

DAYA HAMBAT EKSTRAK ETANOL 70% DAUN ASHITABA (*Angelica keiskei*) TERHADAP BAKTERI *Staphylococcus aureus* YANG DIISOLASI DARI LUKA DIABETES

Rochmanah Suhartati dan Dewi Peti Virgianti
STIKes Bakti Tunas Husada Tasikmalaya

ABSTRAK

Ashitaba (*Angelica keiskei*) merupakan salah satu jenis tanaman obat, tanaman ini merupakan tanaman introduksi yang belum banyak dikenal di Indonesia sedangkan di Jepang tanaman ashitaba dikonsumsi sebagai sayuran, tanaman ini merupakan sayuran yang populer, berpotensi sebagai antibakteri, antijamur, antitumor, antiinflamasi. Tanaman ini mirip dengan seledri hanya memiliki perawakan lebih besar sehingga di Indonesia khususnya di Jawa Barat dikenal dengan nama seledri Jepang atau seledri Raja.

Penelitian dilakukan untuk mengetahui perbedaan daya hambat ekstrak etanol 70% daun ashitaba terhadap pertumbuhan bakteri *S. aureus* dan mengetahui nilai *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*. Metode yang digunakan difusi agar Kirby Bauer dengan kontrol positif antibiotik tetrasiklin 0,01g/mL dan kontrol negatif pelarut akuades steril. Parameter yang diukur ialah besarnya diameter daya hambat yang terbentuk disekitar kertas cakram. Ekstraksi daun Ashitaba dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70% diperoleh ekstrak kental sebanyak 33,67%. Variasi konsentrasi ekstrak yang digunakan (1,0; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2; 0,1; 0,08; 0,06; 0,04; 0,02; 0,01)g/mL dengan ulangan sebanyak 4 kali.

Hasil penelitian menunjukkan rata-rata diameter daya hambat yang terbentuk dengan perlakuan ekstrak konsentrasi 1,0; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2; 0,1; 0,08; 0,06; 0,04; 0,02; 0,01 g/mL secara berturut-turut ialah 18,06; 16,01; 13,55; 12,24; 11,26; 10,50; 9,90; 0,00; 0,00; 0,00; dan 0,00 mm. Sedangkan rata-rata diameter hambat untuk kontrol positif tetrasiklin 0,01 mg/mL adalah 29,05 mm dan kontrol negatif Aquadest adalah 0,00 mm. Nilai MIC ekstrak etanol 70% daun ashitaba terhadap bakteri *S. aureus* adalah 0,1g/mL.

Penelitian dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol 70% daun ashitaba memiliki perbedaan daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri *S. aureus* pada konsentrasi 0,1 -1,0g/mL dan nilai MIC adalah 0,1g/mL

Kata kunci : Ashitaba, *Angelica keiskei*, *S. aureus*.

PENDAHULUAN

Penggunaan obat tradisional sampai sekarang masih sering digunakan di masyarakat terutama di Indonesia untuk tujuan pencegahan dan pengobatan penyakit. Isu yang mencetuskan slogan “*back to nature*” atau kembali ke alam, merupakan upaya mencari, meneliti dan menggunakan bahan alami nabati untuk mengatasi berbagai penyakit yang banyak muncul di lingkungan masyarakat akhir-akhir ini, sehingga penggunaan obat tradisional semakin luas.

Ashitaba (*Angelica keiskei*) adalah salah satu jenis tanaman obat, merupakan tanaman introduksi yang belum banyak dikenal di Indonesia sedangkan di Jepang tanaman ashitaba dikonsumsi sebagai sayuran yang populer di Jepang, berpotensi sebagai antibakteri, antijamur, antitumor, antiinflamasi (Bove, 2013). Tanaman ini mirip dengan seledri hanya

memiliki perawakan lebih besar, sehingga di Indonesia khususnya di Jawa Barat dikenal dengan nama seledri Jepang atau seledri Raja.

Ashitaba mengandung zat aktif yang memiliki fungsi sebagai obat. Ogawa *et al.* (2005) menyatakan ashitaba memiliki kemampuan sebagai antihipertensi dan antistroke. Batang, daun maupun umbi tanaman ashitaba jika dipotong akan mengeluarkan getah berwarna kuning disebut *chalcone* yang termasuk golongan senyawa flavonoid. Shitaba (1994) menyatakan bahwa *chalcone* mempunyai fungsi sebagai antitumorigenik. Zat aktif yang terdapat dalam *chalcone* bermanfaat untuk meningkatkan produksi sel darah merah, serta meningkatkan pertahanan tubuh untuk melawan penyakit infeksi, selain itu juga dapat menyembuhkan diabetes,

hipertensi, jantung koroner, liver dan sebagai antibakteri (Baumann, 2008).

Menurut Enoki *et al.* (2007), ashitaba dapat disebut sebagai tanaman insulin karena dapat menyembuhkan penyakit diabetes. Daun ashitaba dapat digunakan dalam keadaan mentah atau direbus sedangkan batang dan akar harus direbus terlebih dahulu, kemudian sari airnya diminum sebagai obat. Untuk penggunaan dalam bentuk serbuk, satu sendok teh serbuk dicampur dengan 150 mL air panas. Ashitaba dapat diolah menjadi simplisia, serbuk, bentuk kapsul dan teh ashitaba.

