

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL DAUN SIRSAK
(*Annona muricata* L.) TERHADAP METHICILLIN-RESISTANT
Staphylococcus aureus (MRSA)**



Oleh :

**Dwi Sulistiyowati
19133928A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2017**

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL DAUN SIRSAK
(*Annona muricata* L.) TERHADAP METHICILLIN-RESISTANT
Staphylococcus aureus (MRSA)**

SKRIPSI

*Diajukan untuk memenuhi salah satu syarat mencapai
derajat Sarjana Farmasi (S.F)
Program Studi Ilmu Farmasi pada Fakultas Farmasi
Universitas Setia Budi*

Oleh :

**Dwi Sulistiyowati
19133928A**

**FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS SETIA BUDI
SURAKARTA
2017**

PENGESAHAN SKRIPSI
Berjudul

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL DAUN SIRSAK
(*Annona muricata* L.) TERHADAP METHICILLIN-RESISTANT
Staphylococcus aureus (MRSA)**

Oleh :

Dwi Sulistiyowati
19133928A

Dipertahankan di hadapan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi
Pada tanggal : 6 Juni 2017



Prof. Dr. R. A. Oetari, SU., MM., M.Sc., Apt.

Pembimbing,



Dr. Ana Indrayati, M.Si

Pembimbing pendamping,



Drs. Mardiyono, M.Si

Penguji :

1. Opstaria Saptarini, M.Si., Apt.
2. Dra. Suhartinah, M.Sc., Apt.
3. Vivin Nopiyanti, M.Sc., Apt.
4. Dr. Ana Indrayati, M.Si.

1. 

2. 

3. 

4. 

PERSEMBAHAN

**Allah dulu, Allah lagi, Allah terus. All praises to Allah.
Yang Maha Pengasih lagi Maha Penyayang
Yang menjadi ilmu dari segala ilmu**

**Teristimewa dan terhormat untuk Bapak Suparno dan
Ibu Suparti
Karya ini ku persembahkan**

**Untuk yang tercinta, keluarga, sahabat, dan teman
yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu,
terimakasih karena selalu mendukung dan
memotivasi saya**

**Untuk yang terkasih kedua kakak sekaligus rekan
saya, Ani Wijayanti dan Maria Kusumawati**

**Untuk kakak, teman, adik seperjuangan di UKM KSR-
PMI Unit USB**

**dan untuk alam semesta seisinya yang selalu
memberikan pembelajaran dari setiap langkah usaha
saya**

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi ini adalah hasil pekerjaan saya sendiri dan tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila skripsi ini merupakan jiplakan dari penelitian/karya ilmiah/skripsi orang lain, maka saya siap menerima sanksi, baik secara akademis maupun hukum.

Surakarta, 06 Juni 2017



Dwi Sulistiyowati

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Allah SWT atas rahmat dan ridho-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan skripsi yang berjudul “**AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL DAUN SIRSAK (*Annona muricata* L) TERHADAP METHICILLIN-RESISTANT *Staphylococcus aureus* (MRSA)**”.

Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mencapai derajat Sarjana Farmasi di Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi, Surakarta. Penulis menyadari bahwa dalam menyelesaikan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, maka pada kesempatan ini penulis menyampaikan terima kasih banyak kepada :

1. Dr. Ir. Djoni Tarigan, MBA., selaku Rektor Universitas Setia Budi
2. Prof. Dr. R. A. Oetari, SU., MM, M.Sc., Apt., selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi yang telah memberikan kesempatan dan fasilitas dalam penelitian dan penyusunan skripsi ini
3. Dr. Ana Indrayati, M.Si selaku dosen pembimbing utama yang dengan sabar telah memberikan bimbingan dan arahan kepada penulis selama penelitian dan penyusunan skripsi ini
4. Drs. Mardiyono, M.Si selaku dosen pembimbing pendamping yang dengan sabar telah memberikan bimbingan dan arahan kepada penulis selama penelitian dan penyusunan skripsi ini
5. Opstaria Saptarini, M.Si., Apt., Dra. Nony Puspawati M.Si., Dra. Suhartinah, M.Sc., Apt., Vivin Nopiyanti, M.Sc., Apt. selaku dosen penguji yang telah berkenan memberikan masukan dan arahan demi kebaikan skripsi ini.
6. Seluruh Dosen, Asisten Dosen, Staf Perpustakaan dan Staf Laboratorium Universitas Setia Budi atas bantuannya selama penulis menempuh studi dan skripsi
7. Kepada orang tua dan keluargaku yang selalu memberikan dukungan dalam pembuatan skripsi ini
8. Seluruh rekan mahasiswa Universitas Setia Budi

Penulis menyadari masih banyak kekurangan dalam menyusun skripsi ini. Oleh sebab itu kritik dan saran yang bersifat membangun sangat penulis harapkan. Akhir kata penulis berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi siapa saja yang mempelajarinya.

Surakarta,

Dwi Sulistiyowati

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	ii
PENGESAHAN SKRIPSI	Error! Bookmark not defined.
PERSEMBAHAN.....	iii
PERNYATAAN.....	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
INTISARI.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Rumusan Masalah	3
C. Tujuan Penelitian.....	3
D. Kegunaan Penelitian.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
A. Tanaman Sirsak	4
1. Sistematika tanaman.....	4
2. Morfologi tanaman sirsak.....	4
3. Khasiat tanaman	5
4. Kandungan kimia daun sirsak	5
4.1. Flavonoid.....	5
4.2. Saponin.....	5
4.3. Tanin.....	5
B. Simplisia	6
1. Pengertian simplisia	6
2. Pencucian dan pengeringan simplisia.....	6
C. Metode Penyarian.....	7
1. Ekstraksi	7
2. Maserasi.....	7

3. Pelarut.....	8
D. Media.....	8
E. Sterilisasi	9
F. <i>Staphylococcus aureus</i>	10
1. Sistematika <i>Staphylococcus aureus</i>	10
2. Morfologi dan identifikasi.....	10
G. Antibakteri.....	11
1. Definisi	11
2. Mekanisme kerja antibakteri	12
3. Mekanisme resistensi	13
4. Resistensi terhadap betalaktam	15
H. Metode Pengujian Aktivitas Antibakteri	16
I. Vankomisin.....	17
J. Landasan Teori	18
K. Hipotesis	20
BAB III METODE PENELITIAN	21
A. Populasi dan Sampel.....	21
1. Populasi	21
2. Sampel	21
B. Variabel penelitian.....	21
1. Identifikasi variabel utama	21
2. Klasifikasi variabel utama	21
3. Definisi operasional variabel utama	22
C. Alat dan Bahan	23
1. Alat	23
2. Bahan.....	23
2.1 Bahan sampel	23
2.2 Bahan kimia	23
D. Jalannya Penelitian	23
1. Determinasi daun sirsak	23
2. Pengambilan sampel.....	23
3. Pembuatan serbuk daun sirsak	24
4. Kadar lembab serbuk dan ekstrak daun sirsak	24
5. Pembuatan ekstrak etanol daun sirsak.....	24
6. Tes bebas etanol daun sirsak	25
7. Identifikasi kandungan senyawa kimia	25
7.1 Identifikasi flavonoid	25
7.2 Identifikasi saponin	25
7.3 Identifikasi tanin	25
8. Sterilisasi	25
9. Pembuatan suspensi bakteri uji	26
10. Identifikasi bakteri uji	26
10.1. Pewarnaan Gram	26
10.4. Identifikasi bakteri MRSA terhadap antibiotik vankomisin, oksasilin dan sefoksitin.	27

11. Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak daun sirsak.....	28
E. Analisis Hasil.....	29
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....	33
1. Determinasi tanaman sirsak.....	33
2. Pengambilan sampel.....	33
3. Pembuatan serbuk daun sirsak	33
4. Penetapan kadar lembab serbuk dan ekstrak daun sirsak.....	34
5. Pembuatan ekstrak etanol daun sirsak.....	35
6. Uji bebas etanol ekstrak daun sirsak	35
7. Identifikasi kandungan senyawa kimia serbuk dan ekstrak etanol daun sirsak	36
8. Identifikasi bakteri MRSA	37
9. Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak daun sirsak terhadap MRSA secara difusi cakram, difusi sumuran dan dilusi	42
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	47
DAFTAR PUSTAKA	48
LAMPIRAN	52

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1. Skema pembuatan ekstrak etanol daun sirsak.....	30
Gambar 2. Skema uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun sirsak secara difusi	31
Gambar 3. Skema uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun sirsak secara dilusi.....	32
Gambar 4. Hasil identifikasi kandungan senyawa pada serbuk (a) dan ekstrak (b) daun sirsak.....	37
Gambar 5. Hasil identifikasi bakteri MRSA secara mikroskopis.....	38
Gambar 6. Hasil identifikasi bakteri MRSA secara makroskopis pada media VJA	38
Gambar 7. Hasil identifikasi bakteri MRSA pada uji katalase (a) uji koagulase (b) dan uji hemolisin (c).....	40
Gambar 8. Hasil uji sensitivitas bakteri MRSA terhadap antibiotik	41
Gambar 9. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak daun sirsak dengan metode cakram (a) dan sumuran (b)	42
Gambar 10. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak daun sirsak terhadap <i>S.aureus</i> ATCC 25932.....	43
Gambar 11. Hasil uji dilusi yang diinokulasi pada media VJA.....	44

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1. Persentase bobot kering terhadap bobot basah daun sirsak	34
Tabel 2. Hasil penetapan kadar lembab serbuk daun sirsak.....	34
Tabel 3. Hasil penetapan kadar lembab ekstrak daun sirsak.....	34
Tabel 4. Hasil penetapan rendemen ekstrak etanol daun sirsak.....	35
Tabel 5. Hasil uji bebas etanol ekstrak daun sirsak	35
Tabel 6. Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia serbuk dan ekstrak daun sirsak secara kualitatif	36
Tabel 7. Hasil identifikasi bakteri uji secara mikroskopis	37
Tabel 8. Hasil identifikasi bakteri dengan uji katalase dan koagulase.....	39
Tabel 9. Hasil uji sensitivitas bakteri MRSA.....	40
Tabel 10. Hasil uji aktifitas antibakteri ekstrak daun sirsak terhadap MRSA secara difusi	42
Tabel 11. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak daun sirsak terhadap <i>S. aureus</i> ATCC 25932 secara difusi cakram.....	43
Tabel 12. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak daun sirsak terhadap MRSA secara dilusi.....	43

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Surat keterangan hasil determinasi tanaman	53
Lampiran 2. Perhitungan persentase bobot kering terhadap bobot basah daun sirsak.....	54
Lampiran 3. Perhitungan rendemen ekstrak daun sirsak	55
Lampiran 4. Perhitungan penimbangan bahan.....	55
Lampiran 5. Foto tanaman sirsak , serbuk dan ekstrak kental daun sirsak (<i>Annona muricata</i> L)	57
Lampiran 6. Hasil uji sensitivitas bakteri <i>S.aureus</i> ATCC 25932	58
Lampiran 7. Foto hasil pengenceran pada uji dilusi bakteri MRSA.....	58
Lampiran 8. Standar kekeruhan <i>Mc Farland</i> dan tabel Interpretative standards <i>Kirby-Bauer</i>	59
Lampiran 9. Formulasi dan pembuatan media.....	60
Lampiran 10. Foto alat kerja	62

INTISARI

SULISTIYOWATI, D., 2017, AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL DAUN SIRSAK (*Annona muricata* L) TERHADAP METHICILLIN-RESISTANT *Staphylococcus aureus* (MRSA), SKRIPSI, FAKULTAS FARMASI, UNIVERSITAS SETIA BUDI, SURAKARTA.

