

ANALISIS FITOKIMIA DAN UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI IN VITRO EKSTRAK ETANOL DAUN ALPUKAT MUDA DAN TUA (*Persea americana* Mill.) TERHADAP *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883

Iin Kurnia Syahida¹, Agung Nova Mahendra², Ni Wayan Sucindra Dewi², Desak Ketut Ernawati²

¹Program Studi Sarjana Kedokteran dan Profesi Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Udayana

²Departemen Farmakologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Udayana

Email:kurniasyahida@gmail.com

ABSTRAK

Mikroorganisme dalam tubuh dapat menyebabkan suatu infeksi. Penyakit infeksi dapat ditangani dengan pemberian antibiotik, namun penggunaan antibiotik yang irrasional dapat menyebabkan masalah resistensi antibiotik. Bakteri *Klebsiella pneumoniae* merupakan salah satu bakteri yang sudah banyak mengalami resistensi antibiotik dan menjadi penyebab utama pada kasus pneumonia di beberapa negara di dunia. Kandungan senyawa metabolit sekunder (flavonoid, alkaloid, tanin dan saponin) yang dilaporkan pada daun alpukat (*Persea americana* Mill.) dipercaya memiliki aktivitas anti bakteri. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak daun alpukat dapat menghambat pertumbuhan pada bakteri gram positif dan gram negatif. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui apakah ekstrak etanol daun alpukat (*Persea americana* Mill.) dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 secara invitro. Metode yang digunakan adalah ekstraksi daun alpukat muda dan tua dengan pelarut etanol 96% yang terbagi dalam lima konsentrasi (20%, 40%, 60%, 80%, 100%). Pengujian antibakteri dilakukan secara difusi agar (*Kirby Bauer*) menggunakan teknik *disc diffusion*. Serta dilakukannya uji fitokimia metabolit sekunder secara kualitatif. Hasil menunjukkan bahwa tidak ditemukan adanya *clear zone* disekitar cakram yang mengandung ekstrak pada semua konsentrasi. Simpulan Pada penelitian ini ekstrak daun alpukat dari kintamani tidak ditemukan aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae*.

Kata Kunci: Antibakteri, Daun Alpukat, *Klebsiella pneumoniae*

ABSTRACT

Microorganisms in the body can cause an infection. Infectious diseases can be treated with antibiotics, but irrational use of antibiotics can cause antibiotic resistance problems. *Klebsiella pneumoniae* is one of the bacteria that has experienced antibiotic resistance and is the main cause of pneumonia cases in several countries in the world. The content of secondary metabolites (flavonoids, alkaloids, tannins and saponins) reported in avocado leaves (*Persea americana* Mill.) is believed to have an anti-bacterial activity. Previous research has shown that avocado leaf extract can inhibit the growth of gram-positive and gram-negative bacteria. The purpose of this study was to determine whether the ethanolic extract of avocado leaves (*Persea americana* Mill.) could inhibit the growth of *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 bacteria in vitro. The method used is the extraction of young and old avocado leaves with 96% ethanol solvent which is divided into five concentrations (20%, 40%, 60%, 80%, 100%). Antibacterial testing was carried out by agar diffusion (*Kirby Bauer*) using the disc diffusion technique. As well as doing a qualitative secondary metabolite phytochemical test. The results showed that there was no clear zone around the disc containing extract at all concentrations. In conclusion, avocado leaves extract from Kintamani had no antibacterial activity against *Klebsiella pneumoniae* bacteria.

