

# UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI SECARA IN VIVO EKSTRAK ETANOL DAUN PAKIS SAYUR (*Diplazium esculentum* Swartz) PADA MENCIT JANTAN GALUR BALB/C YANG DIINFEKSI *Salmonella typhi* ATCC 14028

Wahyuni, Fery Indradewi Armadany, Mirna Widasri

Fakultas Farmasi, Universitas Halu Oleo

## ABSTRACT

Vegetable fern leaf (*Diplazium esculentum* Swartz) is kind of plant that can inhibit *Salmonella typhi* growth. The study aimed to determine the effect of vegetable fern leaf ethanolic extract on male mice that had been infected by *Salmonella typhi* bacteria. Vegetable fern leaf powder was macerated with 95% ethanol and was evaporated with vacuum rotary evaporator. Dosage variation of vegetable fern leaf ethanolic extract on male mice were (100; 200; 300; 400 and 500 mg/kgbb). Blood of male mice veins was cultured on agar media and counted bacterial colonies that were formed. Study result showed increasing of vegetable fern leaf ethanolic extract could decrease the colony of *Salmonella typhi* that infected in male mice. Vegetable fern leaf ethanolic extract with 500 mg/kgbb could decrease 6,21% of *Salmonella typhi* in male mice. vegetable fern leaf ethanolic extract with dosage variation not significantly decrease the amount of bacteria colonies in mice. Compound identification by thin layer chromatography (TLC) showed vegetable fern leaf ethanolic extract contained of flavonoids, saponins, alkaloids, tanins and terpenoids.

**Keywords:** antibacterial, *Diplazium esculentum* S., *Salmonella typhi*

## PENDAHULUAN

Penyakit infeksi adalah jenis penyakit yang disebabkan oleh mikroba dan biasanya banyak terdapat di daerah tropis seperti Indonesia. Tindakan medis untuk menanggulangnya digunakan antibiotik (Refdanita, dkk., 2004). Antibiotik mempunyai peranan penting dalam dunia kesehatan, karena mampu menghambat maupun membunuh bakteri penyebab infeksi. Menurut WHO, penggunaan antibiotik yang tepat adalah penggunaan antibiotik yang efektif dari segi biaya dengan peningkatan efek terapeutik klinis, meminimalkan toksisitas obat, dan meminimalkan terjadinya resistensi (Amin, 2014).

Resistensi terhadap antibiotik menjadi ancaman kesehatan masyarakat

global yang terus meningkat (Rosenova, 2014). Munculnya bakteri patogen yang resisten terhadap beberapa jenis antibiotik tertentu sangat menyulitkan proses pengobatan sehingga mengakibatkan tingginya angka kematian. Penyebab utamanya adalah penggunaannya yang meluas dan tidak rasional (Utami, 2012).

Beberapa tahun terakhir ditemukan adanya kasus resisten terhadap antibiotik yang lazim digunakan untuk demam tifoid. Resistensi pada strain *Salmonella typhi* untuk kloramfenikol pertama kali terjadi di Inggris tahun 1950 dan di India tahun 1972. Resistensi tersebut ternyata diikuti oleh antibiotik yang lain, strain *S. typhi* yang resisten terhadap ampisilin dilaporkan pertama kali di Meksiko tahun 1973. Pada

perkembangan selanjutnya, beberapa negara melaporkan adanya strain *S. typhi* yang telah resisten terhadap dua atau lebih golongan antibiotik yang lazim digunakan yaitu ampisilin, kloramfenikol, dan kotrimoksazol yang dikenal dengan strain *multi drug resistance* (MDR) *S.typhi* (Ajizah, 2004).

Salah satu tanaman yang banyak dimanfaatkan sebagai obat adalah *Diplazium esculentum* yang dikenal dengan pakis sayur. Secara empirik, rebusan rimpangnya digunakan untuk mengobati batuk berdarah sedangkan bagian daunnya digunakan untuk terapi sakit kepala, nyeri pada luka dan demam (Khausik, dkk., 2011). Selain itu menurut Lense (2011) tanaman pakis juga digunakan untuk mengobati disentri, gangguan pencernaan, diare, pembengkakan kelenjar dan berbagai infeksi pada kulit.

