

# Aktivitas Antibakteri Ashitaba (*Angelica keiskei*) terhadap *Streptococcus mutans*

Dyke Gita Wirasisya\*, Wahida Hajrin\*, Handa Muliasari\*

## Abstrak

**Latar belakang:** *Streptococcus mutans* merupakan bakteri penyebab awal terbentuknya karies gigi. Salah satu tanaman yang mempunyai aktivitas sebagai antibakteri adalah Ashitaba (*Angelica keiskei*) yang banyak ditemui di daerah Sembalun (Lombok Timur). Warga setempat memanfaatkan ashitaba untuk pelengkap makan dan getahnya untuk mempercepat penyembuhan luka.

**Metode:** Penentuan aktivitas antibakteri menggunakan metode makrodilusi dengan parameter akhir berupa Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM). Fraksinasi ekstrak menggunakan metode partisi cair-cari dan skrining fitokimia menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dengan folin-ciocalteu sebagai reagen visualisasi.

**Hasil:** Penelitian yang dilakukan menggunakan ekstrak etanolik ashitaba mendapatkan bahwa KBM ekstrak berada pada 0,5 mg/mL. Ekstrak tersebut kemudian difraksinasi dengan menggunakan pelarut, n-Heksan, etil asetat dan etanol. Hasil uji antibakteri dari 3 fraksi didapatkan bahwa KHM tidak dapat teramati dikarenakan gangguan/bias dari warna fraksi namun KBM dapat teramati pada fraksi N-Hexan (0,125 mg/mL) dan etil asetat (0,5 mg/mL) sedangkan pada hasil fraksi menggunakan etanol 96% tidak teramati adanya KBM.

**Kesimpulan:** Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ashitaba merupakan bahan alam potensial sebagai antibakteri.

## Katakunci

Ashitaba, antibakteri, *Streptococcus mutans*

\*Fakultas Farmasi Universitas Mataram

\*e-mail: dykegita.w@unram.ac.id

## 1. Pendahuluan

Ashitaba merupakan tanaman suku umbelliferae yang banyak tumbuh pada daerah Sembalun (Lombok Timur). Daunnya banyak dimanfaatkan oleh masyarakat setempat sebagai tanaman pelengkap pangan dan getahnya digunakan untuk mempercepat penyembuhan luka pada tubuh. Beberapa senyawa chalcone yang berhasil diisolasi dari ashitaba antara lain adalah xanthoangelol dan isobavachalcone yang secara lanjut diteliti mempunyai aktivitas sebagai penghambat radikal bebas, antibakteri dan dapat menginduksi apoptosis pada neuroblastoma serta sel leukemia.<sup>1-3</sup> Selain itu golongan senyawa alkaloid, triterpenoid, saponin, steroid dan glikosida juga terdeteksi pada batang dan daun ashitaba.<sup>4</sup> Sebelumnya telah dilaporkan efek antibakteri dari senyawa chalcone (xanthoangelol dan 4-hydroxyderricin) yang disolasi dari umbi ashitaba pada beberapa bakteri Gram positif dan negatif dengan aktifitas paling baik ditunjukkan senyawa pada bakteri Gram positif.<sup>5</sup> Karies merupakan salah satu masalah yang paling banyak ditemui pada gigi yang prevalensinya mencapai angka 90,05% menurut Survei Kesehatan Rumah Tangga Indonesia. Mikroorganisme yang dianggap paling berpengaruh terhadap kejadian awal karies gigi adalah *Streptococcus mutans* yang memproduksi asam laktat sehingga dapat menye-

babkan demineralisasi dan pembusukan gigi.<sup>6,7</sup>

Penelitian ini dilakukan untuk mengidentifikasi senyawa aktif antibakteri *Streptococcus mutans* pada ashitaba (*Angelica keiskei*) yang dapat menjadi landasan ilmiah dalam pengembangan antibakteri untuk mengatasi karies gigi.

## 2. Metode Penelitian

### 2.1 Pengumpulan dan Preparasi Sampel

Tanaman ashitaba diambil di Desa Sembalun, Kecamatan Sembalun, Kabupaten Lombok Timur, Provinsi Nusa Tenggara Barat. Ashitaba sebelum digunakan terlebih dahulu dibersihkan dari pengotor menggunakan air mengalir dan dikeringkan dengan dua metode yaitu menggunakan oven dengan suhu di bawah 40°C dan dengan sinar matahari secara tidak langsung menggunakan penutup kain hitam.

