

# ISOLASI DAN IDENTIFIKASI SAPONIN DARI ALOE BARBADENSIS MILLER SEBAGAI ANTIBIOTIK ALAMI : PENANGGULANGAN MASTITIS PADA SAPI PERAH

Imbang Dwi Rahayu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Pertanian dan Peternakan, Jurusan Produksi Ternak, Universitas Muhammadiyah Malang  
 Alamat Korespondensi: Jl. Embong Anyar I Blok D-10 Mulyoagung Dau Malang  
 Tlp. 0341-465272, Hp. 081333055065, E-mail: imbang@umm.ac.id

## ABSTRAK

The mastitis in dairy cattle is caused by *Staphylococcus aureus*. The bacteria are multiresistant to antibiotic. Isolated of *Aloe barbadensis Miller*, that has antibacterial, saponin is needed to replace synthetic antibiotic. The research has conducted to tested antibacterial activity of saponin for the growth of *Staphylococcus aureus*.

Saponin was extracted from gel of *Aloe vera* leaves by 95% ethanol, 50% ethanol and n-butanol. Isolated of saponin used to the Coulom Chromatography and Thin Layer Chromatography. It needs "Liebermann-Burchad" reagent, acetic anhydride and sulfuric acid (1:1:1) for identifying of saponin. These saponin preparation were detected by short wave U.V lamp on silica gel G plates developed with solvent of butanol-ethanol-water (2 : 4 : 4). The saponin's powder was produced by drying process, amylum or dextrin as kinds of filler. The ratio of saponin and dextrin was 80% : 20%. Six levels of saponin were used in experiment i.e : 1,5%; 3,0%; 6,2%; 12,5%; 25% and 50%. The parameters of the research were Minimum Inhibition Concentration (MIC) and cakram disk. The result of experiment was analysed with descriptively, penicillin was used as positive control.

The saponin's powder give antibacterial activity that higher than saponin's concentrated. There were similarity in antibacterial activity between the saponin's powder was added dextrin with penicillin.

**Key words :** Saponin, antibacteria activity, *Aloe barbadensis Miller*, *Staphylococcus aureus*.

## PENDAHULUAN

Mastitis pada sapi perah terutama disebabkan oleh *Staphylococcus aureus* dan *Streptococcus agalactiae* berdampak penurunan produksi susu dan kualitas susu, dan resistensi bakteri penyebab. Sebagian besar bakteri penyebab telah resisten terhadap berbagai antibiotik yang sering digunakan untuk mengatasinya (Rahayu,2007). Diperlukan antibiotik alami, ekstrak tanaman, seperti *Aloe barbadensis Miller*, yang mengandung saponin, sebagai pengganti antibiotik sintetik yang aman, tanpa menimbulkan resistensi bakteri dan residu antibiotik dalam air susu. Penelitian ini secara khusus dimaksudkan untuk memperoleh produk saponin sebagai antibiotik alami yang diekstrak dari *Aloe barbadensis Miller*, sebagai upaya pengendalian penyakit mastitis pada sapi perah secara aman, tanpa menimbulkan resistensi bakteri

## METODELOGI DAN PENELITIAN

Materi yang digunakan berupa daun lidah buaya, spesies *Aloe barbadensis Miller*. dengan bahan pengisi berupa dekstrin. Bahan untuk ekstraksi berupa etanol 95%, Etil Eter, etanol 50%, n-butanol pekat, aquades dan HCl. Bahan kimia yang diperlukan pada uji kromatografi kolom, yaitu  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (Alumina) dan silika gel G. Pada uji dengan KLT diperlukan bahan, antara lain pengembang BEA (Butanol-Etanol-Air) (6 : 2 : 3) dan BAA (Butanol-Asam Asetat- Air) (2 : 1 : 1). Guna penotolan, diperlukan pengembang BEA (2 : 4 : 4). Pada penotolan diperlukan kombinasi reagen "Liebermann-Burchad", asam anhidrida asetat dan asam sulfat (1:1:1). Pada uji cakram diperlukan antibiotik sintetik, penisilin. Alat yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah oven, evaporator, corong pemisah, sentrifuge, dan berbagai alat-alat gelas,

seperti : tabung reaksi, labu erlemeyer dan petri disk. Seperangkat alat kromatografi kolom, KLT, lampu UV. Pada uji MIC diperlukan bahan, antara lain media cair (nutrient broth), agar TSA. Pada uji cakram, bahan yang digunakan adalah agar MHA (Muller Hinton Agar) dan cakram.