Menurut Vincent, dkk., (2014) ekstrak air dan etanol dari *D.esculentum* menunjukkan adanya aktivitas terhadap bakteri patogen seperti *S. typhi*, *Salmonella arizonae*, *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Pada uji skrining antibakteri, 66,7% dari ekstrak *D.esculentum* menunjukkan aktivitas bakteristatik. Data yang dilaporkan menunjukkan bahwa semua ekstrak *D.esculentum* dari yang non polar-polar memiliki aktivitas antimikroba dengan kadar hambat minimum (KHM) berkisar antara 0,08-0,31 mg/mL (Gwee dkk., 2013). Berdasarkan penelitian

sebelumnya menunjukkan ekstrak *D.esculentum* memiliki aktivitas antimikroba yang kuat terhadap *S. typhi* dengan diameter zona hambat sebesar 16,33 mm dan kadar hambat minimum (KHM) untuk masing-masing ekstrak kloroform maupun ekstrak methanol *D.esculentum* yaitu 6,3 mg/mL dan 1,6 mg/mL (Akter, dkk., 2014).

Berdasarkan hasil skrining fitokimia daun tanaman pakis sayur, menunjukkan adanya senyawa golongan glikosida, saponin, steroid, alkaloid, glukosida, taninn dan flavonoid (Akter, 2014). Menurut Khausik dkk., (2012) tanaman pakis mengandung senyawa flavonoid seperti myrcetin dan  $\alpha$ -tokopherol. Beberapa kajian farmakologi telah dilakukan pada daun *D. esculentum* dan menunjukkan adanya aktivitas sebagai laksatif, anti inflamasi, antioksidan, dan anthelmintik (Amit dan Farswan, 2012).

Adanya masalah infeksi *S. typhi* yang menyebabkan gangguan gastrointestinal dan semakin meningkatnya sifat resistensi bakteri terhadap antibiotik, maka peneliti tertarik untuk mengkaji aktivitas antibakteri daun pakis sayur secara *in vivo* yang dinilai akan mampu menjadi alternatif penanganan infeksi bakteri tersebut.

## **METODE PENELITIAN**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang dilakukan dengan kontrol. Penelitian menggunakan 35 ekor

mencit. Mencit yang digunakan adalah mencit jantan galur BALB/C dengan bobot 30-35 g. Tahap awal dalam penelitian ini yaitu dilakukan penyiapan bahan dan alat yang digunakan yaitu ekstrak etanol daun pakis sayur, *Salmonella typhi* ATCC 14028, silika gel, levofloksazin, etanol 70%, NaCl fisiologis, standar Mc. Farland No. 0,5, salmonella shigella agar (SSA), EDTA, timbangan mencit, *restrainer* mencit, vial dan tutup, gunting, sonde oral, cawan petri, dan *colony counter*.

Tahap selanjutnya yaitu penyiapan hewan dan pemeriksaan parameter awal hewan uji. Bahan uji yang digunakan yaitu ekstrak etanol daun pakis sayur (*Diplazium esculentum* Swartz) yang dibagi kedalam lima dosis, yaitu 100 mg/kg bb, 200 mg/kg bb, 300 mg/kg bb, 400 mg/kgbb dan 500 mg/kgbb. Bahan uji tersebut disuspensikan dalam akuades yang diberikan dengan volume 1 mL/20 g bb mencit.

