

Aktivitas Anti-Tuberkulosis Ekstrak Etil Asetat Daun Kenikir (*Cosmos caudatus* H.B.K) dan Daun Sendok (*Plantago major* L.) Secara *In Vitro*

Anti-Tuberculosis Activity of Extract Ethyl Acetate Kenikir Leaves (*Cosmos caudatus* H.B.K) and Sendok Leaves (*Plantago Major* L.) By *In Vitro* Test

Tatang Irianti*, Sylvia Utami Tujung Pratiwi, Kuswandi, Nanan Tresnaasih, Dharmastuti Cahya, Fatmarahmi, Yulia Paramitha

Faculty of Pharmacy, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia.

ABSTRAK

Banyaknya problem terapi termasuk multidrug-resistant pada pasien infeksi Mycobacterium tuberculosis, membuat penemuan obat baru anti tuberculosis diperlukan saat ini. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui aktivitas dari daun kenikir (Cosmos caudatus H.B.K) dan daun sendok (Plantago major L.) terhadap Mycobacterium tuberculosis (M. tuberculosis) H37Rv. Penelitian ini menggunakan metode dilusi cair dengan media Middlebrook (MB) 7H9 dan pengamatan pertumbuhan M. tuberculosis menggunakan media Lowenstein Jensen (LJ) sehingga nilai kadar bunuh minimum (KBM) terhadap bakteri M. tuberculosis dapat ditentukan. Seri kadar untuk pengujian adalah 0,25 mg/ml; 0,50 mg/ml dan 1,00 mg/ml. Sedangkan golongan senyawa aktif dideteksi dengan kromatografi lapis tipis (KLT) dan komposisi fase gerak yang sesuai. Pemisahan pada KLT ditunjukkan dengan harga retardation factor (Rf) serta warna bercak. Aktivitas anti-bakteri pada ekstrak etil asetat daun kenikir dan daun sendok mempunyai nilai KBM sama yaitu 1,00 mg/ml. Berdasarkan hasil KLT diketahui bahwa terdapat golongan senyawa orto-dihidroksi, senyawa fenolik dan senyawa yang mengarah ke terpenoid untuk kedua ekstrak.

Kata kunci: tuberculosis; ethyl acetate extract; kenikir (*Cosmos caudatus* H.B.K); sendok (*Plantago major* L.), leaves; *M. tuberculosis*

ABSTRACT

The increasing therapy problem including multidrug-resistant tuberculosis (TB) has made it important to discover a new anti-TB drug candidate. The aim of this study was to acknowledge the activity of ethyl acetate extracts of kenikir (Cosmos caudatus H.B.K) and sendok (Plantago major L.) leaves against Mycobacterium tuberculosis (M. tuberculosis) H37Rv. This research used Middlebrook (MB) 7H9 media and observed the growth of M. tuberculosis using Lowenstein Jensen (LJ) media. The concentration of extracts were 0.25 mg/ml, 0.50 mg/ml, and 1.00 mg/ml. The result of this study showed that ethyl acetate extracts exhibited anti-TB activity in 1000 µg/ml of both extracts. The active compound group was detected by thin layer chromatography (TLC) and the separation of compounds was shown by retardation factor (Rf) and the color of the spots. Based on TLC chromatograms, it is known that there are types of compounds, such as ortho-dihydroxy compounds, phenolic compounds, and compound leads to terpenoids for both extracts.

Keywords: tuberculosis, ethyl acetate extract, kenikir (*Cosmos caudatus* H.B.K), sendok (*Plantago major* L.), leaves, *M. tuberculosis*

PENDAHULUAN

Hasil evaluasi yang dilakukan Joint External Tuberculosis Monitoring Mission (JEMM) menyebutkan, pada tahun 2015 penduduk Indonesia dengan populasi sekitar 258.000.000 orang, dengan pasien terdiagnosis penyakit TB

adalah 1.020.000 dengan angka kematian mencapai 100.000 orang. Jumlah penduduk besar, merupakan tantangan cukup berat bagi Pemerintah Indonesia dalam mengatasi tuberculosis (TB). Berdasar WHO, Pasien TB di Indonesia pada tahun 2016 menduduki peringkat 2 dunia setelah Negara India dan peringkat dibawahnya adalah Negara China, Filipina dan Pakistan. Peringkat ini mengalami kenaikan

Correspondence author: Tatang Irianti
Email: intanti@ugm.ac.id

setelah pada tahun 2012, Indonesia menduduki peringkat 4. Penyakit TB disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) merupakan penyakit menular dan sebagian besar menyerang paru (WHO, 2016).

Bakteri *M. tuberculosis* memiliki bentuk batang dengan panjang sekitar 1-4 microm dan tebal 0,2-0,4 microm serta mempunyai sifat khusus terhadap asam pewarnaan atau tahan terhadap asam pewarnaan sebagai Basil Tahan Asam (Hiswani, 2009). Karakteristik bakteri *M. tuberculosis* dapat bertahan hidup ditempat gelap dan lembab selama beberapa jam tetapi bila terkena sinar matahari secara langsung akan mati. Sedangkan, dalam jaringan tubuh manusia dapat tertidur selama beberapa tahun atau disebut dorman (Anonim, 2002).

