

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang Masalah

Sirsak (*Annona muricata* L.) berasal dari wilayah Amerika yang beriklim tropis, terutama Amerika Tengah dan Selatan. Tanaman ini menyebar luas ke Asia di antaranya Thailand, Malaysia, dan Indonesia. Pada abad ke-19, tanaman sirsak mulai dibudidayakan di Malaysia dan Indonesia (Sukarmin, 2010). Tumbuhan sirsak merupakan salah satu tumbuhan yang digunakan sebagai obat tradisional pada masyarakat tertentu. Penduduk Amazon menggunakan kulit, akar, dan daun *Annona muricata* L. untuk obat diabetes, sedatif, dan antispasmodik sedangkan di Jamaica, Haiti, dan India jus buah sirsak digunakan untuk obat pusing dan diare. Kulit atau daun sirsak digunakan untuk antispasmodik, sedatif, obat jantung, batuk, influenza, obat sulit melahirkan, asma, hipertensi, dan asthenia (Taylor, 2002). Menurut Hariana (2006), bagian daun *Annona muricata* L. secara empirik dapat digunakan untuk peluruh keringat, antikejang, dan luka bisul. Bagian buahnya digunakan untuk obat disentri, ambeien, anyang-anyangan, dan sumber vitamin C.

Daun sirsak mengandung steroid, glikosida jantung, dan tanin (Prachi, 2010). Penelitian senyawa kimia dan farmakologi pada Annonaceae mengandung alkaloid, *acetogenin*, asam amino, karbohidrat, protein, lemak, polifenol (termasuk di dalamnya flavonoid), minyak esensial, terpen dan senyawa aromatik (Vega dkk., 2007). Flavonoid memiliki banyak aktivitas biologi antara lain antimikroba, antikanker, *antiulcer*, esterogenik, inhibitor sintesis prostaglandin, inhibitor topoisomerase, dan inhibitor protein kinase (Sujata dkk., 2005). Menurut penelitian Candra (1992), daun sirsak mengandung senyawa golongan flavonoid yang diisolasi dengan metode Charaux-Paris (ekstraksi menggunakan pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda). Fraksi etil asetat ekstrak *Annona muricata* L. memiliki aktivitas sitotoksik dan antileismanial lebih tinggi daripada fraksi heksan dan metanol (Jaramillo dkk., 2000).

Menurut Prachi (2010), ekstrak etanol daun sirsak memiliki aktivitas antibakteri, di antaranya terhadap *Klebsiella pneumoniae* (Gram negatif) dan *Staphylococcus aureus* (Gram positif). *Klebsiella pneumoniae* dapat menyerang manusia dan hewan, patogen yang menyerang organ urinari, respiratori, dan jaringan darah. Pasien yang terinfeksi bakteri ini sistem imunnya akan melemah (Brisse dkk., 2009). *Staphylococcus epidermidis* merupakan flora normal pada kulit dan diisolasi dari darah yang terkontaminasi (Motoyama dkk., 2009). *Staphylococcus epidermidis* dapat membentuk biofilm yang dapat melindungi bakteri dari sistem imun tubuh dan terapi antibiotik (Mathur, 2006).

Berdasarkan data tersebut dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari fraksi semipolar ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap *Klebsiella pneumoniae* dan *Staphylococcus epidermidis*.

B. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dikemukakan, maka dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut:

1. Berapa Kadar Hambat Minimum (KHM) fraksi semipolar ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap *Klebsiella pneumoniae* dan *Staphylococcus epidermidis*?
2. Golongan senyawa apa yang terkandung dalam fraksi semipolar ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Klebsiella pneumoniae* dan *Staphylococcus epidermidis*?

C. Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. Mengetahui aktivitas antibakteri fraksi semipolar ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap *Klebsiella pneumoniae* dan *Staphylococcus*

epidermidis dengan menentukan nilai Kadar Hambat Minimal (KHM) melalui metode dilusi padat.

2. Menentukan golongan senyawa yang terkandung dalam fraksi semipolar ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Klebsiella pneumoniae* dan *Staphylococcus epidermidis* dengan metode bioautografi.

