

Aktivitas Antibakteri dan Penyembuhan Luka Fraksi-Fraksi Ekstrak Etanol Daun Kamboja (*Plumeria acuminata* Ait) pada Kulit Kelinci yang Diinfeksi *Staphylococcus aureus*

Antibacterial and Wound Healing Activity of Fractions of Kamboja (*Plumeria acuminata* Ait) Leaves Ethanol Extract on *Staphylococcus aureus* Infected Rabbit Skin

GUNAWAN PAMUDJI WIDODO*, DWI NINGSIH, DAN MONA APRILIA

Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi
Jln. Letjen Sutoyo-Mojosongo Surakarta-57127 Telp. 0271-852518
*Email: gunawanpamudji@yahoo.com

(Diterima 4 September 2010, disetujui 28 September 2010)

Abstrak

Tanaman kamboja (*Plumeria acuminata* Ait) merupakan bahan obat tradisional yang digunakan antara lain sebagai obat bisul dan patek. Flavonoid merupakan komponen senyawa kimia yang terdapat pada daun kamboja yang diduga sebagai antibakteri. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui kemampuan krim fraksi-fraksi daun kamboja dalam menyembuhkan infeksi bakteri *Staphylococcus aureus* pada punggung kelinci dan untuk mengetahui konsentrasi yang paling efektif. Daun kamboja diekstraksi secara soxhletasi menggunakan pelarut etanol 96%, kemudian ekstrak etanol 96% difraksinasi dengan menggunakan pelarut n-heksana, etil asetat dan etanol 70%. Kemudian hasil ketiga fraksi diuji aktivitasnya dalam bentuk krim dengan metode *in vivo*. Didapatkan fraksi etil asetat yang paling efektif, kemudian dilakukan variasi dosis 15%, 20%, dan 25% menggunakan hewan uji yang telah diinfeksi *Staphylococcus aureus*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kemampuan fraksi etil asetat paling baik dibandingkan fraksi etanol 70% dan n-heksana. Fraksi etil asetat pada konsentrasi 15% mampu menyembuhkan infeksi selama 11,40 hari, konsentrasi 20% mampu menyembuhkan infeksi selama 10,60 hari, konsentrasi 25% mampu menyembuhkan infeksi selama 9,40 hari.

Kata kunci: Daun kamboja, n-heksana, etil asetat, etanol 70%, antiinfeksi

Abstract

Kamboja (*Plumeria acuminata* Ait.) plant is traditional medicine used as medication for abscess and yaws. Flavonoid is a component of chemical compound in kamboja leaves that supposed to have antibacterial activity. The aim of the experiment was to find out the ability of kamboja leaves fractions creams in healing the infection of *Staphylococcus aureus* on rabbit skin and to know the most effective concentration. Kamboja leaves were extracted by soxhletation method using 96% ethanol solvent, and then the obtained extract was fractionated using n-hexane, ethyl acetate and 70% ethanol solvents. The antibacterial activities of the three fractions were tested in the form of creams by *in vivo* method. It was found that ethyl acetate fraction was the most effective, and then various doses were conducted with concentrations of 15%, 20%, and 25% using test animals infected by *Staphylococcus aureus*. The result of the experiment showed that ethyl acetate fraction had the best ability compared with n-hexane and ethanol 70% fractions. Ethyl acetate fraction cream concentration of 15%, 20%, and 25% could heal the infection for 11.40, 10.60 and 9.40 days, respectively.

Keywords: Kamboja leaves, n-hexane, ethyl acetate, 70% ethanol, anti-infection

Pendahuluan

Infeksi bakteri merupakan faktor utama penyebab kegagalan penyembuhan luka (Lazarus *et al.* 1994). *Staphylococcus aureus* merupakan salah satu bakteri penting yang dapat menginfeksi luka, selain *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium sp.*, *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa* (Kumar *et al.* 2006). *Staphylococcus aureus* adalah bakteri gram positif yang merupakan anggota flora normal kulit dan selaput lendir manusia. Bakteri *Staphylococcus aureus* cepat menjadi resisten terhadap banyak zat antimikroba sehingga sering menimbulkan masalah dalam pengobatannya (Jawetz *et al.* 1986).

