

Uji In Vitro Efek Antimikroba Ekstrak Daun Kenikir (*Cosmos caudatus H.B.K*) terhadap *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)

Antimicrobial In Vitro Study of Cosmos caudatus H.B.K Leaves Extract Towards Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA)

Zahrah Febianti

Laboratorium Biokimia, Fakultas Kedokteran, Universitas Jember

Jl. Kalimantan 37, Jember 68121, Indonesia, Telp./Fax. (+62331) 337877

e-mail korespondensi : zfebianti.fk@unej.ac.id

Abstrak

Daun kenikir (*Cosmos caudatus H.B.K*) mengandung senyawa aktif yang bermanfaat sebagai antimikroba, yaitu saponin, flavonoid, polifenol, minyak atsiri, costunolide, dan 4,4'-bipiridin. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan bahwa ekstrak daun kenikir memiliki efek antimikroba secara *in vitro* terhadap *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) yang merupakan gram positif. Penelitian ini menggunakan desain eksperimental dengan metode dilusi tabung. Sampel dalam penelitian ini adalah MRSA yang dimiliki oleh Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Kelompok perlakuan yaitu kelompok bakteri yang diberi ekstrak daun kenikir dengan konsentrasi 14%; 12%; 10%; 8%; dan 6%. Kelompok kontrol yaitu kelompok bakteri yang tidak diberi ekstrak atau konsentrasi 0%. Penelitian menunjukkan bahwa KHM (Kadar Hambat Minimal) tidak dapat ditentukan karena ekstrak daun kenikir berwarna hijau keruh. KBM (Kadar Bunuh Minimal) untuk MRSA adalah 14%. Analisis data dengan batas kepercayaan 95% menunjukkan adanya perbedaan bermakna pada efek peningkatan konsentrasi ekstrak terhadap jumlah koloni MRSA (Anova, $p=0,000$). Uji korelasi regresi menunjukkan adanya hubungan yang erat antara konsentrasi ekstrak dengan jumlah koloni yang tumbuh (Korelasi, $r=-0,754$, $p=0,000$ untuk MRSA). Kesimpulan dari penelitian ini adalah ekstrak daun kenikir memiliki efek antimikroba terhadap MRSA.

Kata Kunci : Ekstrak daun kenikir, *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA), antimikroba.

Abstract

Cosmos caudatus H.B.K leaves is known to have many active substances with antimicrobial effect such as saponin, flavonoid, poliphenol, volatile oil, costunolide, and 4,4'-bipyridin. This research is conducted to prove the antimicrobial effect of Cosmos caudatus leaves extract on gram positive Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in vitro. The sample of this research is served by Microbiology Laboratory of Brawijaya University. An experimental study with tube dilution method was carried out. The treated groups are groups of bacteria treated with Cosmos caudatus leaves extract with a range concentrations of 14%; 12%; 10%; 8%; and 6%. The control group is groups treated with 0% extract. The result indicates that the MIC (Minimal Inhibitory Concentration) can not be observed due to the extract's turbid green colour. The MBC (Minimal Bactericidal Concentration) is 14% for MRSA. Data analysis with CI=95% shows a significant difference of effects on the number of MRSA colonies growth (Anova, $p = 0,000$) with the change of extract concentrations. The correlation regression test shows a strong association between the extract concentration and the number of colonies growth (Correlation, $r = -0,754$, $p=0,000$). Cosmos caudatus leaves extract has antimicrobial effect on MRSA.

Keywords : *Cosmos caudatus leaves extract, Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA), antimicrobial.*

Pendahuluan

MRSA merupakan galur *Staphylococcus aureus* yang resisten terhadap metisilin. Galur ini sering menimbulkan masalah di klinik karena sifatnya yang resisten terhadap berbagai antibiotika golongan β -laktam (penisilin, nafsilin, dan sefalosporin) bahkan terhadap golongan antibiotika yang tahan terhadap penisilinase seperti metisilin dan oxasilin (Dzen, *et al.*, 2003). MRSA bisa menyebabkan infeksi dengan memasuki tubuh lewat kulit terbuka atau aliran darah. Bakteri ini bisa menyebabkan infeksi kulit seperti bisul dan impetigo, *cellulitis*, osteomielitis, bakteremia & sepsis, infeksi paru-paru, dan sebagainya (NSW Health, 2003).