Trend penderita TB selalu meningkat jumlahnya, hal ini disebabkan oleh beberapa faktor seperti kegagalan pengobatan, putus pengobatan, pengobatan tidak benar, penderita dengan penyakit degenerasi system imun, dan absorpsi obat kurang baik. Beberapa kasus ini dapat mengakibatkan terjadinya resistensi *M. tuberculosis* terhadap system pengobatan TB (Tirtana, 2011). Mono-resistant, multi-drug resistant (MDR), extended-drug resistant (XDR) atau totally-drug resistant (TDR) merupakan terjadinya resistensi terhadap *M. tuberculosis* (Anonim, 2012). Menurut JEMM pada tahun 2015 sekitar 32.000 pasien TB mengalami MDR. Rekomendasi dari WHO (2003) tentang penggunaan obat tradisional termasuk herba dalam pemeliharaan kesehatan masyarakat, pencegahan dan pengobatan penyakit terutama penyakit kronis, degenerative dan kanker.

Keanekaragaman hayati di Indonesia sangat besar dan luas, terdapat sekitar 40.000 jenis tumbuhan tersebar diseluruh pelosok Negara kita. Kandungan kimia dalam bahan alam dapat banyak jenisnya, sehingga mampu untuk bahan pangan, kosmetika dan obat-obatan (Agusta, 2000). Hal ini kebanyakan tanaman mengandung golongan senyawa flavonoid dan akan lebih poten dengan perlakuan hidrolisis dengan asam yang mampu melepaskan flavonoid bebas dari ikatan glikosidanya (Irianti, *et. al.*, 2015^a dan 2015^b). Penelitian Fabricant dan Farnsworth (2001) menunjukkan 80% dari 122 komponen senyawa pada 94 spesies tanaman digunakan untuk tujuan etnomedisin. Sebanyak 39% dari 520 obat yang disetujui antara tahun 1983 sampai 1994 berasal dari produk alam atau turunannya, dan 60-80% dari antibakteri dan antikanker berasal dari bahan alam (Wahyono, 2008). Daun sendok dan daun kenikir merupakan contohnya bisa dieksplorasi kegunaannya. Daun

sendok mempunyai manfaat antiinflamasi, bakterisida, antifungi serta antioksidan, dan Samuelsen (2000) menyatakan ekstrak ini mengandung triterpenoid asam ursolat dan asam oleanolat. Selanjutnya, penelitian Cantrell *et al.* (2001) menyebutkan bahwa isolate senyawa ursolat dan asam oleanolat memiliki aktivitas dalam penghambatan *M. tuberculosis*.

Tanaman kenikir merupakan familia *Asteraceae* dan dari familia ini telah banyak digunakan sebagai obat penyakit tuberculosis di Negara Uganda. Kenikir mengandung saponin, flavonoid polifenol dan minyak atsiri yang mudah menguap. Beberapa spesies yang digunakan sebagai agen tuberculosis tersebut adalah daun *Vernonia amygdalina* Delle, daun *Veronica cinerea* L, daun *Aspilia Africana* C.D. Adams, daun *Gnaphalium purpureum* L, daun *Bidens pilosa* L, batang *Tithonia diversicola*, dan tanaman utuh *Ageratum conyzoides* L (Bunalema *et. al.*, 2014)

Jalannya penelitian

Bahan utama yang digunakan adalah daun kenikir dan daun sendok. Daun kenikir diperoleh dari daerah PLEMBURAN, SARIHARJO, NGAGLIK, SLEMAN YOGYAKARTA dan daun sendok dipanen dari Desa PURWOSARI, SINDUADI, MLATI, SLEMAN. Pelarut dalam penelitian ini adalah pro analisis (Merck) kecuali untuk maserasi dengan kualitas teknis. Perbandingan pada metode KLT dari Sigma Aldrich, sedangkan reagen penampak bercak dari Laboratorium Fitokimia Departemen Biologi Farmasi UGM.

Serbuk kering daun kenikir dan daun sendok sebanyak masing-masing 1,0 kg dari daun segar 10,0 kg, dimaserasi dengan 7 bagian pelarut etil asetat (1:7, sebuk:pelarut). Proses ini dilakukan selama 48 jam dengan pengadukan setiap 3 jam sekali pada siang harinya, kemudian didiamkan serta selanjutnya disaring. Penyaringan dilaksanakan dengan corong Buchner serta penyedot udara melalui pompa vakum, kemudian filtrate diuapkan sampai diperoleh ekstrak kental.

Pembuatan ekstrak

Sebanyak masing-masing 10 kg daun segar dikeringkan dalam oven dengan suhu 50 °C selama 48 jam kemudian dibuat serbuk. Sebanyak 1 kg serbuk kering dari masing-masing direndam dengan 7 liter etil asetat teknis selama 48 jam. Pengadukan dilakukan secara berulang tiap 3 jam pada siang hari dan didiamkan pada malam hari. Filtrat hasil maserasi diuapkan menggunakan penangas air bersuhu 60 °C dibantu dengan aliran udara dari kipas angin hingga diperoleh ekstrak kental etil asetat (bila wadah dimiringkan, tidak mengalir).