Daun sirsak (*Annona muricata* L) merupakan tanaman yang secara empiris digunakan untuk mengobati kanker. Beberapa penelitian menyebutkan bahwa daun sirsak memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *K. pneumonia*, *S. typhimurium*, *E. coli*. Senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam daun sirsak diantaranya adalah saponin, tanin dan flavonoid. MRSA merupakan strain *S. aureus* yang mempunyai gen *mecA*, dimana gen tersebut menyandi PBP2a yang mempunyai afinitas rendah terhadap antibiotik betalaktam.

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70% daun sirsak terhadap MRSA. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Pengujian aktivitas antibakteri terhadap MRSA secara difusi cakram dan sumuran pada konsentrasi 25%, 50%, 75% dan secara dilusi dengan konsentrasi 75%, 37,5%, 18,75%, 9,37%, 4,69%, 2,34%, 1,17%, 0,59%.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol 70% konsentrasi 25%, 50%, 75% daun sirsak tidak memiliki aktivitas daya hambat dan daya bunuh terhadap bakteri MRSA.

Kata kunci : *Annona muricata* L., MRSA, antibakteri, ekstrak.

ABSTRACT

SULISTIYOWATI, D., 2017, ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ETHANOL EXTRACT OF SOURSOP LEAF (*Annona muricata* L) AGAINST METHICILLIN-RESISTANT *Staphylococcus aureus* (MRSA), THESIS, PHARMACHY FACULTY, SETIA BUDI UNIVERSITY, SURAKARTA.

Soursop leaf (*Annona muricata* L) is a plant that is empirically used to treat cancer. Some studies suggest that soursop leaves have antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *K. pneumonia*, *S. typhimurium*, *E. coli*. Secondary metabolite compounds contained in soursop leaves include saponins, tannins and flavonoids. MRSA is a strain of *S. aureus* that has the *mecA* gene, where the gene encodes PBP2a that having a low affinity for beta-lactam antibiotics.

This research was conducted to find out antibacterial activity of 70% ethanol extract soursop leaf againts MRSA. The extraction was done by maceration method using 70% ethanol solvent. Examination of antibacterial activity of MRSA by diffusion of disc and well at concentration 25%, 50%, 75% and dilution with concentration 75%, 37,5%, 18,75%, 9,37%, 4,69%, 2, 34%, 1.17%, 0.59%.

The results of this study showed that 70% ethanol extract of soursop leaves 25%, 50%, 75% concentration did not inhibit and killing MRSA growth

Keywords : *Annona muricata* L., MRSA, antibacterial, extract.

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Penyakit infeksi merupakan salah satu masalah kesehatan dengan angka kejadian yang cukup tinggi di Indonesia. Infeksi disebabkan oleh mikroba, salah satunya adalah bakteri *Staphylococcus aureus*. *S. aureus* adalah bakteri Gram positif yang dapat bersifat patogen. Penyakit infeksi yang disebabkan oleh *S. aureus* diantaranya adalah bisul, jerawat, infeksi luka, dan yang lebih berat diantaranya pneumonia, mastitis, sepsis dan meningitis. Sejak tahun 1960-an bakteri *S. aureus* telah berkembang menjadi MRSA. MRSA merupakan bakteri *S. aureus* yang telah mengalami resistensi terhadap antibakteri metisilin dan beberapa antibakteri golongan betalaktam (Kusuma 2009).

Penelitian di RSUD ZA Banda Aceh menyebutkan bahwa pola kuman patogen yang berpotensi sebagai penyebab infeksi nosokomial terbanyak adalah *S. aureus* (70%). *S. aureus* yang ditemukan dalam penelitian tersebut semuanya merupakan isolat MRSA, dilihat dari hasil uji sensitivitas antibiotik menunjukkan adanya resistensi terhadap antibiotik oksasilin (100%), amoksilin (57,14%), dan golongan sefalosporin (57,14%) (Hayati *et al* 2012). Penelitian lain, di RSUD Dr. Saiful Anwar Malang selama kurun waktu 2010-2014 didapatkan 772 isolat *S. aureus* yang diambil dari berbagai spesimen pasien, 38,2% diantaranya juga merupakan isolat MRSA (Erikawati *et al* 2016).

Pemilihan dan pemakaian antibiotik harus didasarkan pada pola kuman dan pola resistensi, karena masing – masing bakteri mempunyai sensitivitas yang berbeda dan senantiasa berubah terhadap antibiotik. Penggunaan antibiotik semakin meningkat, akan tetapi penelitian tentang rasionalitas penggunaan antibiotik di Indonesia masih terbatas. Penelitian tim AMRIN di dua rumah sakit (499 pasien di Rumah Sakit A dan 500 pasien di Rumah Sakit B) di Indonesia mendapatkan hanya 21 % persepsan antibiotik yang tergolong rasional, selebihnya digunakan tanpa indikasi (AMRIN 2008).

Intensitas penggunaan antibiotik yang relatif tinggi menimbulkan berbagai permasalahan bagi kesehatan terutama resistensi bakteri terhadap antibiotik. Situasi dan kondisi yang terjadi di Indonesia beberapa tahun belakangan ini menyebabkan terjadinya pergantian pola konsumsi obat pada masyarakat, antara lain dalam hal penggunaan obat tradisional sebagai alternatif pengobatan. Banyak orang beralih ke pengobatan tradisional, selain harganya yang lebih murah juga dikarenakan bahan alam dianggap aman dari efek samping (Hidayati *et al* 2011).

Tanaman yang dapat digunakan sebagai obat tradisional salah satunya adalah sirsak. Tanaman sirsak merupakan salah satu tanaman dari kelas dikotiledon, keluarga annonaseae, dan genus *annona*. Sirsak secara empiris digunakan masyarakat sebagai antikanker, antidiabetes, antihipertensi, antiinflamasi, dan antioksidan. Dalam beberapa tahun ini, penelitian mengenai potensi antibakteri dari daun, akar, dan buah pohon sirsak telah dikembangkan (Gajalakshmi *et al* 2012).

Pengujian aktivitas antibakteri daun sirsak (*Annona muricata* L) telah dilakukan. Penelitian Solomon-Wisdom (2014) menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun sirsak dapat menghambat pertumbuhan beberapa bakteri yaitu *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *K. pneumonia*, *S. typhimurium*, *E. coli*. Pada *S. aureus* mempunyai daya hambat minimum pada konsentrasi ekstrak 400 mg/ml (Wisdom *et al* 2014). Penelitian lain juga menunjukkan adanya daya hambat terhadap *S. aureus* pada konsentrasi 1000 µg/ml (Oyedeji *et al* 2015). Adanya aktifitas daya hambat ini dikaitkan dengan senyawa yang terkandung dalam ekstrak daun sirsak, senyawa tersebut antara lain flavonoid, tanin dan saponin (Vijayameena *et al* 2013).

Banyak penelitian yang telah dilakukan mengenai adanya daya hambat ekstrak daun sirsak pada beberapa bakteri, namun hingga saat ini belum ada pengujian aktivitas daun sirsak pada bakteri resisten seperti MRSA.

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang diatas maka perumusan masalah dalam penelitian ini sebagai berikut :

Pertama, apakah ekstrak etanol 70% daun sirsak konsentrasi 25%, 50% dan 75% memiliki aktivitas antibakteri terhadap MRSA ?

Kedua, berapakah nilai KBM dari ekstrak etanol 70% daun sirsak sebagai antibakteri terhadap MRSA ?

C. Tujuan Penelitian

Pertama, untuk mengetahui adanya aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol 70% daun sirsak konsentrasi 25%, 50% dan 75% terhadap MRSA.

Kedua, untuk mengetahui nilai KBM dari ekstrak etanol 70% daun sirsak sebagai antibakteri terhadap MRSA.

D. Kegunaan Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi dasar ilmiah penggunaan daun sirsak sebagai obat tradisional khususnya sebagai antibakteri terutama terhadap MRSA dan dapat menambah informasi tentang sumber obat alami dari tumbuhan yang terdapat di Indonesia.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman Sirsak

1. Sistematika tanaman

Kedudukan dalam sistematika tumbuhan (taksonomi), tanaman sirsak mempunyai klasifikasi sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Sub Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Bangsa	: Ranunculales
Suku	: Annonaceae
Marga	: Annona
Jenis	: <i>Annona muricata</i> Linn (Depkes 2001).

Nama lain dari sirsak di berbagai daerah adalah deureujan belanda (Aceh), tarutung belanda (Bataktoha), durio olandra (Nias), durian bawawi (Minangkabau), jambu landa (Lampung), durian belanda (Melayu), nangka walanda (Sunda), sirsak (Jawa tengah), nangka boris (Madura), srikaya jawa (Bali), diam blade (Kenya), naka (Flores), naka loanda (Buru), durian (Halmahera) (Depkes 1989).

2. Morfologi tanaman sirsak

Fisiologi tanaman sirsak secara umum adalah pohon, tinggi mencapai 8 m dengan batang yang berkayu, bercabang dan berwarna coklat kotor, daunnya berbentuk tunggal, ujung meruncing, tepi pangkal meruncing, panjangnya 6-18 cm, lebar 2-6 cm, pertulangan menyirip berwarna hijau kekuningan atau hijau. Bunga berbentuk tunggal pada batang dan ranting, daun kelopak kecil berwarna kuning keputih-putihan, benang sari banyak mahkota berdaging dan berbentuk bulat telur. Buahnya majemuk berbentuk bulat telur dengan panjang 15-35 cm berdiameter 5-10 cm dan berwarna hijau. Biji berbentuk bulat telur, keras dan berwarna hitam. Akar berbentuk tunggang, bulat dan berwarna coklat muda (Depkes 2001).

