

OPTIMASI AKTIVITAS ANTIBAKTERI RUTIN DAUN SINGKONG
(*Manihot esculenta* Crantz.)-GENTAMISIN SULFAT TERHADAP BAKTERI

Staphylococcus aureus

Amatul Basit^{*}, Rafika Sari, Sri Luliana

Prodi Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Tanjungpura

Pontianak, Indonesia, amatul.basit97@gmail.com

ABSTRAK

Daun singkong (*Manihot esculenta* Crantz.) terdapat kandungan flavonoid yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri. Salah satu senyawa turunan flavonoid adalah senyawa rutin. Senyawa rutin dalam daun singkong akan diuji aktivitas antibakteri. Penelitian ini yaitu optimasi yang dilakukan hingga diperoleh MIC dari senyawa rutin yang diisolasi dari daun singkong dan gentamisin sulfat dalam menghambat bakteri *Staphylococcus aureus*. Metode dalam penelitian yaitu *disk difusi Kirby Beur* dengan melihat zona bening disekitar cakram sebagai hasil penghambatan bakteri. Hasil penelitian yang didapat, pada isolat rutin didapat hasil MIC 0,2 mg/mL dan MIC pada gentamisin sulfat 5 µg/mL.

Kata Kunci : Rutin (*Manihot esculenta* Crantz.), gentamisin sulfat, *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT

Cassava leaves (*Manihot esculenta* Crantz.) contain flavonoids which have antibacterial activity. One of the flavonoid derivatives is a routine compound. Routine compounds in cassava leaves will be tested for antibacterial activity. This research is an optimization carried out until MIC is obtained from routine compounds isolated from cassava leaves and gentamicin sulfate in inhibiting *Staphylococcus aureus* bacteria. The method in the study was *Kirby Beur diffusion* disk by looking at the clear zone around the disc as a result of bacterial inhibition. The results of the study were obtained, in routine isolates the MIC results were 0.2 mg / mL and MIC in gentamicin sulfate 5 µg / mL.

Keywords : Routine (*Manihot esculenta* Crantz.), Gentamicin sulfate, *Staphylococcus aureus*

Pendahuluan

Daun singkong memiliki kandungan senyawa yang memiliki banyak khasiat. Salah satu khasiat dari senyawa tersebut adalah sebagai antibakteri. Kandungan pada daun singkong yang berperan sebagai antibakteri salah satunya adalah flavonoid.⁽¹⁾ Kandungan utama flavonoid dalam daun singkong adalah rutin yang merupakan glikosida kuersetin dengan disakarida yang terdiri dari glukosa dan rhamnosa.⁽²⁾ Daun singkong mengandung rutin sebesar 0,71%(b/b) pada daun yang muda, 0,35%(b/b) pada daun tua dan 0,16%(b/b) pada daun kuning.⁽³⁾

Senyawa rutin di dalam isolat daun singkong merupakan senyawa fenolik utama yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri.⁽⁴⁾ Penelitian sebelumnya yaitu rutin yang diambil dari ekstrak biji *Phaleria Macrocarpa* berperan penting dalam menghambat pertumbuhan mikroba *S.aureus*, *E.coli* dan *P.aeruginosa*.⁽⁵⁾ Begitu juga dengan rutin yang diambil dari *Citrus sinensis* juga efektif dalam menghambat bakteri *P.aeruginosa*.⁽⁷⁾ Sedangkan, belum ada penelitian aktivitas antibakteri rutin dari *M.esculenta* Crantz. Maka dari itu menjadi latar belakang akan dilakukan penelitian menggunakan rutin dari tanaman *M.esculenta* Crantz yaitu optimasi hingga diperoleh MIC terhadap *S.aureus* dengan pembandingan antibiotik gentamisin sulfat.

