

Uji Efektivitas Antibakteri Fraksi Aktif Daun Sirsak (*Annonamuricata* Linn) Terhadap Bakteri *Escherichia Coli*

Ersita¹, Kardewi²

1. Program Studi Ilmu Keperawatan, Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Bina Husada, Jalan Syech Abdul Somad No.28 Kel. 22 ilir, Palembang, 30131, Indonesia
email: zaki_azahir@yahoo.co.id
2. Program Studi Ilmu Keperawatan, Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Bina Husada, Jalan Syech Abdul Somad No.28 Kel. 22 ilir, Palembang, 30131, Indonesia
email: dw.wibowo@yahoo.co.id

Abstrak

Diare adalah suatu penyakit infeksi bakteri patogen dan merupakan masalah kesehatan masyarakat terutama didaerah miskin dan lingkungan sanitasi yang jelek. Salah satu zat tradisional yang bersifat antibakteri yaitu daun sirsak (*AnnonaMuricata* Linn). Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efektivitas antibakteri daun sirsak (*AnnonaMuricata* Linn) terhadap *Escherichia coli*. Studi Eksperimental secara in vitro telah dilakukan di Laboratorium Genetika dan Bioteknologi Universitas Sriwijaya Palembang dari bulan April – Agustus 2015. Sampel yang digunakan adalah *Escherichia coli* yang didapat dari PT. Bio Farma (Persero) Bandung. fraksi dibagi menjadi 6 konsentrasi yaitu 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,250 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,0625 µg/ml, dengan pembanding *ciprofloxacin*. Analisa menggunakan uji T tidak berpasangan, ANOVA dan *Post Hoc* semua analisa menggunakan komputerisasi statistic SPSS versi 16. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi etil asetat daun sirsak (*AnnonaMuricata* Linn) mempunyai aktivitas terhadap *Escherichia coli*. KHM fraksi etil asetat adalah 0,250 mg/ml. Senyawa antibakteri yang terkandung dalam fraksi etil asetat adalah Tanin. Regresi linier menunjukkan 0,250 mg/ml fraksi etil asetat setara dengan 0.031 µg/ml *ciprofloxacin*. Terdapat perbedaan bermakna antara Ciprofloxacin dengan fraksi etil asetat terhadap *Escherichia coli* (*p Value* = 0,000).

Kata Kunci: Fraksinasi, Daun sirsak, *Escherichia coli*, In Vitro.

Abstract

Diarrhea is an infectious disease of bacterial pathogens and it is a public health problem, especially in the economically poor areas and poor environmental sanitation. One of the natural materials used for traditional medicine as an anti-bacterial is soursop leaf (*AnnonaMuricata* Linn). The purpose of this study was to determine the efficacy of the antibacterial activities of soursop leaf (*AnnonaMuricata* Linn) the active fraction (*AnnonaMuricata* Linn) against *Escherichia coli*. An experimental study, in vitro has been conducted at the Laboratory Genetika and Bioteknologi University of Sriwijaya Palembang in April-August 2015. The sample used was *Escherichia coli* which obtained from PT. Bio Farma (Persero) Bandung. The fraction were divided into 6 concentration 2 mg/ml followed by 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,250 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,0625 mg/ml, compare to *ciprofloxacin*. Analysis used unpaired t test, ANOVA and *Post Hoc*. All data analysis was used by SPSS version 16. The results of this study showed that the fraction of ethyl acetate soursop leaf (*AnnonaMuricata* Linn) have activity against *Escherichia coli*, MIC of the fraction ethyl acetate soursop leaf was 0,250 mg/ml, the class of antibacterial compounds contained in the ethyl acetate fraction was tanin. Linier regression result revealed that 0,250 µg/ml ethyl acetate equivalent to 0,031 µg/ml *ciprofloxacin*. There was a significantly difference between *ciprofloxacin* and fraction of ethyl acetate against *Escherichia coli* (*p value* = 0,000).

Keywords: Fractionation, soursop leaf (*AnnonaMuricata* Linn), *Escherichia coli*, In Vitro

1. Pendahuluan

Latar Belakang

Diare masih merupakan masalah utama pada anak terutama balita karena angka kesakitan dan kematiannya masih tinggi. Penyebab diare adalah multifaktorial yaitu parasit, bakteri, virus, keracunan makanan atau minuman yang disebabkan oleh bakteri maupun bahan kimia, alergi terhadap susu, kurang gizi dan daya tahan tubuh rendah¹.

Kasus penyakit infeksi dari bakteri patogen tersebut merupakan masalah kesehatan masyarakat terutama di daerah yang berekonomi rendah dan sanitasi lingkungan yang kurang baik. Antibiotika adalah obat yang sangat memegang peran penting dalam menanggulangi penyakit infeksi di Indonesia², saat ini obat yang digunakan untuk mengatasi diare adalah *Ciprofloxacin* dan *Cefixime*. Dilain pihak antibiotika mengakibatkan munculnya penyebaran resistensi patogen multi obat³. Studi tentang bakteri patogen resistensi antibiotika telah banyak dilakukan. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terjadi peningkatan jumlah kasus bakteri patogen resistensi antibiotika⁴. Untuk mengatasi hal tersebut maka perlu dicari alternatif pengobatan untuk mengatasi penyakit infeksi ini salah satunya dengan pencarian senyawa aktif antibakteri yang terdapat pada tumbuhan.

Salah satu bahan alam yang memiliki potensi untuk diteliti adalah tanaman sirsak (*Annona muricata* Linn). Hampir semua masyarakat mengetahui buah sirsak, selain rasanya yang manis dan segar, ternyata buah ini juga memiliki segudang manfaat terutama untuk kesehatan. Mulai akar, batang, daun hingga biji ternyata berkhasiat. Penggunaan sirsak sebagai obat-obatan sebenarnya bukan merupakan suatu hal yang baru di Indonesia. Secara turun temurun, sirsak telah digunakan oleh sebagian masyarakat Indonesia untuk mengobati beberapa penyakit. Seperti di daerah Jawa barat buah sirsak muda digunakan untuk obat penurun tekanan darah tinggi dan di Aceh buah sirsak digunakan sebagai obat hepatitis dan daunnya sebagai obat batuk⁵.