3. Khasiat tanaman

Tanaman sirsak berkhasiat sebagai antikanker, antidiabetes, antibakteri, antijamur, emetik, sedatif, digestif, analgetik, dan antimitogenik. Di Malaysia memanfaatkan daun sirsak sebagai obat hipertensi. Daun sirsak yang digunakan sebagai bahan berkhasiat obat yang mampu menurunkan dan mempertahankan kadar gula darah dalam batas normal (Depkes 2001).

4. Kandungan kimia daun sirsak

4.1. Flavonoid. Mekanisme kerja flavonoid sebagai antimikroba dapat dibagi menjadi tiga yaitu menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi membran sel dan menghambat metabolisme energi. Mekanisme kerja flavonoid menghambat fungsi membrane sel adalah membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga dapat merusak membran sel bakteri dan diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler. Flavonoid dapat menghambat metabolisme energi dengan cara menghambat penggunaan oksigen oleh bakteri. Flavonoid menghambat pada sitokrom C reduktase sehingga pembentukan metabolisme terhambat (Cushnie *et al* 2005).

4.2. Saponin. Saponin yang merupakan produk glikosida alam . Mekanisme kerja saponin sebagai antibakteri adalah menurunkan tegangan permukaan sehingga mengakibatkan naiknya permeabilitas atau kebocoran sel dan mengakibatkan senyawa intraseluler akan keluar. Senyawa ini berdifusi melalui membran luar dan dinding sel yang rentan, lalu mengikat membran sitoplasma dan mengganggu dan mengurangi kestabilan itu. Hal ini menyebabkan sitoplasma bocor keluar dari sel yang mengakibatkan kematian sel (Nuria *et al* 2009).

4.3. Tanin. Tanin merupakan senyawa fenol yang larut dalam air dan memiliki berat molekul antara 500 sampai 3000 Dalton (Ismarani 2012). Tannin memiliki aktifitas antibakteri yang berhubungan dengan kemampuannya untuk menginaktifkan adhesin sel mikroba juga menginaktifkan enzim, dan mengganggu transport protein pada lapisan dalam sel. Tanin juga mempunyai target pada polipeptida dinding sel sehingga pembentukan dinding sel menjadi kurang sempurna. Hal ini menyebabkan sel bakteri menjadi lisis karena tekanan osmotik maupun fisik sehingga sel bakteri akan mati (Nuria *et al* 2009).

B. Simplisia

1. Pengertian simplisia

Simplisia adalah bahan alamiah yang dipergunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apapun juga dan kecuali dinyatakan lain, berupa bahan yang telah dikeringkan. Simplisia nabati adalah simplisia yang berupa tanaman utuh, bagian tanaman atau eksudat tanaman dengan tingkat kehalusan tertentu. Simplisia hewani adalah simplisia yang berupa hewan utuh, atau zat-zat berguna yang dihasilkan oleh hewan dan berupa bahan kimia murni. Simplisia pelikan (mineral) adalah simplisia yang berupa tanaman pelikan (mineral) yang belum diolah atau telah diolah dengan cara sederhana dan belum berupa bahan kimia murni. Simplisia harus memenuhi persyaratan minimal untuk menjamin keseragaman senyawa aktif, kemampuan maupun kegunaannya. Faktor yang mempengaruhi yaitu bahan baku simplisia, proses pembuatan simplisia termasuk cara penyimpanan bahan baku simplisia dan cara pengepakan (Depkes 1995).

2. Pencucian dan pengeringan simplisia

Pencucian dilakukan untuk memisahkan kotoran atau bahan asing lainnya dari bahan simplisia. Pencucian dilakukan dengan air bersih. Bahan simplisia mengandung zat yang mudah larut dalam air sehingga pencucian harus dilakukan dalam waktu yang secepat mungkin (Depkes 1985).

Tujuan dari pengeringan adalah untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak, sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lebih lama. Penurunan mutu atau perusakan simplisia dapat dicegah dengan mengurangi kadar air dan menghentikan reaksi enzimatis. Reaksi enzimatis tidak akan berlangsung bila kadar air dalam simplisia kurang dari 10% (Depkes 1985).

Pengeringan secara alamiah dapat dilakukan dengan panas sinar matahari langsung. Cara ini dilakukan untuk mengeringkan bagian tanaman yang relatif keras seperti kayu, biji dan simplisia dengan kandungan senyawa aktif yang relatif stabil apabila terkena panas. Pengeringan alamiah lainnya adalah dengan cara diangin-anginkan dan tidak dipanaskan di bawah sinar matahari langsung. Cara ini terutama untuk mengeringkan bagian tanaman yang lunak seperti bunga dan daun. Pengeringan simplisia yang dilakukan menggunakan alat pengering yang

harus diperhatikan adalah jenis bahan, suhu pengeringan, dan waktu pengeringan, sehingga simplisia tidak mudah rusak dan kandungan kimia yang berkhasiat tidak berubah karena proses fermentasi. Dasar tempat yang digunakan kedua metode diatas mempunyai dasar berlubang seperti anyaman bambu dan sebagainya. Dasar tempat tidak boleh berbahan dari logam karena logam akan bereaksi dan merusak senyawa aktif tertentu (Depkes 1985).

C. Metode Penyarian

1. Ekstraksi

Ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Depkes 2000). Pemilihan pelarut sangat penting dalam proses ekstraksi sehingga bahan berkhasiat yang akan ditarik secara sempurna (Farouq 2003).

Ekstrak tumbuhan obat yang dibuat dari simplisia nabati dapat dipandang sebagai bahan awal, bahan antara atau bahan produk jadi. Ekstrak sebagai bahan awal dianalogkan dengan komoditi bahan baku obat yang dengan teknologi fitofarmasi diproses menjadi produk jadi. Ekstrak sebagai bahan antara berarti masih menjadi bahan yang dapat diproses lagi menjadi fraksi-fraksi, isolat senyawa tunggal atau sebagai campuran dengan ekstrak lain. Ekstrak sebagai produk jadi berarti ekstrak yang berada dalam sediaan obat jadi siap digunakan oleh penderita (Depkes 2000).

2. Maserasi

Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Prinsip metode ini adalah pencapaian konsentrasi pada keseimbangan. Maserasi kinetik berarti dilakukan pengadukan yang kontinu (terus-menerus). Remaserasi berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama, dan seterusnya (Depkes 2000).

Maserasi dapat dilakukan dengan cara memasukkan 10 bagian simplisia dengan derajat halus yang cocok, dimasukkan dalam bejana lalu dituangi dengan 75 bagian cairan penyari, ditutup dan dibiarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya sambil berulang-ulang diaduk, sari kemudian diencerkan dan ampas diperas. Ampas dicuci dengan cairan penyari secukupnya hingga diperoleh 100 bagian. Keuntungan metode maserasi adalah alat yang digunakan sederhana, murah dan mudah dilakukan (Depkes 2000).

3. Pelarut

Pelarut adalah cairan yang digunakan untuk ekstraksi. Pemilihan larutan penyari juga harus memenuhi kriteria yaitu murah dan mudah diperoleh, stabil secara kimia dan fisika, beraksi netral, tidak mudah menguap dan tidak mudah terbakar, selektif yaitu menarik zat berkhasiat yang dikehendaki, tidak mempengaruhi zat berkhasiat. Cairan penyari atau pelarut ada tiga macam yaitu pelarut polar, semi polar dan non polar, contoh cairan penyari adalah air, etanol, etanol-air dan air (Depkes 2000).

Etanol digunakan sebagai larutan penyari karena lebih selektif, kapang dan kuman kulit tidak dapat tumbuh dalam etanol 20% ke atas, tidak beracun, netral, absorpsinya baik, etanol dapat bercampur dengan air pada skala perbandingan, panas diperlukan lebih sedikit. Etanol dapat melarutkan alkaloid basa, minyak menguap, glikosida, kumarin, flavonoid, antrakuinon, steroid, dan klorofil. (Depkes 2005).

D. Media

Media adalah tempat mikroba untuk tumbuh dan mengambil nutrisi yang diperlukan untuk hidup dan memperbanyak diri. Mikroba dapat tumbuh dan berkembang biak dengan baik jika di dalam media mengandung semua unsur hara yang diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangan mikroba. Media harus mempunyai tekanan osmosa, tegangan permukaan dan pH yang sesuai dengan kebutuhan mikroba. Media harus dalam keadaan steril artinya sebelum ditanami mikroba yang dimaksud, media tersebut tidak ditumbuhi mikroba lain (Abdurahman 2008).

Konsistensi media dapat dibuat bermacam-macam berdasarkan pada keperluannya. Media terdapat tiga bentuk yaitu media cair, padat, dan setengah padat. Media cair (liquid media) dapat digunakan pembiakan organisme dalam jumlah besar, fermentasi dan berbagai uji. Media padat (solid media) digunakan untuk mengamati bentuk dan morfologi koloni serta mengisolasi biakan murni. Media setengah padat (semisolid media) digunakan untuk menguji ada atau tidaknya motilitas dan kemampuan fermentasi (Sriyanti dan Wijayani 2008).

E. Sterilisasi

Sterilisasi adalah suatu proses untuk mematikan semua organisme yang terdapat di dalam suatu benda. Tiga cara utama yang umum dipakai dalam sterilisasi, yaitu penggunaan panas, penggunaan bahan kimia, dan penyaringan (filtrasi). Pemilihan metode sterilisasi didasarkan pada sifat bahan yang akan disterilkan.

Sterilisasi panas lembab atau sterilisasi basah adalah panas yang digunakan bersama-sama dengan uap air. Sterilisasi basah biasanya digunakan di dalam autoclave (pressure cooker) berukuran besar atau sterilisator uap yang mudah diangkat (portable) dengan menggunakan uap air jenuh bertekanan 1 atm pada suhu 121°C selama 15 menit. Panas lembab sangat efektif karena uap air berkondensasi pada bahan – bahan yang disterilkan, dilepaskan panas sebanyak 686 kalori per gram uap air pada suhu 121°C . Panas tersebut mendenaturasi atau mengkoagulasikan protein pada organisme hidup dan dengan demikian dapat membuat organisme tersebut mati (Hadioetomo 1985).

Sterilisasi panas kering adalah panas yang digunakan tanpa kelembaban. Sterilisasi panas kering kurang efisien dan membutuhkan suhu lebih tinggi serta waktu yang lebih lama untuk sterilisasi, hal ini disebabkan karena tanpa kelembaban tidak ada panas laten. Bahan-bahan yang biasa disterilkan dengan cara ini antara lain bahan pecah belah (pipet, tabung reaksi, cawan petri dari kaca, botol sampel, jarum suntik), dan bahan-bahan yang tidak tembus uap (gliserin, minyak, vaselin, dan bahan-bahan berupa bubuk) (Hadioetomo 1985).