Uji aktivitas anti-tuberkulosis

Seri konsentrasi ekstrak larut etil asetat dibuat dari larutan stok berisi 10 mg ekstrak ditambahkan 50 µL DMSO 100% kemudian divorteks hingga larut kemudian ditambahkan akuades sebanyak 950 µL. Larutan stok diambil 200 µL lalu ditambah dengan MB 7H9 Broth hingga 1 mL. Larutan ekstrak dalam MB 7H9 Broth diencerkan hingga ekstrak larut etil asetat daun kenikir memiliki seri konsentrasi 0,25; 0,5; dan 1,0 mg/mL.

Sterilisasi alat dan bahan dilakukan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm. Ruang kerja dalam penelitian berupa biosafety cabinet level 2 disiapkan dengan cara disemprot dengan etanol 70% dan dilap menggunakan tisu kemudian disinari lampu UV selama minimal 30 menit sebelum digunakan.

Uji aktivitas anti-tuberkulosis dilakukan pada 7 tabung untuk masing-masing ekstrak pada media cair MB 7H9 Broth. Pertama kontrol positif, berupa media MB 7H9 Broth, diberi Rifampisin dengan konsentrasi 40 µg/mL dan bakteri uji *M. tuberculosis* dan ke-2 adalah kontrol media yakni media MB 7H9 Broth. Tabung ke-3 merupakan kontrol pelarut dengan isi media MB 7H9 Broth, DMSO 5% dan bakteri uji *M. tuberculosis*. Kontrol negative pada tabung ke-4 berisi media MB 7H9 Broth ditambah bakteri uji *M. tuberculosis*, sedangkan sampel uji ekstrak larut etil asetat daun kenikir dengan konsentrasi 0,25; 0,5 dan 1,0 mg/mL ditabung ke-5, 6 dan 7.

Dilusi cair menggunakan MB 7H9 Broth dilakukan dalam wheaton vial dengan volume total 1 mL. Larutan dibuat dengan perbandingan 1:1 antara suspensi bakteri konsentrasi 10⁶ CFU/mL dan ekstrak uji maupun kontrol pelarut serta kontrol antibiotik. Larutan berisi suspensi bakteri diambil sebanyak 0,5 mL dan dimasukkan dalam 3 tabung berisi 0,5 mL larutan ekstrak uji dengan konsentrasi 0,25; 0,5; dan 1,0 mg/mL. Proses yang sama dilakukan pada larutan kontrol. Konsentrasi akhir suspensi bakteri dalam wheaton vial adalah 5 x 10⁵ CFU/mL sedangkan konsentrasi ekstrak dan rifampisin menjadi 0,25; 0,5; 1,0 mg/mL dan 40 µg/mL. Setelah itu wheaton vial ditutup dan dikocok lalu ditempatkan pada rak dan didekontaminasi dengan alkohol 70% kemudian diinkubasi selama 10 hari pada suhu 37 °C.

Pada visualisasi aktivitas anti-tuberkulosis ekstrak dilakukan pada media padat Lowenstein Jensen (L-J). Larutan hasil uji dilusi cair pada media MB 7H9 Broth diambil 100 µL dari masing-masing tabung lalu dimasukkan dalam media L-J

yang berbeda dan dilabel kemudian ditutup. Media L-J diposisikan miring 30° selama 24 jam setelah itu sumbat kapas disegel dengan parafin dan diposisikan tegak pada rak kemudian disterilisasi dengan alkohol dan diinkubasi dalam suhu 37 °C selama 3 minggu. Pengamatan dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya pertumbuhan bakteri *M. tuberculosis* pada media L-J sehingga Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) dari ekstrak larut etil asetat daun kenikir dan daun sendok dapat diketahui.

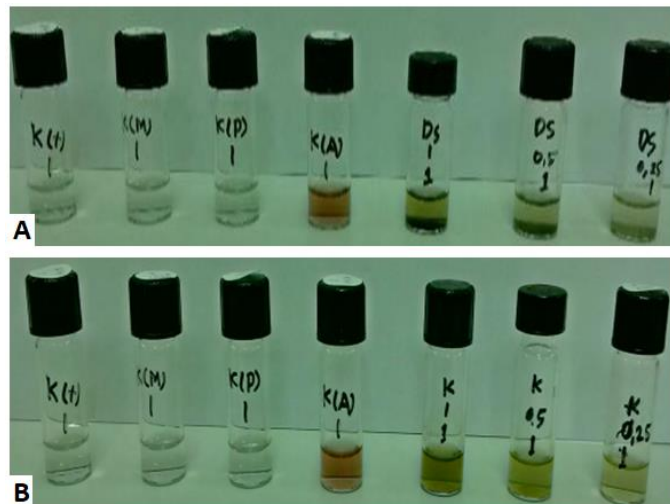
HASIL DAN PEMBAHASAN

Sebanyak 10 kg masing-masing daun segar kenikir (DK) dan sendok (DS) yang dikeringkan dalam oven 50 °C selama 10 jam sampai kering patah, kemudian diambil 1,0 kg untuk dimaserasi dengan etil asetat sebanyak 7 L selama 48 jam. Ekstrak etil asetat daun kenikir diperoleh 117,50 gram dan daun sendok sebanyak 27,59 g. Rendemen DK sebesar 1,175 % dan DS adalah 2,76 %. Organoleptis dari ekstrak DK hijau kehitaman, lengket dan pahit, sedangkan DS hijau kecoklatan, tekstur kering serta pahit.