Keywords: Antibacterial, Avocado Leaf, *Klebsiella pneumoniae*

PENDAHULUAN

Bakteri *Klebsiella pneumoniae* merupakan salah satu penyebab utama kasus pneumonia di beberapa negara di dunia dan masuk dalam agen friedlander pneumonia yang merupakan pneumonia berat dari pneumonia lobar dengan angka kematian yang tinggi.¹ Berdasarkan data WHO tahun 2015 terdapat 920.136 kematian pada balita atau lebih dari 2500 kematian jiwa muda per hari yang dapat diartikan 2 jiwa yang meninggal setiap menitnya. Menurut Riskesdas tahun 2007 menyebutkan bahwa pneumonia di Indonesia menduduki peringkat kedua sebagai penyebab kematian pada bayi dengan kasus diare.² Sampai saat ini beberapa antibiotik sudah mengalami resistensi seperti golongan penisilin (ampisilin), beta lactam (cefotaxime, ampisilin sulbactam dan ceftriaxone), makrolid (eritromisin) dan fluroquinolon (ciprofloxacin).³ Oleh karena itu perlu dilakukan penemuan dan pengembangan jenis antibiotik baru untuk pengobatan pneumonia yang mengalami resistensi.

Salah satu cara yang digunakan oleh kalangan medis saat ini adalah dengan melakukan penelitian pada pemanfaatan keanekaragaman hayati di Indonesia terutama pada tanaman yang memiliki efek sebagai antibakteri. Efek antibakteri ditimbulkan oleh tanaman yang mengandung senyawa bioaktif metabolit sekunder di antaranya senyawa flavonoid, alkaloid, saponin dan tanin.⁴

Daun alpukat (*Persea americana Mill.*) mengandung senyawa metabolit sekunder yang bersifat sebagai antibakteri.⁴ Beberapa penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa ekstrak daun alpukat dapat menghambat beberapa pertumbuhan bakteri gram positif dan gram negatif seperti *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dan *Pseudomonas aeruginosa*.^{5,6} Dari beberapa bakteri diatas, di Indonesia belum banyak dilakukannya penelitian mengenai ekstrak daun alpukat sebagai antibakteri salah satunya pada bakteri *Klebsiella pneumoniae*, karena itu penelitian ini dilakukan untuk menguji aktivitas antibakteri daun alpukat di Indonesia terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental post test only* yang bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak daun alpukat (*Persea americana Mill.*) terhadap pertumbuhan bakteri *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 secara invitro. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun alpukat

muda dan tua yang hidup bebas di daerah Desa Batur Kintamani, Bali dengan ketinggian 1140 mdpl dan rentang suhu sekitar 16-25°C.

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Laboratorium Fakultas Teknologi Pangan Universitas Udayana pada bulan Agustus hingga Oktober 2021. Sampel ekstrak daun alpukat dibagi menjadi 2 kelompok yaitu ekstrak etanol daun alpukat tua dan muda yang masing-masing ekstrak terbagi menjadi lima jenis konsentrasi 20% (I), 40% (II), 60% (III), 80% (IV), 100% (V) dan terdapat kelompok kontrol positif (K1) ciprofloxacin dan kontrol negatif etanol (K2). Pengujian menggunakan metode difusi agar (*Kirby-Baurer*).

Dalam pengumpulannya dilakukan sortasi kering dan basah berdasarkan karakteristik, kelayakan bahan yang digunakan dan tidak terserang penyakit. Daun alpukat muda bertekstur liat, halus, dan berwarna hijau muda dengan atau tanpa tepi berwarna kecoklatan. Sedangkan daun alpukat tua bertekstur keras, kasar dan berwarna hijau tua. Kemudian dikeringkan dalam ruangan (tidak terkena langsung sinar matahari), kemudian dipotong dan dihaluskan hingga menjadi serbuk menggunakan *blender*. Selanjutnya serbuk diayak dan ditimbang sebanyak 100 mg per sampel. Pembuatan ekstrak daun alpukat dilakukan di Laboratorium Teknologi Pangan Universitas Udayana.

Pembuatan ekstrak menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 900 ml setiap sampel. Serbuk yang telah ditimbang direndam oleh etanol 96% selama 3x24 jam dan dilakukan pengadukan setiap 24 jam. Kemudian disaring dengan kertas *Whatmann* dan hasil filtrat dievaporasi menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C hingga didapatkan ekstrak kental. Hasil ekstrak 100% kemudian diencerkan dengan etanol 96% untuk mendapatkan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, 100%. Pengenceran dilakukan dengan perhitungan $V_1.C_1 = V_2.C_2$.