Sterilisasi secara kimia yaitu penggunaan desinfektan, larutan alkohol, larutan formalin dan sterilisasi secara mekanik yaitu penggunaan saringan atau filter untuk bahan yang akibat pemanasan tinggi atau tekanan tinggi mengalami perubahan atau penguraian (Hadioetomo 1985).

F. *Staphylococcus aureus*

1. Sistematika *Staphylococcus aureus*

Menurut G.M. Garrity dkk (2007) sistematika ilmiah dari bakteri *Staphylococcus aureus* sebagai berikut :

Kingdom	: Bakteria
Filum	: Firmicutes
Class	: Bacili
Ordo	: Bacillales
Famili	: Staphylococcaceae
Genus	: Staphylococcus
Species	: <i>Staphylococcus aureus</i>

2. Morfologi dan identifikasi

Staphylococcus adalah bakteri berbentuk bulat dengan diameter kira-kira 1 μm , tersusun dalam kelompok tidak teratur. *Staphylococcus* tidak bergerak karena tidak mempunyai flagella dan tidak membentuk spora. *Staphylococcus* tumbuh dengan mudah pada sebagian besar media bakteriologis dalam kondisi aerob maupun mikroaerofilik. Tumbuh paling cepat pada suhu 37°C. Koloni pada medium padat berbentuk bulat, halus, menonjol dan berkilauan, *S. aureus* membentuk pigmen berwarna abu-abu hingga kuning emas pekat (Jawetz *et al* 2012).

S. aureus dapat meragikan banyak karbohidrat dengan lambat, menghasilkan asam laktat tetapi tidak menghasilkan gas. Aktivitas proteolitik sangat bervariasi, tetapi katalase dihasilkan secara tetap. *S. aureus* relatif resisten terhadap pengeringan dan terhadap panas (tahan pada suhu 50°C selama 30 menit). *Staphylococcus* mempunyai sensitivitas bervariasi terhadap banyak obat antimikroba. Resistensi terjadi yang pertama dengan memproduksi betalaktamase

di bawah kontrol plasmid, dan membuat organisme resisten terhadap banyak penisilin. Resistensi yang kedua tidak tergantung pada produksi betalaktamase, melainkan resistensi yang diatur oleh suatu urutan gen yang ditemukan pada regio kromosom yang disebut *staphylococcal cassette chromosom mec* (SCCmec), biasanya bakteri akan resisten terhadap nafsilin, metisislin dan oksasilin (Jawezt *et al* 2012).

3. Patogenesis

S. aureus cenderung menghasilkan koagulase dan pigmen kuning bersifat hemolitik dan meragikan manitol. *S. aureus* menetap pada folikel rambut menimbulkan nekrosis jaringan. Infeksi stafilokok terlokalisasi tampak sebagai jerawat, infeksi folikel rambut, atau abses. Biasanya terdapat suatu reaksi inflamasi hebat, mengalami supurasi sentral, dan dapat sembuh dengan cepat jika pus didrainase. Infeksi *S. aureus* dapat juga akibat kontaminasi langsung suatu luka, misalnya infeksi luka pasca bedah atau infeksi sesudah trauma (osteomielitis kronis setelah fraktur terbuka, meningitis sesudah fraktur tulang tengkorak) (Jawezt *et al* 2012).

G. Antibakteri

1. Definisi

Antibakteri adalah suatu zat atau senyawa yang dapat menekan atau membunuh pertumbuhan atau reproduksi bakteri. Senyawa atau zat yang digunakan untuk membasmi bakteri penyebab infeksi pada manusia, harus memiliki sifat toksisitas selektif setinggi mungkin, artinya senyawa tersebut harus bersifat sangat toksik terhadap bakteri tetapi relatif tidak toksik untuk hospes. Berdasarkan sifat toksisitas selektif, ada antibakteri yang bersifat menghambat pertumbuhan bakteri yang dikenal sebagai zat bakteristatik dan ada yang bersifat membunuh bakteri yang dikenal sebagai zat bakterisid. Kadar minimal yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan mikroba atau membunuhnya masing-masing dikenal sebagai Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM) (Ganiswarna 2007).

2. Mekanisme kerja antibakteri

Mekanisme kerja dari aktivitas senyawa antibakteri diantaranya ada 5 mekanisme yaitu :

Pertama, mengganggu metabolisme mikroba, mikroba membutuhkan asam folat untuk kelangsungan hidupnya, bakteri patogen harus mensintesis sendiri asam folat dari Para Amino Benzoic Acid (PABA) untuk kebutuhan hidupnya. Antimikroba bila bersaing dengan PABA dalam pembentukan asam folat, maka terbentuk analog asam folat non fungsional sehingga kebutuhan akan asam folat tidak terpenuhi dan bisa menyebabkan bakteri mati (Ganiswarna 2005). Contoh antibakteri yang bekerja menghambat metabolisme sel bakteri adalah sulfonamida dan trimetoprim (Bakung 2014).

Kedua, menghambat sintesis dinding sel bakteri, dinding sel bakteri terdiri atas polipeptidoglikan yaitu suatu kompleks polimer mukopeptida (glikopeptida). Struktur dinding sel dapat rusak dengan cara menghambat pembentukannya atau mengubahnya setelah terbentuk. Kerusakan dinding sel bakteri akan menyebabkan terjadinya lisis (Ganiswarna 2005). Contoh antibakteri golongan ini antara lain yaitu penisilin, sefalosporin, vankomisin, basitrasin (Radji 2002).

Ketiga, mengganggu permeabilitas membran sel bakteri, selaput sel berguna sebagai penghalang yang selektif, meloloskan beberapa zat yang terlarut dan menahan zat-zat yang terlarut lainnya. Kerusakan membran sel menyebabkan keluarnya berbagai komponen penting dari dalam sel mikroba yaitu protein, asam nukleat, nukleotida dan lain-lain (Ganiswarna 2005). Contohnya polimiksin, nistatin, golongan makrolida dan poliena (misal amfoterisin B) (Radji 2002).

Keempat, menghambat sintesis protein sel bakteri, bakteri perlu mensintesis berbagai protein untuk kelangsungan hidupnya. Sintesis protein berlangsung di ribosom dengan bantuan mRNA dan tRNA. Salah satu kerja antibakteri adalah menyebabkan kode pada mRNA salah dibaca oleh tRNA pada waktu sintesis protein yang abnormal dan fungsional bagi sel mikroba. Antibakteri yang termasuk dalam golongan ini yaitu aktinomisin, rifampisin, streptomisin, tetrasiklin, kloramfenikol, eritromisin, klindamisin, dan gentamisin (Radji 2002).

Kelima, menghambat sintesis atau merusak asam nukleat sel bakteri. Antibakteri yang memiliki mekanisme kerja ini pada umumnya bersifat toksik kurang selektif, karena antibakteri ini bersifat sitotoksik yang masih dapat diterima sebagai antibakteri (Ganiswarna 2005). Antibakteri yang termasuk dalam golongan ini antara lain asam nalidiksat dan golongan kuinolon (Radji 2002).

3. Mekanisme resistensi

Resistensi didefinisikan sebagai keadaan tidak terhambatnya pertumbuhan bakteri dengan pemberian antibiotik secara sistemik dengan dosis normal yang seharusnya atau kadar hambat minimalnya. Terdapat banyak mekanisme yang mungkin menyebabkan terjadinya resistensi obat pada mikroorganisme. Pertama, mikroorganisme menghasilkan enzim yang dapat merusak zat aktif dari suatu antibiotik. Contohnya adalah *Staphylococcus* yang resisten terhadap penisilin G menghasilkan suatu betalaktamase yang merusak obat. Betalaktamase lain dihasilkan oleh batang Gram negatif. Kedua, mikroorganisme mengubah permeabilitas mereka terhadap obat. Contohnya adalah resistensi terhadap tetrasiklin, polimiksin, amikasin dan beberapa aminoglikosida. Ketiga, mikroorganisme suatu target struktural yang telah dimodifikasi untuk obat. Contohnya adalah organisme resisten eritromisin memiliki suatu reseptor yang termodifikasi pada subunit 50S ribosom, sebagai hasil dari metilasi RNA ribosomal 23S. Resistensi terhadap sebagian penisilin dan sefalosporin merupakan akibat termodifikasinya PBP. Keempat, mikroorganisme mengembangkan suatu jalur metabolik termodifikasi yang memintas reaksi yang dihambat oleh obat. Contohnya adalah beberapa bakteri resisten sulfonamida tidak memerlukan PABA ekstrasel, tetapi seperti sel mamalia dapat menggunakan asam folat yang telah dibentuk. Kelima, bakteri membentuk suatu enzim termodifikasi yang masih dapat melakukan fungsi metaboliknya, tetapi jauh lebih tidak dipengaruhi obat (Jawezt *et al* 2012).

Resistensi sel mikroba adalah suatu sifat tidak terganggunya sel mikroba oleh antimikroba. Ada empat tipe asal resistensi obat menurut Cesur yaitu pertama, *natural resistance* (resistensi alamiah). Resistensi jenis ini disebabkan oleh karakteristik struktural bakteri dan tidak terkait dengan penggunaan

antibiotik. Hal ini berkembang sebagai akibat dari resistensi alami, atau mikroorganisme tidak termasuk dalam sasaran antibiotik, atau antibiotik tidak mencapai target karena karakteristiknya. Sebagai contohnya, pemberian vankomisin pada bakteri Gram negatif, hasilnya vankomisin tidak dapat melewati membran sel bakteri sehingga bakteri Gram negatif resisten terhadap vankomisin.

Kedua, *acquired resistance* (resistensi yang diperoleh), merupakan resistensi yang diperoleh sebagai akibat dari perubahan karakteristik genetik dari bakteri. Resistensi ini terjadi akibat tidak berpengaruhnya antibiotik yang sebelumnya masih responsif. Resistensi ini terutama terjadi karena struktur kromosomal atau ekstrakromosomal (plasmid, transposon, dll). Resistensi kromosomal timbul dari mutasi spontan kromosom bakteri. Mutasi tersebut dapat terjadi karena faktor kimia dan faktor fisika. Hal ini dapat menyebabkan perubahan struktur sel bakteri, sehingga dapat menyebabkan menurunnya permeabilitas obat atau mengubah target obat pada sel.

Resistensi ekstrakromosomal adalah resistensi yang tergantung pada elemen genetik ekstrakromosomal yang dapat ditransfer melalui berbagai cara seperti plasmid. Plasmid adalah ekstrakromosomal fragmen DNA yang dapat mereplikasi secara independen dari kromosom. Gen plasmid biasanya bertanggung jawab mengontrol pembentukan enzim yang mampu merusak antimikroba. Kelompok plasmid yang membawa gen resistensi disebut faktor R. Faktor R dipindahkan dari bakteri satu ke bakteri lain dengan tiga cara yaitu transformasi, transduksi, dan konjugasi.