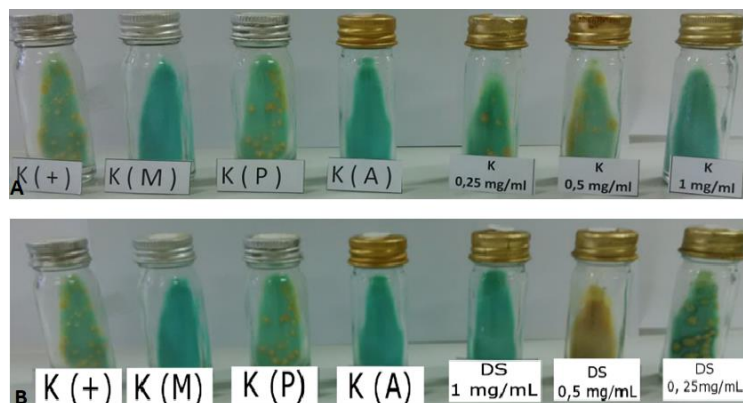
Uji aktivitas anti tuberkulosis ekstrak etil asetat daun kenikir dan daun sendok dilakukan dengan metode dilusi cair menggunakan media Middlebrook 7H9 dengan konsentrasi ekstrak sebesar 0,25; 0,5 dan 1 mg/ml. Metode dilusi cair dengan Middlebrook 7H9 ini ditujukan untuk kultur bakteri *M. Tuberculosis* dan dilakukan selama 14 hari dengan pengulangan sebanyak 2 kali.

Penggunaan media cair terlebih dahulu karena dapat membasahi permukaan sel *M.tuberculosis* dan memungkinkan terjadi penyebaran pertumbuhan di media cair sehingga pertumbuhan bakteri uji lebih cepat (Brooks *et al.*, 2005). Selain itu, apabila sampel ekstrak langsung dikontakkan dengan media padat dapat menyebabkan kerusakan di media padat. Alasan lain digunakan dua media adalah akan memberikan homogenitas yang baik antara media, bahan uji, dan bakteri uji.

Middlebrook 7H9 merupakan salah satu media yang sering digunakan dalam uji anti tuberkulosis. Dilusi cair menggunakan media Middlebrook 7H9 memiliki kelebihan yaitu lebih cepat menumbuhkan bakteri (Munawaroh, *et. al.*, 2015). Inkubasi untuk menumbuhkan bakteri *M. tuberculosis* dilakukan selama 14 hari dimana *M. tuberculosis* merupakan bakteri yang pertumbuhannya lambat karena memiliki susunan yang kompleks mulai dari dinding sel eksternal hingga membran sel dan kaya akan lipid (Brennan dan Nikaido, 1995).



Gambar 1. Hasil uji aktivitas anti tuberkulosis metode dilusi cair dengan media Middlebrook 7H9 (A: Daun kenikir dan B: Daun Sendok). K(+): Kontrol positif; K(M): Kontrol media Middlebrook 7H9; K(P): Kontrol pelarut (DMSO 5%); K(A): Kontrol antibiotik (Rifampicin 40 µg/ml); K: Ekstrak etil asetat daun kenikir dengan konsentrasi 0,25; 0,5; dan 1 mg/ml; DS: Ekstrak etil asetat daun sendok dengan konsentrasi 0,25; 0,5; dan 1mg/ml



Gambar 2. Hasil uji aktivitas anti tuberkulosis metode dilusi padat dengan media Lowenstein Jensen (A daun kenikir dan B daun sendok). K(+): Kontrol positif; K(M): Kontrol media; K(P): Kontrol pelarut (DMSO 5%); K(A): Kontrol antibiotik (Rifampicin 40 µg/ml); K: Ekstrak etil asetat daun kenikir dengan konsentrasi 0,25; 0,5; dan 1 mg/ml; DS: Ekstrak etil asetat daun sendok dengan konsentrasi 0,25; 0,5; dan 1 mg/ml

Dimetil sulfoksida (DMSO) digunakan sebagai pelarut ekstrak dengan konsentrasi sebesar 5%. Dimetil sulfoksida memiliki karakteristik berupa larutan tidak berwarna, dapat bercampur dengan air, alkohol dan eter, tidak berbau atau sedikit berbau khas, sangat higroskopis. Dimetil sulfoksida dapat terdegradasi parsial pada suhu antara 40°C sampai 60°C sehingga harus disimpan pada wadah terbuat dari gelas yang tertutup rapat dan terhindar dari cahaya (Rowe, dkk, 2009). Hasil uji aktivitas anti tuberkulosis dengan metode dilusi cair dapat dilihat pada gambar 1.

Berdasarkan gambar 1 dapat dilihat bahwa terdapat perbedaan warna antara kontrol dengan ekstrak. larutan kontrol positif, kontrol media dan kontrol pelarut tidak berwarna sedangkan kontrol antibiotik berwarna merah dan sampel ekstrak berwarna hijau yang semakin pekat sebanding dengan meningkatnya konsentrasi. Pertumbuhan *M.tuberculosis* di media MB 7H9 nampak seperti serbuk di dasar *wheaton vial*. Adanya perubahan warna dari ekstrak dan kontrol menyebabkan dapat diamati nilai Kadar Hambat Minimum (KHM) pada penelitian ini.