Tanaman ashitaba dapat tumbuh baik di Lombok Timur yang berlokasi di Kecamatan Sumbawa Desa Sembalun, dan dikembangkan di Malang Jawa Timur, serta di Jawa Barat dikembangkan di Kebun Percobaan Manoko, Balai Penelitian Tanaman Obat dan Senyawa Aromatik Lembang, Bandung. Di Indonesia hasil penelitian identifikasi mutu tanaman ashitaba telah dilakukan pada tanaman yang dikembangkan di Jawa Barat yaitu di Balai Tanaman Obat dan Senyawa Aromatik Manoko Lembang Bandung.

Hasil skrining fitokimia daun, batang dan umbi ashitaba dari Balai Tanaman Obat Manoko, secara kualitatif menunjukkan bahwa tanaman ashitaba mengandung senyawa kimia golongan alkaloid, saponin, flavonoid, triterfenoid dan glikosida cukup kuat; dan khusus pada daun terdapat senyawa kimia golongan tanin paling kuat yang disebut juga dengan polifenol (Sembiring, 2005)

Karakteristik mutu bagian daun memiliki kadar air 8,7%, kadar abu 11,20%, kadar sari air 31,5%, kadar sari alkohol 9,75%, natrium 0,81%, kalsium 4,17% , besi 435 ppm, aktivitas radikal bebas (EC_{50}) daun 38,00 ppm, batang 390,98 ppm dan umbi 780,65 ppm sehingga daun ashitaba memiliki aktivitas antioksidan lebih tinggi dalam menangkap radikal bebas dibanding batang dan umbi (Sembiring, 2005). Uji mikrobiologi untuk melihat potensi tanaman ashitaba yang dikembangkan di Kebun Percobaan Manoko Lembang Bandung, sebagai antimikroba belum dilakukan, hasil penelitian sebelumnya menunjukkan dalam daun terdapat senyawa antibakteri.

Menurut Fukuo *et al.*, (2005) menyatakan bahwa getah ashitaba memiliki aktivitas antimikroba terhadap bakteri *Helicobacter pylori* dengan nilai *minimal inhibitory concentration* (MIC) adalah 0,04 mg/mL.

Getah tanaman ashitaba yang terdapat di kebun Manoko Lembang, kurang berlimpah, namun tanaman ini memiliki daun yang cukup banyak, sehingga bagian daun digunakan dalam penelitian ini. Pelarut yang digunakan dipilih etanol 70% karena pelarut ini masih mengandung air yang bersifat polar untuk menarik senyawa antibakteri yang terdapat dalam daun dan etanol dapat menekan kontaminasi mikroba pada saat pembuatan ekstrak sehingga dapat meminimalisasi kerusakan senyawa antibakteri dan kontaminasi mikroba lain pada saat pengujian.

Penyakit yang ditimbulkan oleh bakteri *S.aureus* sangat umum di dunia medis sebagai penyebab infeksi, bakteri ini dapat ditemukan pada luka diabetes melitus. Timbulnya mutan bakteri *S. Aureus* yang resisten terhadap antibiotik dapat disebabkan oleh penggunaan antibiotik yang tidak tepat jenis atau dosisnya menyebabkan luka sukar sembuh, sehingga banyak masyarakat yang lebih tertarik menggunakan obat herbal, karena obat herbal harganya murah dan mudah didapatkan.

Berdasarkan latar belakang tersebut diatas, untuk melihat potensi tanaman ashitaba yang dikultivasi di Balai Tanaman Obat dan Senyawa Aromatik Manoko Lembang Bandung sangat penting dilakukan penelitian untuk mengetahui daya hambat ekstrak etanol 70% daun ashitaba dalam menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* yang di isolasi dari hapus luka penderita *diabetes melitus*.

BAHAN DAN METODA

Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian meliputi *chamber* 2,5L, filter ukuran 1,2 mm (filter1), ukuran 0,6 mm (filter 2), kertas saring Whatman no 125 (filter 3), *rotary evaporator*, cawan uap, labu ukur 100 mL, gelas kimia 100 mL, pipet ukur 10 mL, 5 mL dan 1 mL,

erlenmeyer 500 mL, batang pengaduk, *hot plate*, *waterbath*, cawan petri, neraca analitik, autoklaf, tabung reaksi steril, mikropipet, turbidimeter, *vortex mixer*, *sentrifuge*, jangka sorong, *safety cabinet*, balp, kawat platina, pinset, lampu pijar, botol semprot, sedangkan bahan yang digunakan meliputi etanol 95%, *aquabidest*, garam fisiologis steril, larutan BaCl₂ 1%, larutan H₂SO₄ 1%, media *Mueller Hinton Agar* (Oxoid), *Nutrien Agar* (NA), kertas cakram, Manitol Salt Agar (MSA), media *Blood Agar*, media *Typticase Soya Broth* (TSB), zat pewarna Gram, larutan hidrogen peroksida 3%, plasma sitrat, swab steril, kain kassa, tissue, kapas, spesimen klinis (hapus luka), akuades, antiseptik, desinfektan, sarung tangan karet, masker.