Ketiga, Resistensi silang. Resistensi silang adalah keadaan resistensi terhadap antimikroba tertentu yang juga memperlihatkan sifat resistensi terhadap antimikroba lain. Biasanya terjadi antara antimikroba yang memiliki struktur kimia yang hampir sama (derivat tetrasiklin) atau antara antimikroba dengan struktur kimia yang berbeda dengan mekanisme aksi yang hampir sama.

Keempat, *Multi-drug* resisten dan *pan* resisten. Organisme *multi-drug* resisten biasanya adalah bakteri yang menjadi resisten terhadap antibiotik yang dipakai untuk mengobatinya. Ini berarti obat tertentu tidak lagi mampu membunuh atau menghambat bakteri. Resistensi *multi-drug* pada bakteri dapat

terjadi dengan dua mekanisme. Pertama, bakteri mengakumulasi beberapa gen, masing-masing mengkode resistensi terhadap obat tunggal. Kedua, resistensi terjadi karena peningkatan ekspresi pengkodean gen. Jika strain bakteri mengalami resisten terhadap tiga atau lebih antibiotik ini dianggap sebagai *multi-drug* resisten. Jika strain hanya peka terhadap satu atau dua antibiotik saja maka dianggap sebagai ekstensif *drug* resisten. Jika strain mengalami resisten terhadap semua golongan antibiotik maka dianggap sebagai *pan* resisten (Cesur *et al* 2013).

4. Resistensi terhadap betalaktam

S. aureus berubah menjadi galur resisten metisilin (MRSA) karena mendapat sisipan suatu elemen DNA berukuran besar antara 20-100 kb yang disebut *staphylococcal cassette chromosome mec* (SCC*mec*). SCC*mec* selalu mengandung *mecA* yaitu gen yang menyandi PBP2a yang mendasari resistensi MRSA. Resistensi MRSA terhadap metisilin dan terhadap semua antimikroba golongan betalaktam disebabkan perubahan pada protein binding penicillin (PBP) yang normal yaitu PBP2 menjadi PBP2a. PBP2a memiliki afinitas yang sangat rendah terhadap betalaktam sehingga sekalipun bakteri ini dibiakan pada medium mengandung konsentrasi tinggi betalaktam, MRSA tetap dapat hidup dan mensintesa dinding sel (tumbuh). Eksplorasi pada struktur PBP 2a menunjukkan adanya perubahan pada situs pengikatan (binding site) yang mengakibatkan rendahnya afinitas (Memmi *et al* 2008).

Protein binding penicillin adalah sekelompok protein yang terlibat dalam biosintesa peptidoglikan yaitu mengkatalisa reaksi transpeptidasi (pembentukan anyaman peptida). Peptidoglikan *Staphylococcus* memiliki ciri khas berukuran panjang, berupa struktur anyaman (cross linkage) dengan rantai samping pentaglisin yang fleksibel. Peptidoglikan ini menjadi target antimikroba betalaktam. Resistensi terjadi karena produksi enzim betalaktamase seperti pada galur *S. aureus producing betalactamases* dan perubahan pada struktur PBP seperti yang terjadi pada MRSA. PBP 1, 2 dan 3 memiliki aktifitas transpeptidase primer sedangkan PBP 4 memiliki aktifitas transpeptidase sekunder. Reaksi lain dalam pembentukan peptidoglikan adalah transglikosilasi yang tidak berhubungan dengan *penicillin binding activity* (tidak berhubungan dengan reseptor penisilin).

PBP2 memiliki aktifitas unik yaitu selain sebagai enzim transpeptidase ternyata juga memiliki aktifitas transglikosilase. Afinitas PBP2a yang sangat rendah terhadap betalaktam mengakibatkan antimikroba ini tidak dapat mempengaruhi reaksi transpeptidasi. Selain itu karena aktifitas transglikosilasi PBP2a sama sekali tidak terpengaruh oleh betalaktam maka diduga resistensi MRSA juga ditentukan oleh keutuhan fungsi transglikosilasi dari PBP2a ini (Memmi *et al* 2008).

Secara fenotipik resistensi MRSA bersifat heterogen artinya dalam satu biakan, nilai MIC sangat bervariasi tergantung tipe SCC mec yang dikandungnya. Ekspresi resistensi MRSA juga dipengaruhi konsentrasi paparan betalaktam. Pada kondisi terdapat betalaktam maka nilai MIC akan mendekati nilai sensitif. Syarat mutlak resistensi MRSA adalah adanya PBP2a meskipun dalam jumlah minimal, tetapi ternyata peningkatan produksi PBP2a tidak berkorelasi dengan homogenitas resistensi. Sepasang galur MRSA dengan *mecA* yang sama dan produksi PBP2a yang juga sama tinggi ternyata menghasilkan ekspresi resistensi yang berbeda. Faktor genetik lain seperti gen betalaktamase dan faktor eksternal seperti temperatur, osmolaritas, kandungan ion, tekanan oksigen dan cahaya juga mempengaruhi ekspresi resistensi (Horne *et al* 2009).

H. Metode Pengujian Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri suatu zat digunakan untuk mengetahui apakah zat tersebut dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri uji. Aktivitas antibakteri dapat dilakukan dengan dua metode yaitu:

Pertama, metode difusi. Metode ini dapat dilakukan dengan menggunakan cakram (disk) kertas, sumuran atau silinder tidak beralas. Metode dengan sumuran atau silinder, dilakukan dengan memasukkan larutan uji dengan konsentrasi tertentu ke dalam sumuran. Metode cakram kertas saring berisi sejumlah obat yang ditempatkan pada permukaan medium padat, medium sebelum digunakan diolesi bakteri uji. Diameter zona hambat sekitar cakram yang digunakan untuk mengukur kekuatan hambat obat. Metode difusi agar dipengaruhi oleh faktor fisika kimia, faktor antar obat dan organisme (Jawetz *et al* 2005).

Kedua, metode dilusi. Metode ini dilakukan dengan mencampur secara homogen suatu obat dalam media dengan jumlah atau konsentrasi yang berbeda-beda, masing-masing media ditambahkan suspensi kuman kemudian diinkubasi dan diamati daerah media yang jernih (Bonang & Koeswoyo 1982). Metode ini menggunakan antimikroba dengan kadar yang menurun secara bertahap pada media cair maupun padat. Media diinokulasikan terhadap bakteri uji, selanjutnya diinkubasi dan diamati konsentrasi antimikroba yang mampu menghambat pertumbuhan atau membunuh bakteri uji. Keuntungan metode ini adalah memberikan hasil kualitatif yang menunjukkan jumlah antimikroba yang dibutuhkan untuk mematikan bakteri (Jawetz *et al* 2005).

I. Vankomisin

Vankomisin merupakan glikopeptida trisiklik yang rumit dan tidak lazim dengan massa molekul sekitar 1500 dalton. Vankomisin diindikasikan untuk pengobatan infeksi parah yang disebabkan oleh MRSA. Biasanya pasien yang alergi penisilin, pasien yang tidak dapat menerima atau yang telah gagal menggunakan obat-obatan lain, termasuk penisilin atau sefalosporin, dan untuk infeksi yang disebabkan oleh organisme yang sensitif terhadap vankomisin yang resisten terhadap obat antimikroba lain. Vankomisin efektif dalam pengobatan stafilokokal endokarditis. Efektivitas vankomisin telah didokumentasikan dalam infeksi lain karena *Staphylococci*, termasuk septikemia, infeksi tulang, infeksi saluran pernafasan bawah, kulit, dan infeksi struktur kulit. Antibiotik vankomisin digunakan sebagai tambahan pada pembedah. Vankomisin efektif digunakan dalam tunggal atau dalam kombinasi dengan suatu aminoglikosida untuk endokarditis disebabkan oleh *Streptococcus viridians* atau *S. bovis*. Untuk endokarditis disebabkan oleh *Enterococci* (misalnya *E. faecalis*), vankomisin efektif hanya dalam kombinasi dengan aminoglikosida.

Dosis harian intravena adalah 2 g dibagi dalam 500 mg setiap 6 jam atau 1 g setiap 12 jam. Setiap dosis harus diberikan selama minimal 60 menit. Efek samping vankomisin antara lain hipotensi, bunyi pada pernapasan, dispnea, urtikaria, atau pruritus, kemerahan tubuh bagian atas (leher merah) atau nyeri dan

spasme otot dada, dan punggung. Vankomisin bersifat bakterisida, dengan mekanisme penghambatan biosintesis dinding sel. Selain itu, vankomisin mengubah membran bakteri sel permeabilitas dan sintesis RNA (Good dan Gilman 2010).

J. Landasan Teori

Meticillin resistant Staphylococcus aureus atau lebih dikenal dengan MRSA adalah jenis bakteri *S. aureus* yang telah mengalami resisten terhadap antibiotik metisilin dan beberapa antibiotik golongan betalaktam lainnya. MRSA dapat hidup tanpa membahayakan pada kulit atau hidung seseorang, namun pada kondisi tertentu bakteri ini dapat masuk ke dalam tubuh dan dapat menyebabkan infeksi seperti infeksi luka, kulit, mata dan infeksi pada saluran urin. Pemilihan terapi pada infeksi MRSA tentu menjadi lebih sulit dibanding dengan infeksi oleh *S. aureus*, karena MRSA telah mengalami resistensi pada beberapa antibiotik. Penelitian yang dilakukan oleh Kumar dkk (2016) menyatakan bahwa resistensi terbesar terjadi pada antibiotik ampicilin (82,35%), ciprofloksasin (70,58%), kotrimoksazol (58.82%), sefiksime (52.94%), doksisisiklin (41.17%), ofloksasin (35.29%) (Kumar *et al* 2016).

Mekanisme utama *S. aureus* resisten terhadap metisilin terjadi melalui pembentukan *Protein binding penicillin* (PBP) yang sudah dimodifikasi menjadi PBP2a oleh *mecA*. PBP ikut berperan dalam biosintesis peptidoglikan yang mengkatalisa reaksi transpeptidasi, dimana peptidoglikan tersebut merupakan tempat di mana antibiotik betalaktam bekerja. PBP2a memiliki afinitas yang sangat rendah terhadap betalaktam, sehingga PBP2a ini dapat mengambil tempat PBP ketika pembentukan dinding sel setelah dihambat oleh betalaktam (Memmi *et al* 2008).

