

EFEK EKSTRAK METANOL DAUN SIRSAK (*Annona muricata*) DALAM MENGHAMBAT PERTUMBUHAN BAKTERI *Salmonella typhi* SECARA IN VITRO

Pramadya PN¹⁾, Hendrayana MA²⁾

¹⁾Program Studi Sarjana Kedokteran dan Profesi Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Udayana, Jl. PB. Sudirman, Denpasar, Bali, Indonesia

²⁾Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Udayana, Jl. PB. Sudirman, Denpasar, Bali, Indonesia

Koresponding : Pramadya PN

E-mail: pramadyaputu@gmail.com

ABSTRAK

Salmonella typhi merupakan penyebab utama penyakit demam typhoid. Masalah yang kini dihadapi dari berbagai penyakit infeksi adalah resistensi bakteri terhadap antibiotik. Pengembangan suatu alternatif pengobatan yang tidak menyebabkan efek samping perlu dilakukan. Salah satu tanaman yang telah lama dimanfaatkan sebagai obat tradisional adalah daun sirsak. Kandungan flavonoid, steroid, alkaloid, saponin dan tanin yang dilaporkan pada daun tanaman sirsak (*Annona muricata*) berkontribusi sebagai antibakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek antibakteri dengan mengukur zona hambat yang diinduksi oleh ekstrak methanol daun sirsak pada bakteri *Salmonella typhi* secara *in vitro*. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan rancangan penelitian *posttest only control design* dengan metode difusi agar (*Kirby-Bauer*). Studi ini menggunakan daun sirsak yang diekstraksi dengan metode maserasi dengan menggunakan pelarut metanol. Ekstrak metanol daun sirsak dengan konsentrasi larutan 50mg/mL, 100mg/mL, 200mg/mL dan 400mg/mL yang diuji pada bakteri *S. typhi* secara *in vitro*. Uji ekstrak secara *in vitro* pada bakteri *S. typhi* memperoleh hasil, ekstrak metanol daun sirsak tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. typhi* secara *in vitro*. Terdapat beberapa faktor yang tidak dapat dikontrol yang mempengaruhi hasil dari penelitian ini seperti, jenis bakteri, lingkungan tempat tanaman berasal dan efektifitas ekstrak. Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk uji antibakteri ekstrak methanol daun sirsak dengan konsentrasi larutan yang berbeda, untuk mengetahui konsentrasi yang dapat memberikan efek secara *in vitro* pada bakteri *S. typhi*.

Kata kunci: *Salmonella typhi*, ekstrak daun sirsak, antibakteri

ABSTRACT

Salmonella typhi (*S. typhi*) still the main cause of typhoid fever. The new problem of various infectious diseases are the bacterial resistance towards antibiotic. The development of other alternative treatment which would not making any side effect for patient is a necessary. One of the plant that has been used as traditional medicine is soursop leaves (*Annona muricata*). Soursop leaves have kinds of natural materials which contain tannins, alkaloids, saponins and flavonoids, which is reported has function as an antibacterial. This study was aimed to determine the antibacterial effect by measured the inhibition zone of soursop leaves extract on growth of *in vitro* *S. typhi*. This research conducted as an experimental laboratory using research design *posttest only control design* with Kirby-Bauer modification method. The subject of this study are soursop leaves which were extracted by maceration method using methanol. The methanol extract of soursop leaves were tested with various concentration, range from 50mg/mL, 100mg/mL, 200mg/mL and 400mg/mL. Extraction result of soursop leaves were tested toward *in vitro* *S. typhi* showed that the soursop leaves extracts did not have inhibition effect against *S. typhi*. There are some factors that affect the result such as the type of the bacteria, the

environment of plants origin and the effectiveness of the extract it self. It is necessary to do further research on antibacterial effect from methanol extract of soursop leaves with another concentration which can give antibacterial effect towards *S. typhi*.

