

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek antibakteri ekstrak daun beringin (*Ficus benjamina* L.) terhadap bakteri *MRSA* secara *in vitro*. Bakteri *MRSA* merupakan salah satu bakteri patogen penyebab infeksi nosokomial di rumah sakit, dan menyebabkan banyak kerugian dengan memperpanjang masa perawatan di rumah sakit. Bakteri ini memiliki sifat resistensi yang kuat terhadap antibiotika, misalnya *penicillin* dan turunannya *methicillin*, serta mampu mengembangkan sifat resistensi dengan cepat, sehingga eradikasi infeksi menjadi lebih sulit. Obat antibiotik yang kini dipakai sebagai terapi untuk *MRSA* adalah *vancomycin*, dan *linezolid* (Swandika, *et al.*, 2011) namun harganya relatif cukup mahal, ketersediaan obat yang kurang dan efek samping toksis yang besar (Lee & Burnie, 1988). Oleh sebab itu, untuk menanggulangi masalah resistensi bakteri ini, diperlukan penelitian-penelitian mengenai potensi efek antibakteri dari ekstrak bahan-bahan alam yang mengandung komponen bioaktif yang bisa menghambat pertumbuhan bakteri *MRSA*. Diharapkan zat antibakteri yang berasal dari ekstrak bahan alam dapat memiliki efek samping yang lebih rendah dan harganya juga lebih terjangkau.

Penelitian ini menggunakan metode dilusi tabung yang bertujuan untuk mengetahui besar konsentrasi ekstrak daun beringin terendah yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *MRSA*. Isolat bakteri *MRSA* yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari *stock culture* Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Sebelum digunakan untuk penelitian, bakteri diidentifikasi dengan menggunakan pewarnaan Gram, uji katalase, uji koagulase

dan uji kepekaan terhadap *cefotixin* 30 µg, dimana hasil keempatnya positif yang berarti bakteri yang dipakai adalah benar *MRSA*.

Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian rupa hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan. Metode ekstrak dibuat dengan cara mengekstrak daun beringin hijau dengan pelarut etanol 96%. Etanol banyak digunakan sebagai pelarut berbagai bahan-bahan kimia yang ditujukan untuk konsumsi dan kegunaan manusia karena memiliki efek toksisitas minimal. Etanol dapat melarutkan alkaloid, glikosida, kurkumin, kumarin, antrakinon, flavonoid, steroid, dammar, saponin, tannin, dan klorofil (Noorhamdani, *et al.*, 2009).

Pada penelitian pendahuluan, ekstrak daun beringin dibuat dalam konsentrasi 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%, dan 1,625%, masing-masing sebanyak 1 ml di dalam tabung-tabung reaksi kecil yang telah disterilkan sebelumnya dengan menggunakan *autoclave*. Bakteri *MRSA* telah dibuat menjadi suspensi dalam media *Nutrient Broth* pada hari sebelumnya, dan diinkubasikan semalam pada suhu 37°C. Sebelum digunakan dalam uji dilusi tabung, bakteri *MRSA* dihitung dulu jumlah kepadatan koloninya dalam perbenihan cair *NB* dengan menggunakan spektrofotometer, dan dilakukan pengenceran dengan NaCl 0,9% steril hingga mendapatkan kepadatan koloni 10⁶ CFU/ml. Sebanyak 1 ml suspensi bakteri ditambahkan ke dalam masing-masing tabung reaksi, lalu diinkubasikan bersama dengan 1 tabung reaksi berisi konsentrasi 50% ekstrak daun beringin yang tidak dicampur bakteri (KB) dan 1 tabung reaksi berisi 2 ml suspensi bakteri tanpa dicampur ekstrak (KK) selama 24 jam pada suhu 37°C.