**Isolasi dan identifikasi saponin** dari *Aloe barbadensis Miller* dilakukan menurut Shibata dan Myoga (1977). Gel daun lidah buaya dipisahkan dari kulit daun, dikeringkan dengan oven dan diblender sampai halus. Ekstraksi dilakukan dengan merendam serbuk lidah buaya sebanyak 300 gram dengan 2 liter etanol 95%, selama 2 hari. Hasil perendaman disaring dan dievaporasi. Filtrat ditambah dengan Etil Eter dan digojok, dimasukkan ke corong pemisah, sehingga diperoleh senyawa larut lemak dan tidak larut lemak. Saponin, larutan tidak larut lemak yang berwarna hijau kekuningan selanjutnya dilarutkan dalam etanol 50% panas. Larutan saponin didinginkan, sehingga terbentuk kristal saponin. Cairan di atas kristal saponin ditampung dan dilarutkan lagi dengan etanol 50% panas, didinginkan lagi, sehingga diperoleh kristal saponin maksimal. Kristal saponin selanjutnya dikeringkan dengan oven vacuum, ditambahkan n-butanol pekat, ditambahkan asam klorida, sampai pH sebesar 2. Hasilnya disaring dan dimasukkan ke corong pemisah, sehingga terjadi 2 lapisan, lapisan atas, berupa butanol, dibuang dan lapisan bawah diambil, dicuci dengan aquades untuk menghilangkan HCl. Larutan hasil disentrifuse dengan kecepatan 8000 rpm, selama 10 menit. Endapan yang berwarna kekuningan yang terbentuk

diambil, sedangkan supernatan dibuang. Endapan diperlakukan lagi dengan ditambah butanol, dipisahkan, serta disentrifuse, sehingga terbentuk endapan yang betul-betul kering. Saponin kering diisolasi dengan kromatografi kolom, dengan urutan kolom dari atas ke bawah :  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (Alumina) dan silika gel G. Eluat yang dihasilkan dievaporasi, sehingga diperoleh cairan dan endapan saponin. Endapan saponin yang dihasilkan diuji lebih lanjut dengan kromatografi lapis tipis (KLT). Pengembang yang digunakan adalah BEA (Butanol-Etanol-Air) (6 : 2 : 3) dan BAA (Butanol-Asam Asetat- Air) (2 : 1 : 1). Guna penotolan, diperlukan 100 µg saponin dalam pengembang BEA (2 : 4 : 4). Hasil uji KLT ditambahkan dengan kombinasi reagen "Liebermann-Burchad", asam anhidrida asetat dan asam sulfat (1:1:1). Preparat saponin dideteksi dengan lampu UV, hasil positif, jika berwarna ungu. Larutan saponin pekat (70%) yang dihasilkan ditambahkan bahan pengisi dekstrin (30%), dibekukan dengan freezer dan vacuum freeze dryer, sehingga diperoleh saponin serbuk. Pengujian dengan uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) dan cakram dilakukan terhadap 7 level saponin, yaitu 1,5%; 3,0%; 6,2%; 12,5%; 25% dan 50%. Data hasil penelitian dianalisis secara deskriptif, dengan kontrol positif menggunakan sediaan derivat penisilin.

Pada uji MIC, dibuat larutan stok saponin 10% (100 ml antibiotik dilarutkan dalam 100 ml aquadest steril), dilanjutkan pembuatan seri konsentrasi saponin, seperti Tabel 1.

Tabel 1. Seri Konsentrasi Saponin Pada Uji C

Konsentrasi Perlakuan	Antibiotik	Media Nutrien Broth Yang Diinokulasi Bakteri
	Larutan Stok 10%	
0.7	0.7	9.3
0.8	0.8	9.2
0.9	0.9	9.1
1.0	1.0	9.0
1.1	1.1	8.9
1.2	1.2	8.8
1.3	1.3	8.7
-	-	-
-	-	-
2.5	2.5	7.5
2.6	2.6	7.4

Sumber : Rahayu (2007)

Masing-masing perlakuan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C, selanjutnya diamati pertumbuhan bakteri di dalamnya. Apabila medium keruh, berarti konsentrasi yang digunakan tidak efektif. Tetapi apabila medium tetap jernih, berarti bakteri tidak tumbuh, hal ini berarti konsentrasi tersebut bisa digunakan efektif untuk menghambat pertumbuhan bakteri.