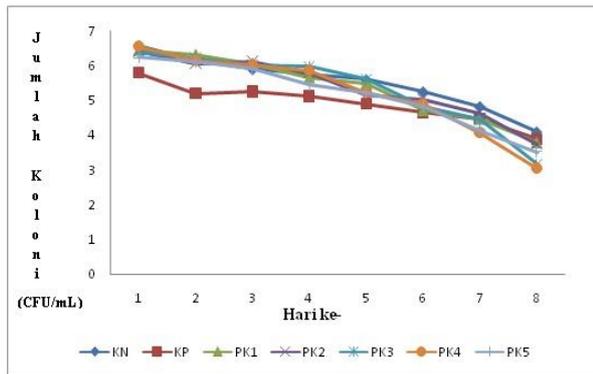
Hewan uji dikelompokkan secara acak masing-masing dibagi dalam 7 kelompok, tiap kelompok terdiri dari lima ekor mencit yaitu kelompok kontrol negatif diinfeksi bakteri *S. typhi* dan diberi akuades 1 ml, kontrol positif diinfeksi bakteri *S. typhi* dan diberi levofloksazin 1,43 mg/kg bb, dan kelompok uji diinfeksi bakteri *S. typhi* dan diberi suspensi daun pakis sayur dalam akuades dengan dosis 100 mg/kg bb, 200 mg/kg bb, 300 mg/kg bb, 400 dan 500 mg/kg bb. Mencit dipuasakan terlebih dahulu selama 1 jam.

Pengujian ini diawali dengan pemeriksaan jumlah koloni awal bakteri dalam darah mencit, kemudian diberikan sediaan uji secara oral. Tiap 1x24 jam diambil darah semua hewan uji melalui vena ekor sebanyak 50 µl dan diletakkan didalam tabung Eppendorf kemudian ditambah dengan 450 µl NaCl fisiologis 0,9% dan dilakukan penanaman pada media SSA dengan cara *pour plate*. Selanjutnya dilakukan inkubasi pada suhu 37<sup>o</sup> C selama 24 jam. Bakteri *S. typhi* akan membentuk koloni berwarna merah dengan warna hitam pada pusat koloninya. Hasil inkubasi tersebut dihitung jumlah koloninya dengan menggunakan alat *colony counter*.

Data penelitian yang diperoleh kemudian dianalisis dengan uji ANOVA ( $p < 0,05$ ) dilanjutkan dengan Uji *Post Hoc* (LSD) untuk mengetahui adanya perbedaan antara kelompok uji dengan kelompok kontrol. Parameter yang digunakan adalah jumlah koloni bakteri dalam darah mencit dan persen penurunannya.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis dilakukan terhadap hasil penurunan jumlah koloni bakteri didalam darah mencit dimulai pada hari pertama hingga hari ke-8 setiap 1 kali 24 jam setelah pengobatan diberikan. Hasil pengujian aktivitas antibakteri pada setiap kelompok perlakuan dan kelompok kontrol dapat dilihat pada Gambar 1.



**Gambar 1.** Penurunan Jumlah Koloni Bakteri *Salmonella typhi* dalam darah mencit Balb/C Selama 8 hari untuk KN (Kontrol negatif), KP (Kontrol positif), PK1 (ekstrak 100 mg/kgbb), PK2 (ekstrak 200 mg/kgbb), PK3 (ekstrak 300 mg/kgbb), PK4 (ekstrak 400 mg/kgbb), PK5 (ekstrak 500 mg/kgbb).

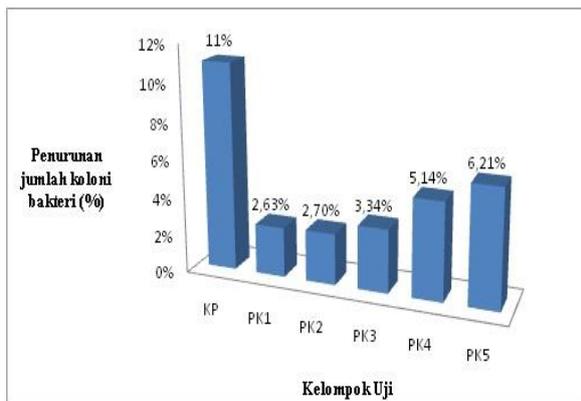
Gambar 1 menunjukkan adanya penurunan jumlah koloni bakteri dalam darah mencit pada masing-masing kelompok perlakuan dan kelompok kontrol selama 8 hari pengobatan. Kelompok perlakuan menggunakan ekstrak etanol daun pakis sayur dengan dosis 100, 200, 300, 400 dan 500 mg/kgbb sedangkan untuk kelompok kontrol positif menggunakan levofloksazin serta kelompok kontrol negatif hanya diberikan akuades sebanyak 1 mL.