Tanaman obat merupakan sumber utama ditemukannya senyawa kimia baru dengan efek terapeutik. Berbagai penelitian telah dilakukan untuk mencari tanaman obat yang dapat dimanfaatkan untuk penyembuhan luka yang disebabkan infeksi. Tanaman kamboja atau *Plumeria acuminata* (Apocynaceae) merupakan tanaman tradisional yang dilaporkan mempunyai berbagai khasiat, antara lain daunnya sebagai pencahar dan antigatal, buah dan kulit batangnya dilaporkan berefek antiinflamasi (Gupta *et al.* 2006). Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat daun kamboja menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* (Anggraeni 2009).

Pengujian lebih lanjut terhadap aktivitas antiinfeksi daun kamboja perlu dilakukan. Penelitian ini menguji aktivitas antiinfeksi sediaan topikal fraksi-fraksi ekstrak etanol daun kamboja (*Plumeria acuminata* Ait) pada kulit kelinci yang diinfeksi *Staphylococcus aureus*. Pelarut yang digunakan pada fraksinasi adalah pelarut polar, non polar, dan semi polar, yaitu berturut-turut etanol, *n*-heksana dan etil asetat. Pelarut polar diharapkan dapat menarik saponin, flavonoid, polifenol, dan alkaloid (Robinson 1995). Pelarut semi polar diharapkan dapat melarutkan senyawa semipolar seperti alkaloid, senyawa-senyawa fenolik seperti fenol-fenol, asam fenolat, fenil propanoid, flavonoid, antraknon, dan xanton. Pelarut non polar digunakan untuk menarik senyawa non polar seperti lemak, steroid, triterpenoid, dan karotenoid.

Metode Penelitian

Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain daun kamboja (*Plumeria acuminata* Ait) yang diambil secara acak Taman Pemakaman Umum Bonoloyo, Kota Surakarta, Jawa Tengah, etanol 70%, etil asetat, *n*-heksan, media *Brain Heart Infusion* (BHI), *Vogel Johnson Agar* (VJA), *Staphylococcus aureus*. Hewan uji yang digunakan adalah kelinci putih jantan (New Zealand White) yang berumur 3-5 bulan dengan berat badan 200-220 g.

Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah meliputi oven, blender, neraca halus dan elektrik, rangkaian alat Soxhletasi, evaporator vakum, berbagai alat gelas yang lazim digunakan, dan mikroskop.

Preparasi Ekstrak dan Fraksi Daun Kamboja

Setelah dilakukan determinasi dan identifikasi terhadap tanaman kamboja, dilakukan identifikasi terhadap daun kamboja secara makroskopis dan mikroskopis. Daun dikumpulkan, dicuci dan dikeringkan pada oven dengan suhu 40°C. Daun kering diserbukkan dan diayak dengan ayakan no. 40, kemudian dilakukan perhitungan prosentase bobot kering dan basah serta penetapan kadar air. Ekstrak etanol dibuat dengan melakukan soxhletasi terhadap 300 g serbuk daun kamboja. Ekstrak dipekatkan kemudian difraksinasi berturut-turut menggunakan *n*-heksana, etil asetat dan etanol 70%. Semua fraksi dipekatkan dengan evaporator vakum.

Identifikasi Kandungan Ekstrak Daun Kamboja

Identifikasi kandungan kimia dilakukan terhadap flavonoid menggunakan serbuk Mg, larutan alkohol: asam klorida (1:1) dan pelarut amil alkohol. Identifikasi terhadap saponin dilakukan dengan pembentukan buih, sedangkan identifikasi polifenol dilakukan dengan pereaksi FeCl₃ 5%. Pereaksi Bouchardat digunakan untuk mengidentifikasi adanya alkaloid (Depkes RI, 1977).

Pembuatan dan Uji Stabilitas Krim

Pembuatan krim setiap fraksi daun kamboja dilakukan secara aseptik. Formula krim adalah sebagai berikut:

Bagian minyak : R/	Stearic acid	13%
	Stearyl alcohol	1%
	Cetyl alcohol	1%
Bagian air : R/	Glycerin	10%
	Methylparaben	0,1%
	Propylparaben	0,05%
	Potassium hydroxide	0,9%
	Purified water q.s	ad. 100%

Penambahan masing-masing fraksi daun kamboja disesuaikan dengan konsentrasi yang akan digunakan yaitu 15%, 20% dan 25%.