Menggosokkan medium yang jernih pada media TSA kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 30°C. Apabila pada media TSA terlihat adanya pertumbuhan bakteri, berarti konsentrasi saponin yang digunakan bersifat bakteriostatik.

Sebaliknya, apabila pada media TSA tidak terdapat pertumbuhan bakteri, ini berarti konsentrasi saponin yang digunakan bersifat bakterisidal. Konsentrasi saponin terkecil yang menunjukkan hambatan pertumbuhan mikroorganisme dan disebut konsentrasi penghambat minimum (MIC).

Pada uji Cakram, masing-masing biakan murni ditanam pada 4 ml media cair (Nutrien Both) sebanyak 5 inokulum dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 2 – 5 jam sehingga akan terbentuk kekeruhan. Membuat seri konsentrasi saponin berdasarkan konsentrasi perlakuan, seperti Tabel 2.

**Tabel 2. Seri Konsentrasi Saponin pada Uji Cakram**

Konsentrasi yang Diinginkan (%)	Antibiotik (ml)	Aquadest steril (ml)
2,5	0,25	9,75
4,5	0,45	9,55
6,5	0,65	9,35
8,5	0,85	9,15
10,5	1,05	8,95

Sumber : Rahayu (2007).

Masing-masing lempeng agar, MHA (Muller Hinton Agar) dibuat setebal 5 mm. Sebelum digunakan diperiksa sterilitasnya serta permukaannya harus kering. Penamaan bakteri pada lempeng agar dilakukan dengan cara mencelupkan pengusap kapas steril ke dalam biakan cair, NB (Nutrient Broth) yang mengandung bakteri sambil ditekan ke dinding tabung untuk melepas kelebihan cairan, kemudian diusapkan pelan-pelan pada seluruh permukaan lempeng agar MHA secara merata dan dibiarkan kering selama 15 – 30 menit.

Cakram disk dicelupkan pada saponin yang telah ditentukan konsentrasinya. Setelah lempeng agar MHA yang telah ditanami bakteri mengering, barulah cakram disk yang telah mengandung saponin tersebut diletakkan secara aseptis pada permukaan lempeng agar. Cakram disk ditekan-tekan supaya saponin meresap ke dalam agar dengan baik. Pembacaan hasil dilakukan setelah diinkubasi selama 18 – 24 jam, dengan cara mengukur daerah hambatan yang terbentuk di sekitar cakram disk.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan uji MIC, diperoleh hasil bahwa saponin pekat masih memberikan kesempatan tumbuh terhadap *S. aureus* pada konsentrasi 1,5 mg/ml sampai dengan 6,2 mg/ml. Pada konsentrasi 12,5 mg/ml, saponin pekat baru menunjukkan daya hambatnya (Gambar 1).

Jika dibandingkan dengan uji MIC saponin serbuk, maka saponin kental memiliki nilai MIC lebih rendah. Pada saponin serbuk, daya hambat terhadap pertumbuhan *S. aureus* terlihat mulai konsentrasi terendah sampai dengan konsentrasi tertinggi, yaitu 1,5% sampai dengan 50% (Gambar 2). Hal ini berkaitan dengan sifat stabilitas saponin serbuk yang lebih bagus daripada saponin pekat, termasuk stabilitas absorpsi, pH, warna, persen kelarutan maupun kadar air. Stabilitas tersebut secara interaktif akan menekan aktivitas mikroorganisme pada saponin, sehingga saponin serbuk mampu mempertahankan struktur kimianya dalam waktu yang lebih la



Gambar 1. Hasil Uji MIC, saponin pekat menghambat pertumbuhan *S. aureus* pada konsentrasi 12,5%.



Gambar 2. Hasil uji MIC, saponin memberikan kesempatan tumbuh *S. aureus* pada konsentrasi 1,5% dan 3,0%

Pada uji lanjut, saponin serbuk murni, tanpa bahan pengisi, dalam media TSA, terlihat masih ada pertumbuhan bakteri *S. aureus* (Gambar 3), sehingga saponin serbuk dalam penelitian ini

memiliki efek bakteriostatik. Hasil yang sama juga diperoleh pada saponin serbuk yang dikombinasi dengan bahan pengisi dekstrin (Gambar 4).



Gambar 3. Terjadi pertumbuhan bakteri *S. aureus* pada media TSA dengan saponin murni, tanpa bahan pengisi.