Keywords: *Salmonella typhi*, soursop leaves extract, antibacteria

PENDAHULUAN

Demam tifus merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri gram negatif *Salmonella typhi* (*S. typhi*). Tingginya angka morbiditas dan mortalitas karena demam tifus terutama pada negara berkembang, menggerakkan berbagai pihak untuk berupaya mencari modalitas baru antibiotik sebagai solusi menangani masalah demam tifus. Berkembangnya paradigma dalam bidang kesehatan, untuk menggunakan ramuan alami dan obat-obat tradisional sebagai terapi penyakit, sangat membuka peluang untuk meneliti dan mengembangkan tanaman obat sebagai cadangan antibiotik di masa depan.^{1,2}

Salah satu tanaman yang telah lama dimanfaatkan sebagai obat tradisional adalah daun sirsak (*Annona muricata*). Kandungan flavonoid, steroid, alkaloid, saponin dan tanin yang dilaporkan pada daun tanaman sirsak berkontribusi sebagai antibakteri. Penelitian terdahulu telah melakukan uji daya hambat ekstrak metanol daun sirsak pada berbagai jenis bakteri gram negatif dan gram positif. Namun belum ada data ilmiah terkait penelitian ekstrak daun sirsak pada bakteri gram negatif *S. typhi*. Sehingga penelitian uji daya hambat ekstrak daun sirsak dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. typhi* secara *in vitro* perlu untuk dilakukan agar nantinya dapat dijadikan sebagai dasar penelitian selanjutnya.^{1,2,3}

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Udayana pada bulan Maret 2016 – Januari 2017. Jenis penelitian ini adalah penelitian *True Experimental Posttest only Control Group*, sehingga dapat mengetahui aktivitas antibakteri dari ekstrak metanol daun sirsak dalam menghambat pertumbuhan *S.typhi* yang dinilai berdasarkan parameter diameter zona hambat. Pengujian dilakukan dengan metode difusi agar (*Kirby-Bauer*), dengan menggunakan empat konsentrasi ekstrak, yakni 50mg/mL(P1), 100mg/mL(P2), 200mg/mL(P3) dan 400mg/mL(P4), serta menggunakan pembanding kontrol negatif methanol (K1) dan kontrol positif ciprofloxacin (K2). Daun sirsak yang digunakan, diperoleh dari tanaman sirsak yang tumbuh di Kabupaten Klungkung, Bali, dengan memilih daun yang berwarna hijau, sudah dewasa, dan tidak terserang hama penyakit.

Daun sirsak yang sudah dibersihkan dengan air kemudian dipotong-potong kecil menggunakan pisau, kemudian dikering-anginkan

tanpa sinar matahari atau dengan menggunakan oven dengan suhu 40°C. Setelah kering, daun sirsak dihaluskan dengan blender dan diayak untuk memisahkan bagian yang masih kasar dengan yang sudah halus. Setelah itu, 500 gram serbuk simplisia daun sirsak direndam dengan larutan metanol sebanyak 2 liter di dalam sebuah toples kaca, lalu ditutup. Biarkan selama 2 hari sambil sesekali diaduk. Setelah 2 hari, rendaman tersebut disaring dengan kertas saring sehingga menghasilkan filtrat 1 dan ampas 1. Setelah itu filtrat (lapisan atas yang berupa campuran metanol dengan zat aktif) diambil dan residu dimaserasi kembali selama semalam. Selanjutnya filtrat diambil lagi dan residu dimaserasi kembali sampai empat kali pengulangan. Setelah semua filtrat ekstrak daun sirsak diperoleh, lalu difiltrasi menggunakan kertas *Whatmann 0,1* dan dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C sehingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak yang telah ditimbang dan disimpan dalam wadah gelas atau botol yang tertutup dengan berat 0.05 gr, 0.1 gr, 0.2 gr, dan 0.4 gr dan sudah diberi label pada botol, diencerkan atau dilarutkan dengan menambahkan larutan metanol 1000 cc pada masing-masing botol, kemudian diaduk hingga ekstrak larut dalam botol.

Media yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri *S. typhi* adalah media agar *Mueller-Hinton* (MH). Bakteri *S. typhi* yang dipakai didapat dari Laboratorium Mikrobiologi FK UNUD yang direjuvenasi terlebih dahulu sebelum digunakan. Biakan bakteri yang berumur 24 jam disuspensi sehingga kekeruhannya setara 0,5 *Mc Farland* dengan konsentrasi bakteri 1×10^8 CFU/ml. Suspensi bakteri kemudian dioleskan ke media agar kemudian diletakkan 6 disk yang masing-masing berisi empat macam konsentrasi ekstrak, kontrol negative dan kontrol positif. Jumlah pengulangan yang dilakukan dalam penelitian ini adalah sebanyak 4 kali sesuai perhitungan rumus *Federer*. Lempeng agar yang sudah berisi bakteri *S.typhi*, bahan uji, dan kontrol diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Setelah inkubasi, data diambil dan dikumpulkan adalah data kuantitatif berupa diameter zona hambat yang diukur menggunakan jangka sorong, kemudian dilakukan analisis data.