Metode Penelitian

Penelitian menggunakan metode eksperimen, desain penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan variasi konsentrasi ekstrak etanol 70% yaitu 1 g/mL, 0,8 g/mL, 0,6 g/mL, 0,4 g/mL, 0,2 g/ml dan 0,1 g/mL dengan 3 kali ulangan sehingga diperoleh 24 unit percobaan. Kontrol positif adalah antibiotik tetrasiklin sedangkan kontrol negatif akuades steril.

CARA KERJA PENELITIAN

Determinasi Tumbuhan Ashitaba

Tumbuhan ashitaba diambil dari kultivasi Kebun Percobaan Balai Tanaman Obat dan Senyawa Aromatik Manoko Lembang Bandung akan dideterminasi di laboratorium Taksonomi Tumbuhan Herbarium Universitas Jendral Soedirman Purwokerto.

Pembuatan Ekstrak

Daun ashitaba diambil dari kultivasi Kebun Percobaan Balai Tanaman Obat dan Senyawa Aromatik Manoko Lembang Bandung yang telah keringkan, kemudian diblender, di ayak sampai ukuran kecil-kecil (serbuk) menggunakan mesh 60, sebanyak 100 gram dimasukkan kedalam kolom (*chamber*), direndam (maserasi) dalam pelarut yaitu etanol 70% sebanyak 300 mL (1:3 b/v) diaduk sampai homogen, diendapkan dalam suhu kamar selama 2 x 24 jam, selanjutnya disaring dengan kertas saring yang diletakan pada *vacum pump*

sehingga didapatkan ekstrak dan residu dilakukan maserasi kembali sebanyak 2x, filtrat dikumpulkan, kemudian ekstrak dipisahkan dari pelarutnya menggunakan *rotary evaporator*, sisa pelarut diuapkan menggunakan *waterbath* selama 1 x 24 jam sehingga didapatkan ekstrak kental Agoes(2007)& Mpila *et al* (2012).

Pengujian Fitokimia

Pengujian fitokimia menurut Habrone (1987) dan Trevor (1995) adalah sebagai berikut ;

- a) Identifikasi Golongan Senyawa Alkaloid
Larutan uji hasil ekstraksi dibasakan dengan larutan amonia 10%, larutan basa di ekstraksi dengan kloroform, ekstrak kloroform diasamkan dengan HCl 1N, kemudian asam dipisahkan dan filtrat diuji dengan pereaksi dragendorf, endapan putih atau kuning menyatakan adanya alkaloid.
- b) Identifikasi Golongan Senyawa Fenol
Larutan uji hasil ekstraksi dimasukan dalam tabung reaksi, selanjutnya ditambahn pereaksi FeCl₃ dalam larutan etanol, hasil positif ditunjukkan dengan adanya warna hijau, merah ungu, biru dan hitam.
- c) Identifikasi Senyawa Flavonoid
Larutan uji hasil ekstraksi dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi butiran logam Mg dan larutan HCl 2N, campuran ini dipanaskan selama 5-10 menit, setelah dingin dan di saring, kedalam filtrat ditambahkan amil alkohol di kocok kuat-kuat, warna merah atau jingga pada lapisan amil alkohol menunjukkan adanya flavonoid.
- d) Identifikasi Golongan Senyawa Saponin
Larutan uji hasil ekstraksi dididihkan dalam penangas air selama 5 menit, setelah dingin kemudian disaring, filtrat dikocok kuat-kuat dengan arah vertikal selama 1-2 menit, senyawa saponin dapat ditunjukkan dengan adanya busa setinggi 1cm yang stabil setelah dibiarkan selama 1 jam atau pada penambahan 1 tetes HCl 0,1N.
- e) Identifikasi Senyawa Tanin
Larutan uji hasil ekstraksi ditambahkan larutan gelatin 1%

kedalam tabung reaksi, hasil positif ditandai dengan adanya endapan putih.

Penyediaan media dan reagensia

Disiapkan media kultur meliputi *Blood Agar plate*, *Manitol Salt Agar*, *Trypticase Soy Broth*, *Mueller Hinton Agar*, *Nutrient Agar*, di timbang bahan berbentuk serbuk dilarutkan dalam akuades 100 mL, dipanaskan menggunakan *hot plate* sambil sesekali diaduk sampai semua bahan larut, autoklaf pada suhu 121°C tekanan 1,2 atm selama 15 menit. Timbang 0,85 gram NaCl larutkan dengan 100 mL aquadest, autoklaf selama 15 menit untuk membuat larutan garam fisiologis steril, plasma sitrat disiapkan dengan perbandingan darah dan *natrium citrat* (9:1), sentrifugasi pada kecepatan 3.000 rpm selama 20 menit dan diambil bagian supernatan yang berwarna kekuningan (plasma sitrat).

Isolasi dan Identifikasi Bakteri *Staphylococcus aureus*

Siapkan swab steril yang telah dibasahi dengan larutan garam fisiologis steril, usapkan swab tersebut pada permukaan luka diabetes mellitus, masukan swab tersebut pada media cair Trypticase Soy Broth, Inkubasikan pada suhu 37 °C selama 24 jam. Hari selanjutnya lakukan pewarnaan Gram dan isolasi hasil pertumbuhan pada media Blood agar, Manitol Salt Agar, ambil koloni yang tersangka lakukan uji biokimia, uji katalase dan uji plasma koagulasi untuk diagnosa bakteri *Staphylococcus aureus*.