Tabel I. Hasil Uji Antibakteri *M. tuberculosis* Pengulangan I

Sampel	Konsentrasi (mg/mL)			K (-)	K (P)	K (+)	K (M)
	0,25	0,5	1				
Ekstrak	-/-	-/-	-/-	2+/2+	25/25	-/-	-/-
Fraksi	-/-	-/-	-/-	2+/2+	25/25	-/-	-/-

Tabel II. Hasil Uji Antibakteri *M. tuberculosis* Pengulangan II

Sampel	Konsentrasi (mg/mL)			K (-)	K (P)	K (+)	K (M)
	0,25	0,5	1				
Ekstrak	-/-	-/-	-/-	2+/2+	1+/1+	-/-	-/-
Fraksi	-/-	-/-	-/-	2+/2+	1+/1+	-/-	-/-

Keterangan : K(+): Kontrol Positif; K(-) : Kontrol Negatif; K(P): Kontrol Pelarut; K(M): Kontrol Media; +3: 200-500 koloni; +2: 100-200 koloni; +1: 20 -100 koloni

Setelah uji aktivitas anti tuberkulosis pada media cair Middlebrook 7H9 selesai, maka dilanjutkan dengan metode dilusi padat menggunakan media Lowenstein-Jensen (L-J). Media L-J merupakan suatu media berbasis telur yang digabungkan dengan penggunaan elektrolit dan *malachite green*. Media ini umum digunakan dalam isolasi, kultur dan studi kerentanan *M. tuberculosis* terhadap obat (Coban, A.Y., dkk, 2006). Telur pada pembuatan media Lowenstein Jensen (L-J) ini memiliki karakteristik berupa telur ayam atau telur bebek segar dengan usia kurang dari 7 hari dan bebas dari antibiotik pada pakan ternak tersebut. Penggunaan *malachite green* bertujuan untuk menghindari kontaminasi bakteri lain dimana *malachite green* memiliki sifat bakteristatik terhadap bakteri lain. Penambahan gliserol bertujuan untuk dijadikan sumber karbon dan energi untuk metabolisme dan mempercepat pertumbuhan *M. tuberculosis* (Kennedy, A.D., 2011) Hasil uji aktivitas anti tuberkulosis dengan metode dilusi padat menggunakan media Lowenstein Jensen dapat dilihat dari gambar 2.

Aktivitas antimikroba secara kuantitatif untuk ekstrak tidak dianjurkan lebih dari 1 mg/ml sedangkan untuk isolat tidak lebih 0,1 mg/ml. Aktivitas antimikroba secara kuantitatif sangat baik bila kurang dari 100 µg/ml untuk ekstrak dan kurang dari 10 µg/ml untuk isolat (Rios, J.L., dan Recio, M.C., 2005).

Berdasarkan hasil penelitian, ekstrak etil asetat daun kenikir dan daun sendok terhadap *M. tuberculosis* di media memberikan hasil yang dapat dilihat pada gambar 2, seri kadar 0,25 mg/ml menunjukkan adanya pertumbuhan koloni. Hal tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi 0,25 mg/ml belum dapat memberikan nilai kadar bunuh minimum (KBM) untuk pertumbuhan *M. tuberculosis*.

Konsentrasi 0,5 mg/ml memberikan hasil pengamatan yaitu media LJ menjadi berwarna kuning tetapi kepadatannya tetap dan tidak luruh. Perubahan warna media menjadi kuning dapat diakibatkan kontaminasi pada tip saat proses pemindahan dari media cair ke media padat di konsentrasi 0,5 mg/ml. Perubahan warna media menyebabkan pengamatan ada atau tidaknya pertumbuhan koloni dari *M. tuberculosis* menjadi lebih sukar jika dibandingkan apabila tidak terjadi perubahan warna. Konsistensi media yang tetap baik dan tidak luruh membuat pertumbuhan koloni *M. tuberculosis* pada konsentrasi 0,5 mg/ml dapat diamati dari permukaan media LJ. Apabila terdapat pertumbuhan koloni maka permukaan media LJ akan terlihat kasar atau tidak rata. Permukaan media pada konsentrasi 0,5 mg/ml yaitu tetap halus dan rata sehingga tidak ada pertumbuhan koloni *M. tuberculosis*. Namun, konsentrasi 0,50 mg/ml bukanlah nilai KBM karena adanya perbedaan warna media dikhawatirkan terjadi pengurangan nutrisi di media LJ sehingga menyebabkan *M. tuberculosis* tidak tumbuh. Apabila konsentrasi 0,50 mg/ml sebagai nilai KBM dapat menyebabkan data menjadi bias.

Data ekstrak etil asetat daun sendok dan daun kenikir dengan konsentrasi 1,00 mg/ml memberikan hasil tidak adanya pertumbuhan *M. tuberculosis* di semua pengulangan. Media LJ yang tetap berwarna hijau-biru, permukaan tetap halus, dan media tidak rusak ataupun luruh. Berdasarkan hasil penelitian, konsentrasi 1,00 mg/ml merupakan nilai konsentrasi bunuh minimum (KBM) ekstrak etil asetat daun kenikir dan daun sendok terhadap pertumbuhan *M. tuberculosis* dan memiliki aktivitas sebagai anti tuberkulosis.