Adapun tahapan yang diambil dalam penelitian ini diawali dengan pembuatan proposal, meminta izin dari komite etik, meminta izin penggunaan Laboratorium Mikrobiologi FK Udayana, pencarian bahan ekstrak dan persiapan isolat bakteri. Tahap pelaksanaan penelitian berupa

pembuatan ekstrak, persiapan bakteri, uji *in vitro* dan pengukuran hasil berupa data kuantitatif. Penelitian

Golongan senyawa	Metode pengujian	Pengamatan	Hasil
	Meyer	Tidak terbentuk endapan putih	-
Alkaloid	Bouchardat	Terbentuk endapan hitam	+
	Wagner	Terbentuk endapan coklat	+
Saponin	Foam	Terbentuk busa yang stabil	+
Flavonoid	Pew	Terbentuk warna kuning intensif	+
Steroid	Lieberman-Burchard	Terbentuk cincin warna biru kehijauan	+
	Lieberman-Burchard	Tidak terbentuk cincin kecoklatan	-
Fenol	FeCl ₃ 10%	Terbentuk warna biru kehitaman	+
	Lieberman-Burchard	Terbentuk warna Hijau kebiruan	+
Tanin	Pbasetat 10%	Terbentuk endapan putih	+

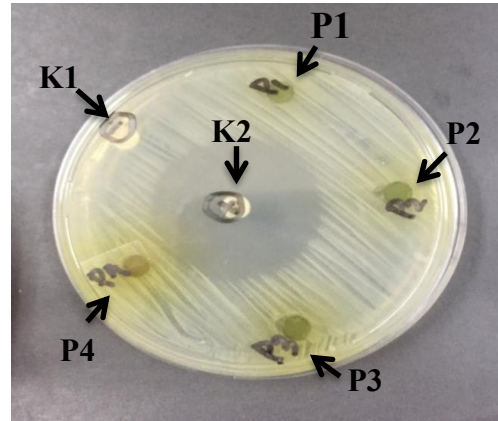
ini sudah mendapatkan izin dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Udayana dengan nomor surat 362/UN.14.2/KEP/2016.

HASIL

Uji fitokimia dilakukan untuk mengetahui jenis senyawa metabolit sekunder yang terdapat didalam ekstrak metanol daun sirsak. Uji fitokimia dilakukan di Laboratorium Fitokimia Farmasi Universitas Udayana.

Tabel 1. Hasil uji fitokimia ekstrak metanol daun sirsak (*Annona muricata*)

Pengukuran diameter zona hambat dilakukan setelah lempeng agar dengan bakteri *S. Typhi* diinkubasi di dalam inkubator selama 18-24 jam dengan suhu 37°C. Diameter zona hambat diukur menggunakan jangka sorong dengan ketelitian 0,05 mm pada zona bening di sekitar cawan petri.



Gambar 1. Hasil uji ekstrak metanol daun sirsak terhadap pertumbuhan bakteri *S. Typhi* secara *in vitro* pada pengulangan pertama.

Dari zona hambat yang ditunjukkan pada gambar di atas, pengukuran dilakukan dari beberapa sisi lingkaran kemudian dirata-ratakan sehingga didapatkan hasil rerata K1 = 0,00 mm, K2 = 32,25 mm, P1 = 0,00 mm, P2 = 0,00 mm, P3 = 0,00 mm, P4 = 0,00 mm. Hasil dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Data hasil pengukuran diameter zona hambat ekstrak metanol daun sirsak terhadap pertumbuhan bakteri *S. typhi* secara *in vitro*

Pengulangan	K1 mm	K2 mm	P1 mm	P2 mm	P3 mm	P4 Mm
I	0,00	35,00	0,00	0,00	0,00	0,00
II	0,00	31,00	0,00	0,00	0,00	0,00
III	0,00	32,00	0,00	0,00	0,00	0,00
IV	0,00	31,00	0,00	0,00	0,00	0,00

PEMBAHASAN

Hasil pengukuran diameter zona hambat dengan metode *disk diffusion* menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun sirsak tidak memberikan efek antibakteri pada bakteri gram negatif *S. typhi* secara *in vitro*. Berbeda dengan hasil yang telah diperoleh oleh penelitian terdahulu, pengujian ekstrak metanol daun sirsak yang dilakukan pada kelompok bakteri gram negatif menunjukkan adanya aktifitas anti bakteri seperti yang dilakukan oleh Ginda Haro, yang menguji pada bakteri *Escherichia coli*, dimana pada konsentrasi minimalnya (5mg/mL) mampu menghambat pertumbuhan bakteri dengan zona inhibisi 8.0 mm. Dian Riani dkk, yang juga menguji ekstrak metanol daun sirsak pada bakteri gram negative *E. coli* memperoleh hasil bahwa ekstrak yang digunakan mampu menghambat pertumbuhan bakteri secara *in vitro* dengan diameter zona hambat 3.0 mm.^{10,11}