Uji Sensitivitas Antibakteri

Untuk mengetahui kemampuan hasil ekstrak daun ashitaba sebagai antibakteri dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen dilakukan uji secara in-vitro untuk mengetahui ukuran zona daya hambat. Peralatan dan bahan yang digunakan untuk uji zona daya hambat disterilisasi terlebih dahulu dengan autoklaf. Metode pengerjaan dilakukan secara steril di ruang *laminar air flow* untuk mencegah kontaminasi. Uji sensitivitas dilakukan dengan menggunakan kertas cakram diameter 6 mm dan diteteskan 10 µL ekstrak etanol

70% daun ashitaba pada kertas cakram, kemudian diletakan diatas media *Mueller Hinton Agar* yang telah diinokulasi dengan bakteri *Staphylococcus aureus* hasil isolasi dari hapus luka *diabetes mellitus* sebanyak 0,1 mL dengan kepadatan bakteri setara dengan 1 Mc. Farland (3×10^8 sel/mL). Masing-masing perlakuan pada tiap konsentrasi diulang 3 kali, kemudian diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C dalam inkubator. Diameter zona hambatan yang dihasilkan pada uji ini kemudian diamati (Arullappan *et al*, 2009).

Uji Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

Uji MIC dilakukan untuk mengetahui dosis minimum yang dapat digunakan untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen dari ekstrak daun ashitaba. Sebanyak 1 mL *trypticase soya broth* (TSB) ditambahkan pada setiap tabung uji. Sejumlah 1 mL filtrate ekstrak etanol daun ashitaba disiapkan dimasukan ke dalam tabung reaksi yang berbeda sesuai perlakuan dengan variasi konsentrasi 0,1-1g/mL dan kontrol positif masukan suspensi bakteri tanpa filtrat dan kontrol negatif hanya media TSB tanpa filtrat dan bakteri. Perlakuan tersebut diulang sebanyak 3 kali. Pengamatan MIC dilakukan dengan mengamati kekeruhan pada media sebagai indikasi adanya pertumbuhan bakteri setelah 24 jam, suhu inkubasi 37°C bila medianya bening menandakan tidak ada pertumbuhan bakteri.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Identifikasi Tanaman Ashitaba

Hasil identifikasi atau determinasi tanaman yang dilakukan di Herbarium Fakultas Biologi Universitas Jendral Soedirman Purwokerto terhadap tanaman ashitaba yang berasal dari Kebun Percobaan Tanaman Obat Balai Penelitian Tanaman Obat Manoko Lembang Bandung, dinyatakan bahwa tumbuhan tersebut tergolong jenis *Angelica keiskei koidz* yang termasuk dalam suku *Apiaceae*. Hasil uji determinasi terlampir.

Hasil Isolasi dan Identifikasi Bakteri *S. aureus*

Untuk mendapatkan isolat bakteri *S. aureus* dilakukan isolasi dan identifikasi dari bahan pemeriksaan berupa swab hapus luka pasien *diabetes mellitus* yang di rawat di Rumah Sakit Umum Dr. Soekarjo Tasikmalaya.

Hasil pembiakan pada media *Tryptone Soya Broth* (TSB)

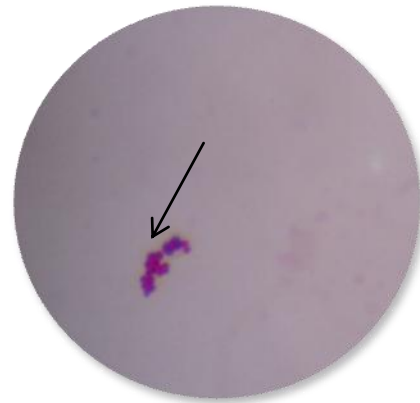
Pada media TSB terdapat kekeruhan, menunjukkan hasil positif (+), hal ini menandakan terdapat pertumbuhan bakteri yang diisolasi dari bahan pemeriksaan hapus luka *diabetes mellitus*. Suhu optimum yang mendukung pertumbuhan bakteri tersebut yaitu 37 °C, secara aerob selama 24 jam. Hasil pembiakan pada media TSB dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1. Pertumbuhan Bakteri pada Media TSB

Hasil Pengecatan Gram

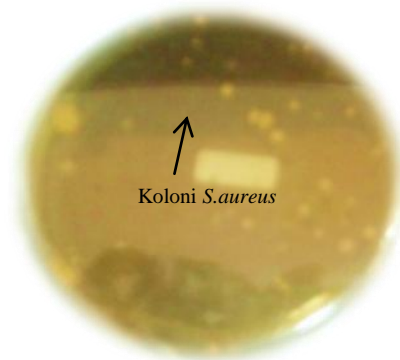
Terhadap bakteri yang tumbuh pada media TSB dilakukan teknik pengecatan Gram, hasil menunjukkan ditemukan bakteri berbentuk kokus, bergerombol seperti buah anggur, warna ungu, sifat Gram positif (+) diduga bakteri *Staphylococcus*. Hasil pengecatan Gram dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Hasil Pengecatan Gram Hapus Luka Diabetes Melittus menunjukkan bakteri *Staphylococcus* Gram +

Hasil *Total Plate Count* (TPC)

Bahan pemeriksaan swab hapus luka *diabetes mellitus*, setelah dilakukan pengenceran dengan seri pengenceran 1:10, 1:100, 1:1000 dalam larutan garam fisiologis steril pada media *Manitol Salt Agar* menggunakan teknik cawan sebar didapatkan hasil *Total Plate Count* bakteri *Staphylococcus* adalah 3×10^3 CFU (*Colony Forming Unit*)/mL. Hasil pemeriksaan *Total Plate Count* pada media *Manitol Salt Agar* (MSA) dapat dilihat pada Gambar 3.



