



PERHIMPUNAN
PENELITI BAHAN OBAT ALAMI
(PERHIPBA)

**PROSIDING
SIMPOSIUM PENELITIAN
BAHAN OBAT ALAMI
[SPBOA] XVI & MUKTAMAR XII
PERHIPBA 2014**

 leutika**prio**



PERHIPBA
PENELITI BAHAN OBAT ALAMI
(PERHIPBA)

PROSIDING
SIMPOSIUM PENELITIAN
BAHAN OBAT ALAMI
[SPBOA] XVI & MUKTAMAR XII
PERHIPBA 2014

terbitan

AKTIVITAS ALKALOID *AGERATUM CONYZOIDES* L. TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI *STAPHYLOCOCCUS* *AUREUS* SECARA IN VITRO

Alkaloid Activity Ageratum conyzoides L. To Growth of Staphylococcus aureus In Vitro

Any Fitriani

*Jurusan Pendidikan Biologi, FPMIPA, Universitas Pendidikan Indonesia
Jl. Dr. Setiabudi 229 Bandung 40154*

ABSTRACT

Ageratum conyzoides plays a role in traditional medicine in many parts of the world. It is widely use externally to treat skin diseases, wounds, ulcers, and boils, internally as febrifuge and to treat diarrhoe and haemorrhages. The reports related to bioassay of the extract of *A. conyzoides* is very limited. The objectives of the research is to study antibacteria activity from leaves and roots alkaloid *A. conyzoides* to growth of *Staphylococcus aureus* in vitro. Alkaloid leaves and roots extracted in methanol and dichloromethane as solvent. Crude extract analysed employing Gas Chromatography/Mass Spectroscopy (GC/MS). Antibacteria activity was studied by disc-diffusion and macro-dillution methods. The research used four concentrations, i.e. 30 g/ml, 40 g/ml, 50 g/ml, and 60 g/ml. Negative control used DMSO 1% and positive control used ampicillin 50 g/ml. GC/MS analysis showed that leaves extract consisted of 3,8,8-Trimethoxy-3-piperidyl-2,2-binaphthyl-1,14,4-tetrone, Benzaldehyde, 4-hydroxy-3,5-dimethoxy, (4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl) methylene hyd), meanwhile roots extract consisted of 3,3 Dimethyl-2-phenyl-2-(1-oxo-1,2,3,4- Tetrahydronaphthalen-2-yl) Azirane). Leaves alkaloid of *A. conyzoides* revealed the highest inhibition zone at 50 g/ml ($10,17 \pm 0,24$) mm, meanwhile roots alkaloid revealed the highest inhibition zone at 40 g/ml ($10,19 \pm 0,33$) mm. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of leaves alkaloid is at 30 g/ml and MIC of roots alkaloid is at 25 g/ml. Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of leaves alkaloid is at 40 g/ml, meanwhile MBC roots alkaloid is at 35 g/ml. Leaves and roots alkaloid statistically has the same effectively to inhibit growth of *S. aureus*. Leaves and roots alkaloid *A. conyzoides* could be used as traditional medicine for *S. aureus* infection.

Keywords : *Ageratum conyzoides*, *Staphylococcus aureus*, disc-diffusion, MIC, MBC

PENDAHULUAN

Di Indonesia, *Ageratum conyzoides* digolongkan sebagai gulma sehingga sering dimusnahkan. Namun beberapa kelompok masyarakat kita menggunakan tanaman ini sebagai obat tradisional untuk menyembuhkan berbagai macam penyakit seperti luka di kulit, malaria, influenza, radang paru-paru dan tumor. *A. conyzoides* merupakan salah satu tumbuhan herba

yang banyak mendapat perhatian oleh para peneliti saat ini, karena *A. conyzoides* merupakan tumbuhan yang tumbuh tersebar hampir di seluruh bagian dunia. *A. conyzoides* sudah sangat populer digunakan sebagai tumbuhan obat, meskipun aplikasinya berbeda di setiap daerah (Ming, 1999).