Metode Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah autoklaf (All American Model no. 75X), inkubator (Mettler®), *Laminar Air Flow* (MINIHELIC® II), jangka sorong (Vernier Caliper), mikropipet (Rainin®), timbangan analitik (BEL model M254Ai), *water bath* (Mettler®). alat-alat gelas (Pyrex® Iwaki),

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus* dari kultur murni Laboratorium Biologi Fakultas Kedokteran Universitas Tanjungpura, daun singkong, gentamisin sulfat (Yantai Justaware Pharmaceutical), akuades, akuades steril (IKA), etanol 96% (Brataco), gliserol (Merck), kertas saring *Whatmann*, larutan DMSO (Merck), larutan NaCl 0,9% (Otsu-Ns), *Mueller Hinton Agar* (HKM), Metanol pa (Merck).

Tahapan Penelitian

Pembuatan Inokulum Bakteri *S.aureus*

Peremajaan bakteri *S.aureus* dilakukan menggunakan agar miring dengan media *Mueller Hinton Agar*. Hasil peremajaan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Koloni *S.aureus* berumur 24 jam disuspensikan ke dalam 10 mL larutan NaCL 0,9% steril sampai diperoleh kekeruhan, kemudian disetarakan dengan larutan standar Mc Farland 3 yaitu setara dengan jumlah pertumbuhan $0,9 \times 10^9$ sel bakteri per ml. Jika kekeruhan telah setara maka suspensi bakteri dapat digunakan sebagai bakteri uji.⁽⁸⁾

Larutan Seri Konsentrasi Isolat Rutin Daun Singkong

Larutan seri konsentrasi isolat rutin daun singkong dibuat 3 larutan stok dengan 3 kali pengujian. Larutan seri konsentrasi pengujian pertama, yaitu berasal dari pengenceran larutan stok 1 mg/mL. Pelarut yang digunakan yaitu larutan DMSO 20% kemudian ditambahkan akuades steril dihomogenkan. Setelah itu, dari larutan stok dibuat variasi konsentrasi yaitu 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; dan 0,1 mg/mL. Pengujian kedua dari larutan stok kedua yaitu 1 mg/mL dibuat variasi konsentrasi yang sama dengan pengujian pertama yaitu 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; dan 0,1 mg/mL. Pengujian ketiga dari larutan stok ketiga 1 mg/mL, dibuat variasi konsentrasi 1; 0,5; 0,1; 0,05; 0,01 mg/mL.

Larutan Seri Konsentrasi Gentamisin Sulfat

Pembuatan larutan seri konsentrasi gentamisin sulfat dilakukan dengan mengencerkan larutan stok 1.000 µg/mL. Serbuk gentamisin sulfat 50 mg dilarutkan dalam 50 mL akuades steril dan diaduk hingga larut. Gentamisin sulfat akan larut sempurna dalam aquades. Setelah itu dibuat variasi konsentrasi. Larutan gentamisin sulfat dalam beberapa konsentrasi yaitu 25; 15; 10; 5; dan 2,5 µg/mL.

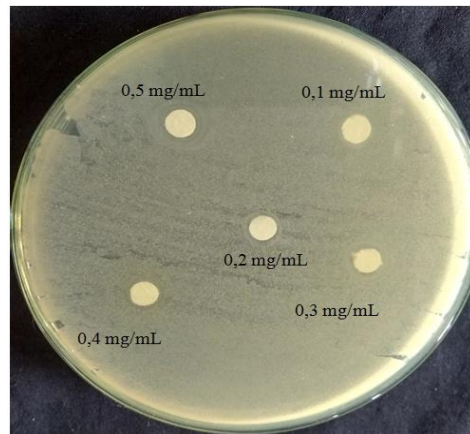
Penentuan Nilai *Minimum Inhibitory Concentration (MIC)*

Nilai *Minimum Inhibitory Concentration (MIC)* ditentukan menggunakan metode *disc diffusion Kirby-Bauer*. Penentuan MIC yang dilakukan terdiri atas penentuan MIC rutin daun singkong dan gentamisin sulfat. Suspensi bakteri *S.aureus* diinokulasikan menggunakan jarum ose steril pada permukaan media MHA dan diletakkan cakram kertas berukuran 6 mm. Cakram kertas dicelupkan

ke dalam larutan sampel yaitu larutan isolat rutin dan gentamisin sulfat. Lalu, diletakkan di atas permukaan media *Mueller Hinton Agar* dan ditekan perlahan menggunakan pinset steril. Setelah itu media diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37⁰C selama 24 jam dan diukur diameter zona hambat yang terbentuk.