Daun sirsak yang mengandung flavonoid, saponin, tanin, dan alkaloid ini berpotensi sebagai bahan untuk mencegah penyakit infeksi bakteri⁶. Selain flavonoid, kimia sirsak yang juga dimanfaatkan sebagai obat adalah tanin. Tanin merupakan senyawa metabolit sekunder yang sering ditemukan pada tanaman. Tanin merupakan astrigen, polifenol, berasa pahit, dapat mengikat dan mengendapkan protein serta larut dalam air (terutama air panas). Umumnya tanin digunakan untuk pengobatan penyakit kulit dan sebagai antibakteri, untuk pengobatan diare, hemostatik (menghentikan pendarahan) dan wasir⁷.

Penelitian yang telah dilakukan oleh Widiana dkk (2011)⁸ menyatakan bahwa sari daun sirsak (*Annona muricata* Linn) dengan konsentrasi efektif 10% dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*, dengan luas daerah hambat bakteri sebesar 22,19 mm⁸.

Dari uraian di atas diketahui bahwa tumbuhan merupakan bahan alam nabati memiliki manfaat bagi manusia karena mengandung senyawa aktif yang dapat digunakan sebagai obat. Berdasarkan hal tersebut maka sangatlah penting dilakukan penelitian uji efektivitas antibakteri fraksi daun sirsak (*Annona muricata* Linn) terhadap bakteri *Escherichia coli*. Untuk menguji hal itu maka akan dilakukan penelitian dengan menggunakan metode fraksinasi, menentukan konsentrasi hambat minimum (KHM) dari fraksi aktif, menentukan golongan senyawa, dan uji kesetaraan dengan antibiotik pada daun sirsak (*Annona muricata* Linn).

Tujuan Penelitian

Tujuan Umum

Mengetahui uji efektivitas antibakteri fraksi daun sirsak (*Annona muricata* Linn) terhadap bakteri *Escherichia coli*.

Tujuan Khusus

1. Mengetahui fraksi yang aktif dari ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn) terhadap bakteri *Escherichia coli*.

2. Menentukan konsentrasi hambat minimum (KHM) dari fraksi aktif daun sirsak (*Annona muricata* Linn) terhadap bakteri *Escherichia coli*.
3. Mengetahui golongan senyawa aktif yang terdapat pada daun sirsak (*Annona muricata* Linn).
4. Menentukan kesetaraan fraksi aktif daun sirsak (*Annona muricata* Linn) dengan obat standar *Ciprofloxacin*.

Manfaat Penelitian

Hasil penelitian ini nantinya dapat digunakan sebagai dasar penelitian lanjutan sehingga tanaman sirsak (*Annona muricata* Linn) berpeluang untuk dikembangkan sebagai fitofarmaka dan menjadi landasan ilmiah serta bahan informasi kepada masyarakat tentang manfaat daun sirsak (*Annona muricata* Linn) yang dapat digunakan sebagai alternatif obat antibakteri.

2. Metode Penelitian

Jenis Penelitian

Penelitian ini bersifat eksperimental laboratories secara *invitro* untuk menguji efektifitas antibakteri fraksi aktif daun sirsak (*Annona muricata* Linn) terhadap bakteri *Escherichia coli*.

Tempat Dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Genetika dan Bioteknologi Universitas Sriwijaya Palembang. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April-Agustus 2015.

Subjek Penelitian

Penelitian ini menggunakan bakteri *Escherichia coli* yang tergolong ke dalam bakteri yang masih sensitif diperoleh di Laboratorium Diagnostik Klinik PT. Bio Farma (Persero) Bandung.

Variabel Penelitian

Variabel Independent: Konsentrasi fraksi aktif daun sirsak (*Annona muricata* Linn)

a. Variabel dependent: Diameter hambat

Definisi Operasional

a. Fraksi aktif daun sirsak (*Annona muricata* Linn)

Definisi: Hasil fraksinasi dari pelarut n-heksan, etil asetat, metanol dalam berbagai konsentrasi yang mempunyai aktivitas terhadap bakteri *Escherichia coli*.

Alat Ukur: Metode Fraksi cair-cair (FCC).

Cara Ukur: Self Assesment.

Hasil Ukur: Fraksi n-heksan, etil asetat, metanol.

Skala ukur: Ratio

b. Diameter hambat

Definisi: Diameter yang terbentuk karena adanya daya antibakteri dari hasil fraksi daun sirsak (*Annona muricata* Linn) dalam berbagai konsentrasi terhadap bakteri *Escherichia coli*.

Alat Ukur: Metode difusi agar dan mistar.

Cara Ukur: Pengukuran diameter vertical ditambah diameter horizontal ditambah diameter diagonal lalu dibagi tiga.

Hasil ukur: Hasil pengukuran diameter hambat dinyatakan dalam satuan millimeter.

Skala Ukur: Ratio

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat, spektrofotometer, autoklaf, timbangan analitik, lampu bunsen, blender, oven, labu erlenmeyer, beker glass, botol flacon, incubator, cawan petri, erlenmeyer, jarum ose, tabung reaksi, mikropipet, pipet tes, magnetic stirrer, penangas air, alat tulis. Bahan yang digunakan adalah bakteri *Escherichia coli*, alkohol 70%, simplisia daun sirsak (*Annona muricata* Linn), *Ciprofloxacin* diperoleh dari PT. Dexa, aquades, larutan n-heksan, larutan etilasetat, larutan metanol, nutrient agar (NA), plat silica gel GF₂₅₄, serbuk silica gel G-60 (0,063 – 0,200), aquadest, kertas cakram, kertas label, kertas saring.

Prosedur Kerja

Daun Sirsak

Daun sirsak diperoleh dari daerah Jalan Tanjung Api-api Kabupaten Banyuasin. Bagian tumbuhan yang akan diambil adalah bagian daun yang tua. Daun dibersihkan dari kotoran yang menempel lalu dikeringkan yang selanjutnya akan dibuat untuk pembuatan ekstrak daun sirsak.