Berdasarkan kromatogram hasil analisis *Gas Chromatography Mass Spectrofotometer* (GCMS) yang telah dilakukan dalam penelitian Desiarianty (2009), pada ekstrak methanol daun atau akar *A. conyzoides* mengandung beberapa jenis senyawa-senyawa metabolit sekunder di antaranya golongan terpenoid dan fenolik. Pada daun *Ageratum* diperoleh jenis senyawa terpenoid yaitu: *-caryophyllene*, *6,7-dimethoxy-2,2-dimethylchromene*, *Ageratochromene* (*Precocene 2*), *6-vinyl-7-methoxy-2,2-dimethylchromene*, *Phytol* dan golongan fenolik yaitu kelompok flavonoid yang terdiri dari senyawa *2H-1-Benzopyran-6-ol*. Pada akar *Ageratum* diperoleh senyawa golongan terpenoid yaitu *Ageratochromene* (*Precocene 2*), *7-methoxy-2,2-dimethylchromene* (*Precocene 1*) dan golongan fenolik yaitu *1-(7-hydroxy-5-methoxy-2,2-dimethyl-2H-1-benzopyran-6-yl)* yang termasuk kelompok flavonoid.

Alkaloid secara umum dikenal sebagai golongan amin yang dihasilkan oleh tumbuh-tumbuhan. Nama alkaloid diambil dari kata *alkaline* yang merupakan istilah untuk menggambarkan zat-zat yang mengandung nitrogen. Alkaloid merupakan turunan dari asam amino, mempunyai rasa yang pahit dan merupakan metabolit sekunder dari tumbuhan, hewan, jamur, dan dapat diekstrak dari sumbernya menggunakan asam (biasanya asam sulfur atau asam hidroklorik) (Maharti, 2007).

Alkaloid memiliki efek farmakologi pada manusia dan hewan sebagai zat antibakteri. Hal ini disebabkan karena alkaloid mempunyai kemampuan dalam menghambat kerja enzim untuk mensintesis protein bakteri. Penghambatan kerja enzim ini dapat mengakibatkan metabolisme bakteri terganggu (Suranintyas *et al.*, 2008). Alkaloid juga dapat merusak komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian pada sel tersebut (Juliantina *et al.*, 2009). Penelitian tentang alkaloid dari *A. conyzoides* masih sangat terbatas.

Staphylococcus aureus merupakan bakteri patogen bagi manusia. Hampir tiap orang akan mengalami beberapa tipe infeksi *S. aureus* sepanjang hidupnya. Setiap jaringan ataupun alat tubuh dapat terinfeksi dan menyebabkan timbulnya penyakit dengan tanda-tanda khas yaitu peradangan, nekrosis, dan pembentukan abses. Selain itu bakteri ini juga dapat menyebabkan penyakit kulit yang dapat menyerang bayi yang baru lahir hingga orang dewasa. *S. aureus* dan *S. pyogenes* dapat menyebabkan penyakit kulit yang sangat parah bahkan penyakit kulit yang membutuhkan perawatan seumur hidup (Chiller *et al.*, 2001). Beberapa antibiotik yang dapat digunakan untuk menghambat *S. aureus* antara lain ampicilin, penisilin, tetrasiklin, kloksasilin, sefalosporin, vankomisin, dan metisilin (Tirta, 2010).

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari ekstrak alkaloid daun dan akar tumbuhan *A. conyzoides* terhadap pertumbuhan *S. aureus* secara *in vitro*.

BAHAN DAN METODE

1. Persiapan Tumbuhan *Ageratum conyzoides* L.

Tumbuhan *A. conyzoides* yang akan digunakan sebagai bahan penelitian sebelumnya dilakukan identifikasi terlebih dahulu dengan mengacu pada kunci determinasi *Flora of Java* (Backer dan Brink, 1965). Tumbuhan berasal dari Kebun Botani Universitas Pendidikan Indonesia. Kemudian tumbuhan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan tanpa terkena

cahaya matahari secara langsung. Tumbuhan yang telah memiliki berat kering konstan siap untuk dilakukan ekstraksi.

2. Ekstraksi Daun dan Akar Tumbuhan *Ageratum conyzoides* L. serta Identifikasi Senyawa Hasil Ekstraksi

Daun dan akar *A. conyzoides* yang akan diekstraksi dicuci bersih lalu dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Daun dan akar tersebut kemudian dihaluskan sampai menjadi serbuk. Selanjutnya menimbang daun atau akar yang telah halus (berat sesuai dengan konsentrasi yang diinginkan) kemudian ditambahkan dengan methanol sampai terendam. Filtratnya diambil dengan penyaringan. Residu hasil penyaringan dibilas dengan methanol sebanyak 2 kali masing-masing 10 ml. Hasil saringan diuapkan dengan menggunakan penangas air dengan suhu 60°C hingga diperoleh ekstrak kasar *A. conyzoides* (Fitriani, 1998).