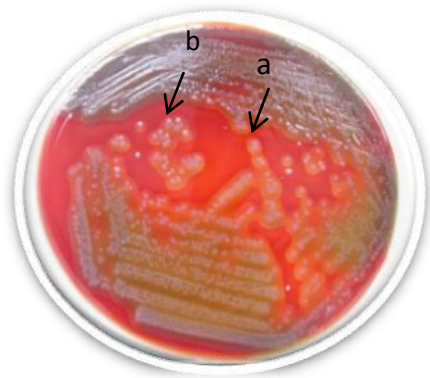
Gambar 3. Hasil *Total Plate Count* *S. aureus* dalam Media MSA

Hasil Pembiakan pada Media Plat

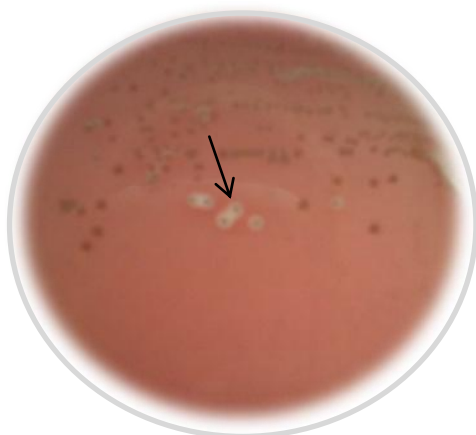
Hasil pembiakan pada media plat ditemukan koloni bakteri *Staphylococcus* yang tumbuh pada media MSA (gambar 3) menunjukkan karakteristik koloni berbentuk bulat, diameter 2 - 4 mm, warna

kuning bersifat manitol fermenter, warna media MSA berubah dari warna orange menjadi kuning, sedangkan hasil kultur pada media *Blood Agar Plate* (BAP) ditemukan koloni bakteri *Staphylococcus* menunjukkan karakteristik warna putih, sifat hemolisis ditandai dengan terdapat daerah bening disekitar koloni (β -hemolisis). Hasil pembiakan pada media BAP dapat dilihat pada Gambar 4.

Setelah pembiakan pada BAP, koloni yang diduga *Staphylococcus* koloni (a) dilakukan subkultur pada BAP untuk memperbanyak bakteri dan melihat reaksi hemolisis terhadap eritrosit, hasil pertumbuhan menunjukkan koloni bakteri *Staphylococcus* dengan karakteristik koloni bulat, smooth, diameter 2-4 mm, warna putih, sifat hemolisis biasanya ditunjukkan oleh koloni bakteri *S. aureus*.



Gambar 4. Hasil Pembiakan pada Media *Blood Agar Plat*, diduga koloni *Staphylococcus* (a), diduga koloni *Enterobacteriaceae* (b).



Gambar 5. Reaksi Hemolisis koloni *S. aureus* pada Media *Blood Agar Plat*.

Hasil Uji Katalase

Koloni bakteri *Staphylococcus* yang tumbuh pada media BAP, setelah direaksikan dengan H_2O_2 3% menunjukkan hasil positif (+) terdapat gelembung. Cappuccino (2008) menyatakan bahwa bakteri *S. aureus* memiliki enzim katalase yang mampu menghidrolisis hidrogen peroksida menjadi molekul air dan oksigen (O_2), setelah direaksikan dengan koloni akan terbentuk gelembung sedangkan bakteri *Streptococcus* tidak memberikan reaksi positif, sehingga dapat digunakan untuk membedakan koloni bakteri *Staphylococcus* dengan *Streptococcus* dalam identifikasi.

Uji Plasma Koagulasi

Koloni bakteri *Staphylococcus* dari hasil subkultur pada BAP yang menunjukkan hasil tes katalase (+), selanjutnya dilakukan uji plasma koagulasi dengan ditambahkan plasma sitrat perbandingan (1:5) dihomogenkan dalam objek glass kemudian dibandingkan terhadap kontrol negatif, yaitu NaCl fisiologis steril ditambah koloni *Staphylococcus*. Hasil test menunjukkan terdapat gumpalan/ aglutinasi (+), sedangkan pada kontrol menunjukkan tidak ada gumpalan/aglutinasi (-). Interpretasi hasil aglutinasi (+) menurut Cappuccino (2008), menunjukkan jenis bakteri *Staphylococcus* patogen yaitu *S. aureus*.