Ekstraksi Serbuk Simplisia Metode Maserasi

Pembuatan ekstrak daun sirsak dengan metode maserasi dan menggunakan pelarut methanol. 250 gr daun sirsak (*Annona muricata* Linn) yang telah dikeringkan dibalander sampai halus sehingga menjadi serbuk kering bersamaan dengan metanol kemudian didiamkan selama 24 jam ditempat yang terlindung dari cahaya langsung (untuk mencegah reaksi yang dikatalisis cahaya/perubahan warna). Selanjutnya disaring yang didapat lalu diuapkan menggunakan rotary evaporator dengan suhu pada pemanas water bath 70 °C sehingga didapatkan ekstrak metanol kental dari daun sirsak (*Annona muricata* Linn) tersebut.

Fraksinasi Ekstrak

Fraksinasi dilakukan dengan metode FCC (Fraksinasi Cair-Cair) dengan pelarut n-heksan, etil asetat, metanol secara sinambung dengan sifat kepolaran pelarut yang berbeda-beda. Fraksinasi dilakukan sebagai berikut : Ekstrak metanol dilarutkan dalam metanol dan air dengan perbandingan 3:7 sebanyak 500 ml. Selanjutnya dimasukkan ke dalam labu pisah, ditambahkan 4 x 250 ml n-heksan, dikocok secara perlahan setelah didiamkan terjadi pemisahan antara fraksi n-heksan dan metanol-air. Fraksi n-heksan dipisahkan, kemudian diulangi beberapa kali sampai larutan berwarna bening. Fraksinasi dilanjutkan menggunakan etil asetat dengan proses yang sama dengan n-heksan. Fraksi n-heksan cair, fraksi etil asetat cair dan fraksi metanol-air diuapkan dengan alat vakum putar, sehingga diperoleh fraksi kental. Fraksi kental diuapkan dengan penangas air sampai diperoleh fraksi

kering. Ketiga fraksi yang diperoleh diujikan aktivitas antibakterinya⁹.

Pembuatan Media Nutrient Agar (NA)

Bubuk NA dimasukkan kedalam Erlenmayer masing-masing sebanyak 14 gr, masing-masing dilarutkan dengan menambahkan 500 ml aquadest, kemudian dipanaskan hingga mendidih di atas penangas listrik sambil dihomogenkan. Setelah itu medium disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121 °C dengan tekanan 15 lbs selama 15 menit¹⁰

Peremajaan kultur bakteri *Escherichia coli*

Bakteri *Escherichia coli* sebanyak 1 ose diinokulasikan kedalam media agar miring NA secara aseptis dengan meletakkan jarum ose mengandung biakan pada dasar kemiringan agar ditarik dengan gerakan zig-zag lalu diinkubasi pada suhu 37,5°C selama 24 jam¹¹.

Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri dilakukan terhadap bakteri *Escherichia coli* dengan metode difusi agar, sebagai berikut: bakteri uji diinokulasikan kedalam media NA (Nutrient Agar) sebanyak 3 jarum ose, diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Suspensi bakteri hasil inkubasi dikocok dengan alat pemutar kemudian diukur transmitannya (T) pada panjang gelombang 580 nm, Transmittan diatur sebesar 25% dengan cara penambahan bakteri bila jumlah selnya terlalu sedikit atau medium cair apabila jumlah selnya terlalu banyak. Suspensi bakteri transmittan (T) 25% dimasukkan ke dalam cawan petri sebanyak 0,1 ml, kemudian ditambah medium NA (Nutrient Agar) 10 ml yang belum membeku, dengan suhu sekitar 40°C. Selanjutnya digoyang-goyang sampai membeku. Kedalam medium yang berisi bakteri dimasukkan kertas cakram 6 mm dan ditetesi dengan larutan fraksi 10 µl dengan konsentrasi 2000 µg/ml. Fraksi dilarutkan dalam DMSO (dimetilsulfoksida). Setelah disimpan selama 24 jam pada suhu 37°C diukur diameter hambat yang terbentuk⁹.

Uji Bioautografi Dan Penentuan Golongan Senyawa Bioaktif Antibakteri

Uji bioautografi dilakukan untuk mengetahui harga R_f senyawa aktif antibakteri dengan menggunakan kromatografi lapis tipis. Prosedur uji bioautografi adalah sebagai berikut: fraksi aktif dengan konsentrasi 1% ditotolkan pada plat silika gel GF254, kemudian dikembangkan dengan fase gerak yang sesuai untuk pemisahan senyawa-senyawa yang terdapat dalam fraksi. Kromatogram diletakkan dalam cawan petri yang telah berisi biakkan bakteri, bercak-bercak pada kromatogram diciplak ke cawan petri, kromatogram dibiarkan menempel pada medium agar selama 30 menit supaya senyawa aktif berdifusi kedalam medium agar, kemudian diangkat dengan hati-hati. Setelah 24 jam diinkubasi dapat dilihat bercak atau daerah yang berwarna bening merupakan daerah senyawa aktif berada.

Penentuan Nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)

Penentuan nilai KHM dilakukan dengan metode difusi agar dengan menggunakan kertas cakram dengan diameter 6 mm. Prosedur kerja penentuan KHM adalah sebagai berikut: fraksi aktif dibuat dengan konsentrasi 2000 $\mu\text{g/ml}$, 1000 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$, 125 $\mu\text{g/ml}$, 62,5 $\mu\text{g/ml}$. Pelarut digunakan adalah DMSO. Suspensi bakteri dengan transmittan 25% pada panjang gelombang 580 nm dimasukkan kedalam cawan petri sebanyak 0,1 mL. Kemudian ditambahkan medium NA 10 ml yang belum membeku, cawan petri digoyang-goyang sampai membeku. Kemudian medium dimasukkan kertas cakram berdiameter 6 mm dan ditetesi konsentrasi fraksi 2000 $\mu\text{g/ml}$, 1000 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$, 125 $\mu\text{g/ml}$, 62,5 $\mu\text{g/ml}$. Setelah diinkubasi selama 24 jam pada inkubator dengan suhu 37⁰C diukur diameter hambat yang terbentuk⁹

Uji kesetaraan Fraksi Aktif Dengan Antibiotik *Ciprofloxacin*.

