

## BAB 6

### PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun Akar Kucing (*Achalyphus indica Linn*) sebagai antimikroba terhadap *E.coli* secara *in vitro*. Selain untuk mengetahui hubungan antara ekstrak dan mengetahui seberapa besar pengaruh pemberian ekstrak daun Akar Kucing terhadap pertumbuhan *E.coli*, penelitian ini juga bertujuan untuk mengetahui Kadar Hambat Minimal dengan melihat kekeruhan pada suspensi ekstrak-bakteri dan Kadar Bunuh Minimal dengan menggunakan *Natrium Agar Plate* (NAP).

Isolat bakteri yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari *stock culture* Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Sebelum digunakan untuk penelitian, *E.coli* diidentifikasi terlebih dahulu dengan pewarnaan Gram dan penanaman pada medium EMB. Dari pewarnaan Gram, didapatkan gambaran bentuk bakteri batang (basil) Gram negatif, yang ditandai dengan warna merah pada bakteri, sedangkan dari penanaman pada medium EMB didapatkan koloni berwarna *metallic sheen*.

Ekstrak daun Akar Kucing yang digunakan dalam penelitian ini merupakan ekstrak cair hasil ekstraksi dengan pelarut ethanol 96%. Daun Akar Kucing yang digunakan diperoleh dari Materia Medica Batu, Malang. Didapatkan ekstrak daun Akar Kucing dengan konsentrasi 100% dengan warna hijau tua. Pelarut yang digunakan adalah etanol 96%. Karena pelarut etanol 96% merupakan pelarut yang bersifat universal yang dapat melarutkan senyawa polar maupun nonpolar sehingga

diharapkan dengan menggunakan pelarut etanol 96% zat aktif yang terkandung dalam daun Akar Kucing dapat tertarik sepenuhnya.

Sebelumnya, penulis telah melakukan penelitian pendahuluan sebelum mendapatkan konsentrasi dari perlakuan. Penelitian pendahuluan menggunakan konsentrasi ekstrak dengan pengenceran bertingkat (3,125%; 6,25%; 12,5%; 25%; 50%; 100%). Dari penelitian pendahuluan ini ditemukan bahwa tidak ada koloni *E.coli* yang terbentuk pada konsentrasi 12,5%. Kemudian menggunakan konsentrasi 6,25% sampai 12,5%. Dari konsentrasi tersebut ternyata tidak ditemukan koloni *E.coli* yang terbentuk. Sehingga penelitian dilanjutkan dengan menggunakan konsentrasi 6,5% sampai 7,5%. Dan hasil yang ditemukan adalah tidak ditemukannya koloni disemua media NAP. Penelitian dilanjutkan kembali dengan menggunakan konsentrasi 1% sampai 5% (karena pada konsentrasi 6,5% sudah tidak ditemukan koloni). Dan hasil menunjukkan bahwa koloni terbentuk sangat padat pada semua media NAP. Karena hasil yang belum bagus akhirnya penulis menggunakan konsentrasi 5% sampai 6%. Dan hasil menunjukkan masih banyak koloni yang terbentuk disemua media NAP. Selanjutnya, dicoba dengan konsentrasi 5% sampai 10% (karena pada penelitian pendahuluan pada konsentrasi 12,5% sudah tidak ditemukan bakteri, dan pada konsentrasi 6,25% ditemukan koloni bakteri yang mulai jarang). Dan ditemukan hasil bahwa tidak adanya koloni yang terbentuk pada semua konsentrasi. Penelitian selanjutnya adalah dengan konsentrasi 8% sampai 12%. Dan hasil menunjukkan jumlah koloni yang mulai jarang dan terlihat perbedaan jumlah koloni yang terbentuk pada media NAP. Dan dari hasil itulah, penulis memutuskan untuk menggunakan konsentrasi terakhir yaitu 10%, 12%, 14%,

16%, dan 18% atau 5%  $\frac{1}{v}$ , 6%  $\frac{1}{v}$ , 7%  $\frac{1}{v}$ , 8%  $\frac{1}{v}$ , 9%  $\frac{1}{v}$  sebagai konsentrasi perlakuan. Masing- masing konsentrasi perlakuan beserta dengan kontrol kuman, di streaking pada NAP (*Natrium Agar Plate*) kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 sampai 24 jam.