Basis yang sudah ditimbang disterilkan dengan cara dioven pada suhu 150°C selama 1 jam, setelah itu basis bagian air langsung ditambahkan ke dalam bagian lemak. Fraksi yang larut air sebelumnya ditambahkan ke dalam basis air, sebaliknya fraksi nonpolar dilarutkan dalam basis lemak. Krim diuji organoleptis dan homogenitas, dengan memperhatikan adanya perubahan fisis yaitu warna, bau, dan homogenitas selama penyimpanan. Pengamatan dilakukan setiap minggu selama 12 minggu (Connors 1992).

Pengujian Aktivitas Antibakteri Masing-masing Fraksi

Pembuatan stok bakteri dilakukan dengan mengambil satu ose dari sediaan bakteri yang dibiakkan, kemudian digoreskan ke media *Brain Heart Infusion (BHI)*, diinkubasi 35°C-37°C selama 18-24 jam. Bulu pada punggung kelinci dicukur kemudian dipilih 3 lokasi penyuntikan dengan jarak masing-masing lokasi \pm 5 cm. Suspensi *Staphylococcus aureus* diinfeksi secara subkutan sebanyak 0,25 ml pada masing-masing lokasi pada kulit punggung kelinci yang telah disiapkan. Pengamatan munculnya eritema setelah 24 jam dan pemberian krim dilakukan setelah 48 jam pada daerah infeksi. Krim daun kamboja dengan konsentrasi 25%, 20% dan 15% dioleskan pada 3 lokasi dibagian kiri punggung

kelinci, 2 lokasi di bagian kanan sebagai kontrol positif dan kontrol. Lokasi penyuntikan ditutup dengan kassa steril untuk mencegah terjadinya kontaminasi bakteri. Pemberian krim dilakukan setiap hari sampai nanah dan eritema hilang (Valgas *et al.* 2007).

Pengamatan Mikroskopis terhadap Apusan Luka

Pengamatan secara mikroskopis dilakukan terhadap bakteri dari nanah dilakukan dengan cara nanah pada punggung kelinci diambil dengan kapas lidi steril lalu digoreskan pada medium VJA. Pengujian juga dilakukan terhadap luka sembuh, yaitu luka sembuh pada punggung kelinci diambil dengan kapas lidi steril lalu digoreskan pada VJA.

Analisa data dilakukan dengan menentukan waktu penyembuhan pada kulit punggung kelinci dalam sediaan krim fraksi etil asetat daun kamboja dengan basis krim tipe O/W. Pengujian statistik waktu penyembuhan *Staphylococcus aureus* pada kulit punggung kelinci dilakukan dengan ANOVA satu jalan.

Hasil dan Pembahasan

Identifikasi Kandungan Ekstrak Daun Kamboja

Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak daun kamboja disajikan pada tabel 1, di mana ekstrak daun kamboja mengandung alkaloid, saponin, flavonoid dan senyawa polifenol. Hal ini sejalan dengan hasil penelitian Gupta *et al.* (2006) yang menyatakan bahwa ekstrak metnaol daun kamboja mengandung steroid, flavonoid, tannin, alkaloid dan glikosida-glikosida. Senyawa-senyawa ini mempunyai tingkat polaritas beragam, yang mampu terekstraksi oleh pelarut etanol. Setelah fraksinasi dengan n-heksana, etil asetat dan etanol diharapkan komponen-komponen dalam ekstrak ini akan terpisah berdasarkan polaritas ke dalam masing-masing fraksi.

Tabel 1. Identifikasi kandungan kimia ekstrak daun kamboja

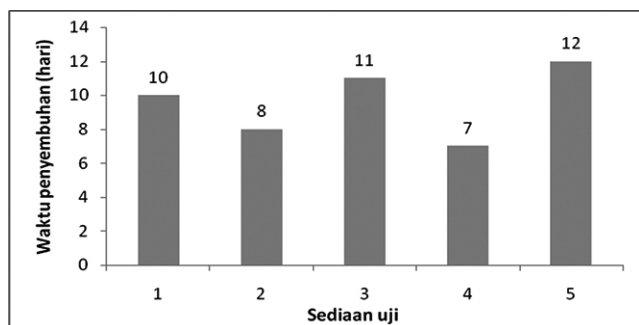
Kandungan	Pereaksi	Pustaka	Hasil	Kesimpulan
Alkaloid	HCl 2% & pereaksi Baucharat	Endapan coklat kehitaman	Endapan coklat kehitaman	Positif
Saponin	Air panas, dikocok kuat	Terbentuk buih yang tidak hilang dengan HCl	Terbentuk buih yang tidak hilang dengan HCl	Positif
Flavonoid	Serbuk Mg, alkohol-HCl, amil alkohol	Warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol	Warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol	Positif
Senyawa polifenol	FeCl ₃ 5%	Warna ungu	Warna ungu	Positif