Pada beberapa dekade terakhir, insiden infeksi MRSA terus meningkat. Di Asia, prevalensi infeksi MRSA mencapai 70% persen. Sedangkan di Indonesia pada tahun 2006 prevalensinya hingga 23,5%. Kecenderungan peningkatan insiden tersebut kemudian semakin diperparah dengan kian meluasnya penyebaran MRSA yang kini tidak hanya ditemukan di rumah sakit sebagai infeksi nosokomial, tetapi juga ditemukan di komunitas (Triana, 2008).

Sementara itu, usaha untuk mencari sumber antimikroba baru, terutama yang berasal dari tanaman indigenus yang terdapat di Indonesia terus dilakukan. Tumbuhan yang digunakan secara tradisional dapat dijadikan sebuah alternatif pencarian senyawa antimikroba, karena pada umumnya memiliki senyawa aktif yang berperan sebagai senyawa antimikroba (Ardiansyah, 2007). Di dalam penelitian ini, penulis ingin mempergunakan daun kenikir (*Cosmos caudatus H.B.K*) sebagai bahan antimikroba karena daun ini mengandung saponin, flavonoid, polifenol dan minyak atsiri (Fuzzati, *et al.*, 1995). Penelitian lain menunjukkan bahwa ekstrak kloroform daun kenikir mengandung *costunolide* dan 4,4'-bipyridin yang memiliki efek sebagai antimikroba (Ragasa, *et al.*, 1997).

Oleh karena itu, maka penulis tertarik untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus H.B.K*) terhadap pertumbuhan bakteri *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) dalam studi *in vitro*.

Metode Penelitian

Pada penelitian ini penulis menggunakan metode penelitian eksperimental dengan uji laboratorium yang bertujuan untuk mengetahui dan membuktikan efek antimikroba dari ekstrak daun kenikir terhadap pertumbuhan koloni MRSA. Adapun uji kepekaan antimikroba yang dipakai adalah uji kepekaan antimikroba dengan metode dilusi tabung. Metode dilusi tabung dengan mempergunakan ekstrak daun kenikir ini meliputi 2 tahap, yaitu tahap pengujian bahan di media cair dengan tujuan untuk mencari seberapa besar Kadar Hambat Minimum (KHM), kemudian dilanjutkan dengan tahap penggoresan pada media NAP yang ditujukan untuk menentukan Kadar Bunuh Minimum (KBM) dari daun kenikir tersebut dalam kaitannya dengan penghambatan pertumbuhan koloni MRSA.

Sampel yang digunakan di dalam penelitian ini adalah bakteri MRSA yang dimiliki oleh Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang. Jumlah koloni kuman distandardisasi menjadi 10^6 CFU/ml. Banyaknya pengulangan dihitung dengan menggunakan rumus (Solimun, 2001), sehingga ditemukan bahwa banyaknya pengulangan yang diperlukan dalam penelitian ini paling sedikit adalah 4.

Data yang dikumpulkan meliputi konfirmasi spesies kuman, KHM, dan KBM untuk masing-masing kuman.

Hasil Penelitian

Konfirmasi Spesies Kuman

Dari proses konfirmasi terhadap masing-masing spesies kuman, didapatkan hasil seperti pada tabel 1 untuk MRSA.