Hasil Screening Fitokimia Ekstrak

Hasil pemeriksaan secara kualitatif menunjukkan bahwa ekstrak etanol 70% daun ashitaba dengan metode maserasi mengandung golongan senyawa : Alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, terpenoid, dan fenol. Hasil kualitatif senyawa fitokimia yang terdapat dalam ekstrak etanol 70 % daun ashitaba dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Etanol 70% Daun Ashitaba

No	Golongan Senyawa	Hasil Uji	Blanko
1	Alkaloid	+++	-
2	Flavonoid	+++	-
3	Tanin	+++	-
4	Saponin	+++	-
5	Terpenoid	+	-
6	Fenol	+++	-

Keterangan : +++ (sangat kuat); ++ (kuat); + (lemah); - (tidak terdeteksi)

Tabel 1 menunjukkan bahwa hasil uji skrining fitokimia memberikan hasil positif sangat kuat pada uji flavonoid, tanin, saponin, fenol dan polifenol dan positif lemah terhadap terpenoid hal ini menunjukkan bahwa pelarut etanol bersifat polar dapat menarik zat-zat aktif yang bersifat polar seperti alkaloid, flavonoid, tanin, saponin dan fenol sedangkan terpenoid umumnya diekstraksi menggunakan pelarut eter atau klorofom bersifat non polar (Sirait, 2007).

Hasil Uji Aktivitas Antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70% daun ashitaba terhadap bakteri patogen Gram positif yaitu *S. aureus* metode difusi cakram, untuk mendapatkan gambaran kemampuan ekstrak etanol daun ashitaba dalam menghambat berbagai bakteri patogen dilakukan uji pendahuluan terhadap ekstrak yang dilarutkan dalam NaCl fisiologis. Digunakan NaCl fisiologis karena dengan akuades tidak larut secara homogen, kelarutan ekstrak lebih baik dalam larutan NaCl fisiologis steril, hal ini diduga adanya senyawa yang bersifat non polar pada ekstrak, dugaan diperkuat oleh hasil uji fitokimia yang menunjukkan hasil positif terhadap uji terpenoid yang bersifat non polar.

Dari hasil penelitian uji aktivitas ekstrak etanol daun ashitaba (*Angelica keiskei*) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* secara *in vitro* diperoleh hasil seperti pada Tabel 2.

Dari Tabel 2 dapat diketahui bahwa konsentrasi ekstrak etanol 70% daun ashitaba, dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* yang diisolasi dari hapus luka diabetes melitus pada konsentrasi 1,0; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2 dan 0,1 g/mL (positif terdapat zona hambat), pada konsentrasi dibawah 0,1 g/mL tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus*.

Berdasarkan hasil pengukuran, dapat diketahui bahwa konsentrasi ekstrak etanol daun ashitaba (*Angelica keiskei*) dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* hal ini ditandai dengan adanya zona jernih disekitar kertas cakram. Rata-rata diameter daya hambat yang terbentuk dengan perlakuan ekstrak konsentrasi 1,0- 0,01 g/mL secara berturut-turut menunjukkan zona hambat semakin kecil konsentrasi maka zona hambat yang terbentuk semakin kecil, sedangkan rata-rata diameter hambat untuk kontrol positif tetrasiklin adalah 29,05 mm dan kontrol negative akuades 0,00 mm.

Tabel 2. Hasil uji aktivitas ekstrak etanol daun ashitaba (*Angelica keiskei*) terhadap pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*

No	Konsentrasi (g/mL)	Hasil Uji Daya Hambat	ZonaHambat			Rata-rata (mm)	Diameter Hambat
			Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III		
1	1	Positif	19,09	18,05	19,05	18,73	18,73±0,59
2	0,8	Positif	16,05	15,90	15,90	15,95	15,95±0,09
3	0,6	Positif	14,50	14,60	14,60	15,57	15,57±0,06
4	0,4	Positif	11,18	11,10	11,18	11,15	11,15 ±0,05

5	0,2	Positif	10,35	10,35	10,35	10,35	10,35 ±0,00
6	0,1	Positif	9,95	9,95	9,95	9,95	9,95 ±0,00
7	0,08	Negatif	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ±0,00
8	0,06	Negatif	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ±0,00
9	0,04	Negatif	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ±0,00
10	0,02	Negatif	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ±0,00
11	0,01	Negatif	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 ±0,00

Keterangan : Kontrol positif (media Mueller-Hinton + suspensibakteri + tetracyclin 0.01 g/mL) = (+) terdapat zona hambat sebesar 29,05 mm. Kontrol negatif (media Mueller-Hinton + suspensi bakteri + *aquadest* steril) = (-) tidak terdapat zona hambat (0,00 mm).

Zona hambat yang terbentuk pada masing-masing konsentrasi ekstrak etanol daun ashitaba (*Angelica keiskei*) berbeda, semakin besar konsentrasi ekstrak etanol daun ashitaba (*Angelica keiskei*), maka semakin besar pula diameter zona hambat yang ditunjukkan terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. Hal tersebut diduga ada hubungannya dengan kandungan zat aktif yang terdapat pada daun ashitaba yang berperan penting dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Zat aktif yang terkandung dalam daun ashitaba yaitu senyawa golongan alkaloid, saponin, flavonoid, fenol dan tanin.

Senyawa saponin dapat melakukan mekanisme penghambatan dengan cara membentuk senyawa kompleks dengan membran sel melalui ikatan hidrogen, sehingga dapat menghancurkan sifat permeabilitas dinding sel bakteri.