Sebagian besar penelitian pendahuluan yang menguji aktivitas antibakteri pada ekstrak daun sirsak, menggunakan bakteri gram negatif yang berasal dari spesies *E. coli*, maka dari itu dapat dipahami apabila hasil yang peneliti dapatkan berbeda dengan apa yang didapat oleh penelitian

sebelumnya. Perbedaan ini dapat terjadi mengingat spesies bakteri yang digunakan berasal dari spesies yang berbeda. Spesies bakteri yang berbeda akan menimbulkan mekanisme pertahanan yang berbeda terhadap antibakteri, baik dari komponen dinding sel bakteri maupun materi genetik yang dibawa.^{10,11,12}

Perbedaan hasil uji penelitian ini dapat pula terjadi karena adanya kemungkinan resistensi bakteri yang digunakan sebagai sampel uji. Resistensi bakteri secara genetik terhadap zat tertentu perlu diperhitungkan mengingat sampel berasal dari isolat pasien Laboratorium Mikrobiologi RSUP Sanglah. Mekanisme strain bakteri yang mengalami resistensi terhadap antibiotik bisa diakibatkan dari pemakaian antibiotik dalam jangka waktu yang relatif lama dan terus-menerus, yang memungkinkan bakteri membentuk mekanisme pertahanan diri. Selain itu, faktor kepatuhan dari diri pasien, juga dapat memengaruhi terjadinya resistensi antibiotik jika pasien tidak memiliki kepatuhan dalam mengonsumsi antibiotik dengan benar.¹²

Hasil uji fitokimia yang dilakukan di Laboratorium Farmasi Universitas Udayana menyatakan bahwa ekstrak metanol daun sirsak mengandung metabolit sekunder yang bersifat antibakteri seperti flavonoid, steroid, alkaloid, saponin, dan tannin. Flavonoid dilaporkan memiliki mekanisme sebagai antibakteri. Adapun mekanisme reaksi antibakteri yang ditimbulkan oleh flavonoid seperti mampu menghambat sintesis asam nukleat bakteri, menghambat fungsi dari membran sitoplasmik, serta mampu menghambat metabolisme energi pada bakteri.¹³ Steroid tersebar di alam sebagai fraksi lipid dari tanaman maupun hewan. Steroid dibentuk oleh bahan alam yang disebut sterol. Sterol merupakan senyawa yang terdapat pada lapisan malam (lilin) buah dan daun yang berfungsi sebagai pelindung diri dari serangan serangga dan serangan mikroba. Saponin berfungsi sebagai antibakteri dengan menyebabkan kebocoran protein dan enzim dari dalam sel. Selain itu saponin dapat menjadi antibakteri karena zat aktif permukaannya mirip detergen. Kemiripan sifat saponin dengan detergen akan menyebabkan penurunan tegangan permukaan dinding sel bakteri, merusak permeabilitas membrane dan akan sangat mengganggu kelangsungan hidup bakteri. Alkaloid sebagai antibakteri bekerja dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel. Selain itu, komponen alkaloid diketahui dapat berfungsi sebagai interkalator DNA dan menghambat enzim topoisomerase sel bakteri. Tanin sendiri merupakan senyawa yang bersifat lipofilik, sehingga mudah terikat pada dinding sel dan mengakibatkan kerusakan dinding sel bakteri.^{11,13}

Hasil uji fitokimia yang dilakukan peneliti dengan uji fitokimia pada penelitian sebelumnya memang memiliki kesamaan, yang menyatakan bahwa ekstrak metanol daun sirsak memiliki potensi

sebagai antibakteri apabila dilihat dari metabolit sekunder yang dikandungnya. Namun hasil uji *in vitro* yang peneliti lakukan pada bakteri jenis gram negatif dalam hal ini adalah bakteri *S. typhi* memberikan hasil bahwa potensi antibiotik yang dimiliki ekstrak metanol daun sirsak tidak memberikan efek antibiotik pada bakteri tersebut. Perbedaan hasil uji ini akan sangat tergantung pula pada efektifitas ekstrak yang digunakan.