Tabel 2. Hasil uji stabilitas krim masing-masing fraksi

Waktu (minggu)	Pengamatan organoleptis (bau dan warna) dan homogenitas		
	Krim fraksi n-heksana	Krim fraksi etil asetat	Krim fraksi etanol
1	Bau khas, hijau, homogen	Bau khas, hijau, homogen	Bau khas, coklat, homogen
2	Bau khas, hijau, homogen	Bau khas, hijau, homogen	Bau khas, coklat, homogen
3	Bau khas, hijau, homogen	Bau khas, hijau, homogen	Bau khas, coklat, homogen
4	Bau khas, hijau, homogen	Bau khas, hijau, homogen	Bau khas, coklat, homogen
5	Bau khas, hijau, homogen	Bau khas, hijau, homogen	Bau khas, coklat, homogen
6	Bau khas, hijau, homogen	Bau khas, hijau, homogen	Bau khas, coklat, homogen
7	Bau khas, hijau, homogen	Bau khas, hijau, homogen	Bau khas, coklat, tidak homogen
8	Bau khas, hijau, homogen	Bau khas, hijau, homogen	Bau khas, coklat, tidak homogen
9	Bau khas, hijau, homogen	Bau khas, hijau, homogen	Bau khas, coklat, tidak homogen
10	Bau khas, hijau, homogen	Bau khas, hijau, homogen	Bau khas, coklat, tidak homogen
11	Bau khas, hijau, homogen	Bau khas, hijau, homogen	Bau khas, coklat, tidak homogen
12	Bau khas, hijau, homogen	Bau khas, hijau, homogen	Bau khas, coklat, tidak homogen

Hasil Uji Stabilitas Krim Masing-Masing Fraksi

Hasil pengamatan terhadap stabilitas krim yang dilakukan dengan uji organoleptis dan homogenitas selama 12 minggu disajikan pada tabel 2. Krim fraksi n-heksana dan etil asetat stabil hingga penyimpanan 12

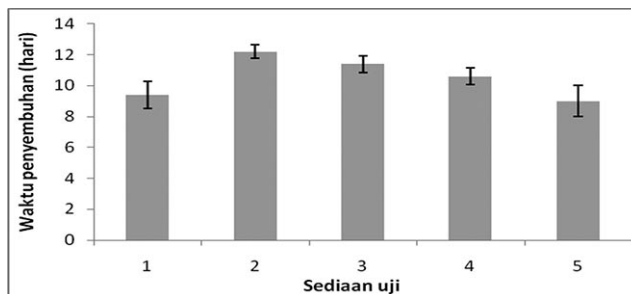


Gambar 1. Waktu penyembuhan infeksi setelah aplikasi sediaan uji. 1: krim fraksi n-heksana (20%), 2: krim fraksi etil asetat (20%), 3: krim fraksi etanol (20%), 4: kontrol positif (krim asam fusidat), 5: kontrol negatif (basis krim).

minggu, sedangkan pada krim fraksi etanol terjadi pecahnya emulsi krim yang menyebabkan ketidakhomogenan sediaan pada minggu ke-7.

Aktivitas Antibakteri Krim Masing-Masing Fraksi

Aktivitas antibakteri terhadap kulit punggung kelinci yang diinfeksi *Staphylococcus aureus*, dilihat dari waktu penyembuhan yang dapat diamati dengan mengecilnya eritema dan menutupnya luka dalam hitungan hari dibandingkan dengan kontrol negatif dan kontrol positif. Waktu penyembuhan setelah aplikasi krim masing-masing fraksi dapat dilihat pada gambar 1. Krim fraksi etil asetat menunjukkan lama waktu penyembuhan paling singkat. Hal ini disebabkan senyawa-senyawa yang aktif sebagai antiinfeksi terfraksinasi dalam pelarut etil asetat, terutama flavonoid dan senyawa-senyawa polifenol. Gupta et al. (2006) juga melaporkan bahwa ekstrak metanol daun kamboja menunjukkan aktivitas anti-inflamasi dan aktivitas ini sangat berperan dalam penyembuhan luka karena inflamasi juga terjadi pada luka terinfeksi.



