

## BAB VI

### PEMBAHASAN

Penelitian eksperimental ini bertujuan untuk mengetahui adanya daya hambat daun sirsak (*Annona Muricata* Linn) terhadap bakteri *Streptococcus pyogenes* secara *in vitro*.

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Tes identifikasi telah dilakukan dengan tes pewarnaan gram, tes katalase, tes hemolisis, dan tes cakram basitrasin. Untuk tes pewarnaan gram, dihasilkan gambaran berwarna ungu, dan terlihat bahwa bakteri berbentuk *coccus* dan berantai yang merupakan bakteri gram positif. Untuk tes katalase didapatkan tidak adanya gelembung saat ditetesi menggunakan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3 % yang menunjukkan bahwa bakteri ini merupakan golongan *Streptococcus*. Untuk tes hemolisis didapatkan adanya zona jernih di sekitar bakteri (hemolisis total) yang menunjukkan bakteri ini golongan  $\beta$  hemolitik. Untuk tes basitrasin didapatkan adanya zona hambat yang terbentuk di sekitar cakram yang menunjukkan bakteri ini *Streptococcus* grup A. Dari hasil indentifikasi bakteri ini merupakan bakteri gram positif *Streptococcus*  $\beta$  hemolitik grup A.

Metode *in vitro* merupakan metode yang dilakukan tidak pada tubuh organisme, tetapi pada lingkungan terkontrol (*petri disk*, cawan petri berisi media pembedihan). Metode ini memiliki kelebihan dibanding metode *in vivo*, karena

dilakukan di luar tubuh organisme, peneliti dapat lebih fokus pada satu komponen, tanpa harus ada interaksi dari fungsi bagian tubuh organisme (contoh: sistem imun), dilakukan di luar tubuh organisme berarti menghindari adanya interaksi bahan bahan yang membahayakan kehidupan organisme (contoh : jika dilakukan uji toksisitas dan farmakologi) (Quignot N *et al.*, 2014). Daun sirsak (*Annona Muricata* Linn) yang digunakan didapatkan dari Ijem Herbal Yogyakarta berupa daun kering berwarna coklat. Daun diambil pada tumbuhan sirsak dengan ranting terpanjang yang memiliki daun tidak bergerombol, lalu diambil daun urutan ke-5 atau lebih dari pucuk ranting. Ekstrak daun sirsak (*Annona Muricata* Linn) yang digunakan berwarna hijau tua dan berbentuk cair. Metode yang digunakan untuk mengekstrak adalah metode maserasi dan menggunakan pelarut etanol. Metode maserasi dipilih karena pelaksanaannya sederhana serta untuk mengurangi kemungkinan kehilangan zat aktif yang terkandung dalam daun sirsak oleh pengaruh suhu, karena dalam maserasi tidak ada proses pemanasan. Pada penelitian ini digunakan etanol sebagai pelarut, dikarenakan etanol mempunyai polaritas yang tinggi dibandingkan dengan jenis pelarut organik lain. Etanol mempunyai titik didih yang rendah dan cenderung aman, tidak beracun dan berbahaya (Janan, 2012). Konsentrasi yang digunakan pada penelitian ini adalah 100 %, 80 %, 60 %, 40 %, 20 % yang dirapatkan setelah melakukan penelitian pendahuluan sebelumnya.

Metode yang digunakan adalah difusi sumuran. Untuk uji pendahuluan digunakan metode difusi cakram. Digunakan difusi cakram / Kirby-Bauer karena metode ini biasanya digunakan untuk uji kepekaan antibakteri, dan metode ini yang direkomendasikan oleh NCLLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*). Kriteria yang ditetapkan NCCLS didasarkan pada pembelajaran

internasional yang berhubungan dengan MIC dan data kinik. NCCLS telah diakui oleh FDA-USA dan direkomendasikan oleh WHO (Lalitha, 2004). Konsentrasi yang digunakan adalah 100 %, 50 %, 25 %, 12.5 %, 6.75 %, penentuan konsentrasi ini dilakukan karena peneliti belum mengetahui berapa konsentrasi yang efektif maka dibuat jarak antara konsentrasi 100 % sampai konsentrasi terkecil dengan membagi setengahnya hingga 5 konsentrasi untuk mempermudah menentukan konsentrasi sesungguhnya yang akan digunakan. Ekstrak yang digunakan berbentuk pasta dengan menggunakan pengencer DMSO (*dimethyl sulfoxide*), dan menggunakan agar BHI. Dari hasil yang didapatkan zona hambat rata – rata yang pada semua konsentrasi dan kontrol negatif aquadest adalah 0 mm, dan pada kontrol positif *penicillin* 17 mm. Beberapa kemungkinan yang menyebabkan tidak terbentuknya zona hambat adalah kertas cakram yang hanya mampu menyerap sedikit dari ekstrak daun sirsak yang pekat dan kental sehingga efektivitas ekstrak berkurang, waktu inkubasi yang kurang lama menyebabkan zona hambat sulit terlihat.