Berdasarkan Gambar 1 menunjukkan bahwa log penurunan jumlah koloni bakteri untuk kelompok kontrol negatif dari hari pertama sebesar 6,553 CFU/mL menurun hingga hari ke-8 sebesar 4,084 CFU/mL. Pada kelompok kontrol positif log penurunan jumlah koloni bakteri dari hari pertama sebesar 5,777 CFU/mL dan menurun pada hari ke-8 pengobatan hingga 3,883 CFU/mL. Untuk

kelompok perlakuan, nilai log penurunan jumlah koloni bakteri paling rendah terjadi pada kelompok mencit yang diberikan ekstrak dengan dosis 100 mg/kgbb yakni dari 6,432 CFU/mL menurun hingga 3,79 CFU/mL pada hari ke-8 pengobatan. Sedangkan untuk kelompok perlakuan dengan nilai log penurunan jumlah koloni bakteri yang lebih besar terjadi pada kelompok mencit yang diberikan ekstrak dengan dosis 300 mg/kgbb dengan nilai penurunan koloni bakteri pada hari pertama sebesar 6,384 CFU/mL menurun hingga hari ke-8 sebesar 3,146 CFU/mL dan kelompok mencit yang diberikan ekstrak dengan dosis 400 mg/kgbb dengan nilai penurunannya sebesar 6,538 CFU/mL pada hari pertama hingga 3,045 CFU/mL pada hari ke-8 pengobatan serta kelompok mencit yang diberikan ekstrak dengan dosis 500 mg/kgbb dengan nilai penurunan koloni bakteri yakni 6,226 CFU/mL menurun hingga 3,5 CFU/mL pada hari ke-8 pengobatan.

Namun berdasarkan hasil rata-rata log penurunan jumlah koloni bakteri diperoleh bahwa untuk kelompok kontrol negatif sebesar 5,505 CFU/mL, kelompok kontrol positif sebesar 4,899 CFU/mL dan kelompok perlakuan dengan dosis 100, 200, 300, 400 dan 500 mg/kgbb masing-masing memiliki log penurunan jumlah koloni bakteri sebesar 5,360; 5,356; 5,321; 5,222; dan 5,163 CFU/mL. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak dengan dosis 500 mg/kgbb dapat berpotensi besar menurunkan jumlah koloni bakteri

didalam darah mencit dibandingkan dengan kelompok perlakuan lain. Hasil persen log penurunan jumlah rata-rata koloni bakteri dapat dilihat pada gambar 2



**Gambar 2.** Persen penurunan jumlah rata-rata koloni bakteri *S. typhi* dalam darah mencit pada KP (Kontrol positif), PK1 (ekstrak 100 mg/kgbb), PK2 (ekstrak 200 mg/kgbb), PK3 (ekstrak 300 mg/kgbb), PK4 (ekstrak 400 mg/kgbb), PK5 (ekstrak 500 mg/kgbb) terhadap KN (Kontrol negatif).

Gambar 2 menunjukkan bahwa persen penurunan jumlah rata-rata koloni bakteri terhadap kontrol negatif untuk kelompok perlakuan yang paling besar secara berturut-turut yaitu pada kelompok mencit yang diberi ekstrak dengan dosis 500 mg/kgbb sebesar 6,21%, kelompok mencit yang diberi ekstrak dengan dosis 400 mg/kgbb sebesar 5,14%, kelompok mencit yang diberi ekstrak dengan dosis 300 mg/kgbb sebesar 3,34%, kelompok mencit yang diberi ekstrak dengan dosis 200 mg/kgbb sebesar 2,70%, dan pada kelompok mencit yang diberi ekstrak dengan dosis 100 mg/kgbb sebesar 2,63%. Sedangkan untuk kontrol positif

memiliki persen penurunan yang lebih besar dibandingkan kelompok perlakuan lain yaitu sebesar 11%. Hal ini disebabkan karena pada kontrol positif menggunakan antibiotik levofloksasin yang merupakan antibiotik pilihan terapi (*drug of choice*) untuk pengobatan infeksi bakteri *S. typhi* yang relatif lebih aman.