D. Tinjauan Pustaka

1. Tumbuhan sirsak (*Annona muricata* L.)

a. Klasifikasi tumbuhan sirsak

Klasifikasi tumbuhan sirsak yang digunakan dalam penelitian ini sebagai berikut:

Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Anak kelas	: Magnoliidae
Bangsa	: Magnoliales
Suku	: Annonaceae
Marga	: <i>Annona</i>
Jenis	: <i>Annona muricata</i> L.

(Backer and Van Den Brink, 1965).

b. Bagian tanaman yang digunakan

Daun, buah segar dan kulit batang berkhasiat obat (Hariana, 2006). Bagian daun dan batang tumbuhan sirsak mempunyai aktivitas antikanker (Taylor, 2002).

c. Khasiat

Tanaman sirsak bermanfaat sebagai obat-obatan tradisional. Daunnya dapat digunakan sebagai obat ambeien, sakit kantung air seni, mencret pada bayi, disentri, sebagai sumber vitamin C, sebagai peluruh keringat, antikejang, dan mempercepat masaknya bisul (Octavia, 2003). *Annonaceous acetogenins* yang

terkandung dalam tanaman sirsak telah dipublikasikan sebagai antitumor, antiparasit, pestisida, antiprotoza, dan antimikrobia (Taylor, 2002).

d. Kandungan kimia

Daun sirsak mengandung steroid, glikosida jantung, dan tanin (Prachi, 2010). Daun sirsak kaya akan tanin, fitosterol, kalsium oksalat, serta alkaloid murisin (Hariana, 2006).

2. Maserasi

Ekstrak merupakan sari pekat tumbuh-tumbuhan atau hewan yang diperoleh dengan cara melepaskan zat aktif dari masing-masing bahan obat, menggunakan pelarut yang cocok, diuapkan sebagian pelarutnya untuk mendapatkan sisa endapan untuk ditetapkan standarnya (Ansel, 1989). Penyarian merupakan peristiwa perpindahan massa zat aktif yang semula berada di dalam sel, ditarik oleh cairan penyari sehingga zat aktif larut dalam cairan penyari. Pada umumnya penyarian akan bertambah baik bila permukaan serbuk simplisia yang bersentuhan dengan penyari semakin luas. Simplisia yang terlalu halus akan mempersulit proses penyarian karena butiran serbuk halus akan membentuk suspensi yang sulit untuk dipisahkan dengan hasil penyarian (Anonim, 1986).

Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari. Cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif, zat aktif akan larut dan karena adanya perbedaan konsentrasi antara di dalam sel dengan yang di luar sel, maka larutan yang terpekat didesak ke luar (Anonim, 1986).

3. Fraksinasi

Kromatografi kolom digunakan untuk memisahkan senyawa-senyawa dalam jumlah yang banyak berdasarkan adsorpsi dan partisi. Kemasan adsorben yang sering digunakan adalah silika gel G-60, kieselgur, Al_2O_3 , dan diaion. Cara pembuatannya ada dua macam :

- a. Cara kering yaitu silika gel dimasukkan ke dalam kolom yang telah diberi kapas kemudian ditambahkan cairan pengelusi.

b. Cara basah yaitu silika gel terlebih dahulu disuspensikan dengan cairan pengelusi yang akan digunakan kemudian dimasukkan ke dalam kolom melalui dinding kolom secara kontinyu sedikit demi sedikit, sambil kran kolom dibuka. Eluen dialirkan hingga silika gel mampat, setelah mampat eluen dibiarkan mengalir sampai batas adsorben dan kran ditutup. Sampel dilarutkan dalam eluen sampai larut sempurna kemudian dipipet dan dimasukkan ke dalam kolom melalui dinding kolom sedikit demi sedikit hingga masuk semua dan kran dibuka dan diatur tetesannya, serta cairan pengelusi ditambahkan. Tetesan yang keluar ditampung sebagai fraksi-fraksi (Kisman dkk., 1994).