HASIL DAN PEMBAHASAN

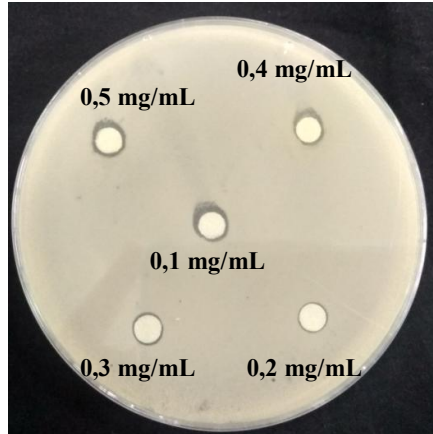
Pengukuran Nilai MIC



Gambar 1. Hasil Pengujian Pertama Isolat Rutin daun singkong terhadap bakteri *S.aureus*

Pengujian untuk menentukan MIC dari isolat rutin dilakukan dengan 3 kali pengujian. Pengujian pertama dibuat dengan konsentrasi 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1 mg/mL. Hasil yang didapat tidak terdapat zona hambat disekitar cakram, dari konsentrasi terbesar hingga terkecil.

Lalu dilakukan dengan pengujian yang kedua dengan larutan stok yang berbeda dari pertama, dan dibuat pada konsentrasi yang sama yaitu pada 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1 mg/mL. Hasil pengujian dapat dilihat pada **gambar 2**.



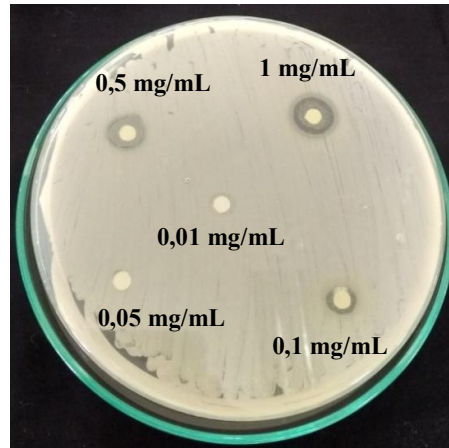
Gambar 2. Hasil Pengujian 2 Isolat Rutin daun singkong terhadap bakteri *S.aureus*

Tabel 1. Diameter Zona Hambat Isolat Rutin Daun Singkong terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*

No	Konsentrasi (mg/mL)	Zona Hambat (mm)
1	0,5	9,7
2	0,4	9,76
3	0,3	7,45
4	0,2	6,95
5	0,1	9,72

Isolat rutin daun singkong pada konsentrasi 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1 mg/mL menghasilkan zona hambat secara berturut-turut 9,7; 9,76; 7,45; 6,95 dan 9,72 mm. Hasil pengujian yang didapat tidak bisa ditentukan MIC karena zona hambat tiap konsentrasi masih terlihat, dan semakin rendah konsentrasi tidak membuat zona hambat semakin rendah. Hal ini terlihat bahwa hasil yang didapat tidak berbanding lurus.

Pada pengujian ketiga, dengan larutan stok yang berbeda. Dilakukan pada konsentrasi 1; 0,5; 0,1; 0,05; 0,01 mg/mL. Hasil zona hambat dari pengujian dapat dilihat pada **gambar 3**.