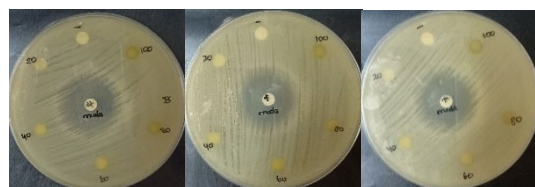
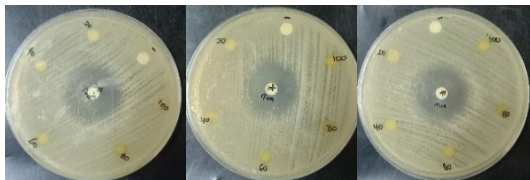
Pada proses penelitian dilakukan penanaman kembali bakteri *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 dengan cara mensuspensikan bakteri pada NaCl 0,9% dan mencocokkan tingkat kejernihan dengan 0,5 *Mc Farland*. Kemudian dilakukan penanaman dengan cara mengoleskan *cotton bud steril* pada cawan petri yang telah berisikan media *Muller Hinton Agar* (MHA). Selanjutnya setiap konsentrasi ekstrak etanol daun alpukat tua dan muda ditetaskan ke *blank disk*. Kemudian letakan disk yang berisikan 7 disk yang terdiri dari kontrol positif, kontrol negatif dan 5 konsentrasi ekstrak. Selanjutnya, cawan petri di inkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam. Penelitian ini dilakukan tiga kali pengulangan. Pengambilan data dilakukan dengan cara melakukan pengukuran diameter zona bening yang terbentuk pada cawan petri menggunakan jangka sorong yang selanjutnya data akan dianalisis.

HASIL

Hasil pengujian dilakukan pengukuran pada zona bening yang terbentuk menggunakan jangka sorong. Pada ekstrak etanol daun alpukat tua dan muda tidak terbentuknya zona bening. Namun pada kontrol positif terbentuk zona bening, sehingga dilakukan pengukuran pada kontrol positif.

Tabel 1. Hasil pengukuran zona hambat bakteri *K. pneumoniae* ATCC 13883

No	K1	K2	Diameter Zona Hambat (mm)				
			I	II	III	IV	V
Daun Alpukat Tua							
1	23	0	0	0	0	0	0
2	24	0	0	0	0	0	0
3	23	0	0	0	0	0	0
Rerata	54,6	0	0	0	0	0	0
Daun Alpukat Muda							
1	21	0	0	0	0	0	0
2	22	0	0	0	0	0	0
3	21	0	0	0	0	0	0
Rerata	49,3	0	0	0	0	0	0



Gambar 2. Hasil uji ekstrak etanol daun alpukat muda (*Persea americana* Mill.) terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883

Penelitian ini juga dilakukan uji fitokimia yang bertujuan untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder pada daun alpukat (*Persea americana* Mill.). Terdapat beberapa senyawa yang diuji diantaranya flavonoid, alkaloid, saponin dan tanin. Pengujian dilakukan di Laboratorium Fakultas Teknologi Pangan Universitas Udayana.

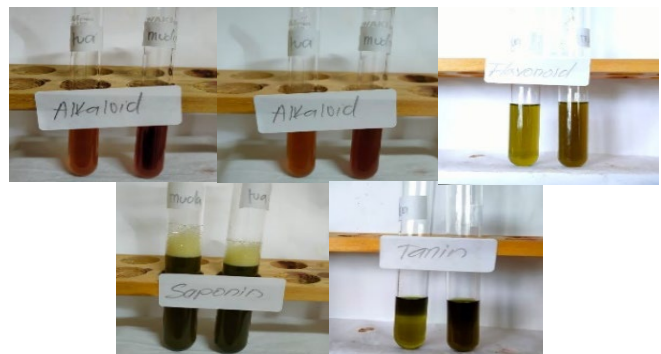
Tabel 2. Hasil skrining fitokimia senyawa metabolit sekunder ekstrak etanol daun alpukat (*Persea americana* Mill.)