Setelah itu residu didispersikan dengan 10 ml HCl 0,5 M. Kemudian ekstraksi dengan menambahkan diklorometan sebanyak 2 kali masing-masing 25 ml menggunakan corong pemisah. Setelah itu akan diperoleh fase asam yang selanjutnya akan dibasakan dengan NaOH 4 N hingga pH-nya 10. Ekstraksi kembali dengan diklorometan sebanyak 3 kali masing-masing 25 ml. Fase diklorometan atau fase yang terbanyak diambil dan kemudian diuapkan di suhu ruang sehingga diperoleh ekstrak murni alkaloid. Residu kemudian didispersikan dengan 1 ml DMSO 1% (Fitriani, 1998). Kemudian ekstrak diuji dengan menggunakan alat GCMS. Hasil ekstraksi lalu disimpan ke dalam botol gelap dengan kemasan yang baik dan disimpan di dalam lemari es.

3. Sterilisasi Alat dan Bahan

Seluruh alat tahan panas dan bahan yang akan digunakan disterilisasi di dalam autoclave selama 30 menit dengan mengatur tekanan sebesar 15 dyne/cm³ (1 atm) dan suhu sebesar 121°C yang sebelumnya dicuci bersih, dikeringkan, dan dibungkus dengan kertas (Capuccino dan Sherman, 2001; Pelczar, 1986). Untuk alat yang tidak tahan panas, dibersihkan menggunakan alkohol 70%.

4. Pembuatan Kurva Tumbuh dan Kurva Baku Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Bakteri uji diaktivasi terlebih dahulu dengan menginokulasikan satu ose bakteri yang diambil dari KNA miring, ke dalam labu erlenmeyer yang berisi 10 ml medium *Nutrient Broth* (NB) lalu diinkubasi pada *waterbath shaker* dengan kecepatan 120 rpm dengan suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam, biakkan bakteri yang telah diaktivasi tadi kemudian ditambahkan ke dalam labu erlenmeyer lain yang berisi 90 ml medium NB lalu diinkubasi lagi dengan kecepatan 120 rpm dengan suhu 37°C selama 24 jam (kultur inokulum). Metode yang digunakan untuk membuat kurva tumbuh menggunakan Metode Turbidimetri (Cappuccino & Sherman, 1987).

5. Pembuatan Standar Turbiditas Inokulum

Nilai densitas standar inokulum bakteri ekuivalen dengan 0,5 Mc Farland standar (0,5 ml BaCl₂ 1% dicampurkan dengan 99,5 ml H₂SO₄ 1%). Sebelum digunakan, campuran diaduk secara konstan untuk mempertahankan suspensi. Densitas yang tepat untuk standar turbiditas ini dihitung dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 625 nm dan dengan nilai absorbansi antara 0,08 sampai 0,10. (NCCLS, 2003).

6. Uji Aktivitas Ekstrak Alkaloid *Ageratum conyzoides* L. terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

a. Metode *Disc-Diffusion*

Biakan bakteri 24 jam disuspensikan ke dalam larutan NaCl 0,85% steril dan disesuaikan kekeruhannya dengan 0,5 Mc Farland Standar (Akinyemi, 2005).

b. Uji *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC)

Biakan bakteri dari KNA diambil kira-kira satu ose lalu dihomogenkan ke dalam larutan NaCl. Kemudian biakan dalam larutan tersebut dibandingkan dengan larutan 0,5 Mc Farland Standar sampai kekeruhannya sama.

Penentuan nilai MIC ditentukan dengan cara membandingkan biakan bakteri dan ekstrak yang telah diinkubasi selama 24 jam dengan biakan bakteri berusia 0 jam secara kasat mata. Sebelum dibandingkan secara kasat mata, kultur berusia 24 jam dan 0 jam dihomogenkan dengan menggunakan *vortex* terlebih dahulu. Nilai MIC merupakan nilai konsentrasi terendah sebelum kekeruhan kultur berusia 24 jam sama dengan kultur berusia 0 jam (NCCLS, 2003).

c. Uji *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC)

Uji aktivitas untuk nilai MBC dilakukan dengan memindahkan 1 ml dari setiap tabung uji MIC kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri dan selanjutnya KNA dimasukkan. Biakan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Nilai MBC dicatat di mana pada konsentrasi ekstrak terendah tidak lebih dari satu koloni bakteri yang tumbuh pada medium padat (Akinyemi, 2005).