Gambar 3. Hasil Pengujian 3 Isolat Rutin daun singkong terhadap bakteri *S.aureus*

Tabel 2. Diameter Zona Hambat Isolat Rutin Daun Singkong terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*

No	Konsentrasi (mg/mL)	Zona Hambat (mm)			$\bar{x} \pm SD$ (mm)
		I	II	III	
1	1	11,85	11,15	11,90	11,30±0,492
2	0,5	10,55	10,75	10,68	10,66±0,101
3	0,1	9,45	9,15	8,95	9,18±0,25
4	0,05	6,15	6,25	6,05	6,15±0,5
5	0,01	0	0	0	0±0

Keterangan \bar{x} = rata-rata, SD = Standar deviasi

Isolat rutin daun singkong pada konsentrasi 1; 0,5; 0,1; 0,05; 0,01 mg/mL menghasilkan zona hambat secara berturut-turut 11,3; 10,66; 9,18; dan 6,15 mm. Zona hambat tidak terlihat pada konsentrasi 0,01 mg/mL sehingga nilai MIC isolat rutin daun singkong terhadap bakteri *S.aureus* terdapat pada konsentrasi 0,05 mg/mL. MIC isolat rutin yang diuji pada konsentrasi 0,05 mg/mL termasuk dalam katagori sedang terhadap *Staphylococcus aureus* menurut tabel katagori zona hambat oleh David Stout.⁽⁹⁾

Dari ketiga pengujian, didapat hasil terbaik pada pengujian ketiga. Setelah dievaluasi, kesalahan terjadi pada larutan stok dan seri konsentrasi yang dibuat. Pada pengujian pertama, larutan stok dibuat 2 hari sebelum pengujian. Pengujian

kedua, larutan stok dibuat 1 hari sebelum pengujian, dan pengujian ketiga, larutan stok dibuat di hari yang sama saat akan digunakan untuk pengujian.

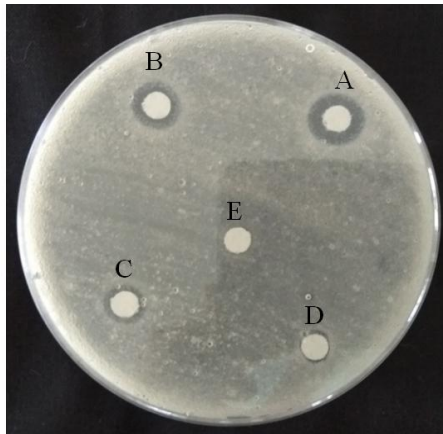
Senyawa rutin adalah senyawa yang mudah mengkristal kembali.⁽¹⁴⁾ Senyawa ini sukar larut dalam air, sehingga dalam mearutkannya membutuhkan DMSO. Tetapi, setelah larut, sesuai sifatnya rutin akan mengkristal kembali. Pada pengujian pertama, larutan yang sudah didiamkan selama 2 hari, rutin sudah mengendap, sehingga saat cakram dicelupkan kedalam larutan uji tersebut rutin sudah tidak terikut, dan larutan yang terisisa hanya aquades dan DMSO. Pada pengujian kedua, seelah 1 hari larutan dibiarkan , maka rutin akan mengendap tetapi belum mengendap sempurna, sehingga masih terdapat zona hambat pada pengujian, tetapi tdiak teratur karena rutin tidak merata dilarutan yang diuji. Pada pengujian ketiga, rutin setelah dilarutkan DMSO dan air, akan larut sempurna dan langsung dilakukan pengujian sehingga, didapat zona hambat pada pengujian. Hasil zona hambat akan dilihat MIC yaitu konsentrasi terkecil yang dapat menghambat bakteri *S.aureus* ditandai dengan tidak ada lagi zona hambat dibawah konsentrasi yang ditentukan sebagai MIC.