Gambar 3. Hasil skrining fitokimia senyawa metabolit sekunder ekstrak etanol daun alpukat (*Persea americana* Mill.)

PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun alpukat tua dan muda memiliki efek antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883. Berbeda hasilnya dengan penelitian yang dilakukan oleh Ogundare & Oladejo di Nigeria pada penelitian tersebut menunjukkan pada bakteri *Klebsiella pneumoniae* terdapat zona hambat walaupun hasil penelitian jika dibandingkan dengan bakteri lainnya bakteri *Klebsiella pneumoniae* memiliki hasil zona hambat yang paling kecil. Tidak terdapatnya zona hambat pada penelitian ini dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor.

Ekstrak	Uji Fitokimia	Pereaksi	Hasil
Daun Alpukat Tua	Flavonoid	Mg + HCl Pekat	+
	Alkaloid	HCl 2N + Dragendrof HCl 2N + Wagner	+
Daun Alpukat Muda	Tanin	FeCl ₃	+
	Saponin	HCl 2N	+
	Flavonoid	Mg + HCl Pekat	+
Daun Alpukat Muda	Alkaloid	HCl 2N + Dragendrof HCl 2N + Wagner	+
	Tanin	FeCl ₃	+
	Saponin	HCl 2N	+



Faktor yang mempengaruhi bisa berasal dari bakteri, bahan dan metode penelitian. Faktor bakteri berupa faktor virulensi dari bakteri *Klebsiella pneumoniae*. Faktor virulensi yang telah teridentifikasi pada *K. pneumoniae* diantaranya yaitu kapsul polisakarida, lipopolisakarida (LPS), siderofor dan fimbria atau disebut dengan pili. Selain itu, terdapat protein adhesin, resistensi serum, mekanisme

urease, formasi biofilm, resistensi antibiotik dan metabolisme allantoin.^{7,8,9}

Kapsul

Kapsul merupakan matriks polisakarida ekstraseluler yang melapisi sel bakteri dan sangat berperan penting dalam virulensi. Kapsul memiliki beberapa peranan yaitu mencegah dan menghambat proses fagositosis dan opsonofagositosis oleh sel granulosit PMN (*Polymorphonuclear*), mencegah terjadinya aksi bakterisida pada peptida antimikroba seperti *human beta defensins 1* hingga 3 dan laktoferin yang mengikat molekul dari membran luar dan memblokir komponen pelengkap seperti C3 dari interaksi dengan membran sel bakteri, sehingga dapat mencegah lisis dan opsonisasi.⁷

Lipopolisakarida

LPS melindungi bakteri dari sistem pertahanan humoral manusia dan dikenal sebagai endotoksin yang merupakan komponen utama untuk melapisi membran luar sel pada semua bakteri gram negatif. LPS terdiri dari tiga sub unit utama yaitu lipid A, inti oligosakarida dan antigen O. Lipid A merupakan aktivator untuk peradangan dan melindungi bakteri dari aksi bakterisida peptida antimikroba kationik. Antigen O adalah subunit terluar dari LPS berperan melindungi dari komplemen, termasuk mencegah pengikatan C1q ke bakteri, menghambat aktivasi jalur komplemen selanjutnya, serta mengikat C3b dari luar membran bakteri untuk mencegah terjadinya lisis pada bakteri.⁷

Resistensi Serum

Resistensi serum dikorelasikan hubungannya dengan timbulnya infeksi dan tingkat keparahan gejala. Hal ini dikarenakan peran utama dari resisten serum bakteri adalah mencegah mikroorganisme untuk menyerang dan tetap bertahan dalam darah. Perbedaan derajat kerentanan serum bakteri menentukan apakah strain mampu menginfeksi dan berapa lama waktu yang dibutuhkan bakteri untuk menimbulkan infeksi pada hospes.⁸