Senyawa polifenol dan flavonoid merupakan senyawa golongan dari fenol. Senyawa fenol memiliki mekanisme kerja dalam menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara inaktivasi protein (enzim) pada membran sel bakteri. Selain itu flavonoid bersifat polar sehingga lebih mudah menembus lapisan peptidoglikan yang juga bersifat polar pada bakteri gram positif, selain itu pada dinding sel gram positif mengandung polisakarida yang merupakan polimer larut dalam air yang berfungsi sebagai transpor ion positif. Sifat larut inilah yang menunjukkan bahwa dinding sel bakteri Gram positif bersifat lebih polar.

Senyawa tanin memiliki aktivitas antibakteri karena mempunyai kemampuan untuk menginaktivasi adhesin mikroba, enzim dan protein transport pada membran sel. Secara garis besar mekanismenya adalah dengan merusak

membran sel bakteri (Akiyama, *et al.*, 2001).

Alkaloid bersifat antibakteri karena memiliki kemampuan menghambat kerja enzim untuk mensintesis protein bakteri, mengganggu metabolisme bakteri sehingga membuat kebutuhan energi tidak tercukupi dan mengakibatkan rusaknya sel bakteri secara permanen yang berlanjut kepada kematian bakteri.

Ekstrak etanol daun ashitaba (*Angelica keiskei*) dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* yang merupakan bakteri Gram positif. Dinding sel bakteri Gram positif terdiri atas beberapa lapisan peptidoglikan yang membentuk struktur lapisan tebal dan kaku serta mengandung substansi dinding sel yang disebut asam teikoat. Selain itu, bakteri Gram positif memiliki susunan dinding sel yang tidak terlalu rumit atau kompleks, sehingga dinding sel bakteri Gram positif masih dapat ditembus oleh senyawa aktif yang terdapat di dalam ekstrak etanol daun ashitaba seperti tanin, saponin, alkaloid, flavonoid dan fenol.

Staphylococcus aureus merupakan bakteri Gram positif anggota famili micrococcaceae. Pada media pertumbuhan koloni berbentuk bulat, berwarna abu-abu hingga kuning tua sedangkan pada pewarnaan Gram didapat bakteri berbentuk bulat, berwarna ungu dan bergerombol seperti susunan buah anggur. *Staphylococcus aureus* toleran terhadap kadar garam yang tinggi sehingga dapat tumbuh pada media selektif seperti MSA (*Manit Salt Agar*) dan pada saat uji aktivitas antibakteri ditumbuhkan pada media Mueller Hinton, suhu inkubasi 37°C dapat tumbuh dengan optimal.

Berdasarkan hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70% daun ashitaba dapat diketahui bahwa

konsentrasi hambat minimal (Minimum Inhibitory Concentration/ MIC) ekstrak etanol daun ashitaba terhadap bakteri *S. aureus* adalah 0,1 g/mL dengan rata-rata diameter hambat sebesar $9,95 \pm 0,00$.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol 70% daun ashitaba (*Angelica keiskei*) dapat menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* secara *in vitro* pada konsentrasi 1- 0,1 g/mL dan nilai konsentrasi hambat minimal adalah 0,1g/mL.

DAFTAR PUSTAKA

- Adam, Syamsuri. 1992. *Dasar-Dasar Mikrobiologi Parasitologi*. Jakarta: EGC.
- Agoes G. 2007. *Teknologi Bahan Alam*. ITB, Bandung.
- Agus, Syarurahman dkk. 1994. *Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta: Bina Aksara.
- Aidilfiet Chatim dan Suharto. 1994. *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta: Binarupa Aksara.
- Akihisa, T., Tokuda, H., Ukiya, M. 2003. Chalcones, coumarins and flavonones from the exudate of *Angelica keiskei* and their chemopreventive effects. *Elsevier*. 201: 133-137
- Akiyama, H., Fujii., Yamasaki, O., Oono, T., Iwatsuki, T. 2001. *Antibacterial Action of Several Tannins Against Staphylococcus aureus*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.
- Arullappan, S., Z. Zakaria, and D.F Basri. 2009. Preliminary Screening of Antibacterial Activity Using Crude Extracts of *Hibiscus rosa sinensis*. *Tropical Life Sciences Research*, 20 (2): 109-118.
- Baba, K. 1995. Healthy vegetable ashitaba. *Chikuya Shuubansha*. p125.
- Baumman. 2008. *Angelica: Part II, Skin & Allergy News*, www.litelaturesearch.net diakses 1 Juni 2013.
- Bonang, Gerard. 1982. *Mikrobiologi Kedokteran untuk Laboratorium Klinik*, Jakarta: Gramedia
- Bove, F. Ashitaba : Tomorrow's Leaf Today. <http://moderenfarmer.com/2013/04/ashitaba-tomorrows-leaf-today/diakses> tanggal 24 September 2013.
- Clinical and Laboratory Standar Institute (CLSI), 2006. *Methods Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically: Approved Standar*.
- Departemen Kesehatan RI. 2000. *Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan. Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Depkes RI.
- Enoki, T., Ohnogi, H. and Nagamine K. 2007. Antidiabetic activities of Chalcones isolated from a Japanese herb *Angelica keiskei*. *Journal of agricultural and food chemistry*. 55 : 6013-6017.
- Fukuo, Y., Kazuya, O., Hayami gun. Antimicrobial Agent. *Japan Bio Science*. 11:160,190.
- Gembong Citro Soepomo. 1997. *Morfologi Tumbuhan*. Yogyakarta: UGM.
- Harborne, J.R. 1987. *Metode fitokimia Pantunan Cara Metode Menganalisis Tumbuhan*. ITB, Bandung.
- Hastuti Tri Rini. 2008. Faktor-Faktor Resiko Ulkus Diabetika Pada Penderita Diabetes Mellitus. *Tesis*, Universitas Diponegoro, Semarang.
- Hida, K. 2007. *Ashitaba. A Medicinal Plant and Health Method*. www.Organicashitaba.com/articles.html. diakses: 9 Desember 2014.
- Jawetz, Melnick and Adelberg. 1996. *Mikrobiologi Kedokteran*. Terjemahan oleh Edi Nugrohdan RF. Maulany. Jakarta: EGC.
- Jawetz, Melnick and Adelberg. 2005. *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta: Salemba Medika.
- Jawetz Melnick and Adelberg. 1996. *Mikrobiologi Kedokteran*. Terjemahan oleh Edi Nugrohdan dan RF. Maulany, EGC, Jakarta