Dari hasil inkubasi tersebut, didapatkan bahwa kejernihan larutan ekstrak mulai tampak pada konsentrasi 25%. Kejernihan menandakan bahwa terjadi penghambatan pertumbuhan bakteri *MRSA*. Konsentrasi 12,5% menunjukkan sedikit kejernihan, sedangkan pada konsentrasi 6,25% dan di bawahnya terlihat sangat keruh yang hampir mendekati kekeruhan tabung KK. Pada KB terlihat jernih yang menunjukkan bahwa pada larutan ekstrak tidak didapati pertumbuhan bakteri. Selanjutnya, masing-masing hasil uji dilusi tabung dilakukan penggosokan atau *streaking* pada media NAP dan diinkubasikan kembali selama 24 jam pada suhu 37°C untuk menghitung jumlah koloni bakteri yang tumbuh dalam masing-masing konsentrasi ekstrak. Dari hasil *streaking* ini ditemukan bahwa pada KB, 50%, dan 25% tidak didapati pertumbuhan koloni bakteri, 12,5% didapati hanya sedikit koloni bakteri, pada 6,25% terdapat pertumbuhan koloni yang cukup banyak, namun berbeda secara signifikan dengan kerapatan koloni yang tumbuh pada konsentrasi 3,125%, 1,625% dan KK. Secara umum, dapat disimpulkan bahwa semakin kecil konsentrasi ekstrak daun beringin, semakin banyak koloni bakteri *MRSA* yang tumbuh.

Selanjutnya, ditentukan rentang konsentrasi ekstrak daun beringin yang hendak dipakai pada penelitian ini, yaitu mulai dari 6% hingga 12%, dengan interval 1% (6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, dan 12%). Kembali dilakukan uji dilusi tabung dan *streaking*, lalu jumlah koloni bakteri dihitung dengan menggunakan *colony counter*. Dari hasil uji kedua, didapati perbedaan jumlah koloni bakteri yang cukup signifikan pada setiap perbedaan konsentrasi ekstrak yang diberikan, dengan setiap peningkatan konsentrasi ekstrak, didapati jumlah koloni bakteri yang berkurang. Konsentrasi 6% menunjukkan pertumbuhan koloni yang cukup banyak, namun berkurang hampir setengahnya pada konsentrasi 7%. Konsentrasi 8% hanya menunjukkan jumlah koloni yang kurang dari 10.000

CFU/ml. Konsentrasi 9% menunjukkan satu koloni, sedangkan pada konsentrasi 10%, 11%, dan 12% tidak didapati pertumbuhan koloni bakteri *MRSA* satupun.

Dari setiap perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak empat kali, dan data hasil penghitungannya dimasukkan dalam uji statistik menggunakan program *SPSS for Windows*® versi 20.0 dengan batas kepercayaan 95%. Artinya, kemungkinan kesalahan hasil penelitian berkisar 5%. Uji statistik yang dilakukan adalah uji statistik parametrik ANOVA searah (*One Way Analysis of Variance*). ANOVA digunakan karena perbedaan hasil yang dicatat disebabkan dari perbedaan perlakuan peneliti pada setiap grup uji. Setelah melalui pengujian statistik dengan menggunakan uji *One Way ANOVA*, didapati bahwa memang terdapat pengaruh yang sangat signifikan antara konsentrasi ekstrak yang diberikan terhadap jumlah koloni bakteri *MRSA*, dengan nilai signifikansi 0,000 ($p < 0,05$). Dari hasil penghitungan nilai rata-rata jumlah koloni bakteri menggunakan ANOVA didapati bahwa konsentrasi 8% merupakan konsentrasi ekstrak terendah yang menunjukkan perubahan yang sangat signifikan pada jumlah koloni bakteri *MRSA*, sehingga dapat disimpulkan KHM dalam penelitian ini adalah 8%.

Untuk menilai konsentrasi ekstrak berapakah yang memiliki kemampuan penghambatan pertumbuhan bakteri yang tinggi hingga dapat membunuh bakteri (bakterisidal), dilakukan uji multikomparasi *Post Hoc Tukey*. Uji *Post Hoc Tukey* menunjukkan bahwa konsentrasi 10% mempunyai kemampuan penghambatan pertumbuhan bakteri yang paling baik dibandingkan kelompok-kelompok uji dengan konsentrasi yang lebih rendah, namun tidak berbeda signifikan dengan konsentrasi 11% dan 12%. Sehingga untuk KBM dalam penelitian ini digunakan konsentrasi 10%. Sedangkan untuk KHM dalam penelitian ini adalah 8%. Nilai KHM dapat ditentukan karena ekstrak berwarna relatif lebih jernih atau terang sehingga perbedaan kekeruhan antar larutan uji bisa dilihat.