Analisis data dilakukan menggunakan program SPSS (*Statistical Package For Social Science*) ANOVA satu arah untuk mengetahui apakah pada masing-masing kelompok uji memiliki nilai penurunan jumlah koloni bakteri yang sama atau berbeda. Analisis data menggunakan ANOVA pada hari ke-1 hingga hari ke-3 pengambilan cuplikan darah mencit yang telah terinfeksi bakteri dan diberi pengobatan memiliki nilai F hitung secara berturut-turut yaitu 2,568; 5,135; 2,649 sedangkan nilai F tabel yang diperoleh yaitu 2,445, karena nilai F hitung > nilai F tabel dan nilai probabilitas < 0,05, maka hipotesis ( $H_0$ ) ditolak dan hipotesis ( $H_1$ ) diterima yang berarti bahwa ada perbedaan penurunan jumlah koloni bakteri pada tiap kelompok perlakuan. Berdasarkan hipotesis  $H_1$  dimana ada perbedaan tiap kelompok perlakuan, maka dapat dilanjutkan dengan uji berikutnya sesuai dengan nilai F hitung > nilai F tabel.

Kemudian dilanjutkan uji lanjutan LSD (*Least Significant Difference*) untuk mengetahui kelompok mana yang mengalami perbedaan bermakna.

Hasil menunjukkan bahwa pada hari pertama pengujian aktivitas antibakteri dengan analisis statistik LSD hanya kelompok kontrol positif terhadap kelompok perlakuan lain yang berbeda bermakna sedangkan kelompok kontrol negatif terhadap kelompok perlakuan yang diberi ekstrak daun pakis sayur dengan berbagai variasi konsentrasi menunjukkan hasil uji statistik yang sama. Hal tersebut juga terjadi pada hari kedua hingga hari ketiga.

Analisis data pada hari ke-4 hingga hari ke-8 pengambilan cuplikan darah mencit yang telah terinfeksi bakteri dan diberi pengobatan diperoleh nilai F hitung berturut-turut yaitu 1,693; 0,941; 0,408; 0,634; 0,899, sedangkan nilai F tabel yang diperoleh yaitu 2,445, karena nilai F hitung < nilai F tabel dan nilai probabilitas >0,05, maka hipotesis ( $H_0$ ) diterima. Berdasarkan  $H_0$  yang berarti tidak ada perbedaan antara kelompok perlakuan yang satu terhadap kelompok perlakuan yang lain, maka tidak dapat dilanjutkan dengan uji berikutnya. Hal ini sesuai dengan nilai F hitung < F tabel yang menunjukkan tidak ada pengaruh pemberian obat dan variasi dosis ekstrak etanol daun pakis sayur terhadap penurunan jumlah koloni bakteri *S.typhi* dalam darah mencit pada hari ke-4 hingga hari ke-8.

Berdasarkan analisis statistik pada hari pertama hingga hari ke-8 pengujian aktivitas antibakteri terhadap *S.typhi* dalam tubuh mencit, menunjukkan ekstrak

etanol daun pakis sayur dengan berbagai variasi dosis tidak secara signifikan dapat menurunkan jumlah koloni bakteri *S.typhi*. Hal ini berhubungan dengan kepekaan mikroorganisme terhadap zat aktif dari ekstrak dan distribusi zat aktif ekstrak terhadap bakteri penyebab infeksi. Distribusi zat aktif ekstrak terhadap bakteri penyebab infeksi, salah satunya dipengaruhi oleh jumlah zat aktif dari ekstrak yang mampu menembus dinding sel bakteri.

*S.typhi* merupakan bakteri gram negatif yang dinding selnya tersusun atas tiga komponen yaitu lipoprotein, membran terluar yang mengandung molekul protein yang disebut porin dan lipopolisakarida. Porin pada membran terluar dinding sel bakteri gram negatif bersifat hidrofilik. Porin yang terkandung pada membran terluar bakteri tersebut menyebabkan molekul-molekul komponen ekstrak sukar masuk ke dalam sel bakteri. Hal ini disebabkan oleh perbedaan sifat dari porin dan ekstrak dimana ekstrak cenderung bersifat hidrofobik. Akibatnya dalam kondisi demikian bakteri dapat bertahan hidup, memperbanyak diri, dan mampu menekan produksi metabolit sitotoksik sel fagosit yang menyebabkan terjadinya deaktivasi makrofag dan membalikkan efek protektif interferon- $\gamma$  dalam melawan infeksi bakteri tersebut (Basuki, 2004).