Kromatografi lapis tipis digunakan melihat

profil kromatogram ekstrak larut etil asetat daun kenikir dan daun sendok. Fase diam yang digunakan silika gel 60 F254 dan mengandung senyawa berfluoresensi pada gelombang maksimum 254 nm sehingga keberadaan senyawa dapat dideteksi dengan adanya pemataman bercak pada zona tertentu. Deteksi KLT dilakukan dengan sinar tampak, sinar UV254 dan sinar UV366, dan bertujuan untuk mengetahui adanya senyawa-senyawa yang memiliki ikatan rangkap terkonjugasi dalam sampel. Plat silika gel 60 F254 akan berfluoresensi kuning-hijau jika terkena sinar UV254. Jika senyawa mempunyai ikatan rangkap terkonjugasi dalam strukturnya maka sinar UV tidak dapat mengeksitasi indikator sehingga tidak terjadi pancaran sinar. Hasil visual terlihat berupa pemataman pada plat KLT. Adanya ikatan rangkap terkonjugasi memperlihatkan zona gelap dengan latar belakang berfluoresensi hijau (Gritter *et. al.*, 1985; Wagner dan Bladt, 1996). Deteksi dengan sinar UV366 akan menunjukkan adanya pemadaman bercak dengan warna tertentu (Wagner dan Bladt, 1996).

Pereaksi semprot sitroborat digunakan untuk identifikasi golongan senyawa yang mempunyai gugus orto dihidroksi (Harborne, 1987). Berdasarkan hasil identifikasi dengan sitroborat, kromatogram terdapat bercak dengan warna kuning, cokelat dan hijau dari ekstrak larut etil asetat daun kenikir pada nilai Rf 0,6; 0,66; dan 0,95 serta daun sendok 0,39; 0,44; 0,49; 0,74; 0,80 dan 0,86. Sedangkan pembandingan muncul dengan bercak tunggal berwarna hijau pada nilai Rf 0,54. Hasil ini menunjukkan adanya senyawa dalam ekstrak larut etil asetat daun kenikir dan daun sendok yakni substituen orto- dihidroksi.

Pereaksi semprot FeCl₃ digunakan untuk identifikasi adanya senyawa fenol dalam ekstrak larut etil asetat daun kenikir dan daun sendok. Adanya bercak berwarna hijau, merah, biru, abu-abu, atau hitam yang kuat menunjukkan senyawa fenol (Harborne, 1987). Pereaksi FeCl₃ akan bereaksi dengan ion fenolat membentuk ion kompleks [Fe(Oar)₆]³⁺. Berdasarkan profil kromatogram tersebut, bercak setelah disemprot dengan FeCl₃, bercak ekstrak uji pada UV366 muncul sebanyak 6 bercak dengan warna beragam mulai dari abu-abu, hijau, kuning, hijau gelap, dan kehijauan pada nilai Rf 0; 0,06; 0,6; 0,92; 0,95 dan 0,99 sedangkan bercak pembandingan kuersetin muncul sebagai bercak tunggal berwarna cokelat pada nilai Rf 0,54. Pada daun sendok ada enam bercak yang positif fenolik yaitu pada Rf 0,45; 0,53; 0,58; 0,89 dan 0,94. Hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak larut etil asetat daun kenikir dan daun sendok memiliki kandungan senyawa fenol.

Pengujian untuk terpenoid dilakukan menggunakan fase diam silika gel 60 F254 dengan fase gerak toluena: etil asetat: metanol (3:2:1, v/v) baik untuk ekstrak larut etil asetat daun kenikir maupun daun sendok. Penelitian ini menggunakan timol sebagai pembandingan. Sistem KLT dalam deteksi senyawa golongan terpenoid fase diam silika gel 60 F₂₅₄ dan eluen toluene: etil asetat: methanol (3:2:1, v/v), sedangkan jarak elusi 8 cm serta pembandingan adalah timol.

Profil kromatogram hasil identifikasi golongan senyawa terpenoid dengan reagen semprot anisaldehyd-asam sulfat dapat dilihat pada gambar 3A dan 3B. Anisaldehyd - asam sulfat merupakan pereaksi untuk identifikasi senyawa steroid, karbohidrat, glikosida, sapogenin, dan minyak atsiri atau terpenoid (Jork dkk., 1990). Deteksi terpenoid menggunakan anisaldehyd-asam sulfat dilakukan setelah plat KLT dipanaskan pada suhu 100-105 °C selama 10 menit sebagai percepatan reaksi (Sutrisno, 1986). Reaksi ini didasarkan pada gugus aromatik anisaldehyd sehingga mengakibatkan munculnya gugus penarik atau penerima elektron. Adanya gugus tersebut memicu terjadinya kondensasi dengan molekul organik target. Kondensasi tersebut membentuk senyawa trifenilmetan dengan ikatan rangkap terkonjugasi dan semakin panjang sehingga berwarna pada pengamatan sinar tampak. Deteksi terpenoid dengan pereaksi ini akan memberikan bercak dengan warna ungu, biru, merah, cokelat atau hijau pada plat KLT (Harborne, 1987).