Bakteri mempunyai lapisan luar yang kaku yang disebut dinding sel. Dinding sel terdapat pada baik bakteri Gram (+) maupun bakteri Gram (-). Dinding ini berfungsi mempertahankan bentuk sel dari perbedaan tekanan osmotik internal dan eksternal yang sangat tinggi. Pada kedua bakteri mempunyai suatu lapisan yang bernama peptidoglikan. Lapisan ini berfungsi mensintetis

dinding bakteri melalui reaksi yang disebut transpeptidasi. Lapisan ini lebih tebal pada bakteri Gram (+) dan pada Gram (-) di antara peptidoglikan dan dinding terdapat lapisan membran lemak sehingga terdapat gambaran membran bilayer. Proses penghambatan sintesis dinding bakteri dapat melalui 2 jalur. Jalur pertama berasal dari penghambatan proses transpeptidasi. Semua obat β -laktam dapat menghambat proses ini. Jalur berikutnya adalah golongan glikopeptida dengan mekanisme kerja melalui penghambatan sintesis peptidoglikan (Yim *et al* 2014).

Antibiotik yang diketahui masih peka terhadap MRSA adalah vankomisin. vankomisin merupakan antibiotik glikopeptida bekerja dengan mengikat *N-acyl-D-Ala-D-Ala* peptidoglikan dan prekursor lipid II. Pengikatan tersebut secara efektif menghambat substrat enzim yang berperan penting pada sintesis dinding sel bakteri. Hal tersebut menyebabkan dinding sel bakteri bersifat kaku, lemah dan tidak mampu untuk tumbuh hingga menyebabkan kematian sel bakteri (Yim *et al* 2014).

Penggunaan antibiotik yang semakin meningkat dan beresiko terjadinya resistensi jika dikonsumsi secara tidak tepat telah mendorong banyak peneliti untuk menemukan antibakteri dari bahan alam. Salah satunya adalah tanaman sirsak. Daun sirsak mempunyai kandungan kimia seperti flavonoid, alkaloid, saponin, tanin. Aktivitas antibakteri dari daun sirsak dikaitkan dengan kandungan fenolik pada flavonoid akan membentuk kompleks dengan protein ekstraseluler dan dinding sel bakteri, sehingga akan merusak pertahanan bakteri. Aktivitas antibakteri daun sirsak telah dilakukan pada beberapa bakteri seperti *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *S. typhi* (Oyedeji *et al* 2014). Penelitian Abdulsalami dkk (2016) menyatakan bahwa ekstrak etanol daun sirsak mampu menghambat *S. aureus* pada konsentrasi 400 mg/ml dengan diameter zona hambat 16,67 mm. Adanya aktivitas antibakteri ekstrak daun sirsak pada *S. aureus* mendorong peneliti untuk melakukan pengujian ekstrak etanol daun sirsak terhadap bakteri *S. aureus* tetapi pada strain yang telah mengalami resisten terhadap antibiotik seperti bakteri MRSA.

Pada penelitian ini, penentuan aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun sirsak terhadap bakteri MRSA menggunakan metode difusi dan dilusi, sedangkan

untuk memperoleh ekstrak daun sirsak dilakukan maserasi dengan pelarut etanol 70%. Penelitian lain, ekstrak etanol 70% daun sirsak memiliki rendemen yang lebih baik (29,00%) dibanding dengan etanol 50% (21,33%) dan etanol 96% (24,33%) (Fathurrachman 2014).

Media yang digunakan pada metode difusi adalah *Mueller Hinton Agar* (MHA). Bakteri yang telah diinokulasi pada media *Mueller Hinton Agar* (MHA) kemudian diberi ekstrak etanol 70% daun sirsak dengan konsentrasi 25%, 50%, 75%. Diameter zona hambat diukur dari area jernih yang terlihat disekitar cakram. Diameter zona hambat pada ekstrak uji dibandingkan dengan diameter zona hambat pada vankomisin, oksasilin dan sefoksitin. Konsentrasi ekstrak uji yang menunjukkan diameter zona hambat terbesar dilanjutkan dengan metode dilusi.

K. Hipotesis

Berdasarkan permasalahan yang ada, maka hipotesis dalam penelitian ini adalah :

Pertama, ekstrak etanol 70% daun sirsak konsentrasi 25%, 50% dan 75% mempunyai aktivitas antibakteri terhadap MRSA.

Kedua, nilai KBM dari hasil ekstrak etanol 70% daun sirsak dalam membunuh MRSA ditentukan dari hasil penelitian.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirsak yang diambil dari daerah Sukoharjo Kabupaten Sukoharjo Jawa Tengah.

2. Sampel

Sampel adalah suatu bagian dari populasi yang ada atau bagian yang diambil dengan kriteria tertentu, sehingga memenuhi syarat random dan representatif. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirsak yang masih segar, berwarna hijau, tidak terlalu muda yang berkedudukan 3-4 nodus dari ujung, diambil sekitar bulan Januari 2017.

B. Variabel penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dari penelitian ini adalah ekstrak daun sirsak hasil maserasi dengan pelarut etanol 70% yang diuji daya antibakterinya terhadap kultur bakteri MRSA.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel kendali, dan variabel tergantung.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas untuk penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak daun sirsak.

Variabel kendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung, sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel kendali dalam penelitian

ini adalah metode ekstraksi, kemurnian bakteri, penyimpanan isolat bakteri, laboratorium, peneliti, sterilitas, media, peralatan, serta pekerjaan aseptis sehingga tidak terjadi kontaminasi.

Variabel tergantung adalah titik pusat permasalahan pilihan dalam penelitian ini. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah diameter daya hambat dari ekstrak daun sirsak dengan konsentrasi ekstrak yang berbeda-beda terhadap bakteri MRSA.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun sirsak adalah seluruh daun pada tanaman sirsak yang masih segar, berwarna hijau, tidak terlalu muda yang berkedudukan 3-4 nodus dari ujung diambil sekitar bulan Januari 2017 di daerah Sukoharjo Jawa Tengah.

Kedua, serbuk daun sirsak adalah simplisia kering daun sirsak yang dihaluskan dengan penggiling dan diayak dengan ayakan no. 40.

Ketiga, ekstrak etanol daun sirsak adalah hasil ekstraksi daun sirsak dengan pelarut etanol 70% menggunakan metode maserasi, kemudian diuapkan dengan evaporator dan dilanjutkan dengan oven untuk mendapat ekstrak kental.

Keempat, bakteri yang digunakan adalah bakteri MRSA. Bakteri MRSA diperoleh dari laboratorium mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret.

Kelima, uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi. Metode difusi adalah metode uji aktivitas antibakteri pada media MHA dengan meletakkan cakram yang berisi ekstrak uji.

Keenam, metode dilusi adalah metode uji aktivitas antibakteri dengan membuat satu seri pengenceran dalam berbagai konsentrasi yaitu 75%, 37,5%, 18,75%, 9,375%, 4,6875%, 2,34375%, 1,171875%, 0,5859%. Kontrol positif adalah suspensi bakteri dalam media BHI dan kontrol negatif adalah ekstrak daun sirsak yang mempunyai diameter zona hambat terluas.

Ketujuh, Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) adalah konsentrasi terendah yang masih dapat membunuh pertumbuhan bakteri yang ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan bakteri setelah diinokulasi pada media selektif.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat penggiling, timbangan analitik, oven, ayakan nomor 40, inkas, jarum ose, cawan petri, cawan porselin, seperangkat alat gelas laboratorium, kain flanel, kertas saring, lampu spiritus, *waterbath*, *autoclave*, *Moisture Balance*, *Rotary evaporator*, inkubator, kaca objek, dan mikroskop.

2. Bahan

2.1 Bahan sampel. Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirsak dan bakteri MRSA. Media yang digunakan adalah *Mueller Hinton Agar* (MHA), *Brain Heart Infusion* (BHI), *Vogel Johnson Agar* (VJA), dan media agar darah.

2.2 Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 70% sebagai larutan penyari, sitrat, etil asetat, air, aqua destilata, DMSO 1%, *Mc Farland* 0,5, cakram antibiotik vankomisin, cakram antibiotik oksasilin, cakram antibiotik sefoksitin, cakram steril, alkohol 70%, amil alkohol, HCl, CH₃COOH, H₂SO₄, cat kristal violet, larutan lugol, iodin, aseton, safranin, kalium tellurit.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi daun sirsak

Determinasi tanaman dilakukan untuk menetapkan kebenaran sampel tanaman berkaitan dengan ciri-ciri morfologi yang ada pada tanaman terhadap pustaka yang dilakukan di laboratorium biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam (MIPA) Universitas Sebelas Maret Surakarta.

2. Pengambilan sampel

Pengambilan sampel daun sirsak dilakukan pada daun sirsak yang masih segar, berwarna hijau, tidak terlalu muda yang berkedudukan 3-4 nodus dari ujung, diambil sekitar bulan Januari 2017.

3. Pembuatan serbuk daun sirsak

Daun yang telah dipilih kemudian dicuci dengan air untuk membersihkan kotoran yang menempel, ditiriskan dan dikering anginkan (tanpa terkena sinar matahari langsung) selama 4 - 7 hari yang bertujuan untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lama. Simplisia yang telah didapat kemudian dibuat serbuk dan diayak dengan ayakan nomor 40.

4. Kadar lembab serbuk dan ekstrak daun sirsak

Kadar lembab serbuk daun sirsak dilakukan dengan cara serbuk dan ekstrak daun sirsak masing - masing ditimbang sebanyak 2 gram, kemudian diukur kadar lembab dengan menggunakan alat *Moisture Balance*. Suhu yang digunakan adalah 105°C dan waktu pengeringan yaitu 5 menit. *Moisture Balance* merupakan alat pengukur kadar air, prinsipnya pada saat kumparan listrik memanaskan berat sampel secara otomatis dimonitor dan persentase kadar air dihitung, ketika persentase yang termonitor mencapai kestabilan maka alat akan berbunyi dan persentase kadar air sampel ditampilkan. Suhu yang digunakan pada alat ini disesuaikan dengan suhu pada metode oven. Suhu pengeringan untuk penentuan kadar air yang ditetapkan dalam SNI 01-2891-1992 butir 5.1 adalah 105°C dengan waktu pengeringan selama 3 jam. Asumsi dasarnya adalah bahwa air bertitik didih 100°C, sehingga dengan pemanasan 5°C di atas suhu didih air, diharapkan semua air dalam bahan dapat diuapkan. Kelebihan dari alat ini yaitu hasil lebih tepat, waktu lebih cepat, mudah pengoperasiannya, mengurangi *human error* pada saat penimbangan (Kumalasari 2012). Penandaan hasil analisa setelah selesai yaitu sampai diperoleh bobot konstan yang dilakukan penimbangan sebanyak tiga kali. Kadar lembab memenuhi syarat jika kurang dari 10%.