Uji difusi sumuran digunakan karena uji difusi cakram tidak mendapatkan hasil, maka dicari uji yang sama tetapi dengan macam yang berbeda untuk melihat apakah ada kesalahan pada metode uji sebelumnya. Untuk uji difusi sumuran ekstrak yang digunakan berbentuk cair dengan pengencer aquadest, menggunakan agar BHI dan konsentrasi yang digunakan adalah 100 %, 80 %, 60 %, 40 %, dan 20 %. Dari hasil yang didapatkan zona hambat rata – rata pada konsentrasi 100 %, 80 %, 60 %, 40 %, 20 %, kontrol negatif aquadest adalah 0 mm, dan pada kontrol positif *penicillin* 16,69 mm. Beberapa kemungkinan yang menyebabkan zona hambat tidak terbentuk pada metode ini adalah kandungan zat aktif dalam ekstrak yang sedikit, struktur bakteri *Streptococcus pyogenes*

yang kompleks sehingga zat aktif sulit untuk memberikan daya hambat, dan adanya aktivitas antara zat aktif. Perbedaan antara bentukan ekstrak pasta dan cair, adalah untuk bentukan pasta pelarut diupayakan seluruhnya sehingga hanya meninggalkan bentukan yang padat sehingga jika ingin digunakan harus menggunakan pengencer yang bersifat non polar atau semi polar, sedangkan untuk bentukan cair pelarut tidak diupayakan seluruhnya sehingga masih meninggalkan sisa tetapi sisa tersebut sudah tidak mengandung sifat pelarut. Untuk dari segi penggunaan yang berbentuk cair lebih mudah digunakan karena tidak perlu mencari pengencer yang cocok untuk melarutkan ekstrak, karena dengan pelarut polar (*aquadest*) ekstrak sudah dapat larut. Untuk dari segi kualitas keduanya sama saja hanya bentuknya yang berbeda, tetapi untuk bentukan pasta jika pengencer kurang cocok maka ekstrak tidak dapat larut sempurna sehingga mengurangi efektivitas ekstrak (Sukhdev *et al.*, 2008).

Struktur bakteri *Streptococcus pyogenes* yang lebih kompleks juga dapat menyebabkan sulitnya ekstrak daun sirsak (*Annona Muricata* Linn) untuk menghambat bakteri ini. Faktor virulensi seperti kapsul hialuronidat dan protein M yang bersifat tahan panas sehingga membuat bakteri resisten terhadap fagositosis. Dinding sel yang kompleks terdiri dari protein spesifik, asam lipoteikoat, peptidoglikan, dan karbohidrat polisakarida grup A, serta mengandung berbagai struktur antigenik, dibentuk oleh polimer *N-asetil-D-glukosamin* dan *N-asetil-D-muraminic acid* yang dihubungkan oleh asam amino. Asam lipoteikoat dapat mempercepat kolonisasi kuman dan mengadakan ikatan dengan fibronektin pada permukaan sel epitel. Lapisan mukopolipeptida (peptidoglikan) yang tebal juga berperan dalam rigiditas dinding sel (Pardede, 2009). Hal - hal ini yang dapat menyebabkan sulitnya zat - zat antibakteri dalam

menghambat bakteri ini. Kondisi daun sirsak sendiri juga mempengaruhi kandungan zat aktif yang ada di dalamnya. Metabolit sekunder dalam suatu tumbuhan dapat bervariasi karena kondisi lingkungan, jenis, dan kondisi fisiologis. Faktor lingkungan seperti suhu udara, kelembapan, radiasi matahari, angin, suhu tanaman, ketersediaan air, cahaya, juga mempengaruhi fungsi fisiologis, bentuk anatomis, dan siklus hidup tumbuhan. Faktor - faktor inilah yang mungkin mempengaruhi senyawa zat aktif yang dihasilkan oleh daun sirsak (*Annona muricata* Linn) (Rusmiyati *dkk.*, 2012). Interaksi dari zat aktif sendiri juga dapat mempengaruhi kemampuan daun sirsak dalam menghambat bakteri. Ada beberapa macam interaksi farmakologi langsung yang terjadi jika dua zat memiliki aksi di tempat yang sama yaitu 1. aditif, di mana efek 2 zat yang diberikan bersamaan dan hasilnya adalah jumlah masing – masing dari zat tersebut, 2. antagonis, efek 2 zat yang diberikan bersamaan dan hasil akhirnya kurang dari jumlah efek kedua zat tersebut, 3. Sinergis, efek 2 zat yang diberikan bersamaan dan hasilnya lebih besar daripada jumlah efek kedua zat tersebut. Flavonoid dan alkaloid yang memiliki metode hambat yang sama dengan menghambat sintesis dinding sel kemungkinan berinteraksi satu sama lain sehingga menyebabkan efeknya saling meniadakan (antagonis) (Simbala *dkk.*, 2009) .