Uji kesetaraan fraksi aktif dengan antibiotik *Ciprofloxacin* dilakukan dengan cara memasukan data diameter hambat kedalam

kurva standar *Ciprofloxacin*. Untuk menentukan diameter hambat *Ciprofloxacin* dibuat larutan dengan konsentrasi 1000 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 0,1 $\mu\text{g/ml}$. Larutan ini diujikan terhadap pertumbuhan koloni bakteri dengan metode difusi agar dan dibuat kurva standar antara diameter hambat dengan log konsentrasi *Ciprofloxacin*.

Analisis Data

Data yang diperoleh merupakan hasil pengamatan secara laboratorium yang selanjutnya akan dianalisis dengan menggunakan uji t-test. Kemudian dianalisis varians (UJI ANOVA) dan di lanjutkan dengan Post Hoc Test untuk mengetahui kesesuaian dosis. Dengan program SPSS versi 16 yang digunakan untuk melihat perbedaan pengaruh masing-masing perlakuan dan penentuan nilai Konsentrasi Hambat Minimum. Kemudian dilakukan regresi linier untuk menentukan kesetaraan dari fraksi aktif daun sirsak (*Annona muricata* Linn) terhadap *Ciprofloxacin*.

3. Hasil Dan Pembahasan

Penelitian ini bersifat eksperimental dalam bentuk invitro untuk menguji aktivitas antibakteri fraksi aktif daun sirsak (*Annona muricata* Linn) terhadap bakteri *Escherichia coli*. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Genetika dan Bioteknologi Universitas Sriwijaya Palembang . Tahapan kemajuan penelitian ini dimulai dari proses ekstraksi, fraksinasi, uji sensitivitas bakteri, uji aktivitas antibakteri fraksi, KHM, golongan senyawa dan uji kesetaraan. Penjelasan dari masing-masing tahapan dapat dilihat sebagai berikut.

Ekstraksi daun sirsak (*Annona muricata* Linn)

Berdasarkan hasil ekstraksi dengan menggunakan pelarut metanol terhadap simplisia daun sirsak (*Annona muricata* Linn) didapatkan hasil ekstraksi seperti pada tabel 1 dibawah ini :

Tabel 1. Hasil Ekstraksi daun sirsak (*Annona muricata* Linn)

NO	Jumlah Simplisia (gram)	Berat Ekstrak (gram)	Persen Berat (%)
1	250	12,6	5,04

Hasil ekstraksi daun sirsak (*Annona muricata* Linn) sebanyak 250 gram dengan pelarut metanol diperoleh ekstrak sebesar 12,6 gram (5,04%). Metode ekstraksi dengan cara maserasi yaitu maserasi merupakan proses perendaman sampel dengan pelarut organik yang digunakan pada temperatur ruangan, hal ini sangat menguntungkan karena dengan perendaman sampel tumbuhan akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara didalam dan diluar sel sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik dan ekstraksi senyawa akan sempurna karena dapat diatur lama perendaman yang dilakukan.

Teori diatas sejalan dengan pernyataan Ahmad (2006)¹² bahwa Pelarut akan menembus dinding sel dan masuk kedalam rongga sel yang mengandung zat aktif sehingga zat aktif akan larut, karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif didalam sel, maka larutan yang terpekat akan didesak keluar, keuntungan cara ekstraksi ini pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan dapat menghindari rusaknya komponen senyawa akibat panas.

Fraksinasi Ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn)

Fraksinasi dengan metode fraksinasi cair-cair dengan pelarut n-heksan, etil asetat dan metanol air. Berdasarkan fraksinasi didapatkan hasil fraksi seperti pada tabel 2 dibawah ini :

Tabel 2. Hasil Fraksinasi Ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn)

No	Pelarut	Berat Fraksi (gram)	Pesan Berat (%)
1	N-heksan	6,5	8,72
2	Etil asetat	64,5	86,57
3	Metanol air	3,5	4,69

Dari tabel diatas dapat dilihat hasil dari fraksinasi ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn) dengan pelarut etil asetat memiliki berat yang lebih besar yaitu 64,5 gram (86,57%) dibandingkan dengan berat N-heksan dan metanol air.

Perbedaan berat fraksi yang di peroleh dari masing-masing pelarut yang digunakan tidak mempengaruhi aktivitas antibakteri. Pelarut-pelarut tersebut mempunyai kemampuan memisahkan senyawa dalam ekstrak berdasarkan kepolarannya.

Fraksinasi cair-cair merupakan cara fraksinasi yang sederhana dan umum dilakukan, fraksinasi metode cair-cair melibatkan distribusi suatu zat terlarut (solut) diantara dua pelarut yang tidak bercampur. Zat terlarut akan terdistribusi dengan sendirinya kedalam dua pelarut tersebut setelah dikocok dan dibiarkan terpisah. Pelarut yang digunakan pada fraksinasi adalah N-heksan, Etil asetat, dan metanol dimana masing-masing pelarut memiliki kemampuan yang berbeda dalam menarik senyawa yang terdapat di dalam ekstrak berdasarkan kepolarannya.

Uji Aktivitas Antibakteri Fraksinasi Ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn)

Hasil uji aktifitas antibakteri dari masing-masing fraksi daun sirsak (*Annona muricata* Linn) Terhadap Bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 dapat dilihat pada Tabel 3 berikut ini

Tabel 3. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi N-heksan, Etil asetat dan Metanol air daun sirsak (*Annona muricata* Linn)

No	Jenis Fraksi	Konsent rasi (mg/ml)	Diameter Hambat (mm)
1	Fraksi N-heksan	2	-
2	Fraksi Etil asetat	2	11
3	Fraksi Metanol air	2	7

Dari Tabel 3 dapat dilihat bahwa fraksi N-heksan tidak memiliki diameter hambatan, fraksi Etil asetat memiliki diameter hambatan

11 mm dan fraksi metanol air memiliki diameter hambat 7 mm.

Uji aktivitas antibakteri fraksi dilakukan dengan metode difusi. Metode difusi cakram metode yang paling sering digunakan dimana cara kerja difusi cakram yaitu antibakteri fraksi yang akan diuji diserapkan pada kertas cakram dan akan ditempelkan pada media agar yang telah di homogenkan dengan bakteri kemudian diinkubasi sampai terlihat zona hambat didaerah sekitar cakram.