7. Analisis Data

Uji statistika yang digunakan untuk membandingkan pengaruh ekstrak alkaloid daun dan akar *A. conyzoides* terhadap pertumbuhan *S. aureus* adalah dengan uji *Two Way ANOVA* dengan menggunakan program SPSS versi 16 for windows dengan tingkat kepercayaan 95%. Kemudian dilakukan uji lanjutan dengan menggunakan uji *Tukey* untuk membandingkan nilai rata-rata diameter zona hambat masing-masing kelompok konsentrasi ekstrak alkaloid daun dan akar *A. conyzoides* terhadap *S. aureus*.

HASIL

Berdasarkan hasil *Gas Chromatography Mass Spectrofotometer* (GCMS) ekstrak daun dan akar *A. conyzoides* mengandung beberapa jenis senyawa kimia seperti yang terlihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Kandungan Senyawa Kimia yang Terdapat di dalam Tumbuhan *A. conyzoides* dari Hasil GCMS

Organ	Nama Kelompok Besar Senyawa	Nama Senyawa
Daun	Alkaloid	3,8,8-Trimethoxy-3-piperidyl-2,2-binaphthyl-1,14,4-tetrone
		Benzaldehyde, 4-hydroxy-3,5-dimethoxy, (4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl) methylene hyd)
Akar	Alkaloid	3,3 Dimethyl-2-phenyl-2-(1-oxo-1,2,3,4-Tetrahydronaphthalen-2-yl) Azirane)

Rata-rata diameter zona hambat yang terbentuk dari ekstrak alkaloid daun dan akar *A. conyzoides* terlihat pada Tabel 2.

Uji normalitas digunakan uji Kolmogorov-Smirnov untuk ekstrak alkaloid daun dan akar *A. conyzoides* yang menunjukkan bahwa data berdistribusi normal. Uji homogenitas digunakan uji Levene's dengan hasil yang diperoleh untuk data diameter zona hambat ekstrak alkaloid daun dan akar adalah homogen, karena nilai signifikansi $> 0,05$. Karena data memenuhi syarat yaitu berdistribusi normal dan homogen, maka data diolah dengan uji parametrik yaitu uji *Two Way Anova*.

Uji *Two Way Anova* dilakukan untuk mengetahui adanya perbedaan diameter zona hambat antara masing-masing konsentrasi dan masing-masing ekstrak alkaloid yaitu daun dan akar *A. conyzoides*. Setelah diuji, untuk diameter zona hambat masing-masing konsentrasi menunjukkan hasil nilai signifikansi sebesar 0,000 yang berarti nilai signifikansi hitung $< 0,05$. Hal ini menunjukkan adanya perbedaan data diameter zona hambat pada masing-masing konsentrasi yang digunakan untuk ekstrak alkaloid daun maupun akar *A. conyzoides*. Sedangkan untuk ekstrak alkaloid daun dan akar tidak terdapat perbedaan diameter zona hambat, karena nilai signifikansi hitung $> 0,05$ yaitu 0,407. Hal ini berarti ekstrak alkaloid daun dan akar *A. conyzoides* memiliki efektivitas yang sama dalam menghambat pertumbuhan *S. aureus*.

Untuk mengetahui variabel-variabel yang berbeda pada setiap kelompok konsentrasi ekstrak alkaloid daun dan akar *A. conyzoides* selanjutnya dilakukan uji lanjutan yaitu uji *Tukey*. Hasil dari uji ini tidak terdapat perbedaan diameter zona hambat antara konsentrasi 50 g/ml (sig. 0,967) dengan diameter zona hambat 40 g/ml (sig. 0,967) dan antara diameter zona hambat pada konsentrasi 60 g/ml (sig. 0,057) dengan diameter zona hambat pada konsentrasi 40 g/ml (sig. 0,057) pada masing-masing ekstrak alkaloid daun dan akar *A. conyzoides*.