Dari penelitian ini, ekstrak daun beringin terbukti memiliki potensi antibakteri terhadap bakteri *MRSA* secara *in vitro*, dengan KBM yang cukup rendah, yaitu 10%, dibandingkan dengan bahan-bahan lainnya, misalnya ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) yang memiliki KBM 40% (Yusup, 2010), ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) yang memiliki KBM 30% (Noorhamdani *et al.*, 2009), dan ekstrak daun mengkudu (*Morinda citrifolia*) yang memiliki KBM 70% (Diassanti, 2012). Daun kelor memiliki kandungan saponin yang sama seperti daun beringin, namun pada penelitian tersebut KHM dari ekstrak daun kelor terhadap *MRSA* tidak dapat ditentukan karena ekstrak berwarna hitam pekat (Yusup, 2010). Namun diperkirakan bahwa KHM dari ekstrak daun kelor terhadap *MRSA* masih lebih besar daripada KBM ekstrak daun beringin terhadap *MRSA*, sehingga dapat dikatakan bahwa ekstrak daun beringin lebih poten daripada ekstrak daun kelor sebagai antibakteri untuk *MRSA*. Bila dibandingkan dengan ekstrak daun pegagan dan ekstrak daun mengkudu yang sama-sama memiliki kandungan flavonol *quercetin* dan *kaempferol* serta saponin seperti beringin, ekstrak daun beringin menunjukkan kemampuan antibakteri yang lebih tinggi terhadap *MRSA* dengan KBM yang lebih kecil daripada KBM ekstrak daun pegagan. Hal ini mungkin bisa disebabkan karena daun beringin yang diekstraksi dengan pelarut etanol 96% memiliki kandungan bahan bioaktif antibakteri flavonoid dan saponin yang jauh lebih banyak daripada ketiga bahan alam lainnya yang diekstrak dengan menggunakan pelarut dan metode yang sama.

Pohon beringin telah dimanfaatkan dalam pengobatan tradisional di beberapa negara, seperti India dan Indonesia, untuk mengobati beberapa penyakit kulit tertentu, sakit perut, hipotensi dan disentri (Kanaujia, *et al* 2011). Kandungan bahan bioaktif yang paling tinggi dalam ekstrak daun beringin adalah flavonol yaitu *quercetin* dan *kaempferol* (Yarmolinsky, *et al* 2012), di samping adanya saponin, dan glikosida (Sukadana, 2011). Kandungan flavonol tersebut

juga telah diteliti memiliki efek hepatoprotektif pada tikus yang diinduksi dengan karbon tetraklorida (Kanaujia, *et al* 2011). Mekanisme antibakteri flavonol adalah dengan menghambat sintesis asam nukleat, protein, dan merusak membran sitoplasma yang menyebabkan kebocoran ion potassium, berakibat pada kematian sel bakteri, sehingga flavonol bekerja secara bakterisidal. *Quercetin* juga menghambat motilitas bakteri dan menurunkan resistensi bakteri terhadap antibakteri (Cushnie & Lamb, 2005). Flavonoid juga bekerja dengan cara menghambat sintesis asam nukleat dari bakteri, sehingga menghambat metabolisme sel dan mengganggu proses pembelahan sel bakteri, juga menurunkan resistensi bakteri terhadap antibakteri karena tidak bisa membentuk protein PBP-2.

Kandungan saponin dalam ekstrak daun beringin merusak integritas membran sel dengan cara berikatan dengan kolesterol penyusun membran sel bakteri dan menghambat aktivitas kanal ion membran sel. Dengan rusaknya membran sel bakteri, bakteri tidak akan mampu bertahan hidup karena ion-ion penting di dalam sitoplasma keluar. Terhambatnya aktivitas kanal ion membran sel membuat bakteri tersebut tidak mampu mempertahankan homeostatis selnya terhadap lingkungan sehingga akhirnya sel bakteri tersebut lisis dan mati. Saponin juga dapat menghambat sintesis asam nukleat dan metabolisme bakteri (Francis *et al.*, 2002). Saponin juga mampu menstimulasi imunitas tubuh host agar mampu membunuh bakteri (Soetan *et al.*, 2006; Francis *et al.*, 2008). Keduanya mempunyai efek bakterisidal terhadap bakteri *MRSA*.

Dengan melihat data hasil penelitian, yaitu adanya penurunan jumlah koloni bakteri *MRSA* seiring dengan peningkatan dosis ekstrak daun beringin, serta diperkuat dengan data kandungan bahan aktif ekstrak daun beringin yang mampu menghambat pertumbuhan *MRSA*, maka dapat dikatakan bahwa ekstrak

daun beringin terbukti memiliki efek sebagai antibakteri terhadap bakteri *MRSA*. Ini membuktikan bahwa hipotesis yang telah disusun sebelumnya adalah benar.