Mekanisme pemisahan menjadi fraksi-fraksi tertentu (fraksinasi) terjadi disebabkan adanya adsorpsi, partisi, difusi molekular antara fase gerak dengan fase diam. Untuk mendapatkan ekstrak dalam bentuk fraksi-fraksi dapat menggunakan metode kolom kromatografi, kromatografi preparatif dan *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC). Pemisahan fraksi berdasarkan sifat kepolaran suatu fase gerak. Kolom dielusi dengan fase gerak dengan gradien kepolaran bertingkat. Sampel hasil elusi dites dengan kromatografi lapis tipis untuk mengelompokkan fraksi-fraksi tersebut (Elizabeth dkk., 1996).

4. *Klebsilla pneumoniae*

Klasifikasi *Klebsilla pneumoniae* adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Proteobacteria
Class	: Gamma Proteobacteria
Order	: Enterobacteriales
Family	: Enterobacteriaceae
Genus	: Klebsiella
Species	: <i>Klebsiella pneumonia</i> (Anonim, 2000)

Klebsiella pneumoniae adalah bakteri Gram negatif yang termasuk famili Enterobacteriaceae yang berbentuk batang (basil), tergolong bakteri non motil, fakultatif anaerob indol negatif, dapat memfermentasikan laktosa, dan dapat mereduksi nitrat (Anonim, 2000). *Klebsiella pneumoniae* dapat menyerang

manusia dan hewan, patogen yang menyerang organ urinari, respiratori, dan jaringan darah. *Klebsiella pneumoniae* yang diisolasi dari rumah sakit menunjukkan resistensi. Pasien yang terinfeksi bakteri ini sistem imunnya akan melemah (Brisse dkk., 2009).

5. *Staphylococcus epidermidis*

Klasifikasi *Staphylococcus epidermidis* adalah sebagai berikut:

Filum	: Firmicutes
Kelas	: Bacilli
Bangsa	: Bacillales
Suku	: Staphylococcaceae
Marga	: Staphylococcus
Jenis	: <i>Staphylococcus epidermidis</i> (Anonim, 2011)

Staphylococcus epidermidis merupakan Gram positif, nonmotil, dan anaerob fakultatif. Bakteri ini merupakan flora normal pada kulit dan diisolasi dari darah yang terkontaminasi (Motoyama dkk., 2009). *Staphylococcus epidermidis* dapat membentuk biofilm yang dapat melindungi bakteri dari sistem imun tubuh dan terapi antibiotik (Mathur, 2006). Biofilm merupakan aglomerasi multiseluler yang terbentuk pada permukaan mikroorganisme. Biofilm memiliki karakteristik struktur 3 dimensi dan sifat bersifat fisiologis (Otto, 2009).

6. Antibakteri

Antibakteri adalah obat atau senyawa kimia yang digunakan untuk membasmi bakteri, khususnya bakteri yang bersifat merugikan manusia (Jawetz dkk., 2001). Berdasarkan sifat toksisitas selektif, ada antibakteri yang bersifat menghambat pertumbuhan bakteri yang dikenal sebagai bakteriostatik, dan ada yang bersifat membunuh bakteri dikenal sebagai bakterisid. Kadar minimal yang diperlukan untuk menghambat atau membunuh bakteri, masing-masing dikenal sebagai Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM). Antibakteri tertentu aktivitasnya dapat meningkat menjadi bakterisid bila kadar antimikrobanya ditingkatkan melebihi KHM (Ganiswara dkk., 1995).

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antibakteri dibagi menjadi lima kelompok yaitu:

- a. Antibakteri yang menghambat sintesis dinding sel bakteri.
- b. Antibakteri yang mengganggu keutuhan membran sel bakteri.
- c. Antibakteri yang menghambat sintesis asam nukleat sel bakteri
- d. Antibakteri yang menghambat sintesis protein sel bakteri
- e. Antibakteri yang menghambat metabolisme sel bakteri (Ganiswara dkk., 1995).

7. Uji Aktivitas Antibakteri

Penentuan kepekaan bakteri patogen terhadap antimikroba dapat dilakukan dengan salah satu dari dua metode pokok yakni dilusi atau difusi.