Efektifitas ekstrak yang digunakan pada masing-masing penelitian sangat dipengaruhi oleh adanya variasi biologis dari tanaman yang digunakan. Tempat asal dari tanaman sirsak yang daunnya digunakan, diketahui dapat memengaruhi jumlah kandungan bahan aktif yang ada. Faktor-faktor lingkungan seperti suhu lingkungan, kelembaban relatif, radiasi matahari, angin, jenis unsur hara dalam tanah, ketersediaan air, ketercukupan cahaya dalam proses fotosintesis akan sangat memengaruhi fungsi fisiologis, bentuk anatomis dan siklus hidup tumbuhan. Faktor lingkungan inilah yang mungkin memengaruhi kadar senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh daun.¹⁴

Perbedaan hasil uji antibakteri antara peneliti satu dengan lainnya dapat pula dipengaruhi oleh ekstrak bahan alam yang digunakan. Tidak adanya standarisasi pembuatan ekstrak bahan alam antara laboratorium satu dengan yang lain akan menimbulkan hasil yang berbeda pula. Selain prosedur standar pembuatan ekstrak, faktor lain yang dapat memengaruhi mutu ekstrak yang digunakan adalah faktor kimia seperti jenis dan jumlah senyawa kimia serta metode ekstraksi dan pelarut yang digunakan.¹⁴

SIMPULAN

Adapun simpulan dari penelitian ini adalah ekstrak metanol daun sirsak pada konsentrasi 50mg/mL, 100mg/mL, 200mg/mL dan 400mg/mL tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. typhi* secara *in vitro*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Center for Disease Control and Prevention. Diakses pada 15 Agustus 2014. http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/typhoid_fever/technical.html#incidence
2. Kavita N., ShivannarT.C. Antimicrobial Susceptibility Of *Salmonella typhi* In India. *Journal Infect Dev Ctries*. 2010. 4(20): 070-073.
3. Widoyono. Penyakit Tropis Edisi Kedua. 2011. Erlangga. Hal:40-45
4. Mandal B.K. Penyakit Infeksi Edisi Keenam. 2008. Erlangga. Hal: 144-145
5. Singh S. Symposium: Typhoid Fever Pathogenesis and Laboratory Diagnosis. *Journal Indian Academy of Clinical Medicine*. 2001;2
6. World Health Organization. Background Document: The Diagnosis, Treatment And

- Prevention Of Typhoid Fever. Communicable Disease Surveillance and Response Vaccines and Biologicals. 2003. Hal 1-48 diakses melalui http://whqlibdoc.who.int/hq/2003/WHO_V&B_03.07.pdf
7. Onyechi U, Ibeanu U, Nkiruka V, Eme EP, Madubike K. Nutrient, Phytochemical Composition and Sensory Evaluation Of Soursop (*Annona muricata*) Pulp and Drink in South Eastern Nigeria. *International Journal of Basic & Applied Sciences*. 2012;12(6):53-7
 8. Moghadamtousi S, Fadaeinasab M, Nikzad S, Mohan G, Ali H, Kadir H. *Annona muricata* (*Annonaceae*): A Review of Its Traditional Uses, Isolated Acetogenins and Biological Activities. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(7):15625-58
 9. Solomon-Wisdom GO, Ugoh SC, Mohammed B. Phytochemical Screening and Antimicrobial activities of *Annona muricata* (L) leaf extract. *American Journal of Biological, Chemical and Pharmaceutical Sciences*. 2014 Jan;2(1):1-7
 10. Haro G, Utami NP, Sitompul E. Study Of The Antibacterial Activities Of Soursop (*Annona muricata* L.) Leaves. *International Journal of Pharm Tech Research*. 2014;6(2):575-81
 11. Dian R, Kartika D. Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder serta Uji Aktivitas Ekstrak Daun Sirsak sebagai Antibakteri. *Molekul*. 2016;11(1):101-111
 12. Juwita S, Hartoyo E, Budiarti LY. Pola Sensitivitas *In Vitro Salmonella typhi* terhadap Antibiotik Klorampenikol, Amoksisilin dan Kotrimoksazol di Bagian Anak RSUD Ulin Banjarmasin periode Mei-September 2012. *Berkala Kedokteran Unlam*. 2013;9(1):25-34
 13. Cushnie TT, Lamb AJ. Antimicrobial Activity of Flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* 26. 2005 Nov 1;26(5) 343-56
 14. Tuna MR, Kepel BJ, Leman MA. Uji Daya Hambat Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata*) Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* secara *In Vitro*. *Pharmacon: Jurnal Ilmiah Farmasi*. 2015;4(4):65-70