1. Hasil Penentuan KHM

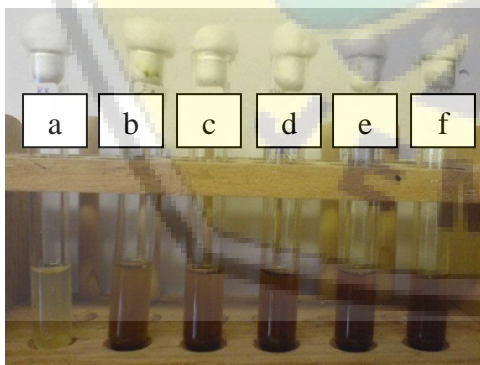
Kadar Hambat Minimal (KHM) adalah konsentrasi antimikroba terendah yang mampu menghambat pertumbuhan kuman (ditandai dengan tidak adanya kekeruhan pada tabung) (Forbes, *et al.*, 2008), setelah diinkubasikan selama 18-24 jam. Kejernihan larutan ekstrak daun kenikir ini dikonfirmasi dengan larutan kontrol bahan yang terdiri dari ekstrak daun kenikir sebanyak 2 ml. Tabung yang jernih dengan konsentrasi ekstrak

terendah menunjukkan Kadar Hambat Minimum (KHM).

Tabel 1. Hasil Tes Konfirmasi terhadap MRSA

Tes Konfirmasi MRSA	Hasil
Pewarnaan gram	Kokus, gram positif
Kultur pada NAP/ <i>Nutrient Agar Plate</i>	Koloni kuning emas
Tes katalase	Positif
Tes koagulase	Positif
Kultur pada <i>Manitol Salt Agar</i>	Meragikan manitol menyebabkan adanya daerah terang berwarna kuning di sekitar koloni
Tes sensitivitas terhadap metisilin	Resisten

Dari pengamatan terhadap hasil dilusi tabung, peneliti tidak dapat menentukan KHM ekstrak daun kenikir pada MRSA (gambar 1), karena warna ekstrak daun kenikir yang keruh sehingga tidak dapat dibedakan derajat kekeruhannya pada masing-masing tabung.



Gambar 1. Hasil Uji Dilusi Tabung MRSA

Keterangan Gambar :

- Kontrol Positif (KP) / Konsentrasi ekstrak daun kenikir 0%
- Ekstrak daun kenikir dengan konsentrasi 6%
- Ekstrak daun kenikir dengan konsentrasi 8%

- Ekstrak daun kenikir dengan konsentrasi 10%
- Ekstrak daun kenikir dengan konsentrasi 12%
- Ekstrak daun kenikir dengan konsentrasi 14%

2. Hasil Penentuan KBM

Kadar Bunuh Minimal (KBM) adalah konsentrasi antimikroba terendah yang mampu membunuh kuman (ditandai dengan tidak tumbuhnya kuman pada NAP), atau pertumbuhan koloninya kurang dari 0,1% dari jumlah koloni inokulum awal (*original inoculum*) pada medium NAP yang telah dilakukan penggoresan sebanyak satu ose (Forbes, *et al.*, 2008). *Original inoculum* (OI) adalah inokulum bakteri dengan konsentrasi 10^6 CFU/mL sebelum diinkubasi yang diinokulasikan pada media agar padat dan digunakan untuk mencari kategori KBM.

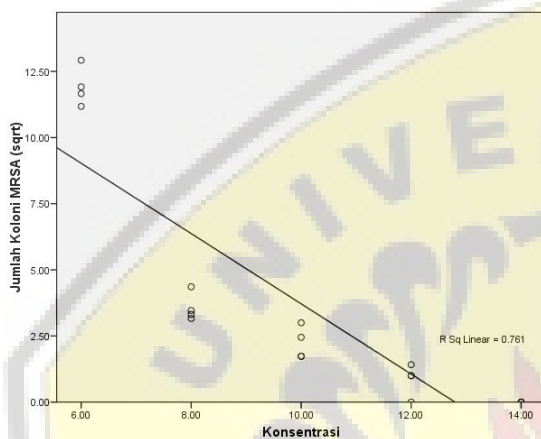
Hasil hitung koloni dari penanaman dilusi tabung pada medium NAP menunjukkan bahwa KBM ekstrak daun kenikir terhadap MRSA terdapat pada konsentrasi 14% (tabel 2).