Peningkatan konsentrasi isolat rutin *Manihot esculenta* Crantz berbanding lurus dengan peningkatan diameter zona hambat. Hal ini disebabkan semakin besar konsentrasi larutan isolat rutin maka semakin banyak senyawa rutin terkandung dalam larutan. Senyawa rutin turunan flavonoid yang merupakan glikosida kuersetin dengan disakarida yang terdiri dari glukosa dan rhamnosa memiliki aktivitas sebagai antibakteri dengan mekanisme membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler. Hal ini akan menyebabkan lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh. Kerusakan dinding sel dapat menyebabkan perubahan permeabilitas membran sel sehingga menghambat kerja enzim intraseluler dan air masuk ke dalam sel secara tidak terkontrol.⁽²⁾

Optimasi MIC Gentamisin Sulfat

Gentamisin Sulfat larut sempurna dalam aquades, sehingga pada pengujian gentamisin sulfat tidak ditambahkan DMSO. Pengujian dilakukan dengan 3 kali pengujian. Dimana, larutan stok 1 dibuat 2 hari sebelum pengujian, larutan stok kedua dibuat 1 hari sebelum pengujian, dan larutan stok 3 dibuat 3 hari sebelum

pengujian. Hasil larutan diamati, tidak terjadi endapan dari ketiga larutan, hal ini karena gentamisin sulfat sifatnya mudah larut dan tidak mengendap. Pengujian dilakukan dengan 3 kali replikasi pada konsentrasi 25; 15; 10; 5; 2,5 µg/mL. Hasil pengujian dapat dilihat pada **Gambar 4**.



Gambar 4. Hasil pengujian Gentamisin Sulfat terhadap bakteri *S.aureus*

Keterangan : A = 25 µg/mL; B = 15 µg/mL; C = 10 µg/mL; D = 5 µg/mL; E = 2,5 µg/mL

Tabel 3. Diameter Zona Hambat Gentamisin Sulfat terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*

No	Konsentrasi (µg/mL)	Zona Hambat (mm)			$\bar{x} \pm SD$ (mm)
		I	II	III	
1	25	12,55	12,25	11,90	12,23±0,325
2	15	11,30	11,10	11,20	11,20±0,1
3	10	9,75	9,85	9,45	9,68±0,208
4	5	8,45	8,20	8,15	8,26±0,160
5	2,5	0	0	0	0 ± 0

Keterangan \bar{x} = rata-rata, SD = Standar deviasi

Gentamisin sulfat pada konsentrasi 25; 15; 10; 5; dan 2,5 µg/mL menghasilkan zona hambat secara berturut-turut 12,23; 11,20; 9,68; dan 8,26 mm. Zona hambat tidak terlihat pada konsentrasi 2,5 µg/mL sehingga nilai MIC gentamisin sulfat terhadap bakteri *S.aureus* terdapat pada konsentrasi 5 µg/mL. MIC gentamisin sulfat yang diuji pada konsentrasi 5 µg/mL termasuk dalam katagori intermediet terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* berdasarkan

katagori zona hambat menurut CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*).⁽¹⁰⁾

Penelitian sebelumnya tentang aktivitas gentamisin sulfat dalam menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* didapat nilai MIC 5 µg/mL dengan zona hambat 7,57 mm.⁽¹²⁾ Penelitian juga dilakukan terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis* dan hasil MIC dari gentamisin sulfat adalah 1 µg/mL dengan diameter zona hambat 8,18 mm.⁽¹³⁾ Penelitian sebelumnya, menunjukkan bahwa hasil MIC yang didapat termasuk dalam katagori intermediet dan sensitif. Hasil yang berbeda dikarenakan sensitifitas bakteri terhadap antibiotik yang berbeda beda.

Gentamisin sulfat sebagai antibakteri yang merupakan antibiotik golongan aminoglikosida. Gentamisin akan masuk kedalam sel dan berikatan kuat pada komponen sisi tRNA dibagian 16S RNA pada subunit ribosom 30S. Ikatan tersebut dapat menyebabkan ketidaksesuaian antara kodon dengan antikodon sehingga terjadi kesalahan hasil terjemahan. Sambungan terjemahan asam amino yang salah pada rantai polipeptida akan menyebabkan jenis protein tidak sesuai.⁽¹¹⁾ Berdasarkan hasil MIC didapat hasil diameter zona hambat yang bervariasi terhadap konsentrasi yang berbeda-beda. Semakin tinggi konsentrasi yang digunakan maka semakin besar zona hambat yang dihasilkan.