Simplisia kering ashitaba dihaluskan dengan blender. Ekstraksi serbuk dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% teknis. Sebanyak 400 gram serbuk ashitaba diekstraksi dengan 2.000 mL pelarut dalam bejana selama 3 hari, remaserasi dilakukan sebanyak 2 kali. Ekstrak cair tersebut digabungkan dan dikentalkan dengan menggunakan rotary evaporator (suhu < 65°C) sampai menjadi ekstrak kental.

Tabel 1. Berat dan Rendemen Hasil Partisi

| Nama               | Berat (g) | Rendemen (%0) | KHM            | KBM         |
|--------------------|-----------|---------------|----------------|-------------|
| Fraksi n-Heksan    | 5,24      | 26,2          | Tidak Teramati | 0.125 mg/mL |
| Fraksi etil asetat | 0,66      | 3,3           | Tidak Teramati | 0.5 mg/mL   |
| Fraksi etanol      | 7,04      | 35,2          | Tidak Teramati | -           |

## 2.2 Fraksinasi dan Deteksi

Ekstrak yang menunjukkan aktivitas antibakteri selanjutnya difraksinasi. Fraksinasi dilakukan menggunakan pelarut organik dengan tingkat kepolaran bertingkat dimulai dari n-hexana, etil asetat dan etanol 96%.

Deteksi senyawa dilakukan menggunakan teknik Kromatografi Lapis Tipis (KLT) menggunakan fase diam silika gel 60 F254. Masing-masing ekstrak dan fraksi dilarutkan dalam pelarut awal dan ditotolkan pada lempong KLT dan dikembangkan menggunakan fase gerak optimal dan setelahnya diamati pada sinar tampak, UV 254 nm dan UV 366 nm serta disemprot menggunakan folin ciocalteu untuk melihat adanya senyawa fenolik.

## 2.3 Uji Mikrobiologi

Preparasi sampel untuk uji mikrobiologi dilakukan untuk membuat ekstrak dan fraksi. Sampel berbentuk ekstrak untuk penentuan Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM) dibuat dengan kadar 4 mg/mL. Sampel fraksi dibuat dengan kadar 2 mg/mL dalam *Nutrient Broth* (NB) dengan menggunakan 25% Dimetil sulfoksida (DMSO) sebagai ko-solven, sampel uji selalu dibuat baru.

Preparasi bakteri uji dilakukan dengan menyegarkan bakteri stok. Sebanyak satu ose bakteri stok *Streptococcus mutans* pada media *Nutrient Agar* (NA) ditambahkan pada 2 mL NB, kemudian diinkubasi pada suhu  $\pm 37^{\circ}\text{C}$  selama 18-24 jam. Untuk memastikan tidak adanya kontaminasi, hasil inkubasi digoreskan pada NA dan kembali diinkubasi pada suhu  $\pm 37^{\circ}\text{C}$  selama 18-24 jam. Hasil inkubasi ini digunakan untuk membuat suspensi bakteri uji.

Suspensi bakteri uji selalu dibuat baru menggunakan satu ose bakteri yang telah disegarkan dan ditambahkan pada 2-5 mL media NB dan diinkubasi pada suhu  $\pm 37^{\circ}\text{C}$  selama 18-24 jam. Penyetaraan kekeruhan setara dengan standar 0,5 McFarland ( $1,5 \times 10^8$  CFU/mL) dilakukan dalam aqua pro injeksi. Kemudian dilakukan pengenceran 1.000x terhadap suspensi tersebut dalam media NB sehingga suspensi bakteri akhir adalah  $1,5 \times 10^5$  CFU/mL.

Kadar hambat minimum dari sampel ditentukan dengan metode makrodilusi pada volume 4 mL dengan menggunakan 5 tabung reaksi. Sebanyak 2 mL media NB dimasukkan pada tabung reaksi 2-5 kemudian sampel uji sebanyak 2 mL dimasukkan pada tabung nomor 1 dan 2. Dilakukan pengenceran dengan mengambil 2 mL pada tabung 2 dan dimasukkan pada tabung 3 dan seterusnya sampai tabung 5. Selanjutnya 2 mL isi dari tabung 5 dibuang dan ditambahkan 2 mL suspensi bakteri dalam media NB ( $1,5 \times 10^6$  CFU/mL) pada ta-

bung 1-5. KHM ditetapkan sebagai konsentrasi terkecil yang dapat menghambat bakteri yang ditandai dengan jernihnya media pertumbuhan setelah inkubasi pada suhu  $\pm 37^{\circ}\text{C}$  selama 18-24 jam. KBM ditentukan dengan tidak adanya pertumbuhan bakteri pada media agar setelah penggoresan satu ose suspensi uji dan inkubasi pada suhu  $\pm 37^{\circ}\text{C}$  dalam inkubator selama 18-24 jam.