Gambar 4. Pertumbuhan bakteri *S. aureus* yang rendah pada media TSA dengan saponin berbahan pengisi dekstrin, konsentrasi 1,5%.

Jika dibandingkan dengan hasil penelitian Rahayu (2007), maka efektivitas saponin terhadap *S. aureus* lebih rendah daripada antiseptik, berupa etanol 70%, kaporit 60 mg/L dan iodofoor 10 ml/L, yang memiliki efek bakterisidal terhadap bakteri tersebut. Menurut Boyd (1988), etanol mampu mendenaturasi protein dan melarutkan lemak yang terdapat pada dinding bakteri dan lemak pembungkus virus. Kaporit, berupa kalsium hipoklorit, memiliki aktivitas antimikroba dengan cara menginaktivasi protein yang mengandung ikatan-ikatan sulfur, sehingga menyebabkan perubahan konformasi protein dan merubah aktivitasnya. Todar (2000), menyatakan bahwa iodofoor merupakan antiseptik kulit, memiliki kemampuan denaturasi dan inaktivasi protein,

sehingga mempengaruhi susunan kimia dinding sel *S. aureus*, yang berupa peptidoglikan, yang tergolong mukopeptida.

Brooks *et al.* (2005) menyatakan bahwa desinfektan dan antiseptik memang berbeda dengan antibiotik, karena desinfektan dan antiseptik memiliki toksisitas selektif yang rendah, keduanya bersifat toksik tidak hanya pada sel mikroba patogen, tetapi juga terhadap sel inang. Oleh karena itu, desinfektan hanya digunakan untuk membunuh mikroorganisme pada lingkungan mati, sedangkan antiseptik mungkin hanya digunakan pada jaringan hidup terbatas pada permukaan kulit

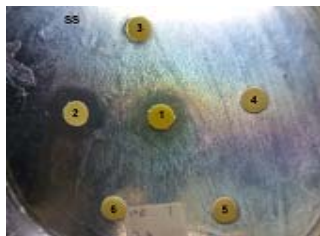
Hasil penelitian ini sesuai dengan pernyataan Soetan *et al.* (2006), bahwa saponin yang diekstrak dari *Sorghum bicolor* L. Moench, efektif

menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif, namun tidak efektif terhadap Gram negatif maupun fungi. Hasil uji MIC saponin dengan bahan pengisi dekstrin sebanding dengan MIC penisilin terhadap *S. aureus*, yaitu pada level 25 mg/ml, saponin-dekstrin dan penisilin mulai menghambat pertumbuhan *S. aureus*. Tidak efektifnya saponin-dekstrin menghambat bakteri Gram negatif diduga karena saponin tidak cukup mampu melakukan penetrasi ke dalam membran sel bakteri Gram negatif, *Escherichia coli* maupun sel fungi, seperti *C. Albicans*. Selanjutnya Avato *et al.* (2006) menambahkan bahwa salah satu jenis saponin, yaitu sapogenin memiliki aktivitas yang tinggi dalam melawan bakteri gram positif, seperti *Bacillus subtilis*, *B. Cereus*, *Staphylococcus aureus* dan *Enterococcus faecalis*.

Apabila dibandingkan hasil uji MIC Soetan *et al.* (2006), maka saponin yang diisolasi dari *Aloe barbadensis Miller* pada penelitian ini, baik bentuk pekat maupun serbuk, memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan *S. aureus* yang lebih besar. Pada saponin pekat, efek hambat bakteri mulai terjadi pada level 12,5 mg/ml, sedangkan pada saponin serbuk terjadi pada level 1,5 dan 3,0 mg/ml. Pada konsentrasi yang lebih besar justru daya hambat menjadi rendah, hal ini disebabkan konsentrasi air semakin rendah. Menurut Rahayu (2007), aktivitas antibiotik sangat dipengaruhi oleh konsentrasi air.