Tabel 2. Hasil Hitung Koloni MRSA pada NAP

Konsentrasi	Rataan Jumlah Koloni MRSA dari 4 Pengulangan	Standard Deviasi
OI	975	12.91
6%	142.5	17.79
8%	13	4.08
10%	5.25	2.87
12%	1	0.82
14%	0	0

Analisis data dengan batas kepercayaan 95% menunjukkan adanya perbedaan bermakna pada efek peningkatan konsentrasi ekstrak terhadap jumlah koloni MRSA (Anova, $p=0,000$) Uji korelasi regresi menunjukkan adanya hubungan yang erat antara konsentrasi ekstrak dengan jumlah koloni

MRSA yang tumbuh (Korelasi, $r = -0,754$, $p=0,000$). Untuk mengukur ketepatan garis regresi dalam menjelaskan variasi nilai variabel dependen dilakukan perhitungan regresi. *R square* menunjukkan bahwa besarnya pengaruh konsentrasi ekstrak daun kenikir terhadap jumlah koloni MRSA adalah 76 %, sedangkan 24% dipengaruhi oleh faktor lain. Jika y adalah jumlah koloni dan x adalah konsentrasi ekstrak daun kenikir, adapun persamaan liniernya adalah $y = -1,328x + 16,997$ untuk MRSA (gambar 2).



Gambar 2. Persamaan Linier $y = -1,328x + 16,997$

Pembahasan

Dalam penelitian ini digunakan lima konsentrasi ekstrak daun kenikir, yaitu 6%; 8%; 10%; 12%; 14%. Pemilihan kelima konsentrasi ekstrak daun kenikir tersebut berdasarkan pada hasil penelitian eksplorasi yang dilakukan sebelum penelitian. Hasil eksplorasi menunjukkan bahwa tidak ada pertumbuhan koloni MRSA pada konsentrasi 25%, tetapi masih terdapat pertumbuhan koloni pada konsentrasi 12,5%.

Kadar hambat minimal (KHM) diamati dengan melihat konsentrasi terendah ekstrak daun kenikir yang mengalami kekeruhan setelah diinkubasi 18-24 jam. Namun pada penelitian ini, gradasi tingkat kekeruhan kuman tidak dapat diamati karena dikacaukan oleh warna dasar ekstrak daun kenikir yang berwarna hijau keruh sehingga KHM tidak dapat ditentukan.

Kadar bunuh minimal (KBM) MRSA pada penelitian ini diperoleh pada konsentrasi 14%. Hal ini ditunjukkan dengan tidak ditemukannya koloni MRSA pada konsentrasi 14%. Dari rataan pertumbuhan koloni yang diamati, terdapat kesan bahwa terjadi penurunan pertumbuhan koloni dengan adanya peningkatan konsentrasi ekstrak.

Untuk memastikan signifikansinya perlu dilakukan pengujian statistik. Hasil uji ANOVA terhadap variabel MRSA menunjukkan $p < 0,05$. Artinya, sampel berdistribusi normal, homogen, dan membuktikan bahwa terdapat perbedaan jumlah koloni MRSA pada pemberian konsentrasi ekstrak daun kenikir yang berbeda. Pada uji korelasi didapatkan hubungan yang sangat erat antara konsentrasi ekstrak daun kenikir dengan jumlah koloni MRSA ($r = -0,754$; $p < 0,05$). Korelasi negatif menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun kenikir semakin sedikit jumlah koloni kuman yang tumbuh.