Media agar yang digunakan juga dapat berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes*. *Brain heart infusion* agar merupakan media non selektif yang digunakan untuk isolasi dan kultur dari mikroorganisme *anaerobik*. Antibiotik dan inhibitor pertumbuhan bakteri akan larut pada agar ini dan menyebabkan efeknya menjadi berkurang. Kekurangan dari kultur anaerobik adalah patogen anaerobik dapat ditumbuhi oleh patogen

anaerobik lain atau patogen aerob, di mana media pembenihan patogen anaerobik dapat digunakan seperti *Prereduced anaerobically sterilized media* (PRAS), *anaerobic blood agar*, atau *chocolate agar* (Daniel *et al.*, 2008). Untuk metode difusi agar, metode ini tergolong mudah dan tidak menggunakan banyak waktu, tetapi ada beberapa kerurangan di antaranya sulitnya melihat kepekaan dari bakteri dengan pertumbuhan yang lambat. Karena bakteri tumbuh pada permukaan *plate* yang akan diuji, jika pertumbuhannya lambat akan menyebabkan antibakteri yang diuji akan meresap ke dalam agar tanpa adanya bakteri yang tumbuh sehingga menyebabkan hasilnya tidak akurat.

Data hasil pengukuran diameter zona hambat *Streptococcus pyogenes* dianalisa menggunakan SPSS. Hasil uji normalitas menunjukkan data kontrol positif terdistribusi normal, dan data konsentrasi 100 %, 80 %, 60 %, 40 %, 20 % dan kontrol negatif aquadest tidak dapat dilakukan uji normalitas karena semua data memiliki nilai yang sama yaitu 0.

Penelitian ini dilakukan berdasarkan dari penelitian sebelumnya. Penelitian sebelumnya dilakukan Sari yaitu Uji Aktivitas Antibakteri Infusa Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) Secara in Vitro Terhadap *Staphylococcus Aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 35218 Serta Profil Kromatografi Lapis Tipisnya. Daun sirsak (*Annona muricata* Linn) dibuat dalam bentuk infusa karena belum mengetahui zat aktif apa saja yang terkandung dalam daun sirsak, sehingga setelah dilakukan uji bakteri dilakukan uji kromatografi untuk mendapatkan zat aktif apa saja yang terkandung dalam daun sirsak. Metode kepekaan yang digunakan adalah dilusi tabung, dan media pembenihan yang digunakan adalah BHI. Variasi konsentrasi yang digunakan pada uji pendahuluan adalah 100 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 %. MIC pada

penelitian pendahuluan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* tidak dapat ditentukan karena larutan sampel berwarna coklat tua yang menyebabkan tidak dapat ditentukan kekeruhan atau kejernihannya. Untuk MBC pada penelitian pendahuluan *Staphylococcus aureus* adalah 90 %, sedangkan untuk *Escherichia coli* tidak dapat ditentukan karena sampai kadar 100 % tidak dapat menghambat bakteri. Setelah uji pendahuluan, dilakukan uji antibakteri menggunakan konsentrasi yang dirapatkan yaitu 100 %, 95 %, 90 %, 85 %, 80 %, 75 % untuk *Staphylococcus aureus* dan 100 %, 90 %, 80 %, 70 %, 60 %, 50 % pada *Escherichia coli*. Dari hasil didapatkan MIC sulit diamati karena larutan sampel berwarna coklat tua, dan dilanjutkan pada penentuan MBC. Dari hasil didapatkan MBC pada *Staphylococcus aureus* adalah 85 %, dan pada *Escherichia coli* sampai konsentrasi 100 % tidak menunjukkan adanya aktivitas antibakteri. Hal ini disebabkan struktur bakteri gram negatif *Escherichia coli* yang lebih kompleks sehingga daun sirsak tidak memiliki pengaruh antibakteri (Sari dkk., 2006).