Kadar Hambat Minimal (KHM) dapat ditentukan dengan cara melihat perubahan kekeruhan pada masing- masing tabung setelah diinkubasi selama 18-24 jam. Nilai KHM diperoleh dari tabung yang tidak menunjukkan kekeruhan (tetap jernih). Akan tetapi, pada penelitian ini tidak dapat diketahui besarnya KHM secara jelas karena pada uji dilusi tabung yang diamati secara kualitatif, ekstrak daun Akar Kucing berwarna hijau pekat sehingga sulit diidentifikasi. Namun, pada konsentrasi 5%  $\frac{1}{v}$ , 6%  $\frac{1}{v}$ , 7%  $\frac{1}{v}$ , dan 8%  $\frac{1}{v}$  koloni bakteri masih terbentuk, namun secara berurutan (dari konsentrasi terendah hingga tertinggi) menunjukkan penurunan jumlah koloni. Hal ini menunjukkan adanya efek penghambatan pertumbuhan bakteri (bakteriostatik).

Kadar Bunuh Minimal (KBM) dapat dihitung dengan menggunakan *colony counter* pada medium NAP (*Natrium Agar Plate*). Dan dari hasil perhitungan tersebut, diketahui bahwa pertumbuhan koloni merupakan Kadar Bunuh Minimal (KBM) apabila jumlah koloni  $<0,1\%$  dari *original inokulum* pada tiap pengulangan, yaitu terletak pada ekstrak 9%  $\frac{1}{v}$ . Tidak ditemukan koloni bakteri sama sekali pada konsentrasi 9%  $\frac{1}{v}$ , sehingga konsentrasi 9%  $\frac{1}{v}$  ditentukan sebagai KBM. Dan ini merupakan konsentrasi ekstrak yang memberikan efek bakterisidal (membunuh bakteri)

Data jumlah koloni yang diperoleh, berdasarkan empat (4) kali pengulangan kemudian dianalisis dengan uji statistik menggunakan *software SPSS for windows* ver 13.0 dengan batas kepercayaan 95%. Pada tiap pengulangan didapatkan jumlah koloni yang berbeda-beda. Hal ini disebabkan salah satunya karena sensitivitas setiap isolat yang diteliti terhadap pemberian ekstrak mungkin berbeda. Uji statistik yang dipakai yaitu *One-way ANOVA*, regresi korelasi, serta analisis *Post hoc*. Artinya, kemungkinan kesalahan hasil penelitian berkisar 5%. Hasil uji *One-way ANOVA* menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0,000 ( $p < 0,05$ ), sehingga bisa disimpulkan bahwa dosis ekstrak mempunyai pengaruh yang nyata terhadap jumlah koloni *E.coli*. Hasil analisis korelasi 0,000 ( $p < 0,05$ ) menunjukkan bahwa hubungan dosis ekstrak daun Akar Kucing dan *Escherichia coli* sangat erat. Namun, nilainya negatif, artinya semakin tinggi dosis ekstrak maka semakin sedikit jumlah koloni bakteri yang tumbuh.

Berdasarkan nilai koefisien determinasi didapatkan bahwa 82% variasi jumlah koloni *E.coli* dipengaruhi oleh dosis ekstrak daun Akar Kucing. Sedangkan 18% lainnya dipengaruhi faktor lain yang tidak dapat dikontrol oleh peneliti, seperti waktu penyimpanan ekstrak yang lama sehingga menurunkan daya kerjanya, terjadi resistensi oleh *E.coli* itu sendiri, atau adanya *human error* saat dilakukan penelitian tersebut.

Pada penelitian yang sudah pernah dilakukan, disimpulkan bahwa ekstrak daun Akar Kucing memiliki kandungan yang dapat menghambat beberapa spesies bakteri. Penelitian yang dilakukan Anggun pada tahun 2008, menunjukkan bahwa ekstrak daun Akar Kucing (*Achalyphus indica Linn*) berpengaruh pada pertumbuhan

bakteri *Staphylococcus aureus*, yaitu dapat membunuh bakteri pada konsentrasi 15% (Anggun, 2008).

Efek antimikroba daun Akar Kucing terhadap bakteri *E.coli* diperkirakan diperankan oleh beberapa zat aktif yang larut dalam ethanol 96%. Zat- zat tersebut adalah flavonoid, saponin, tanin, dan alkaloid. Komponen flavonoid yang memiliki efek antibakteri memiliki kemampuan untuk membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut dari membrane bakteri (Cowan, 1999 ; Fowler, 2011 dalam Savoia, 2012).