Berdasarkan profil kromatogram pada gambar 3A dan 3B, bercak timol muncul sebagai bercak tunggal dan hanya bisa diamati pada sinar UV254 sebelum di semprot anisaldehyd-asam sulfat. Hal ini dikarenakan ikatan ganda pada timol yang termasuk golongan monoterpenoid sangat terbatas sehingga hanya dapat diamati pada sinar UV254 dengan pemataman plat KLT. Pengamatan bercak timol pada sinar tampak dan sinar UV366 tidak terlihat dikarenakan timol tidak muncul warna sehingga tidak dapat diamati pada sinar tampak dan timol tidak mampu menyerap paparan UV dengan panjang gelombang lebih tinggi di UV366. Bercak pada ekstrak larut etil asetat daun kenikir pada Rf 0,16 dan Rf 0,25 hanya muncul pada sinar UV254 seperti bercak pembandingan timol namun memiliki warna berbeda. Pada daun sendok terdapat bercak pada Rf 0,15; 0,29; 0,48; 0,54; 0,60; 0,66; 0,73; 0,84 dan 0,96.

Bercak tersebut diduga merupakan senyawa terpenoid dengan ikatan ganda terbatas seperti pada pembandingan timol. Berdasarkan profil kromatogram pada gambar 3, ekstrak larut

etil asetat daun kenikir dan daun sendok muncul bercak dengan warna beragam yang mayoritas berwarna ungu sedangkan timol sebagai pembanding menunjukkan bercak tunggal pada Rf 0,94 dengan warna merah tebal. Warna bercak muncul karena ikatan rangkap terkonjugasi dalam struktur hasil reaksi dengan anisaldehyd-asam sulfat. Senyawa-senyawa memiliki karakteristik dengan perubahan warna tertentu pada pengaruh durasi pemanasan tertentu.

Senyawa yang mengarah ke orto dihidroksi, senyawa fenol, dan senyawa terpenoid dalam ekstrak larut etil asetat daun kenikir dan daun sendok diduga berkontribusi terhadap aktivitas anti-tuberkulosis. Sedangkan golongan senyawa terpenoid seperti seskuiterpenoid lakton memiliki gugus epoksida yang reaktif dan sifat lipofiliknya berpengaruh terhadap permeabilitas membran sel bakteri *M. tuberculosis* dengan dinding sel tebal.

KESIMPULAN

Ekstrak larut etil asetat daun kenikir (*Cosmos caudatus* H.B.K) dan daun sendok (*Plantago major* L.) memiliki aktivitas sebagai anti-tuberkulosis. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) kedua ekstrak etil asetat daun kenikir dan daun sendok terhadap *M. tuberculosis* yaitu 1,0 mg/mL. Ekstrak etil asetat daun kenikir dan daun sendok mengandung senyawa fenolik, senyawa orto-hidroksi, dan senyawa triterpenoid asam ursolat dan asam oleanolat.

DAFTAR PUSTAKA

- Agusta, A., (2000), Minyak Atsiri Tumbuhan Tropika Indonesia, Penerbit: ITB-Ganesha, Bandung, hal. 101
- Akbar, Hendra Rizki. 2010. *Isolasi dan Identifikasi Golongan Flavonoid Daun Dandang Gendis (Clinacanthus Nutans) Berpotensi Sebagai Antioksidan* (Skripsi). Bogor: IPB.
- Anonim, 1995, *Farmakope Indonesia*, Edisi IV, Kementerian Kesehatan RI Jakarta.
- Anonim, 2002, *Pedoman Nasional Penanggulangan Tuberkulosis* Edisi 9, Departemen Kesehatan RI, Jakarta.
- Anonim, 2007, *Pedoman Nasional Penanggulangan Tuberculosis*, Edisi II, Kementerian Kesehatan RI, Jakarta.
- Anonim, 2010, *Cosmos caudatus* Kunth, Malaysian Herbal Monograph, http://www.globinmed.com/index.php?option=com_content&view=article&id=104892:cosmos-caudatus-kunth&catid=209&Itemid=143, 2 September 2016.
- Anonim, 2012^a, *Petunjuk Teknis Pemeriksaan*