Penelitian lain dilakukan oleh Haro mengenai Pembelajaran Aktivitas Antibakteri dari Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn). Bakteri yang diuji adalah *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Penelitian ini menggunakan daun sirsak dalam bentuk ekstrak dan menggunakan pelarut metanol. Metode kepekaan yang digunakan adalah difusi cakram dan media pembedahan yang digunakan adalah *nutrient broth*. Konsentrasi yang digunakan adalah 300 mg / ml, 250 mg / ml, 200 mg / ml, 100 mg / ml, 50 mg / ml, 25 mg / ml, 10 mg / ml, dan 5 mg / ml. Dari hasil didapatkan bahwa ekstrak daun sirsak dengan konsentrasi 300 mg / ml memiliki diameter hambat terbesar, berukuran 16,4 mm untuk *Staphylococcus aureus* dan 15,3 mm untuk *Escherichia coli*. Sedangkan

diameter terkecil dimiliki oleh konsentrasi 5 mg / ml, dengan ukuran 8,6 mm untuk *Staphylococcus aureus* dan 8 mm untuk *Escherichia coli*. Konsentrasi 5 mg / ml ditetapkan sebagai MIC karena merupakan konsentrasi terkecil yang dapat menghambat bakteri (Haro *et al.*, 2014). Dari hasil kedua penelitian ini maka peneliti memutuskan untuk menggunakan daun sirsak dalam bentuk ekstrak untuk penelitiannya.

Penelitian lain dilakukan Hambali yaitu bioaktivitas ekstrak metanol daun sirsak tua (*Annona muricata* Linn) dalam sebagai antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*, dan bakteri *Propionibacterium acnes*. Hambali menggunakan daun tua (daun ke 4 dan ke 5 dari pucuk) karena mengacu pada penelitian sebelumnya bahwa daun yang berada pada pucuk ke 4 atau 5 adalah yang paling banyak mengandung senyawa annonaceous acetogenin (Sastrodihardjo *et al.*, 1997). Metode kepekaan yang digunakan adalah difusi cakram, proses ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan menggunakan pelarut metanol, karena metanol merupakan pelarut semi polar yang dapat melarutkan senyawa polar dan non polar, dan media pembenihan yang menggunakan MHA (*Mueller Hinton Agar*). Konsentrasi yang digunakan adalah 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, dan 25 %. Dari hasil menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun sirsak tua (*Annona muricata* Linn) dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*, dan bakteri *Propionibacterium acnes* dengan diameter zona hambat terbesar pada konsentrasi 25 % sebesar 14 mm pada *Staphylococcus aureus* dan 12 mm pada *Propionibacterium acnes*. Daya antibakteri pada daun sirsak dikarenakan adanya senyawa annonaceous acetogenin yaitu annomiricin dan murica pentocin. Acetogenin merupakan senyawa polyketides dengan struktur 30-32 rantai karbon tidak bercabang yang

terikat pada gugus 5-methyl, 2-furanone. Rantai furanone dalam gugus hydrofuranone pada C23 memiliki sifat sitotoksik (Hambali *dkk.*, 2007).

Beberapa penelitian lain mengenai bakteri *Streptococcus pyogenes* yaitu madu dapat menghambat bakteri *Streptococcus pyogenes* dengan MIC sebesar 90 %, karena terdapat kandungan flavonoid dalam madu berperan dalam menghambat bakteri dengan merusak dinding sel bakteri (Erywiyatno, 2012). Penelitian lain yang dilakukan Madani mengenai aktivitas gambir dalam menghambat bakteri *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutants*, dan *Streptococcus pyogenes* memberikan hasil bahwa gambir dapat menghambat ketiga bakteri tersebut, namun dengan nilai MIC tertinggi pada *Streptococcus pyogenes*. Hal ini menunjukkan bahwa *Streptococcus pyogenes* merupakan bakteri yang paling resisten karena dinding selnya memiliki peptidoglikan yang sangat tebal dan memberikan pertahanan untuk keutuhan selnya (Madani, 2010).

Berdasarkan hasil penelitian ini, yaitu tidak terbentuknya zona hambat pada biakan bakteri *Streptococcus pyogenes* setelah pemberian berbagai konsentrasi ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn), maka dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn) tidak memiliki efek antibakteri terhadap *Streptococcus pyogenes* secara *in vitro*.

Terdapat beberapa kekurangan dalam penelitian ini, diantaranya adalah kondisi usia daun sirsak yang belum ditetapkan apakah daun tua atau daun yang masih muda sebelumnya, sulitnya kertas cakram menyerap ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* Linn) yang pekat pada penelitian pendahuluan, waktu penelititan yang terlalu lama karena DMSO yang sulit dicari, kurangnya waktu inkubasi sehingga zona hambat tidak terlihat dengan jelas pada penelitian

pendahuluan, penggunaan BHI pada uji antibakteri sehingga bakteri *Streptococcus pyogenes* kemungkinan tidak dapat tumbuh sebaik pada *blood agar*, penggunaan satu isolat bakteri *Streptococcus pyogenes*. Pada penelitian lebih lanjut dapat menggunakan media *blood agar* untuk bakteri *Streptococcus pyogenes*, waktu inkubasi yang diperlama dan penggunaan beberapa isolat sehingga diharapkan akan didapatkan hasil yang lebih akurat. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat sebagai referensi penelitian lebih lanjut dalam bidang mikrobiologi.