Kesimpulan

Hasil penelitian yang didapat, pada isolat rutin didapat hasil MIC 2 mg/mL dan MIC pada gentamisin sulfat 5 mg/mL terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Hutapea JR, SS Syamsuhidat. Inventaris Tanaman Obat Indonesia. Jilid 1. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan; 1992.
2. Sukrasno KR, Wirasutisna, Fidrianny I. Pengaruh Perebusan terhadap Kandungan Flavonoid dalam Daun Singkong. Jurnal Obat Bahan Alam. 2007; 6(2): 1.
3. Bahruddin, Sirait M, Moesdarsono. Pemeriksaan Kadar Rutin pada Daun Singkong (*manihot utilissima Pohl.*) Muda, Tua, dan Kuning. <http://bahan-alam.fa.itb.ac.id/diakses> tanggal 2 Oktober 2009; 2007.
4. Quarenghi MV, Tereschuk ML, Abdala LR. Antimicrobial Activity of Flowers From *Anthemis cotula*. Fitoterapi. 2000; 7(6): 710-712.

5. Hendra R, Ahmad S, Sukari A, Shukor MY, Oskoueian E. Flavonoid Analyses and Antimicrobial Activity of Various Parts of Phaleria Macrocarpa (Scheff.) Boerl Fruit. *Int.J.Mol.Sci.* 2011; 12: 3422-3431
6. Farzam F, Asgarpanah J, Mahboubi A. Evaluation of Antibacterial Activity and Total Phenolic and Flavonoid Content of *Tanacetum fruticosum* Ledeb Against 6 Bacterial Strains. *American Journal of Advanced Drug Delivery.* 2014; 2(4): 468-476.
7. Deepika, et al. Combined Effect of a Natural Flavonoid Rutin from *Citrus Sinensis* and Conventional Antibiotic Gentamicin on *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilm Formation. *Journal Elsevier;* 90 (1).
8. Staf Pengajar Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. *Farmakologi dan Terapi.* Edisi 5. Jakarta: Balai Penerbit FKUI; 2008. 585- 586.
9. Nopiyanti, HT. Agustriani,F. Krining *Nypa fruticans* sebagai antibakteri *Bacillus subtilis, Escherichia coli, dan Staphylococcus aureus.* *Maspero J.* 2016; 8(2): 83-90.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-Fourth Informational Supplement. USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014. 30,68
11. Wattimena JR, Nelly CS, Mathilda BW, Elin YS, Andreanus AS dan Anna RS. *Farmakodinamik dan Terapi Antibiotik.* Gadjah Mada University Press: Yogyakarta; 1991. 48-49.
12. Rifani A, Sari R, Robiyanto. Penentuan Nilai FICI Kombinasi Ekstrak Etanol Kulit Daun Lidah Buaya (*Aloe Vera* (L) Burm.f) dan Gentamisin Sulfat Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus.* *Journal Traditional Medicine.* 2017; 22(3): 175-181.
13. Safitri G. Penentuan Nilai FICI Kombinasi Ekstrak Etanol Kulit Daun Lidah Buaya (*Aloe vera* (L) Burm.f) dan Gentamisin Sulfat Terhadap Bakteri Aerob Penyebab Infeksi Ulkus Diabetik. [Skripsi]. Pontianak: Universitas Tanjungpura; 2018.
14. Sari ER, Meitisa. Standarisasi Mutu Ekstrak Daun Singkong (*Manihot esculenta* Crantz). *Jurnal Ilmiah Bakti Farmasi.* 2017; II(1): 13-20.