- a. Metode dilusi menggunakan antimikroba dengan kadar yang menurun secara bertahap, baik dengan media cair atau padat. Kemudian media diinokulasi bakteri uji dan dieramkan. Tahap akhir dilarutkan antimikroba dengan kadar yang menghambat atau mematikan. Uji kepekaan cara dilusi agar memakan waktu dan penggunaannya dibatasi pada keadaan tertentu saja.
- b. Metode difusi merupakan metode yang paling sering digunakan. Cakram kertas saring berisi sejumlah tertentu obat ditempatkan pada permukaan medium padat yang sebelumnya telah diinokulasi bakteri uji pada permukaannya. Setelah inkubasi, diameter zona hambatan sekitar cakram dipergunakan mengukur kekuatan hambatan obat terhadap organisme uji (Jawetz dkk., 2001).

Metode dilusi dan difusi dapat digunakan untuk mengukur MIC (*Minimum Inhibitory Concentration* atau Kadar Hambat Minimum, KHM) dan MBC (*Minimum Bactericidal Concentration* atau Kadar Bunuh Minimum, KBM). Jika kadar obat di bawah KHM atau KBM maka efek terapi tidak akan tercapai. Nilai KHM atau KBM suatu obat terhadap bakteri berubah sesuai perkembangan resistensinya (Pratiwi, 2008).

8. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi Lapis Tipis merupakan metode pemisahan fisikokimia, lapisan yang memisahkan terdiri atas bahan berbutir-butir (fase diam),

ditempatkan dalam penyangga berupa pelat gelas, logam atau lapisan lain yang cocok. Fase diam yang umum ialah silika gel, aluminum oksida, kieselgur, poliamida, selulosa, dan turunannya. Fase gerak ialah medium angkut yang terdiri atas satu atau beberapa pelarut. Fase gerak bergerak di dalam fase diam, yaitu lapisan berpori, karena ada gaya kapiler (Stahl, 1985). Keuntungan kromatografi lapis tipis dalam identifikasi suatu senyawa yaitu:

- a. Pemisahan suatu senyawa dapat dilakukan dengan mudah.
- b. Beberapa sampel dapat dilakukan dengan dua kali elusi.
- c. Hasil elusi dapat dideteksi dengan reagen-reagen tertentu.
- d. Dapat digunakan sebagai komponen *radiolabelling* untuk memonitor aktivitas mikrobia pada totalan (Kalasz dan Bathorl, 2001).

Hasil yang diperoleh diidentifikasi di bawah lampu UV (254 dan 366 nm), ditandai dengan ada atau tidaknya fluoresensi. Jika tidak tampak dengan cara di atas, maka dilakukan secara kimia yaitu penyemprotan dengan pereaksi yang sesuai (Auterhoff dan Kovar, 1987).

Hasil KLT dinilai dengan parameter jarak pengembangan senyawa pada kromatogram biasanya dinyatakan dengan R_f/hR_f

$$R_f = \frac{\text{Jarak antara titik penotolan ke pusat bercak}}{\text{Jarak antara titik penotolan ke batas elusi}} \quad (1)$$

Angka R_f berjarak antara 0,00, 1,00 dan hanya dapat ditentukan 2 desimal. hR_f adalah angka R_f dikalikan faktor 100 (h), menghasilkan nilai berjangka antara 0 sampai 100 (Stahl, 1985).

9. Bioautografi

Bioautografi yaitu kromatografi lapis tipis dikembangkan kemudian ditempatkan ke lapisan media (telah diinokulasi dengan bakteri) memungkinkan difusi antibiotik dari lempeng KLT. Manfaat utama bioautografi adalah memberikan informasi tentang aktivitas antimikroba suatu zat yang dipisahkan dengan elusi fase gerak tertentu (Choma, 2005).