## 3. Hasil dan Pembahasan

Ashitaba (*Angelica keiskei*) diambil di daerah Sembalun kabupaten Lombok Timur Provinsi Nusa Tenggara Barat pada bulan Agustus 2016. Ashitaba sebelum digunakan terlebih dahulu dibersihkan dari pengotor menggunakan air mengalir dan dikeringkan dengan dua metode yang berbeda yaitu menggunakan oven dan sinar matahari secara tidak langsung menggunakan penutup kain hitam. Pengerian dilakukan dengan tujuan untuk menghentikan reaksi enzimatik yang terjadi, sehingga kandungan kimia tanaman dapat terjaga stabilitasnya.

Simplisia lalu dikecilkan ukuran partikelnya menjadi bentuk serbuk. Penyerbukan dilakukan untuk memperluas permukaan simplisia serta merusak dinding sel tanaman sehingga pelarut dapat berpenetrasi untuk mencari kandungan kimia dalam tanaman.<sup>8</sup>

Dalam penelitian serbuk ashitaba diekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% dengan metode maserasi. Maserasi merupakan metode ekstraksi dengan cara merendam sampel dengan pelarut yang sesuai. Perendaman dapat dilakukan dalam waktu sehari-hari dengan harapan semakin lama waktu ekstraksi maka zat-zat yang terkandung di dalam sampel akan berpindah pada pelarut dengan maksimal.<sup>9</sup> Keuntungan maserasi mampu menjaga senyawa-senyawa yang terkandung di dalamnya agar tidak rusak terhadap panas, karena senyawa yang terkandung maupun yang aktif sebagai antibakteri belum diketahui sifat fisika dan kimianya. Setelah dilakukan ekstraksi, selanjutnya dilakukan penguapan dengan menggunakan *rotary evaporator* sampai didapatkan ekstrak etanol. Pada penelitian ini, digunakan 400 gram serbuk dan menghasilkan rendemen pengeringan sebesar 17,52%. Ekstrak ini berwarna hijau, memiliki rasa khelat, dan bau yang khas.

Biasanya proses standardisasi dilakukan pada simplisia dan ekstrak untuk menjamin reproduktibilitas apabila akan dilakukan penelitian berkelanjutan menggunakan produk dari bahan alam. Pada penelitian ini dilakukan penetapan pada 2 parameter yaitu organoleptis dan rendemen ekstraksi. Pengujian organoleptis ekstrak (bentuk, warna dan bau) dilakukan menurut cara yang tertera pada Farmakope Herbal Indonesia I tahun 2009,

dengan mengingat bahwa data organooptis hanya merupakan data deskriptis dan bukan parameter penentu standar kemurnian ekstrak bersangkutan.<sup>10</sup> Pada penelitian menggunakan bahan alam, penetapan rendemen ekstraksi adalah sangat penting karena hal ini merupakan cara paling mudah untuk menjamin reproduktibilitas hasil apabila akan dilakukan penelitian berkelanjutan.<sup>11</sup> Semakin besar rendemen ekstrak yang didapat maka dapat dikatakan bahwa semakin banyak pula senyawa yang dapat ditarik dari simplisia.

Golongan senyawa fenolik merupakan agen antibakteri yang pada konsentrasi rendah dapat menginaktivasi enzim-enzim penting pada sel sehingga menimbulkan gangguan keseimbangan sel sedangkan pada konsentrasi tinggi senyawa fenolik berperan sebagai racun pada protoplasma dengan cara mengendapkan protein sel serta dapat merusak dan menembus dinding sel sehingga mengakibatkan kebocoran sel.<sup>12</sup> Oleh karena itu, keberadaan senyawa ini diidentifikasi dengan menggunakan KLT dengan pereaksi semprom folin ciocalteu.