Berdasarkan hasil pengukuran diameter hambat menunjukkan bahwa etil asetat daun sirsak (*Annona muricata* Linn) memiliki daya hambat kuat terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922. Penentuan kriteria ini berdasarkan Davis dan Stout (1971)¹³ yang menyatakan bahwa ketentuan kekuatan daya antibakteri sebagai berikut: daerah hambatan 20 mm atau lebih berarti sangat kuat, daerah hambatan 10-20 mm berarti kuat, 5-10 mm berarti sedang dan daerah hambatan 5 mm atau kurang berarti lemah.

Penentuan konsentrasi hambat minimum (KHM) Fraksi etil asetat daun sirsak (*Annona muricata* Linn)

Hasil uji aktivitas antibakteri menunjukkan fraksi etil asetat aktif terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922. Penentuan konsentrasi hambat minimum (KHM) fraksi etil asetat menggunakan konsentrasi 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,250 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,0625 mg/ml dengan 5 kali pengulangan. Hasil penentuan konsentrasi hambat minimum (KHM) pada masing-masing konsentrasi dapat dilihat pada Tabel 4.

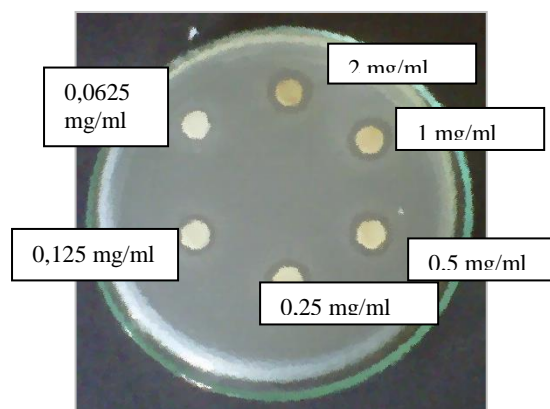
Tabel 4. Rata-rata diameter hambat etil asetat terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922

Konsentrasi fraksi etil asetat mg/ml	N	Rata-rata ± Standar Deviasi diameter hambat etil asetat
2	5	10,60 ± 0,547
1	5	9,60 ± 0,547
0,5	5	8,40 ± 0,547
0,250	5	7,40 ± 0,547
0,125	5	0,00 ± 0,00
0,0625	5	0,00 ± 0,00

Dari Tabel 4 dapat dilihat bahwa konsentrasi Fraksi etil asetat yang berbeda-beda mempunyai diameter hambat yang berbeda pula. Konsentrasi 2 mg/ml mempunyai diameter hambat terbesar 10,60 mm, diikuti dengan konsentrasi 1 mg/ml dengan diameter hambat 9,60, konsentrasi 0,5 mg/ml dengan diameter hambat menurun menjadi 8,40 mm, konsentrasi 0,250 mg/ml dengan diameter hambat menjadi 7,40 mm,. Hal ini dapat dipengaruhi oleh rendahnya konsentrasi fraksi maka jumlah kandungan senyawa antibakteri juga semakin menurun sehingga daya hambat fraksi menjadi lebih kecil terhadap pertumbuhan bakteri. Sehingga dapat disimpulkan bahwa konsentrasi hambat minimum (KHM) fraksi etil asetat dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 terletak pada konsentrasi 0,250 mg/ml dengan diameter hambat 7.40 mm.

Nilai KHM 0,250 mg/ml (250 µg/ml) termasuk kedalam aktivitas antibakteri yang cukup kuat sesuai dengan pernyataan Holetz *et al* (2002)¹⁴ bahwa berdasarkan nilai KHM dibedakan menjadi 4 yaitu, aktivitas antibakteri sangat kuat jika KHM kurang dari 100 µg/ml, aktivitas antibakteri cukup kuat jika KHM 100-500 µg/ml, aktivitas antibakteri yang lemah jika KHM 500-1000 µg/ml, tidak memiliki aktivitas antibakteri jika KHM lebih dari 1000 µg/ml.

Aktifitas antibakteri dari fraksi etil asetat dengan berbagai konsentrasi dapat dilihat pada gambar 1.



Gambar 1 hasil uji aktivitas antibakteri fraksi Etil asetat terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 pada berbagai konsentrasi .

Dari Gambar 1 dapat dilihat konsentrasi fraksi Etil asetat yang berbeda-beda mempunyai diameter hambat yang berbeda pula. Fraksi Etil asetat dengan konsentrasi diatas dapat dilihat bahwa rata-rata diameter hambat fraksi Etil asetat dengan konsentrasi 2 mg/ml mempunyai diameter hambat terbesar 10,60 mm dan konsentrasi 0,250 mg/ml dengan diameter hambat terkecil 7,40 mm. Semakin besar konsentrasi fraksi semakin besar pula diameter hambat yang dibentuknya, sehingga dapat diketahui besarnya konsentrasi dan diameter hambat berbanding lurus satu sama lain.

Dari hasil pengukuran diameter hambat tersebut fraksi Etil asetat memiliki daya hambat sedang hingga kuat bakteri terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 hal ini sesuai dengan pernyataan Davis dan Stout (1971)¹³ yang menyatakan bahwa ketentuan kekuatan daya antibakteri sebagai berikut: daerah hambatan 20 mm atau lebih berarti sangat kuat, daerah hambatan 10-20 mm berarti kuat, 5-10 mm berarti sedang dan daerah hambatan 5 mm atau kurang berarti lemah.

Untuk mengetahui perbandingan rata-rata Diameter Hambat Fraksi etil asetat daun sirsak (*Annona muricata* Linn) terhadap bakteri *Escherichia coli* pada berbagai konsentrasi dapat dilihat pada Tabel 5:

Tabel 5. Perbandingan Efektifitas Fraksi etil asetat terhadap bakteri *Escherichia coli*

Konsentrasi (mg/ml)	Konsentrasi (mg/ml)	<i>p value</i>
2	1	0,139
	0,5	0,002
	0,250	0,000
	0,125	0,000
	0,0625	0,000
1	0,5	0,064
	0,250	0,002
	0,125	0,000
	0,0625	0,000
0,5	0,250	0,139
	0,125	0,000
	0,0625	0,000
0,250	0,125	0,000
	0,0625	0,000
0,125	0,0625	0,000

Uji t tidak berpasangan

Dari Tabel 5 dapat dilihat bahwa konsentrasi etil asetat mulai efektif dari 1 mg/ml sampai 0,250 mg/ml. Setelah dilakukan uji t tidak berpasangan dilanjutkan uji *oneway anova* berdasarkan uji tersebut didapatkan perbandingan diameter hambat etil asetat menunjukkan ada perbedaan yang bermakna maka dilanjutkan dengan analisis *post hoc* untuk melihat perbedaan rata-rata diameter hambat pada masing-masing konsentrasi dan dibandingkan dengan *ciprofloxacin*.