Kemampuan daun kenikir dalam menghambat pertumbuhan bakteri MRSA disebabkan oleh adanya bahan-bahan aktif yang dapat berperan sebagai antimikroba, yaitu saponin, flavonoid, minyak atsiri, dan polifenol. Interaksi antar substansi yang didapatkan melalui ekstraksi dapat bersifat sinergis, addisi, maupun kontradiktif. Addisi berarti terjadi peningkatan efek jika terdapat dua substansi atau lebih sehingga efek akhir sama dengan jumlah masing-masing efek. Sinergis berarti terdapat kooperasi atau kerjasama antar dua substansi atau lebih sehingga efek akhir lebih besar dari pada jumlah masing-masing efek dari substansi yang terlibat. Sedangkan interaksi yang kontradiktif, menunjukkan aktivitas yang saling berlawanan antara dua substansi atau lebih (Pillai, *et al.*, 2005).

Pada dasarnya, antibiotika bekerja dengan cara mempengaruhi sintesis protein, sintesis DNA, sintesis dinding sel, menghambat enzim, mempengaruhi permeabilitas membran, dan memodifikasi membran (Dzen, *et al.*, 2003). Demikian pula dengan kandungan ekstrak daun kenikir, setiap substansi yang terdapat di dalamnya memiliki mekanisme antimikroba tersendiri. Namun, beberapa substansi juga memiliki aktivitas yang sama seperti flavonoid dan saponin, serta minyak atsiri dan polifenol. Substansi tersebut dapat merusak integritas membran plasma (Hopkins, 2005). Mungkin terdapat sinergisme dalam aktivitas merusak membran ini. Selain itu, flavonoid juga dapat menghambat sintesis DNA (Melderer, 2002). Minyak atsiri dan polifenol sama-sama bekerja pada dinding sel (Venturella, 2000; Evelyn, 2008). Sedangkan *costunolide* menginduksi apoptosis sel (Park *et al.*, 2001) dan 4,4'-bipyridin dapat bereaksi dengan lipid sehingga terbentuk radikal bebas (Venturella, 2000).

Dengan melihat fakta bahwa pada penelitian ini dapat ditentukan KBM larutan ekstrak daun kenikir

terhadap MRSA, dan diperkuat dengan adanya data bahwa daun kenikir mengandung bahan aktif yang memiliki data antibakteri, serta setelah dilakukannya uji statistik yang mempunyai nilai kemaknaan yang tinggi, maka dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun kenikir terbukti memiliki daya antibakteri terhadap kuman MRSA secara *in vitro*. Hal ini membuktikan bahwa hipotesis yang telah disusun adalah benar. Untuk lebih memastikan KBM, perlu dilakukan penelitian serupa dengan interval konsentrasi yang lebih kecil.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil dari penelitian ini disimpulkan bahwa ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus H.B.K*) dapat menghambat pertumbuhan MRSA *in vitro*. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus H.B.K*), maka semakin rendah per-tumbuhan kuman MRSA.

Pada penelitian ini Kadar Hambat Minimum (KHM) tidak dapat di-tentukan karena suspensi ekstrak daun kenikir tersebut berwarna hijau keruh sehingga kekeruhan kuman tidak dapat terlihat.

Beberapa saran yang penulis ajukan terkait dengan hasil penelitian dan analisis data antara lain perlu dilakukan penelitian dengan interval konsentrasi yang lebih sempit agar dapat menentukan KHM dan KBM yang lebih tepat serta untuk mendapatkan persamaan regresi yang lebih teliti. Selain itu diperlukan adanya penelitian untuk menentukan KHM dengan metode lain yang tidak dipengaruhi oleh kekeruhan ekstrak, misalnya dengan metode *Agar Dilution Test*.

Penulis merasa perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai efek antimikroba ekstrak daun kenikir secara *in vivo*, untuk melihat farmakodinamik, farmako-kinetik dan toksisitas dari bahan aktif yang ter-kandung dalam ekstrak daun kenikir. Juga perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai efek ekstrak daun kenikir dalam menghambat pertumbuhan atau membunuh bakteri lain selain MRSA.

Penulisi menyarankan perlu dibuat ekstrak daun kenikir yang dapat mengisolasi masing-masing bahan aktif yang terkandung di dalamnya secara lebih khusus agar dapat diketahui bahan aktif yang mana yang memiliki efek yang signifikan.