Protein Adhesin

Protein adhesin berperan dalam proses adhesi dan invasi suatu bakteri pada sel hospes untuk melakukan kolonisasi dan invasi hingga timbulnya suatu penyakit infeksi. Protein adhesin terbagi menjadi dua yaitu *fimbrial adhesion* (fimbria tipe 1, tipe 3 dan fimbria Kpc) dan *non fimbrial adhesion* (OMP).¹⁰

Siderofor

Dalam proses pertumbuhan bakteri dalam jaringan inang tidak hanya dipengaruhi oleh mekanisme pertahanan bakteri, tetapi juga dengan pasokan besi yang tersedia. Zat besi merupakan faktor penting dalam pertumbuhan bakteri yang berfungsi untuk katalis redoks dalam protein yang berpartisipasi dalam oksigen dan proses transpor electron.⁸

Mekanisme Urease

Peran urease berfungsi untuk bakteri yang tumbuh di saluran kemih dan berkontribusi pada pembentukan infeksi batu Hidrolisis urea dapat menyebabkan peningkatan pH yang menghasilkan pengendapan garam anorganik yang tidak larut pada pH yang relatif tinggi (pH 9,0). Hasil dari presipitasinya menghasilkan pembentukan kerak, terutama pada pemasangan kateter urin yang dapat mempengaruhi jalannya infeksi.⁹

Biofilm

Peran dari pembentukan biofilm menyebabkan bakteri menjadi kurang rentan terhadap pembunuhan dari mekanisme pertahanan host dan lebih tahan terhadap antibiotik, sehingga meningkatkan resistensi. Susunan matriks biofilm terdiri dari protein padat, polisakarida dan DNA yang mampu mencegah terjadinya proses difusi pada antibiotik, sehingga secara signifikan dapat mengurangi paparan pada bakteri.

Selain faktor virulensi adalah senyawa bioaktif pada daun alpukat (*Persea americana Mill.*). Merujuk pada hasil uji fitokimia yang telah dilakukan menunjukkan bahwa daun alpukat memiliki kandungan senyawa bioaktif flavonoid, alkaloid, saponin dan tanin, seharusnya daun alpukat dapat menghambat pertumbuhan pada bakteri. Hal ini dapat dipengaruhi oleh faktor lingkungan seperti suhu, PH, dan cahaya. Suhu yang tinggi dapat merusak senyawa kimia pada spesimen.¹¹ Dan faktor dari jenis pelarut yang digunakan yang mampu mempengaruhi bagaimana senyawa tertentu dalam sampel dapat larut. Faktor-faktor tersebut dapat mempengaruhi jumlah zat aktif antibakteri pada sampel, jika jumlah zat rendah maka konsentrasi zat aktif tersebut tidak mampu merusak membran sel atau mengganggu proses fisiologis pada sel bakteri. Sehingga dapat disimpulkan daun alpukat dari Kintamani, Bali tidak memiliki konsentrasi senyawa yang cukup untuk dapat menghambat pertumbuhan bakteri *K. pneumonia*. Berbeda dengan spesimen daun alpukat yang berada di Nigeria.

Faktor lain berasal dari metode penelitian. Pada penelitian Ogundare & Oladejo menggunakan metode *well diffusion* (sumuran), sedangkan pada penelitian ini menggunakan difusi agar. Teknik sumuran dikatakan lebih baik dilakukan dalam proses menghambat pertumbuhan bakteri dikarenakan pada teknik sumuran terjadi proses osmolaritas yang menyebabkan lebih homogen dan kuat dalam menghambat pertumbuhan bakteri.¹² Meskipun demikian, teknik sumuran dapat memberikan hasil yang kurang efektif dan menimbulkan beberapa bias salah satunya kemungkinan retak atau pecah di sekitar sumuran sehingga hal tersebut dapat mengganggu proses peresapan antibakteri ke dalam media yang akan mempengaruhi terbentuknya zona bening.¹³

SIMPULAN DAN SARAN

Simpulan

Disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun alpukat (*Persea americana* Mill.) yang diperoleh dari Kintamani, Bali tidak ditemukan aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883. Hal ini dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor dari bakteri, bahan dan metode penelitian. Adapun senyawa metabolit sekunder pada daun alpukat melalui uji fitokimia kualitatif yaitu flavonoid, alkaloid, saponin dan tanin.

Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai uji aktivitas antibakteri daun alpukat (*Persea americana* Mill.) dengan menggunakan metode dan bakteri uji yang berbeda untuk mengetahui apakah daun alpukat di Indonesia memiliki aktivitas sebagai antibakteri. Serta perlu dilakukan uji senyawa kimia secara kuantitatif untuk menilai kandungan kimia dan jumlah konsentrasinya pada daun alpukat (*Persea americana* Mill.).

DAFTAR PUSTAKA

1. Tarina NTI, Kusuma SAF. Deteksi Bakteri *Klebsiella pneumoniae*. J Farmaka [Internet]. 2017;15(2):119–26. Diunduh dari: <http://jurnal.unpad.ac.id/farmaka/article/view/13173>.
2. Kementerian Kesehatan RI. Profil Kesehatan Indonesia 2017. 2018. h.142.
3. Kurniawan J, Semiarty R. Pola Kepekaan Bakteri Penyebab Pneumonia terhadap Antibiotika di Laboratorium Mikrobiologi RSUP Dr . M . Djamil. J Kesehat andalas. 2015;4(2):562–566.
4. Pakadang SR, Salim H. Sensitivitas *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus epidermidis* terhadap Buah Asam Jawa. Media Farm. 2020;XVI(1):603.
5. Kavaz D, Ogbonna C. Comparative study of biological activity and chemical composition of methanolic and ethanolic plant extract of *Persea americana* leaves in vitro. Eur J Sci Technol Spec Issue [Internet]. 2019;(17):216–70. Diunduh dari: <http://dergipark.gov.tr/ejosat>
6. O OA, O OB. Antibacterial Activities of the Leaf and Bark Extract of *Persea americana*. Am J Ethnomedicine [Internet]. 2014;1(1):64–071. Diunduh dari: www.ajethno.com<http://www.ajethno.com>
7. Paczosa MK, Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. Microbiol Mol Biol Rev. 2016;80(3):629–661.
8. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp . as Nosocomial Pathogens: Epidemiology , Taxonomy , Typing Methods , and Pathogenicity Factors. Clin Microbiol Rev. 1998;11(4):589–603.
9. Clegg S, Murphy CN. Epidemiology and Virulence of *Klebsiella pneumoniae*. Microbiol Spectr. 2016;4(1):6.
10. Agustina D, Nadyatara K, Mufida DC, Elfiah U, Shodikin MA, Suswati E. Faktor Virulensi Outer Membrane Protein 20 kDa *Klebsiella pneumoniae* sebagai Protein Hemagglutinin dan Adhesin. 2019;7(3):200–204.
11. Paat EM, Wewengkang DS, Rotinsulu H. Aktivitas Antimikroba Ekstrak Etil Asetat Jamur Laut yang Diisolasi dari Karang Lunak *Sarcophyton* sp. dari Perairan Desa Tumbak Kecamatan Pusomaen. Pharmacon. 2020;9(1):142.
12. Arirahmayanti IGAE, Artini IGA, Ernawati DK. Perbandingan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Kunyit (*Curcuma longa*) dan Bawang Putih (*Allium sativum*) Terhadap *Escherichia coli* ATCC 8739. J Med Udayana. 2019;8(11):3.
13. Khusama A, Safitri Y, Yuniarni A, Rizki K. Uji Teknik Difusi Menggunakan Kertas Saring Media Tampung Antibiotik dengan *Escherichia Coli* Sebagai Bakteri Uji. J Kesehat Prima. 2019;13(2):151–155.