Bioautografi merupakan metode yang spesifik untuk mendeteksi bercak pada kromatogram hasil KLT yang mempunyai aktivitas sebagai antibakteri, antifungi, dan antivirus yang ada di dalam ekstrak tumbuhan (Zweig dan Whittaker, 1971). Bioautografi merupakan metode yang spesifik untuk mendeteksi bercak pada lempeng hasil KLT yang memiliki aktivitas antibakteri, antifungi, dan antivirus, sehingga mendekati metode separasi dengan uji biologis. Keuntungan metode ini adalah sifatnya yang efisien untuk mendeteksi adanya senyawa antimikroba karena letak bercak dapat ditentukan walaupun berada dalam campuran yang kompleks sehingga memungkinkan untuk isolasi senyawa aktif tersebut. Kerugiannya adalah metode ini tidak dapat digunakan untuk menentukan Kadar Hambat Minimum dan Kadar Bunuh Minimum (Pratiwi, 2008). Ada dua macam metode bioautografi, yaitu:

a. Bioautografi langsung

Bioautografi ini dilakukan dengan menyemprot lempeng KLT dengan suspensi mikroorganisme ataupun dengan menyentuh lempeng KLT pada permukaan media agar yang telah ditanami mikroorganisme. Setelah inkubasi pada waktu tertentu, letak senyawa aktif tampak sebagai area jernih dengan latar belakang keruh.

b. Bioautografi *overlay*

Bioautografi ini dilakukan dengan menuangkan media agar yang telah dicampur dengan mikroorganisme di atas permukaan lempeng KLT, media ditunggu hingga padat, kemudian diinkubasi. Area hambatan dilihat dengan penyemprotan menggunakan tetrazolium klorida. Senyawa yang aktif sebagai antimikroba akan tampak sebagai area jernih dengan latar belakang ungu (Pratiwi, 2008).

E. Landasan Teori

Menurut penelitian Vega dkk. (2007), Annonaceae mengandung alkaloid, asetogenin, asam amino, karbohidrat, protein, lemak, polifenol (termasuk di dalamnya flavonoid), minyak esensial, terpen, dan minyak atsiri. Daun sirsak

mengandung steroid, glikosida jantung, dan tanin (Prachi, 2010). Menurut penelitian Candra (1992), daun sirsak mengandung senyawa golongan flavonoid yang diisolasi dengan metode Charaux-Paris (ekstraksi menggunakan pelarut dengan tingkat kepolaran yang berbeda). Dari fase-fase hasil ekstraksi yang diperoleh, hanya fase etil asetat dan fase n-butanol yang mengandung senyawa flavonoid.

Flavonoid memiliki banyak aktivitas biologi antara lain: antimikroba, antikanker, *antiulcer*, esterogenik, inhibitor sintesis prostaglandin, inhibitor topoisomerase, dan inhibitor protein kinase (Sujata dkk., 2005). *Annonaceous acetogenins* hanya terdapat di suku Annonaceae (termasuk *Annona muricata* L.), *Annonaceous acetogenins* yang terkandung dalam tanaman sirsak telah dipublikasikan sebagai antitumor, antiparasit, pestisida, antiprotoza, dan antimikrobia (Taylor, 2002).

Menurut Vieira dkk., (2010) dan Prachi (2010), ekstrak metanol daun sirsak pada konsentrasi 0,6% terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Proteus vulgaris* ATCC 13315, *Streptococcus pyogenes* ATCC 8668, *Bacillus subtilis* ATCC 12432, *Salmonella typhimurium* ATCC 23564 dan *Klebsiella pneumonia* NCIM No.2719 sedangkan konsentrasi 0,8% pada bakteri *Enterobacter aerogenes* NCIM No.2340 dan *Escherichia coli* ATCC 8739 memiliki aktivitas antibakteri dengan menunjukan zona hambat. Ekstrak air daun sirsak dapat menghambat pertumbuhan *S. aureus*, *E. coli*, dan *Salmonella*. Senyawa yang memiliki aktivitas terhadap *B. subtilis* dan *S. aureus* adalah asam *trachylobanoic*. Annonaceae mengandung acetogenins yang memiliki spektrum aksi yang luas termasuk aksi antibiotik.

F. Hipotesis

Fraksi semipolar ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) mengandung senyawa yang mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Klebsiella pneumoniae* dan *Staphylococcus epidermidis*.