Tabel 6. Uji Kesesuaian dosis antara Fraksi etil asetat dan *ciprofloxacin* terhadap bakteri *Escherichia coli*

Konsentrasi (mg/ml)	Konsentrasi (mg/ml)	<i>p value</i>
2	1	0,091
	0,5	0,000
	0,250	0,000
	1*	0,000
1	0,5	0,025
	0,250	0,000
	1*	0,000
0,5	0,250	0,091
	1*	0,000
0,250	1*	0,000

Uji T *Bonferroni*
*Ciprofloxacin**

Berdasarkan hasil uji tersebut didapatkan bahwa *Ciprofloxacin* lebih efektif bila dibandingkan dengan fraksi etil asetat (*p value* < 0,000). Hal ini dapat dipahami karena *Ciprofloxacin* memiliki spectrum lebih luas terhadap bakteri gram negatif (Legg, 1999)¹⁵. Sehingga perlu dilakukan upaya untuk meningkatkan aktivitas fraksi daun sirsak, salah satunya dengan jalan isolasi senyawa aktif dari larutan uji. Isolasi senyawa aktif akan menghasilkan senyawa yang lebih spesifik sehingga aktivitasnya akan lebih spesifik karena tidak ada lagi senyawa-senyawa lain yang bisa mengganggu aktivitas antibakteri larutan uji.

Uji bioautografi dan penentuan golongan senyawa

Hasil uji aktivitas antibakteri menunjukkan bahwa fraksi paling aktif dari daun sirsak

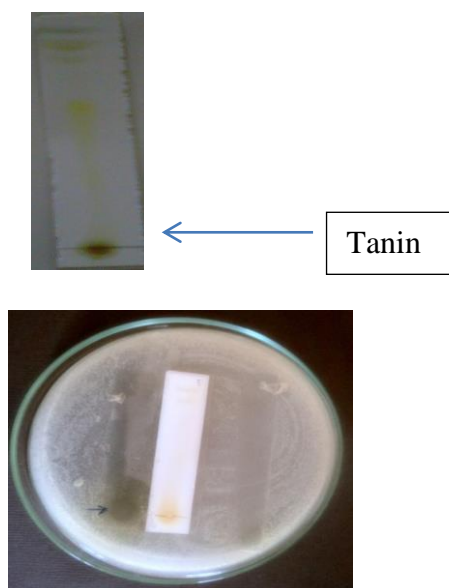
(*Annona muricata* Linn) adalah fraksi etil asetat, selanjutnya dilakukan uji bioautografi untuk mengetahui nilai Rf senyawa aktif antibakteri dengan KLT. Pada cawan petri yang telah berisi biakan bakteri, bercak bahan bioaktif yang terbentuk setelah ada pemisahan diletakkan ke dalam cawan petri, dibiarkan menempel pada medium agar selama 1 jam supaya bahan bioaktif berdifusi kedalam agar. Setelah itu kromatogram diangkat dari cawan petri yang erisi biakan bakteri tersebut diinkubasi selama 24 jam, setelah 24 jam dapat terlihat zona bening yang merupakan daerah aktif berada.

Nilai Rf menunjukkan jenis senyawa yang diperoleh, setiap senyawa memiliki nilai Rf masing-masing. Nilai Rf didefinisikan sebagai jarak yang ditempuh oleh senyawa dari titik asal dibagi dengan jarak tempuh oleh pelarut dari titik asal.

Tabel 7. Hasil Uji Bioautografi dan penggolongan senyawa aktif

No	Jenis Fraksi	Eluen 8:2	Rf	Warna	Senyawa Aktif
1	Etil asetat	Etil asetat	0,09	Coklat	Tanin

Hasil Uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) etil asetat dapat terlihat pada gambar dibawah ini :



Gambar 2. Uji bioautografi Fraksi etil asetat

Terbentuknya zona bening pada media uji pada uji bioautografi menunjukkan hambatan pertumbuhan bakteri yang merupakan daerah senyawa aktif. Pada fraksi aktif Etil asetat terlihat adanya bercak coklat pada kromatogram ini menunjukkan bahwa dalam fraksi Etil asetat terdapat senyawa tanin dengan nilai Rf etil asetat 0,09.

Secara medis tanin digunakan sebagai antibakteri menurut Naim (2004)¹⁶ berhubungan dalam kemampuan tanin dalam menginaktivasi adhesi sel mikroba (molekul yang menempel pada sel inang) yang terdapat pada permukaan sel. Tanin yang mempunyai target polipeptida dinding sel akan menyebabkan kerusakan dinding sel karena tanin merupakan senyawa fenol. Tanin menyebabkan kerusakan pada dinding sel bakteri. Terjadinya kerusakan pada dinding sel bakteri menyebabkan sel bakteri tanpa dinding yang disebut protoplasma. Kerusakan pada dinding sel bakteri akan menyebabkan kerusakan membran sel yaitu hilangnya sifat permeabilitas membran sel, sehingga keluar masuknya zat-zat antara lain air, nutrisi, enzim-enzim tidak terseleksi. Apabila enzim keluar dari dalam sel, maka akan terjadi hambatan metabolisme sel dan selanjutnya akan mengakibatkan terhambatnya pembentukan ATP yang diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangbiakan sel.

Senyawa fenol sebagai antibakteri pada konsentrasi rendah adalah dengan merusak membran sitoplasman dan dapat menyebabkan kebocoran pada inti sel, sedangkan pada konsentrasi tinggi senyawa fenol bekoagulasi dengan protein seluler. Aktivitas tersebut sangat efektif ketika bakteri pada tahap pembelahan dimana lapisan fosfolipid disekeliling sel sedang dalam kondisi yang sangat tipis sehingga fenol dapat dengan mudah merusak isi sel¹⁷.