- Biakan, Identifikasi, dan Uji Kepekaan Mycobacterium tuberculosis pada Media Padat*, Kementerian Kesehatan RI, Jakarta.
- Anonim, 2012^b, *Taxonomy-Mycobacterium tuberculosis complex*, www.uniprot.org/taxonomy77643, 19 November 2016.
- Brennan, P.J., 2003, Structure, function and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*, *Tuberculosis*, 83 : 91-97.
- Bunamela, J.G., Martinez Moralis, Stashenko E., and Ribon W., (2014), Antitubercular activity of eleven aromatic and medicinal plants occuring in Africa, *Biomedica*, Vol. 29: 51-60
- Cantrell, C.L., Franzblau, S.G., Fischer N.H., 2001, Antimycobacterial Plant Terpenoids, *Planta Med* 67: 685-694..
- Coban AY, Cihan CC, & Bilgin K., 2006, Blood agar for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* against first-line drugs, *Int J Tuberc Lung Dis*, 10: 450-453.
- Dias, H. M., Falzon, D, Fitzpatrick, C., Floyd, K., Glaziou, P., & Hiatt, T., 2012, *Global Tuberculosis Report 2012*, World Health Organization, Geneva.
- Fansworth, N.R., & Fabricant, D.S., 2001, The value of plants used in traditional medicine for drug discovery, *Environ Health Perspect*, 109: 69-75.
- Gritter, R.J., J.M. Robbit, & A.E. Schwarting, 1991, *Pengantar Kromatografi*, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata, Edisi 2, 34-81, ITB, Bandung.
- Harborne JB., 1987, *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan*, Padmawinata K penerjemah, Penerbit ITB, Bandung. Terjemahan dari: *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*.
- Hiswani, 2009, Tuberkulosis Merupakan Penyakit Infeksi Yang Masih Menjadi Masalah Kesehatan Masyarakat, <http://library.usu.ac.id/download/fkm-hiswani-6.pdf> 2009, 7 Januari 2017.
- Irianti, T., Puspitasari, A., Machwiyyah, L., dan Rabbani, H.R., (2015^a), The Activity of Radical Scavenging 2-2'-diphenil-1-Picrylhydrazyl (DPPH) by Ethanolic Extract of Mengkudu leaves, brotowali stem, its water fraction and its hydrolyzed fraction, *Traditional Medicine Journal* Vol. 20 No. 3, Yogyakarta, Indonesia.
- Irianti, T., Puspitasari, A., Suryani, E., Rabbani, HR., Kuswandi and Kusumaningtyas RA. (2015^b), Scavenging Activity Of Radical 2-

- 2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) by Acid Fraction and Aqueous Hydrolyzed Fraction of *Tinospora Crispa* L. Ethanol Extract, ICEOH-Johor-Malaysia, Conference.
- Jork, H., Werner, F., Walter, F., dan Hans, W., 1990, Thin-Layer Chromatography, Reagen and Detection Methods, VCH Publisher, USA.
- Kennedy AD, (2011), Biochemical profil of mycobacterium tuberculosis gron under hypoxic conditions (snow globe model, SG7), (online) www.metabolon.com.
- Merfort, I., 2002, Review of the analytical techniques for sesquiterpenes and sesquiterpene lactones, *Journal of Chromatography A*, 967: 115-130.
- Middlebrook, G.M.D dan Cohn, M.L., 1957, Bacteriology of Tuberculosis: Laboratory Methods, *American Journal Public Health*, 48(7).
- Munawaroh, A.L., Dwi Y.N.H., dan Yulian W.U., 2015, Studi komparasi media kultur Coco Blood Malachite Green (CBM) dengan Lowenstein Jensen (LJ) untuk diagnosis cepat, spesifik, dan sensitif pada sputum pasien suspek tuberkulosis, *Majalah Kesehatan FKUB*, Vol. 2 (2).
- Purba, R.D 2001. *Analisis Komposisi Alkaloid Daun Handeuleum (Graptophyllum pictum (Linn), Griff) yang Dibudidayakan dengan Taraf Nitrogen yang Berbeda* (Skripsi). Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Rios dan Recio, 2005, Medicinal plants and antimicrobial activity, *Journal of Ethnopharmacology*, 100: 80-84.
- Rowe, R.C., Shekey, P.J. dan Quinn, M.E., 2009, *Handbook of Pharmaceutical Excipients Sixth Edition*, Pharmaceutical Press and American Pharmacist Association, USA.
- Samuelsen, A.B., 2000, A Review: *The traditional uses, chemical constituents and biological activities of Plantago major L.*, *J. Ethnopharmacol.*, 71, 1-21
- Saric, D., Bojic, M., Haas, V.S, dan Males, Z., 2013, Determination of Flavonoids, Phenolic Acids, and Xanthines in Mate Tea (*Illex paraguariensis* St.-Hill), *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, Vol. 2013.
- Sutrisno, (2016), Eksplorasi Potensi Senyawa Organik Bahan Alam Dengan Pendekatan Berbasis Struktur dan Implikasinya Pada Pembelajaran Kimia Organik di perguruan Tinggi, Prosiding Seminar Nasional Kimia, ISBN: 978-602-0951-12-6, Universitas Negeri Surabaya, hal 11.
- Taofik, *et. al.* 2010. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Aktif Ekstrak Air Daun Paitan (*Thitonia Diversifolia*) Sebagai Bahan Insektisida Botani Untuk Pengendalian Hama Tungau Eriophyidae. *Alchemi* Vol. 2(1): 104- 157.
- Tirtana, B.T., 2011, Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Keberhasilan Pengobatan pada Pasien Tuberkulosis Paru dengan Resistensi Obat Tuberkulosis di Wilayah Jawa Tengah, *Skripsi*, Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang.
- Wagner H., Blatt S., dan Zgainski, E. M., 1984, *Plant Drug Analysis, A Thin Layer Chromatography Atlas*, Springer, Berlin.
- Wahyono, 2008, *Tanaman Sebagai Sumber Obat-Obatan*, Sidang Pengukuhan Guru Besar UGM, Yogyakarta.
- World Health Organization (WHO), 2016, *Tuberculosis country profiles*, <http://www.who.int/tb/country/data/profiles/en> 18 Oktober 2017.
- World Health Organization (WHO), 2003, *Adherence to long-term therapies: evidence for action*, World Health Organization, Geneva.
- World Health Organization (WHO), 2016, *Global Tuberculosis Report 2016*, World Health Organization, Geneva.