Pada beberapa penelitian menunjukkan beberapa mekanisme efek antibakteri pada flavonoid misalnya aktifitas quercetin (salah satu turunan flavonoid) melalui inhibisi DNA gyrase, sedangkan sophoraflavone G dan Epigallocatechin galate menghambat fungsi membran sitoplasma dan licochalones A dan C menghambat metabolisme energi (Savoia, 2012). Saponin memiliki efek antibakteri. Saponin akan merusak membran sitoplasma yang kemungkinan mempunyai efek yang sinergis maupun adiktif dengan tanin dalam merusak permeabilitas sel bakteri. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Mandal P, *et al.* (2005) dikatakan bahwa saponin yang diisolasi dari tumbuhan *Acacia auriculiformis* mempunyai aktivitas dalam menghambat germinasi *Aspergillus ochraceous* dan *Culvularia lunata* pada dosis sekitar 300 µg/ml dan mampu menghambat pertumbuhan *Escherichia coli*, *Salmonella Typhii*, dan *Pseudomonas aeruginosa* pada dosis kurang lebih 700 µg/ml. Sedangkan pada penelitian ekstrak daun Akar Kucing yang sekarang dilakukan didapatkan kadar bunuh minimal pada dosis kurang lebih 9 µg/ml, hal ini kemungkinan disebabkan karena kandungan saponin pada daun Akar Kucing lebih

besar daripada saponin yang terdapat pada *Acacia auriculiformis*, atau adanya efek sinergisme antara tanin dengan saponin pada ekstrak daun Akar Kucing menyebabkan daya antimikroba bahan tersebut meningkat.

Serupa dengan tanin, flavonoid merupakan senyawa fenol yang berfungsi sebagai antibakteri dengan cara membentuk senyawa kompleks terhadap protein ekstraseluler yang mengganggu integritas membran dan dinding sel. Kedua bahan aktif ini juga kemungkinan mempunyai efek adiktif maupun sinergis. Selain itu, senyawa flavonoid mempunyai kerja menghambat enzim topoisomerase II pada bakteri yang dapat merusak struktur DNA bakteri dan menyebabkan kematian. Intinya, antimikroba hampir semuanya bekerja dengan mempengaruhi sintesa protein dan sintesa DNA, serta merusak integritas membran dan dinding sel bakteri yang akan mempengaruhi permeabilitas sel. Penelitian (2011) di Malaysia oleh Ehsan Karimi *et al.* menyebutkan bahwa flavonoid merupakan zat antimikroba yang ditemukan pada beberapa varietas *Labisia pumila*. Ditemukan pada *Labisia pumila* var. *alata* memiliki flavonoid tertinggi yaitu 811,2 µg/g dengan bakteri yang diujikan adalah *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumonia*, *Escherichia coli*, dan *Pseudomonas aeruginosa*. Oleh karena itu dapat diduga bahwa kandungan flavonoid dari ekstrak ethanol daun Akar Kucing pada penelitian ini mempunyai potensi sebagai antimikroba terhadap *Escherichia coli*.

Alkaloid merupakan nitrogen heterosiklik yang memiliki efek antimikroba. Pada penelitian oleh Damintoti *et al.* tahun 2005 di Italia menggunakan tanaman *Sida acuta* menunjukkan bahwa alkaloid memiliki efek antimikroba yang baik. Senyawa alkaloid yang dominan teridentifikasi adalah cryptolepin dan quindolin.

Dengan metode mikrodilusi agar, menunjukkan nilai KHM berkisar 16 sampai 400 µg/ml dan KBM berkisar 80 sampai lebih dari 400 µg/ml. Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah *S.aureus*, *E. Faecalis*, *Sal.typhi*, *E.coli*, dll. Oleh karena itu, jelas bahwa alkaloid merupakan zat aktif yang memiliki efek antimikroba sangat baik.

Sasaran utama zat antimikroba adalah dinding sel. Kandungan peptidoglikan pada bakteri Gram negatif lebih tipis, hanya 1 sampai 2 persen dari berat keringnya. Pada membran terluar bakteri terdapat lapisan lipopolisakarida. Senyawa- senyawa lipolik seperti tanin, saponin, dan flavonoid kemungkinan bisa berinteraksi dengan lapisan lipid, lipopolisakarida, pada membran luar bakteri sehingga merusak integritas dinding sel bakteri. Dinding sel bakteri Gram negatif yang terdiri dari lipopolisakarida lebih tipis daripada yang dimiliki oleh bakteri Gram positif, selain itu dinding selnya tidak selektif permeabel. Hal ini diduga dapat memudahkan penetrasi zat- zat dari luar ke dalam dinding sel (Kayser, 2005 ; University of Texas, 1995).

