satu macam isolat bakteri, sehingga masih sulit untuk digeneralisasikan. Meskipun penelitian ekstrak daun *rosemary* mempunyai efek terhadap *E. coli* secara *in vitro*, namun masih diperlukan uji lebih lanjut, baik itu tentang farmakokinetik, farmakodinamik, toksisitas, dan efek ekstrak ini pada hewan coba lain dan *clinical trial* pada manusia. Selain itu, perbedaan geografi dan juga metode ekstraksi dari daun *rosemary* mempengaruhi kandungan bahan aktif pada ekstrak daun *rosemary*, sehingga masih perlu diteliti lebih lanjut mengenai metode dan bahan pelarut untuk mendapatkan ekstrak yang lebih murni dan mengandung bahan aktif dalam jumlah yang lebih tinggi. Oleh karena itu masih diperlukan penelitian yang lebih luas dari penelitian ini agar nantinya dapat diaplikasikan secara klinis pada manusia.

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun *rosemary* memiliki efek antimikroba terhadap *E. coli*. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun *rosemary*, maka semakin rendah tingkat pertumbuhan *E. coli* yang ditandai dengan jumlah koloni yang semakin sedikit. Dengan demikian, hipotesis penelitian terbukti benar.