5. Pembuatan ekstrak etanol daun sirsak

Ekstraksi serbuk daun sirsak dilakukan dengan metode maserasi. Serbuk daun sirsak ditimbang 1000 gram lalu dimasukkan ke dalam bejana kemudian ditambahkan etanol 70% dengan perbandingan 10:75. Campuran tersebut didiamkan selama 5 hari dengan sesekali digojog. Filtrat dengan ampas dipisahkan dengan menggunakan kain flanel. Filtrat yang didapat kemudian

dipekatkan dengan *Vacum Rotary evaporator* dengan suhu 40°C dan diuapkan dengan *water bath* sehingga diperoleh ekstrak kental daun sirsak (Depkes 2000).

6. Tes bebas etanol daun sirsak

Ekstrak yang telah pekat diuji bebas etanol dengan cara uji esterifikasi yaitu ekstrak ditambah dengan asam asetat pekat dan asam sulfat pekat kemudian dipanaskan, uji positif bebas etanol ditandai dengan tidak terbentuk bau ester yang khas dari etanol (Praeparandi 2006).

7. Identifikasi kandungan senyawa kimia

Identifikasi kandungan senyawa kimia dilakukan untuk memastikan kebenaran zat kimia yang terkandung di dalam daun. Identifikasi senyawa meliputi senyawa flavonoid, saponin dan tanin.

7.1 Identifikasi flavonoid. Sebanyak 2 mg serbuk, ekstrak, masing - masing ditimbang lalu ditambah dengan 5 mL aquadest lalu dipanaskan selama satu menit, disaring dan diambil filtratnya. Filtrat ditambah 0,1 g serbuk Mg, 2 mL larutan alkohol 95% : asam klorida (1:1) dan pelarut amil alkohol. Campuran ini dikocok kuat-kuat, kemudian dibiarkan memisah. Reaksi positif ditunjukkan dengan warna merah, kuning, jingga, pada amil alkohol (Robinson 1995).

7.2 Identifikasi saponin. 0,5 gram serbuk dan ekstrak, masing-masing dilarutkan pada 10 ml air panas dalam tabung reaksi kemudian dikocok kuat-kuat selama \pm 10 detik. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya busa yang stabil (Depkes 1989).

7.3 Identifikasi tanin. Identifikasi tanin. Serbuk simplisia dan ekstrak masing - masing ditambah dengan 10 mL air panas kemudian dididihkan selama 15 menit dan saring. Filtrat yang diperoleh disebut larutan B. Sebanyak 5 mL larutan B ditambah pereaksi besi (III) klorida 1%. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru kehitaman (Robinson 1995).

8. Sterilisasi

Sterilisasi inkas dengan menggunakan formalin, media yang digunakan disterilkan terlebih dahulu dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Alat-alat dari gelas yang ada ukurannya disterilkan dengan oven pada suhu 170-

180°C selama 2 jam, sedangkan alat-alat seperti jarum Ose disterilkan dengan pemanasan api langsung.

9. Pembuatan suspensi bakteri uji

Bakteri uji diambil dari biakan murni pada media NA, diambil kurang lebih 2 ose dan ditanam pada 5 ml media BHI, homogenkan kemudian disamakan kekeruhannya dengan *Mc Farland* 0,5 yang setara dengan jumlah koloni $1,5 \times 10^8$ CFU/ml.

10. Identifikasi bakteri uji

10.1. Pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram menggunakan reagen Gram A (cat Kristal violet sebagai cat utama), Gram B (lugol iodine sebagai mordan), Gram C (etanol:aseton = 1:1 sebagai peluntur), dan Gram D (cat safranin sebagai cat lawan atau penutup). Pewarnaan gram dilakukan dengan cara dibuat preparat ulas (smear) yang telah difiksasi kemudian ditetesi dengan Gram A sampai semua ulasan terwarnai, didiamkan selama kurang lebih 1 menit. Dicuci dengan aquadestilata mengalir kemudian ditetesi Gram B, didiamkan kurang lebih 1 menit kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikering anginkan, preparat dilunturkan dengan peluntur Gram C dan didiamkan selama kurang lebih 45 detik, dicuci dengan aquadestilata mengalir kemudian ditetesi Gram D dan didiamkan selama kurang lebih 1 menit. Dicuci dengan aquadestilata mengalir kemudian dikeringkan preparat. Bakteri akan terlihat berwarna ungu yang menunjukkan bakteri Gram positif, berbentuk bulat dan bergerombol seperti buah anggur ketika diamati di bawah mikroskop menunjukkan bakteri *Staphylococcus*.

10.2. Identifikasi morfologi koloni. Suspensi bakteri MRSA diinokulasi pada media VJA yang sudah ditambahkan kalium tellurit 1% sebanyak 3 tetes dalam cawan petri dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil pengujian ditunjukkan dengan warna koloni hitam dan warna media sekitar koloni kuning. Hal ini disebabkan karena *S. aureus* dapat memfermentasi manitol menjadi asam dan adanya indikator fenol red menyebabkan warna media di sekitar koloni kuning, sedangkan warna hitam pada koloni disebabkan *S. aureus* dapat mereduksi kalium tellurit menjadi metalik tellurit.

10.3. Identifikasi Biokimia. Identifikasi biokimia dilakukan dengan dua uji yaitu uji katalase dan uji koagulase. Uji katalase menggunakan suspensi bakteri MRSA yang ditanam pada medium nutrisi cair ditambah dengan 2 tetes hidrogen peroksida 3%. Penambahan H₂O₂ akan terurai menjadi H₂ dan O₂ hasil dinyatakan positif bila terlihat gelembung udara di sekitar koloni, hal ini disebabkan karena *Staphylococcus aureus* mempunyai enzim katalase (Jawetz *et al* 2012).

Uji koagulase menggunakan plasma darah kelinci yang diberi asam sitrat, diencerkan (1:5) ditambah 1 ose biakan bakteri, diinkubasi pada suhu 37 °C. Hasilnya positif jika terjadi pembentukan bekuan selama 1-4 jam. (Jawetz *et al* 2012).

Uji hemolisin dilakukan untuk mengetahui adanya toksin yang dimiliki oleh MRSA. Uji hemolisin dilakukan dengan menginokulasi bakteri MRSA pada media agar darah kemudian diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Terbentuknya zona bening hemolisis disekitar koloni menunjukkan toksin yang dimiliki MRSA (Jawetz *et al* 2012).

10.4. Identifikasi bakteri MRSA terhadap antibiotik vankomisin, oksasilin dan sefoksitin. Identifikasi bakteri MRSA dilakukan dengan menggunakan metode difusi agar *Kirby-Bauer*. Prinsip dari metode ini adalah penghambatan terhadap pertumbuhan mikroorganisme, yaitu zona hambat akan terlihat sebagai daerah jernih di sekitar kertas cakram yang mengandung zat antibakteri. Metode difusi dilakukan dengan menyelupkan kapas lidi steril pada suspensi yang telah dibuat dan ditekan-tekan pada dinding tabung, diratakan pada media MHA sampai rata. Media MHA yang telah gores bakteri MRSA kemudian diletakkan cakram antibiotik vankomisin, oksasilin dan sefoksitin, media didiamkan selama 5-10 menit pada suhu ruang agar agen antimikroba dapat berdifusi pada media agar, lalu diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Hasil dapat dilihat dengan adanya area jernih yang menandakan adanya penghambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh agen antimikroba. Zona hambat ditentukan dengan mengukur diameter area jernih kemudian dibandingkan dengan tabel *Interpretive Standard Kirby Bauer*.

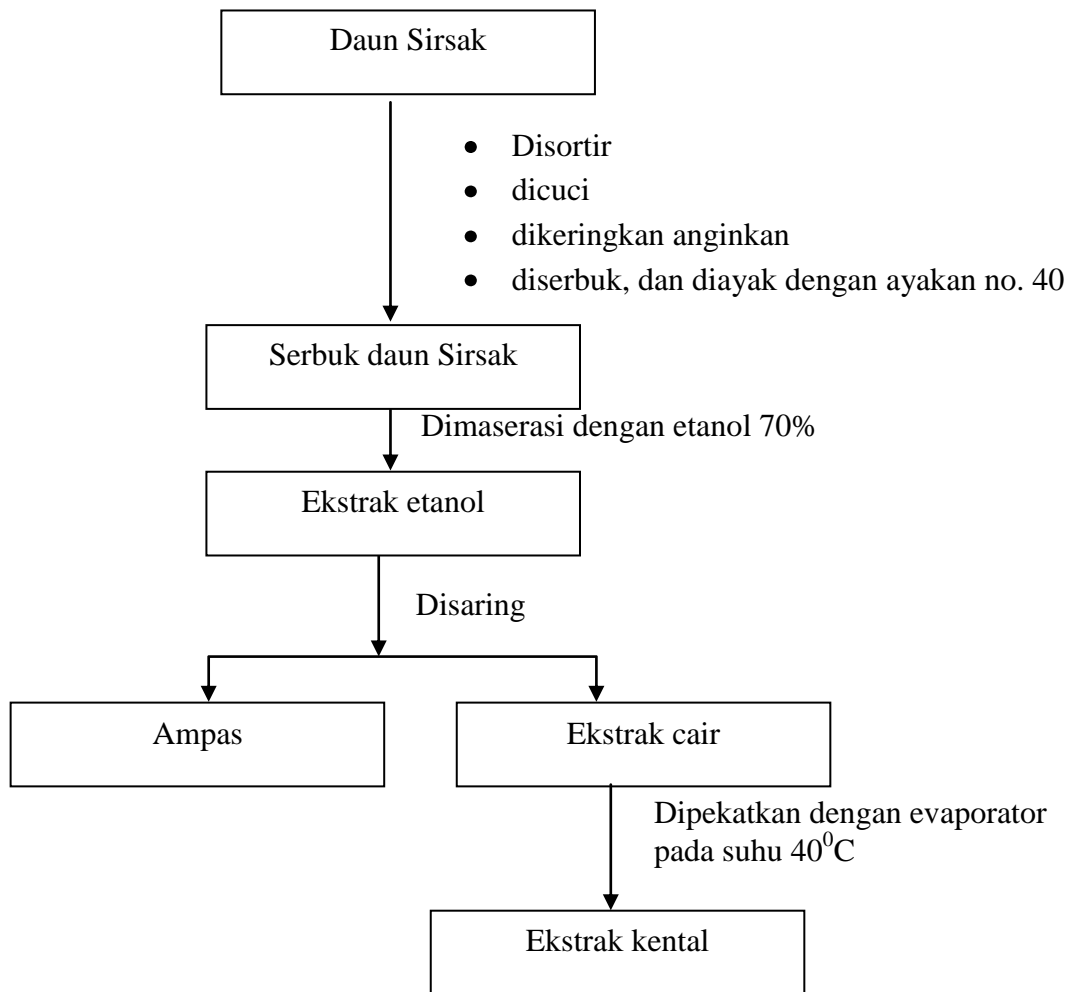
11. Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak daun sirsak

Metode pengujian aktivitas antibakteri yang digunakan adalah metode difusi dan dilusi. Metode difusi dilakukan dengan menyelupkan kapas lidi steril pada suspensi bakteri yang sudah sesuai dengan *Mc Farland* 0,5 kemudian diratakan pada media MHA, didiamkan pada suhu ruang selama 5-10 menit agar suspensi bakteri terdifusi ke media. Pada media tersebut dibagi menjadi 7 bagian yang sama, kemudian masing-masing diletakkan cakram antibiotik vankomisin 30 µg sebagai kontrol positif, cakram antibiotik oksasilin 5 µg dan sefoksitin 30 µg sebagai pembanding, cakram steril yang berisi ekstrak daun sirsak dengan konsentrasi 25%, 50%, 75% dan cakram steril yang berisi DMSO 1% sebagai kontrol negatif. Area jernih disekitar cakram bahan uji diukur dan hasilnya adalah sebagai diameter zona hambat antibakteri.