Dari hasil KLT terlihat ada bercak signifikan pada Rf 0,93 dan 0,96 yang pada sinar tampak berwarna berturut-turut berwarna hijau dan kuning yang setelah disemprot menggunakan folin-ciocalteu akan berubah warna menjadi abu-abu gelap.

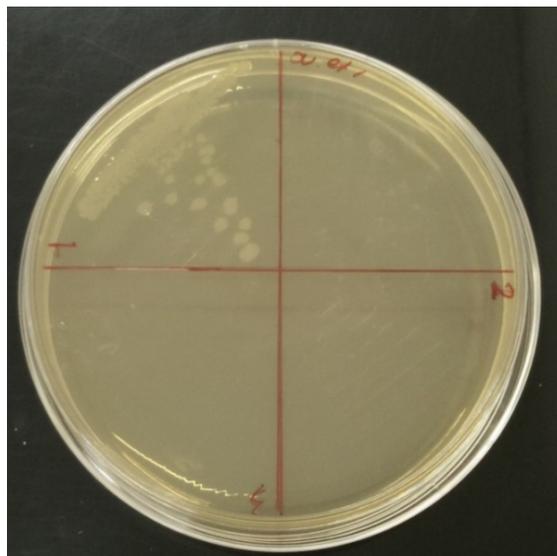
Uji potensi antibakteri dilakukan untuk mengetahui aktivitas ekstrak kental ashitaba pada beberapa proses pengeringan terhadap bakteri *Streptococcus mutans* yang merupakan koleksi dari Laboratorium Riset Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gadjah Mada. Sebelumnya dilakukan orientasi untuk menentukan metode uji yang sesuai untuk skrining aktivitas antibakteri. Metode difusi banyak dipilih penggunaannya dalam proses skrining bioaktivitas namun mengingat parameter yang ditentukan adalah KHM dan KBM maka digunakanlah metode makrodilusi.

Sebagai pertimbangan, biasanya sampel yang mempunyai sifat lipofilik misalnya saja minyak atsiri metode difusi dirasa tidak tepat digunakan untuk penentuan aktivitas antibakteri, namun untuk sampel dengan konten kompleks misalnya saja ekstrak dan fraksi metode difusi lebih dipilih daripada metode lainnya. Tidak hanya kompatibilitas metode dan sampel yang harus diperhatikan dalam pemilihan metode skrining aktivitas antibakteri namun parameter akhir yang ingin didapatkan dan spesies bakteri uji pun harus diperhatikan, selain itu spesies bakteri dan kadar inokulum yang dipergunakan pun dapat mempengaruhi hasil akhir dari uji aktivitas.<sup>13,14</sup>

Dari hasil uji ekstrak didapatkan bahwa KHM tidak dapat teramati pada sampel dikarenakan adanya gangguan/bias oleh warna dari sampel, untuk KBM didapatkan hasil pada kadar 0,5 mg/mL.

Ekstrak etanol ashitaba di partisi berturut-turut dengan menggunakan pelarut n-Heksan untuk menyari senyawa non polar, pelarut etil asetat untuk menyari senyawa-senyawa semi polar, dan pelarut etanol untuk menyari senyawa polar. Hasil partisi dari 20 g ekstrak etanol dapat dilihat pada tabel dibawah ini.

Hasil partisi kemudian di lihat pola kromatogramnya



**Gambar 1.** Hasil Goresan Agar Ekstrak Etanolik Pengeringan Oven



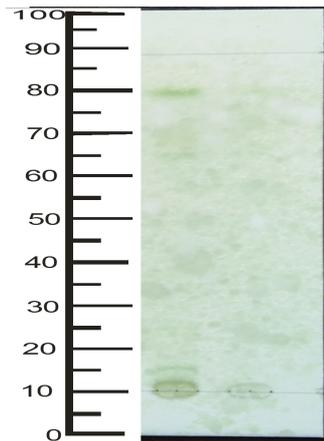
**Gambar 2.** Hasil Partisi N-Hexan (Kiri), Etil Asetat (Tengah) dan Etanol 96%(Kanan)

menggunakan KLT dengan pengamatan menggunakan pereaksi semprom folin ciocalteu. Folin-ciocalteu digunakan sebagai pereaksi untuk mendeteksi adanya gugus fenolik pada bercak hasil elusi sampel, adanya gugus fenolik ditandai dengan berubahnya bercak menjadi abu-abu gelap untuk deteksi fenolik.