- Kayser, F.H., Beinz, K.A., Eckertz, J., Zinkernagel, R.M. 2005. *Medical Microbiology*. Thieme, New York.
- Kishiro, S., S. Nunomura, H. Nagai. 2008. Selinidin Suppresses IgE-Mediated Mast Cell Activation by Inhibiting Multiple Steps of FcεRI Signaling. *Bioll. Pharm. Bull.* 31 (3): 442-448.
- Lay, Bibiana W. 1994. *Analisis Mikroba di Laboratorium*. Jakarta: Raja Grafindo Persada.
- Li, L., G. Aldini, M. Carini, C.Y.O. Chen, H. Chun, S. Choo, K. Park, C.R. Correa, R.M. Russell, J.B. Blumberg dan K. Yeum. 2009. *Characterisation, extraction efficiency, stability and antioxidant activity of phytonutrients in Angelica keiskei*. Food chemistry.
- Mpila, D.A., Fatimawali dan Weny, I.W. 2012. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Mayana (*Coleus atropurpureus* (L) Benth) Terhadap *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa* Secara in vitro. *Pharmakon article* 1 (1): 1-9.
- Mustarichie Resmidkk, 2011. *Metode Penelitian Tanaman Obat*. Jakarta: Widya Padajaran.
- Nurkusuma, D.D. 2009. Faktor yang Berpengaruh Terhadap Kejadian Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA) Pada kasus Infeksi Luka Pasca Operasi di Ruang Perawatan Bedah Rumah Sakit Dokter Kariadi Semarang, *Tesis*, Universitas Diponegoro, Semarang.
- Ogawa, H., Nakamura, R., Baba, K. 2005. "Beneficial effect to laserpitin, a coumarin compound from *Angelica keiskei*, on lipid metabolism in strokeprone spontaneously hypertensive rats". *Journal of Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 32:1104-1109.
- Safitri, RatudanSinta S. 2010. *Medium Analisis Mikroorganisme (Isolasidan Kultur)*. Jakarta : Trans Info Media.
- Schaeffler S. 1989. Methicillin Resistant Strain of *Staphylococcus aureus* Resistant to Quinolones, *Journal of clinical microbiologi*. 4:46-48
- Seidemann, J. 2005. *Word Spice Plant*. Springer, Germany.
- Sembiring Bagem Br., Manoi Feri. 2011. Identifikasi Mutu *Ashitaba*. *Litrro*. 22(2) :177-185.
- Shibata, S. 1994. Antitumorigenic chalcones. *Stem cells*. 12 : 44-52.
- Sigurdsson, S., H.M. Ogmundsdottir, J. Hallgrimsson dan S. Gudbjarnson. 2005. *Antitumor activity of Angelica archangelica leaf extract. In vivo*.
- Soemarno. 1987. *Penuntun Praktikum*. Yogyakarta: C.V karyona.
- Stephen, Gillspie, Kathleen B. Bamford. 2009. *At a Glance Mikrobiologi Medis dan Infeksi*. Jakarta: Erlangga.
- Trevor Robinson, 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. ITB, Bandung.
- Usman Chatib Warsa. 1994. *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta: Binarupa Aksara.
- Volk, A., W., and Wheeler, F., M. 1990. *Mikrobiologi Dasar*. Erlangga, Jakarta.
- Wahjono, 2007, *Peran Mikrobiologi Klinik Pada Penganganan Penyakit Infeksi*, "Makalah disajikan dalam pidato pengukuhan guru besar Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang 28 Juli 2007.
- Warsa, U.C., Sanitosa A.U.S. dan Fera S. 1994. Efektivitas Cefmetazole terhadap MRSA, Bagian Mikrobiologi FKUI Jakarta
- Wicaksono, R. dan H. Syafirudin. 2003. *Ashitaba (Angelica keiskei Koidzumi) tanaman peningkat system kekebalan tubuh*. Prosiding Seminar dan Pameran Nasional Tumbuhan Obat Indonesia XXIV