Meskipun secara statistik tidak ada pengaruh variasi dosis ekstrak etanol daun pakis sayur terhadap penurunan

jumlah koloni bakteri namun jika ditinjau berdasarkan Gambar 2 ekstrak etanol daun pakis sayur dengan berbagai variasi dosis berpotensi menghambat pertumbuhan bakteri *S.typhi* dalam tubuh mencit.

## KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun pakis sayur dengan berbagai variasi konsentrasi tidak secara signifikan dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi* pada mencit.

## UCAPAN TERIMAKASIH

Peneliti mengucapkan terimakasih kepada seluruh pihak Fakultas Farmasi Universitas Halu Oleo atas bantuan yang telah diberikan selama penelitian berlangsung.

## KEPUSTAKAAN

- Ajizah, A. Sensitivitas *Salmonella typhimurium* Terhadap Ekstrak Daun *Psidium guajava* L., *Bioscientiae*. 1(1). 2004
- Akter S., Md. Monir Hossain, Ismot Ara, dan Parvez Akhtar. *Investigation of In vitro Antioxidant, Antimicrobial and Cytotoxic activity of Diplazium esculentum* (RETZ). SW., *IJAPBC*. 3(3). 2014
- Amin L.Z. *Pemilihan Antibiotik yang Rasional*. *Medicinus*. 27(3). 2014
- Amit S. dan Farswan Mamta Singh F.M.. *In-Vitro Anthelmintic Activity of Diplazium esculentum* (Retz.) Swiss Rhizome Extract. *JPhar Phyto*. 1(4).2012
- Gunawan, S.G., Nafrialdi, R.S., dan Elysabeth. *Farmakologi dan Terapi*. Jakarta. *Balai Penerbit FKUI*. Jakarta. 2009
- Kaushik A, Kaushik J, Das A, Gemal S and Gaim D. *.IntJ Phar Sci Res*. 2(5).2011
- Lense O. *Biological screening of selected traditional medicinal plants species utilized bylocal people of Manokwari, West Papua Province*. *Nus Biosci*. 3(3). 2011
- Musnelina L., A. Fuad Afdhal, Ascobat Gani, dan Pratiwi Andayani. *Pola Pemberian Antibiotika Pengobatan Demam Tifoid Anak Di Rumah Sakit Fatmawati Jakarta Tahun 2001–2002*. *Makara Kesehatan*. 8(1). 2004.
- Refdanita, Maksum R., Nurgani A., dan Endang P. *Pola Kepekaan Kuman Terhadap Antibiotika Di Ruang Rawat Intensif Rumah Sakit Fatmawati Jakarta Tahun 2001 – 2002*. *Makara Kesehatan*. 8(2). 2004
- Rosenova, F. *Uji Aktivitas Antibakteri Secara In Vivo Fraksi Non-Polar Ekstrak Etanol Batang Inggu (Ruta angustifolia [L.] Pers) Pada Mencit Yang Diinfeksi Staphylococcus aureus dan Streptococcus mutans*. *Jurnal Penelitian Saintek*. 19(1). 2014
- Utami, E.R.. *Antibiotik, Resistensi dan Rasionalitas Terapi*. *Saintis*, 1(1). 2012.
- Vincent V. Tongco, Ronald ArletP. Villaber, Remil M. Agudadan Ramon A. Razal. *Nutritional and phytochemical screening, and total phenolic and flavonoid content of Diplazium esculentum*(Retz.) Sw. from Philippines. *J. Chem. Pharm. Res.*, 6(8). 2014.
- Wilson, G., *Textbook of organic medical and pharmaceutical chemistry*. New York. Edisi 11.Lippincott Williams & Wilkins. 2004.