Hasil partisi kemudian di lihat pola kromatogramnya menggunakan KLT dengan pengamatan menggunakan pereaksi semprom folin ciocalteu. Folin-ciocalteu digunakan sebagai pereaksi untuk mendeteksi adanya gugus fenolik pada bercak hasil elusi sampel, adanya gugus fenolik ditandai dengan berubahnya bercak menjadi abu-abu gelap untuk deteksi fenolik.

Hasil KLT partisi dapat terlihat perbedaan bercak yang teridentifikasi sebagai senyawa fenolik dari tiga macam fraksi. Pada fraksi n-heksan terdeteksi 7 bercak (Rf: 0; 0,06; 0,35; 0,63; 0,68; 0,87 dan 0,96), fraksi etil asetat terdeteksi 3 bercak (Rf: 0; 0,06 dan 0,87) sedangkan fraksi etanol hanya 1 bercak pada batas bawah elusi (Rf: 0).

Uji antibakteri kembali dilakukan kepada hasil partisi. Hasil uji antibakteri dari 3 fraksi didapatkan bahwa KHM pada tidak dapat teramati semua karena ada gangguan/bias dari warna sampel namun KBM dapat teramati pada partisi N-Hexan (0,125 mg/mL) dan etil asetat (0,5 mg/mL) sedangkan pada hasil partisi menggunakan etanol 96% tidak teramati adanya KBM



**Gambar 3.** Hasil KLT Partisi Deteksi Semprot Folin-Ciocalteu

#### 4. Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat dilihat bahwa fraksi n-heksan mempunyai aktivitas antibakteri paling tinggi dibandingkan dengan fraksi lainnya dengan KBM sebesar 0,125 mg/mL. hal ini dimungkinkan karena fraksi n-heksan secara kualitatif mempunyai lebih banyak senyawa fenolik.

#### Daftar Pustaka

1. Tabata K, Motani K, Takayanagi N, Nishimura R, Asami S, Kimura Y, et al. Xanthoangelol, a major chalcone constituent of *Angelica keiskei*, induces apoptosis in neuroblastoma and leukemia cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2005;28(8):1404–1407.
2. Akihisa T, Tokuda H, Ukiya M, Iizuka M, Schneider S, Ogasawara K, et al. Chalcones, coumarins, and flavanones from the exudate of *Angelica keiskei* and their chemopreventive effects. *Cancer Letters*. 2003;201(2):133–137.
3. Nishimura R, Tabata K, Arakawa M, Ito Y, Kimura Y, Akihisa T, et al. Isobavachalcone, a chalcone constituent of *Angelica keiskei*, induces apoptosis in neuroblastoma. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2007;30(10):1878–1883.
4. Sembiring BB, Manoi F, et al. Identifikasi mutu tanaman ashitaba. 2011;.
5. Inamori Y, Baba K, Tsujibo H, Taniguchi M, Nakata K, Kozawa M. Antibacterial activity of two chalcones, xanthoangelol and 4-hydroxyderricin, isolated from the root of *Angelica keiskei*. *Chemical and pharmaceutical bulletin*. 1991;39(6):1604–1605.
6. Volk W, Wheeler M. *Mikrobiologi Dasar*, diterjemahkan oleh Soenartono Adisoemarto, Edisi Kelima, Jilid 2. Jakarta: Erlangga. 1984;p. 30–41.
7. Brotsotoetarno S. Peran serta mikroorganisme dalam proses terjadinya karies gigi. Dalam *Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Indonesia*. 1997;7.
8. Voigt T. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi Edisi V*, Alih Bahasa Noerono, S. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta; 1994.
9. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. *Sediaan Galenik*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 1986;p. 10–11.
10. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. *Farmakope Herbal Indonesia. Edisi Pertama*. Departemen Kesehatan RI. 2009;.
11. Saifudin A, Rahayu V, Teruna HY. Standarisasi bahan obat alam. Yogyakarta: Graha Ilmu. 2011;4(21):69–84.
12. Reddish GF. *Antiseptics, Disinfectants, Fungicides, and Chemical Physical Sterilization*. The United States Of America; 1954.
13. Rios J, Recio M, Villar A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *Journal of ethnopharmacology*. 1988;23(2-3):127–149.
14. Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of pharmaceutical analysis*. 2016;6(2):71–79.