Berdasarkan uji cakram, daya hambat saponin serbuk ternyata lebih baik daripada saponin

pekat. Perbandingan daya hambat dari kedua sediaan saponin sebagaimana ditampilkan pada Gambar 5 dan Gambar 6. Hal ini berkaitan dengan stabilitas struktur kimia saponin serbuk yang lebih tinggi pada suhu refrigerator daripada saponin pekat. Berdasarkan uji kestabilan absorbansi, pH, dan warna, maka saponin serbuk memiliki kestabilan yang lebih baik daripada saponin pekat pada suhu refrigerator dan lama simpan yang sama, yaitu sampai 3 minggu. Kestabilan sifat tersebut disebabkan oleh persentase kadar air dan Aw yang terkandung pada saponin serbuk lebih rendah daripada saponin pekat. Hal ini sesuai dengan pernyataan Rahayu (2008), bahwa kadar air dan Aw yang rendah diciptakan oleh adanya bahan pengisi berupa dekstrin, yang terdiri atas unit glukosa dan bersifat melindungi struktur saponin dengan cara mengikat air dari saponin, sehingga oksigen yang larut dapat dikurangi dan selanjutnya proses oksidasi saponin bisa dicegah. Dekstrin juga berperan sebagai lapisan film yang melindungi partikel saponin, ketika proses pengeringan dengan freeze dryer berlangsung. Sebagai kontrol positif daya hambat saponin serbuk terhadap *S. aureus*, maka dilakukan pula pengujian daya hambat beberapa sediaan penisilin semisintetik terhadap bakteri tersebut. Daya hambat saponin serbuk dengan bahan pengisi dekstrin memberikan kemampuan penghambatan terhadap *S. aureus* yang hampir sama dengan sediaan penisilin semisintetik, seperti ampisilin dan amoksisilin (Gambar 7 dan Gambar 8).



Gambar 5. Uji cakram saponin serbuk dengan bahan dekstrin terhadap pertumbuhan *S. aureus* yang diisolasi dari sapi perah penderita mastitis.



Gambar 6. Uji cakram saponin pekat terhadap pengisi pertumbuhan *S. aureus* yang diisolasi dari sapi perah penderita mastitis.



Gambar 7. Uji cakram ampisilin terhadap pertumbuhan *S. aureus* yang diisolasi dari sapi perah penderita mastitis.



Gambar 8. Uji cakram amoksisilin terhadap pertumbuhan *S. aureus* yang diisolasi dari sapi perah penderita mastitis.

## KESIMPULAN DAN SARAN

Disimpulkan bahwa saponin serbuk dengan bahan pengisi dekstrin memberikan daya hambat terhadap *S. aureus* yang jauh lebih besar daripada saponin pekat. Pada uji kontrol positif, saponin serbuk memberikan daya hambat yang hampir sama dengan daya hambat sediaan penisilin semisintetik.

## DAFTAR PUSTAKA

- Avato, P., Rosellia Bucci, Aldo Tava, Cesare Vitali, Antonio Rosato, Zbigniew Bialy, Marian Jurzysta. 2006. **Antimicrobial activity of Saponins from Medicagosp : Structure-Activity Relationship**. Wiley InterScience Journals Phytotherapy Research
- Brooks, G.F., Butel, J.S., dan Morse, S.A. 2005. **Mikrobiologi Kedokteran**. Terjemahan. Buku Teks asli : Medical Microbiology. Penerbit Salemba Medika.
- Boyd, Robert, F. 1988. **General Mycrobiology**. Second Edition. Times Mirror/Mosby College Publishing.
- Rahayu, I.D. 2007. **Sensitifitas Staphylococcus aureus sebagai Bakteri Patogen Penyebab Mastitis terhadap Antiseptik Pencelup Puting Sapi Perah**. Jurnal Ilmiah Ilmu Peternakan dan Perikanan. **PROTEIN**. Vol.

14. NO.1. Hal : 31- 36. Pusat Publikasi dan Penelitian Fakultas Peternakan-Perikanan. Universitas Muhammadiyah Malang.

Rahayu, I.D. 2008. **Produksi Antibiotik Alami Hasil Isolasi Aloe Barbadensis Miller : Penanggulangan Mastitis pada Sapi Perah**. Laporan Penelitian Hibah Bersaing. Universitas Muhammadiyah Malang.

Shibata, Fumio and Myoga Kiyoshi. 1977. **Ladino Clover Saponin : Its Chemical Characteristics Related to Densitometric Assay Methode**. J.Japan. Grassl. Sci. 23, 60-66.

Soetan k. O., Oyekunie M.A., Aiyelaagbe O. O. and Fafunso M. A. , 2006. **Evaluation of the Antibacterial Activity of Saponins Extract of Sorghum bicolor Moench**. African Journal of Biotechnology. Vol 5, pp. 2405-2407, 4 December 2006.

Todar, Kenneth. 2000. **Controlling Growth with Chemical Agents**. University of Wisconsin-Madison.