Gambar 2. Waktu penyembuhan infeksi setelah aplikasi sediaan uji. 1: kontrol positif (krim asam fusidat), 2: kontrol negatif (basis krim), 3: krim fraksi etil asetat (15%), 4: krim fraksi etil asetat (20%), 5: krim fraksi etil asetat (25%)

Berdasarkan lama waktu penyembuhan masing-masing fraksi, uji aktivitas antiinfeksi dilakukan terhadap krim fraksi etil asetat sebagai fraksi teraktif.

Pengamatan Mikroskopis terhadap Apusan Luka Terinfeksi dan Luka Sembuh

Hasil inokulasi goresan dari nanah kelinci pada medium VJA menunjukkan hasil positif yang ditandai dengan adanya koloni yang berwarna hitam dan medium di sekitar koloni berwarna kuning. Koloni yang berwarna hitam disebabkan oleh kemampuan dari *Staphylococcus aureus* dalam mereduksi kalium telurit, sedangkan warna di sekitar koloni berwarna kuning disebabkan oleh kemampuan *Staphylococcus aureus* memfermentasikan manitol menjadi asam. Phenol red sebagai indikator dalam suasana asam akan mengubah warna medium menjadi kuning di sekitar koloni. Sedangkan hasil inokulasi goresan dari luka sembuh pada medium VJA memberikan hasil negatif yang menunjukkan tidak adanya bakteri *Staphylococcus aureus*.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa krim fraksi n-heksan, etil asetat dan etanol dari ekstrak etil asetat daun kamboja (*Plumeria acuminata* Ait) mampu menyembuhkan luka pada punggung kelinci yang sudah diinfeksi dengan *Staphylococcus aureus* di mana fraksi yang mempunyai aktivitas paling tinggi adalah fraksi etil asetat. Ketiga, konsentrasi 20% krim fraksi etil asetat paling optimal dalam menyembuhkan luka terinfeksi *Staphylococcus aureus*.

Daftar Pustaka

- Anggraeni D. 2009. Uji aktivitas antibakteri fraksi n-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi etanol 96% daun kamboja (*Plumeria acuminata* Ait) terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 59232 secara dilusi [Skripsi], Surakarta: Fakultas Farmasi Unibversitas Setia Budi.
- Connors KA. 1992. *Stabilitas Kimiawi Sediaan Farmasi*, Jilid I, Edisi II, diterjemahkan oleh, IKIP Semarang Press, Semarang, 136.
- [Depkes RI] Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1977. *Materia Medika Indonesia*. Jilid I. Jakarta: Depkes RI. 40-46.
- Gupta M, Mazumder UK, Gomathi P, and Selvan VT. 2006. Antiinflammatory evaluation of leaves of *Plumeria acuminata*, *BMC Complem. and Alter. Med.*, 6: 36-42.
- Jawetz E, Melnick JL, and Adelberg EA. 1986. *Mikrobiologi Untuk Profesi Kesehatan*, diterjemahkan oleh Bonang G., Edisi XVI, Jakarta: EGC Kedokteran. Terjemahan dari: 330 – 331.
- Kumar M, Vijayakumar M, Govindarajan R, and Pushpangadan P. 2007. Ethopharmacological approaches to wound healing-exploring medicinal plants of India. *J. Ethnopharmacol.* 114: 103-113.
- Lazarus GS, Cooper DM, Knighton DR, Margolis DJ, Pecoraco RE, Rodeheaver G, and Robson MC. 1994. Definitions and Guidelines for Assessment of Wounds and Evaluation of Healing. *Arch. Dermatol.*, 130: 489-493.
- Robinson T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Padmawinata, penerjemah. Bandung: ITB. Terjemahan dari: *The Organic Constituents of Higher Plant*. 71-72. 71-75, 732-191.
- Valgas, C., de Souza, S.M., Smânia, E.F.A., Smânia, A. 2007. Screening Methods to Determine Antibacterial Activity of Natural Products, *Braz. J. of Microbiol.*, 38:369-380.