Aplikasi klinis dari hasil penelitian ini di dalam dunia kedokteran selain dapat dimanfaatkan sebagai salah satu alternatif antibiotik baru untuk mengatasi masalah resistensi bakteri, ekstrak daun beringin juga dapat digunakan secara topikal untuk pengobatan infeksi *MRSA* pada kulit, seperti impetigo, furunkel, karbunkel, dan selulitis. Ekstrak daun beringin dapat pula dimanfaatkan sebagai salah satu bahan aktif alami dalam suplemen makanan untuk menyeimbangkan sistem imun untuk membuat seseorang tidak mudah terkena infeksi, terutama bagi mereka yang sedang mengalami keadaan *immunocompromised*. Penggunaan lainnya adalah sebagai salah satu komposisi *alcohol based hand rubs* yang digunakan untuk mencegah terjadinya penyebaran infeksi nosokomial di rumah sakit dan pusat layanan kesehatan.

Jumlah kandungan bahan bioaktif antibakteri dalam daun beringin yang digunakan dalam penelitian ini dipengaruhi oleh adanya variasi biologis yang dimiliki pohon beringin. Variasi biologis tersebut dapat dipengaruhi oleh kondisi lingkungan geografis seperti jenis tanah, curah hujan, kelembaban udara, dan iklim di tempat tumbuh dari masing-masing pohon beringin. Faktor lain yang mungkin mempengaruhi adalah lamanya masa penyimpanan ekstrak sebelum dipakai untuk uji kepekaan bakteri. Semakin lama ekstrak disimpan, maka biasanya sensitivitas ekstrak tersebut akan menurun, sehingga menurunkan kemampuan antibakteri ekstrak tersebut.

Keterbatasan penelitian ini antara lain pada metode pembuatan ekstrak etanol daun beringin yang menggunakan metode maserasi yang bersifat sederhana, sehingga masih tidak diketahui secara pasti proporsi jumlah bahan aktif yang terkandung di dalam ekstrak. Tidak diketahui secara pasti pula bahan aktif manakah yang memiliki peran paling besar dalam menghambat

pertumbuhan *MRSA*, dan apakah bahan aktif tersebut dapat bekerja sendiri-sendiri atau bersama-sama dalam menghambat bakteri *MRSA*.

Keterbatasan lainnya dalam penelitian ini, yaitu pada keadaan penelitian *in vitro* yang seringkali kurang sesuai dengan pemakaian pada praktik sehari-hari secara *in vivo*, sehingga banyak faktor lain yang memiliki pengaruh signifikan terhadap hasil akhir efek antibakteri ekstrak daun beringin yang digunakan, seperti lama pemberian terapi, cara metabolisme bahan ekstrak di dalam tubuh makhluk hidup, serta tanda-tanda toksisitas akut dan kronis yang mungkin muncul pada saat terapi diberikan. Pada percobaan *in vivo* yang dilakukan untuk mengetahui efek hepatoprotektif ekstrak daun beringin pada mencit yang diinduksi karbon tetraklorida, tidak ditemukan tanda-tanda toksisitas akut pada hewan coba setelah pemberian dosis ekstrak daun beringin sebesar 2000 mg/kgBB selama 72 jam (Kanaujia, *et al.*, 2011). Namun untuk penggunaan ekstrak daun beringin sebagai antibakteri, masih perlu dilakukan uji klinis untuk mengetahui dosis pemberian ekstrak daun beringin yang mampu bekerja efektif sebagai antibakteri secara *in vivo*, lama terapi, cara pemberian terapi (oral, topikal atau parenteral), beserta bahaya toksisitasnya.

Selain itu, juga masih diperlukan pengetahuan mengenai efek ekstrak beringin terhadap jenis-jenis mikroorganisme patogen lainnya yang masih belum dapat diuji pada penelitian ini karena keterbatasan sumber daya yang dimiliki peneliti. Oleh karena itu masih diperlukan penelitian lanjutan secara *in vitro* maupun *in vivo*, serta uji klinis bertahap untuk mendapatkan pengetahuan yang lebih lengkap tentang pengaruh ekstrak daun beringin terhadap mikroorganisme patogen lainnya dan terhadap makhluk hidup agar hasil penelitian ini dapat diimplementasikan sebagai salah satu pilihan terapi untuk mengeradikasi penyakit-penyakit infeksi.