Bakteri gram negatif mengandung sejumlah besar lipoprotein, lipopolisakarida dan lemak (Schlagel 1993 dalam Rinawati 2009) adanya lapisan-lapisan dinding sel pada bakteri tersebut mempengaruhi aktivitas kerja dari zat antibakteri. Pertumbuhan sel bakteri

terganggu oleh komponen fenol dimana fenol memiliki kemampuan untuk mendenaturasi protein dan merusak membran sel.

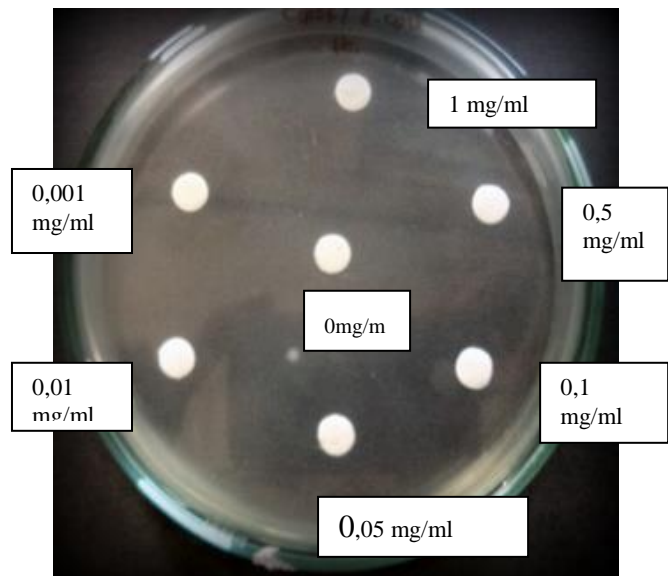
Menurut Plezer & Chan (2005)¹⁸, Pendenaturasi protein dan asam amino ini merusak secara tetap tanpa dapat diperbaiki lagi. menyatakan bahwa denaturasi protein melibatkan perubahan keseimbangan muatan-muatan molekul protein sehingga terjadi perubahan keseimbangan muatan-muatan dalam molekul protein sehingga terjadi perubahan struktur protein dan menyebabkan terjadinya koagulasi. Protein mengalami denaturasi atau koagulasi akan kehilangan aktivitas fisiologinya sehingga tidak dapat berfungsi dengan baik.

Uji Kesetaraan fraksi etil asetat dengan obat Ciprofloxacin

Uji kesetaraan digunakan untuk mengetahui perbandingan fraksi etil asetat dengan antibiotic Ciprofloxacin, untuk mengetahui kesetaraan fraksi dan antibiotik Ciprofloxacin dilakukan pengujian aktivitas antibakteri Ciprofloxacin dengan berbagai konsentrasi. Hasilnya dapat dilihat pada Tabel 8.

Tabel 8. Hasil pengujian antibiotik Ciprofloxacin terhadap pertumbuhan bakteri Escherichia coli

Konsent rasi mg/ml	Konse ntrasi µg/ml	Log	Rerata ± standar deviasi Diameter Hambat Ciprofloxacin
1	1000	1	32,40 ± 0,547
0,5	500	0.699	30,60 ± 0,547
0,1	100	0	27,60 ± 0,547
0,05	50	-0.301	25,60 ± 0,547
0,01	10	-1	21,60 ± 0,547
0,001	1	-2	19,40 ± 0,547



Gambar 3. Uji aktivitas obat Ciprofloxacin terhadap bakteri Escherichia coli ATCC 25922 pada berbagai konsentrasi.

Hasil pengukuran diameter hambatan pada Tabel 8 dibuat persamaan garis regresi, sehingga didapat persamaan garis regresi yaitu: $Y = 10,535 X + 23,284$

Keterangan : Y = Diameter Hambat

X = Konsentrasi ciprofloxacin

Selanjutnya dimasukkan nilai diameter pada KHM 0,250 mg/ml (250 µg/ml)

Tabel 9. Hasil Uji Kesetaraan fraksi etil asetat daun sirsak (Annona muricata Linn) dengan ciprofloxacin.

Konsentrasi Fraksi etil asetat (µg/ml)	Konsentrasi ciprofloxacin (µg /ml)
250	0,031

Kesetaraan fraksi etil asetat daun sirsak (Annona muricata Linn) dengan ciprofloxacin didapatkan dengan memasukkan nilai diameter hambatan fraksi etil asetat pada persamaan regresi diatas.

Contoh konsentrasi fraksi etil asetat daun sirsak (Annona muricata Linn) terhadap bakteri Escherichia coli ATCC 25922 adalah 250 µg/ml dengan diameter hambatan 7,40 mm maka:

$$Y = 10,535 X + 23,284$$

$$7,40 = 10,535 X + 23,284$$

$$X = (23,284 - 7,40) / -10,535$$

$$\text{Log } X = -1,507$$

$$\text{Antilog } X = -1,507$$

$$X = 0,031 \mu\text{g/ml}$$

Kesetaraan fraksi etil asetat dengan *Ciprofloxacin* didapatkan dengan memasukkan diameter hambat fraksi etil asetat pada persamaan regresi yaitu $Y = 10,535 X + 23,284$

Tabel 10. Hasil Uji Kesetaraan fraksi etil asetat daun sirsak (*Annona muricata* Linn) dengan *ciprofloxacin*

Konsentrasi Fraksi etil asetat ($\mu\text{g/ml}$)	Konsentrasi <i>ciprofloxacin</i> ($\mu\text{g/ml}$)
250	0,031

Dari hasil uji kesetaraan menunjukkan bahwa 250 $\mu\text{g/ml}$ fraksi etil asetat setara dengan 0,031 $\mu\text{g/ml}$ *ciprofloxacin* terhadap bakteri *Escherichia coli*. Dari fraksi tersebut jika dibandingkan dengan *ciprofloxacin* memiliki konsentrasi lebih besar dari antibiotik.