Tabel 2. Diameter Zona Hambat (mm) Ekstrak Alkaloid Daun dan Akar *A. conyzoides* terhadap *S. aureus* ATCC 6538

Ekstrak	Konsentrasi (g/ml)	Rata-rata diameter zona hambat (mm) + SD	Sensitifitas
Daun	30	8,43 ± 0,73	Rendah
	40	9,66 ± 0,17	Sedang
	50	10,17 ± 0,24	Sedang
	60	9,30 ± 0,22	Sedang
Akar	30	8,57 ± 0,57	Rendah
	40	10,19 ± 0,33	Sedang
	50	9,90 ± 0,68	Sedang
	60	9,37 ± 0,51	Sedang
Ampisilin	50 µg/ml	24,27 ± 0,42	Kuat
DMSO	1%	-	-

Keterangan :

- Sensitifitas rendah (6 - 9 mm)
- Sensitifitas sedang (9 - 12mm)
- Sensitifitas kuat (> 12 mm)
- = Tidak ada zona hambat
- Perhitungan diameter zona hambat termasuk dengan diameter kertas cakram (6 mm) (Devi *et al.*, 2009)

PEMBAHASAN

Efektivitas yang sama dari kedua ekstrak alkaloid ini dipengaruhi oleh adanya kandungan klorofil di dalam ekstrak. Kandungan klorofil tersebut menyebabkan ekstrak menjadi lebih pekat. Adanya klorofil ini dapat dilihat dari adanya gugus aldehid dan metil pada hasil GCMS. Menurut Kusmiyati dan Agustini (2007), kandungan klorofil dapat menurunkan aktivitas senyawa antibakteri terhadap bakteri uji karena memiliki molekul yang lebih besar, sehingga diperlukan proses ekstraksi yang lebih lanjut untuk memisahkan klorofil dari senyawa aktif.

Setelah pada konsentrasi optimum menghambat, untuk kedua jenis ekstrak alkaloid yaitu daun dan akar mengalami penurunan besar diameter zona hambat yaitu pada konsentrasi 60 g/ml untuk ekstrak alkaloid daun dan pada konsentrasi 50 g/ml untuk ekstrak alkaloid akar *A. conyzoides*. Hal ini dikarenakan pada konsentrasi yang lebih tinggi diduga terjadi saling mengikat antarmolekul yang terkandung dalam ekstrak sehingga terbentuk molekul yang berukuran lebih besar. Semakin tinggi konsentrasi maka pembentukan senyawa berukuran lebih besar menjadi lebih banyak sehingga menyebabkan senyawa-senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak berukuran lebih besar dari sebelumnya. Molekul berukuran besar ini tidak mampu menembus pori-pori medium agar dan menyebabkan tidak terjadi kontak langsung antara senyawa aktif dengan bakteri uji, sehingga tidak terjadi kerusakan pada sel bakteri oleh senyawa aktif. Kemampuan difusi bahan dan kepekatan ekstrak juga dapat memengaruhi terjadinya penurunan zona hambat pada konsentrasi yang lebih tinggi. Kemampuan difusi yang rendah disebabkan oleh ekstrak yang terlalu pekat karena konsentrasi yang terlalu tinggi. Hal ini menyebabkan ekstrak sulit untuk berdifusi secara maksimal ke dalam medium yang mengandung inokulum. Pada konsentrasi ekstrak yang lebih tinggi juga dapat terjadi kejenuhan sehingga menyebabkan senyawa-senyawa aktif yang terkandung di dalam ekstrak tidak terlarut dengan sempurna (Nimri, 1999 dalam Maleki, 2008).

Penurunan besar diameter zona hambat juga diduga terjadi karena senyawa yang terkandung di dalam ekstrak mengalami perubahan susunan senyawa dan ikatan-ikatan antarmolekul yang terkandung dalam ekstrak. Hal ini dapat memengaruhi komposisi suatu senyawa aktif dan mengubah gugus aktif dari senyawa tersebut. Perubahan ini menyebabkan sifat toksik dari senyawa aktif berubah menjadi tidak toksik terhadap bakteri.

SIMPULAN

Ekstrak alkaloid daun dan akar *Ageratum conyzoides* memiliki efektivitas yang sama dalam menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. Ekstrak alkaloid daun *A. conyzoides* memiliki diameter zona hambat tertinggi pada konsentrasi 50 g/ml sebesar $10,17 \pm 0,24$ mm, sedangkan untuk ekstrak alkaloid akar *A. conyzoides* memiliki diameter zona hambat tertinggi pada konsentrasi 40 g/ml sebesar $10,19 \pm 0,33$ mm. Nilai *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) ekstrak alkaloid daun *A. conyzoides* terdapat pada konsentrasi 30 g/ml, sedangkan untuk ekstrak alkaloid akar *A. conyzoides* terdapat pada konsentrasi 25 g/ml. Nilai *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC) ekstrak alkaloid daun *A. conyzoides* terdapat pada konsentrasi 40 g/ml, sedangkan untuk ekstrak alkaloid akar *A. conyzoides* terdapat pada konsentrasi 35 g/ml.