Berdasarkan hasil penelitian dan analisis yang dikhususkan pada daun Akar Kucing, disimpulkan bahwa ekstrak daun Akar Kucing mempunyai efek antimikroba dengan hubungan yang kuat terhadap *Escherichia coli* secara *in vitro*. Hal ini makin diperkuat dengan adanya hubungan yang kuat bukti- bukti tentang penelitian terkait yang telah dilakukan sebelumnya. Namun, penelitian ini masih memiliki kelemahan antara lain pada metode pembuatan ekstrak daun Akar Kucing masih sederhana sehingga tidak diketahui secara pasti proporsi jumlah bahan aktif yang terkandung di dalamnya dan zat aktif yang dominan berperan sebagai antimikroba. Mungkin bahan aktif itu bekerja sendiri untuk menimbulkan efek antimikroba atau mungkin

bekerjasama dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. KHM dalam penelitian ini juga tidak dapat ditentukan karena kekeruhan yang terjadi pada dilusi tabung sehingga pengamatan terhadap KHM tidak memungkinkan. Selain itu, tidak ada standarisasi pembuatan ekstrak bahan alam, sehingga ada kemungkinan apabila dilakukan di laboratorium yang berbeda, maka ekstrak yang dihasilkan kemungkinan memiliki efek yang berbeda. Kemungkinan yang lain adalah adanya variasi biologis dari masing-masing daun Akar Kucing. Daun Akar Kucing yang ditanam di daerah X mungkin memiliki efek yang tidak sama dengan daun Akar Kucing yang ditanam di tempat Y. Faktor lain yang juga mempengaruhi adalah lamanya penyimpanan. Semakin lama disimpan, sensitivitas ekstrak biasanya akan menurun. Akan tetapi, ada juga yang efeknya justru meningkat. Oleh karena itu, untuk penelitian-penelitian selanjutnya diperlukan adanya standarisasi seperti pemilihan bahan yang digunakan (daun Akar Kucing), alat ekstraksi serta lamanya masa simpan (jangka waktu ekstrak masih dapat digunakan sebagai antimikroba) sehingga diharapkan apabila dilakukan penelitian yang sama di tempat yang berbeda akan mendapatkan hasil yang relatif atau mungkin sama. Oleh sebab itu, untuk penerapan langsung di masyarakat, penelitian ini dapat dikatakan masih memerlukan banyak penelitian-penelitian lanjutan agar nantinya kandungan antibakteri yang didapatkan pada ekstrak daun Akar Kucing ini dapat diaplikasikan secara klinis.

Aplikasi klinis yang memungkinkan diterapkan dari penelitian ini adalah menggunakan ekstrak daun Akar Kucing sebagai pengobatan infeksi yang disebabkan oleh *E.coli* seperti vaginitis, diare baik pada anak maupun orang



dewasa, dll. Sedangkan penggunaan secara sistemik, masih memerlukan penelitian lebih lanjut yaitu melalui pengujian pada hewan coba maupun pengujian pada manusia (uji klinik). Sebelum calon obat baru dicobakan kepada manusia, dibutuhkan waktu untuk meneliti sifat farmakodinamik, farmakokinetik dan efek toksiknya pada hewan coba. Dalam studi farmakodinamik ini tercakup pengembangan teknik analisis untuk mengukur kadar senyawa tersebut dan metabolitnya dalam cairan biologis. Semuanya diperlukan untuk memperkirakan dosis efektif dan memperkecil risiko penelitian yang dilakukan pada manusia. Studi toksikologi pada hewan umumnya dilakukan sebanyak tiga (3) tahap yaitu penelitian toksisitas akut bertujuan mencari besarnya dosis tunggal yang membunuh 50% sekelompok hewan coba (LD50), penelitian toksisitas jangka panjang bertujuan meneliti efek toksik pada hewan coba setelah pemberian obat dalam jangka panjang, penelitian toksisitas khusus meliputi penelitian terhadap sistem reproduksi termasuk teratogenitas, uji karsinogenitas dan mutagenitas, serta uji ketergantungan. Sedangkan pengujian pada manusia (uji klinik) terdiri dari uji fase I sampai IV (Setiawati, 2007). Pada dasarnya uji klinik tersebut bertujuan untuk memastikan efikasi, keamanan, dan gambaran efek samping yang sering timbul pada manusia akibat pemberian suatu obat (Setiawati, 2007), dalam hal ini adalah obat yang berasal dari daun Akar Kucing.