Daftar Pustaka

- Ardiansyah, 2007. *Antimikroba dari Tumbuhan*. Berita IPTEK (online). http://www.beritaipetek.com/pdf_berita.php?kat=berita&id=345. Diakses 11 Nov 2008, jam 09.18 WIB.
- Abedon, S.T., 1998. *Procarvate Cell Walls and Membranes*. <http://www.mansfield.ohio-state.edu/~sabedon/biol1080.htm>. Diakses 5 Februari 2010, jam 07.15 WIB.
- Dzen, Sjoekoer M. *et al.*, 2003. *Bakteriologi Medik*. Malang: Bayumedia. Hal: 134-135
- Evelyn, R. 2008. *Khasiat Kemangi*. <http://vibizlife.com>. Diakses 27 Nov 2008 jam 11.51 WIB.
- Forbes, Betty A.; Sahm, Daniel F.; Weissfeld, Alice S., 2008. *Laboratory Methods and Strategies for Antimicrobial Susceptibility Testing* in Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology, 12th Edition, USA: Elsevier, Mosby Company. Chap:12, p:187-214
- Fuzzati, N., *et al*, 1995. *Phenylpropane Derivatives From Roots of Cosmos caudatus*. *Phytochemistry*, vol. 39:2, 409-412.
- Hopkins, W.G., 1995. *Introduction to Plant Physiology*, 2th Ed, The University of Western Ontario, John Wiley and Sons Inc USA. Hal 273.
- Melderer, L., 2002. *Molecular Interaction of The CcdB Poison With Its Bacterial Target, The DNA Gyrase*. *IJMM*, 291, 537 – 544.
- NSW Health, 2003. *Staphylococcus aureus Kebal Methicillin 'MRSA' itu apa?* http://www.health.nsw.gov.au/mhcs/publication_pdfs/7155/DOH-7155-IND.pdf. Diakses 11 November 2008, jam 09.20 WIB.
- Ragasa, C. Y., *et al*, 1997. *Antimutagen and Antifungal Compounds from Cosmos caudatus*. *Philippine Journal of Science* Volume 126: No3. http://philjournalsci.dost.gov.ph/data/cosmos_caudatus.htm. Diakses 02 Februari 2010, jam 10.03 WIB.

Solimun, 2001. *Diklat Metodologi Penelitian LKIP dan PKM Kelompok Agrokompleks*. Malang: Universitas Brawijaya.

Triana, N., 2008. *Waspada Penularan Penyakit di Rumah Sakit*. Jakarta: Jurnal Nasional. <http://jurnalnasional.com/?med=aboutus>. Diakses 11 November 2008, jam 09.22 WIB.

Park, H. J.; Kwon, S. H.; Han, Y. N.; Choi, J. W.; Miyamoto, K; Lee, S.H.; Lee, K. T., 2001. *Apoptosis-Inducing Costunolide and a Novel Acyclic Monoterpene from the Stem Bark of Magnolia sieboldii*. *Archive of Pharmacal Research* Vol 24, No 4, 342-348 <http://apr.psk.or.kr>. Diakses 26 Februari 2010, jam 09.15 WIB

Paustian, T., 2002. *The Cell Wall*. University of Wisconsin-Madison. <http://lecturer.ukdw.ac.id/dhira/BacterialStructure/CellWall.html>. Diakses 02 Februari 2010, jam 09.20 WIB.

Pillai SK, Moellering RC Jr, Eliopoulos GM. Chapter 9: *Antimicrobial Combinations*. pages 365-440 (pages 376-377). IN: Lorian V (editor). *Antibiotics in Laboratory Medicine, Fifth Edition*. Lippincott Williams & Wilkins. 2005.

Venturella, VS. *Natural Product* in: Gardner H, 2000. *Remington The Science and Practice of Pharmacy 20th edition*. Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia hal 675-683.