Hal ini dapat disebabkan karena zat antibakteri yang diisolasi dari daun sirsak masih dalam bentuk fraksi walaupun demikian fraksi daun sirsak sudah menunjukkan aktivitas antibakteri yang positif dan efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.

Ciprofloxacin merupakan antibiotika sintetik yang termasuk dalam golongan quinolone yang sangat aktif terhadap berbagai bakteri gram negatif. *Ciprofloxacin* menghambat sintesis DNA bakteri dengan menghambat topoisomerase II bakteri (DNA gyrase) dan topoisomerase IV bakteri. Penghambatan DNA gyrase mencegah relaksasi supercoiled DNA secara positif yang dibutuhkan untuk transkripsi dan replikasi normal. Penghambatan topoisomerase IV mungkin berhubungan dengan pemisahan DNA kromosom yang direplikasi kedalam sel-sel anak selama masa pembelahan sel.¹⁹

4. Simpulan dan Saran

Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan yang telah dilakukan, maka diperoleh simpulan sebagai berikut:

1. Fraksi Etil asetat daun sirsak (*Annona muricata* Linn) mempunyai aktivitas terhadap bakteri *Escherichia coli*
2. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dari fraksi etil asetat adalah 0,250 mg/ml dengan rata-rata diameter hambat 7,40 dalam menghambat bakteri *Escherichia coli*.
3. Zat aktif yang terkandung didalam daun sirsak (*Annona muricata* Linn) adalah tanin (fraksi Etil asetat).
4. Nilai kesetaraan Fraksi etil asetat daun sirsak (*Annona muricata* Linn) 0,250 $\mu\text{g/ml}$ setara dengan 0,031 $\mu\text{g/ml}$ *ciprofloxacin*.
5. Terdapat perbedaan bermakna aktivitas antibakteri antara fraksi Etil asetat dan *ciprofloxacin* terhadap bakteri *Escherichia coli*.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap daun sirsak (*Annona muricata* Linn) Penelitian lanjut tersebut adalah:

1. Penelitian terhadap bakteri, jamur, virus lain untuk mengetahui efek anti mikroba lain fraksi daun sirsak (*Annona muricata* Linn)
2. Perlu penelitian lebih lanjut untuk mengisolasi senyawa aktif daun sirsak (*Annona muricata* Linn) dan menentukan struktur molekul senyawa aktif dan metode yang paling efektif untuk mendapatkan isolat senyawa aktif.
3. Penelitian lanjutan berupa studi *In vivo* dengan menggunakan hewan percobaan.

Daftar Pustaka

1. Saroso S. 2007. Diare. www.diare.articles.php.htm
2. Djamaan, A., Marlina, Netty, S., Rustini, dan Auzal, H. 1997. Produksi Antibiotika Secara Fermentasi Menggunakan Mikroba *Penicillium sp.* Am-951. Jurnanl Sains dan Teknologi Farmasi. Padang
3. Panzani, S.W. 2009. An Examination of Antibacterial and Antifungal Properties of Constituents describe in Traditional Ulster

- Cures and Remedies. The Ulster Medicinal Society
4. Kennedy, F.H., P. Baker, C. Piper, P.D. Cotter, M. Walsh, M.J. Mooij, M.B. Bourke, M.C. Rea. M.P. O'Connor, P. Ross, C. Hill, F. O'Gara, J.R. Marchesi, and A.D.W. Dobson. 2009. Isolation and Analysis of Bacteria with Antimicrobial Activities from the Marine Sponge *Haliclona simulans* Collected from Irish Waters. *Mar. Biotechnol.*
 5. Mardiana, L. Dan Ratnasari, J. 2011. *Ramuan & Khasiat Sirsak. Penebar Swadaya* : Jakarta
 6. Astawan, Made. 2008. *Sehat Dengan Buah* Bogor. Dian Rakyat.
 7. Subroto, A. Saputro, H. 2006. *Gempur Penyakit Dengan Sarang Semut*. Penebar Swadaya: Jakarta.
 8. Widiana, R. Indriati, G. Andika, I. 2011. *Daya Hambat Sari Daun Sirsak (Annona muricata Linn) Terhadap Pertumbuhan Bakteri E. Coli*. STKIP PGRI Padang Sumatera Barat
 9. Salni, Hanifa marisa, Ratna wedya mukti, 2011. *Isolasi senyawa antibakteri dari daun jengkol (Pithecolobium lobatum Benth) dan penentuan nilai KHM-nya*. Jurnal penelitian Sains.
 10. Oxoid Agents & Main Distribution. 1998. *The Oxoid Manual*. Eight Edition. Oxoid limited Wade Road. Hampshire. England
 11. Lay, B. W. 1994. *Analisis Mikroba di Laboratorium*. PT. Raja Grafindo Persada. Jakarta.
 12. Ahmad, M.M. 2006. Anti Inflammatory Activitiest Of *Nigella Sativa* Linn <http://Lailanurhayati.multiply.com/journal>.
 13. Davis, W. W. And T.R. Stout 1971. Disc Plate Methods Of Microbiological Antibiotis Assay. *Microbiologu* 22:659-665
 14. Holetz., Bakteri, F., G. L. Pessini., N. R. Sanchez, D., Cortez G., C. V. Nakamura., B. P. D. Filho. 2002. Screening of Some Plants Used in The Brazillian Folk Medicine for The Treatment of Infectious I. *Journal of Bioline International*. <http://www.bioline-org.br/request?oc02229>.
 15. Legg JM, Brint AJ. Will. 1999. *Pneumococci put quinolones in their place* *Journal Of Antimicrobial Chemotrrophy*.
 16. Naim, R. 2004. Senyawa Antimikroba dari tumbuhan. FKH dan Sekolah Pascasarjana IPB. Bogor
 17. Volk, W. A. dan Wheller, M. F. 1984. *Mikrobiologi Dasar Jilid*. Terjemah oleh Soenartono Adisoemarto, hal. 137-138, Erlangga, Jakarta.
 18. Pelczar, M. J. & Chan, E. C. S. 1998. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. UI. Jakarta
 19. Katzung, G Bertram. 2004. *Farmakologi Dasar dan Klinik*. Edisi 8. Terjemahan Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Jakarta.