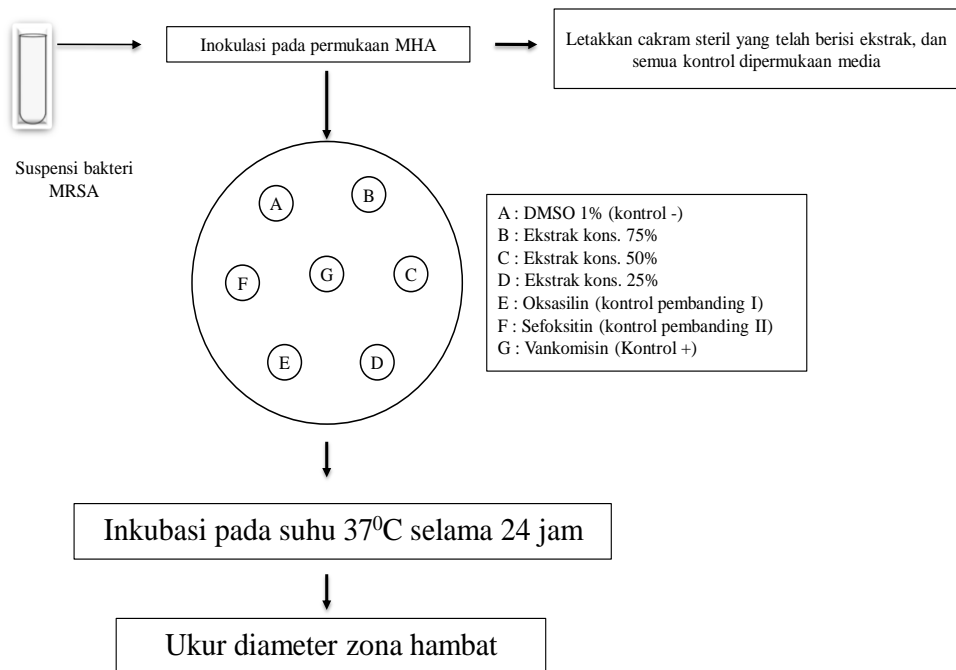
Metode dilusi digunakan untuk mengetahui konsentrasi terendah ekstrak uji yang masih dapat membunuh bakteri MRSA. Metode ini menggunakan 1 deretan tabung yang terdiri dari 10 tabung reaksi steril. Tabung pertama sebagai kontrol negatif berisi ekstrak uji. Tabung kedua sampai kesembilan adalah tabung seri pengenceran dengan konsentrasi masing-masing 75%, 37,5%, 18,75%, 9,37%, 4,69%, 2,34%, 1,17%, 0,59%. DMSO 1% dimasukkan ke dalam tabung ketiga sampai ke tabung ke sepuluh secara aseptis sebanyak 1 ml. Larutan stok ekstrak sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam tabung kedua dan ketiga, dari tabung ketiga diambil 0,5 ml dimasukkan ke tabung keempat, dari tabung keempat diambil 0,5 ml dimasukkan ke tabung kelima, begitu seterusnya sampai tabung kesembilan. 0,5 ml dari tabung kesembilan kemudian dibuang. Suspensi bakteri dimasukkan ke dalam tabung seri pengenceran sebanyak 0,2 mL. Tabung kesepuluh berisi 1ml suspensi bakteri sebagai kontrol positif. Seluruh tabung diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam, kemudian diinokulasi pada cawan petri berisi media VJA lalu diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Pertumbuhan koloni terlihat berwarna hitam dan di sekitar koloni berwarna kuning pada permukaan media VJA. Cawan petri yang tidak menunjukkan adanya pertumbuhan koloni bakteri merupakan nilai KBM.

E. Analisis Hasil

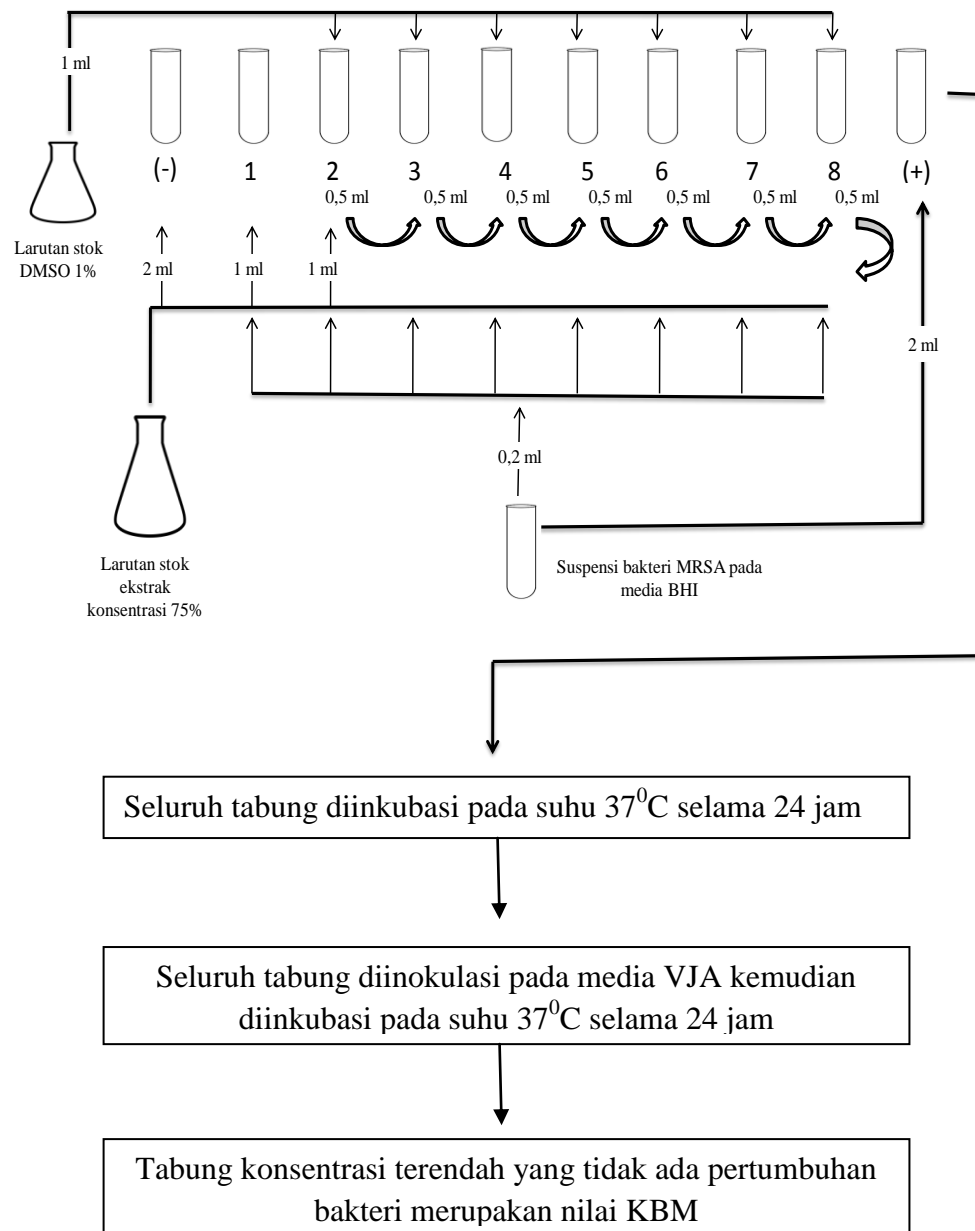
Analisis hasil yang digunakan dalam penelitian ini adalah dengan mengamati diameter zona hambat yang terbentuk pada metode difusi kemudian dibandingkan dengan tabel *Interpretive Standard Kirby-Bauer*. Analisis pada metode dilusi dengan mengamati adanya tidaknya pertumbuhan koloni pada media VJA untuk menentukan nilai KBMnya.



Gambar 1. Skema pembuatan ekstrak etanol daun sirsak



Gambar 2. Skema uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun sirsak secara difusi



Gambar 3. Skema uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun sirsak secara dilusi

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

1. Determinasi tanaman sirsak

Determinasi tanaman sirsak (*Annona muricata* L.) dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas MIPA Universitas Sebelas Maret Surakarta. Determinasi bertujuan untuk mengetahui kebenaran dari tanaman yang akan diteliti sehingga menghindari kesalahan dalam pengumpulan bahan dan kemungkinan tercampurnya dengan tanaman yang lain (Depkes 1985). Hasil determinasi menunjukkan bahwa ciri – ciri morfologi tanaman sirsak yang digunakan pada penelitian ini sesuai dengan literatur. Berdasarkan hasil tersebut dapat diketahui bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah benar tanaman sirsak. Hasil determinasi dapat dilihat pada lampiran 1.

2. Pengambilan sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirsak yang diperoleh dari desa Tegalsari, Sukoharjo, Jawa Tengah pada bulan Januari 2017. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sirsak yang masih segar, berwarna hijau. Daun yang diambil adalah daun yang tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua berkedudukan 3-4 nodus dari ujung, ini dikarenakan umur daun mempengaruhi kandungan senyawa metabolit yang terkandung pada daun. Pengambilan sampel dilakukan pada sore hari karena pada sore hari hasil dari proses fotosintesis sudah tersimpan sehingga senyawa metabolit yang terkandung lebih banyak (Syafira 2016).

3. Pembuatan serbuk daun sirsak

Daun yang telah dipanen kemudian dicuci dengan air bersih untuk menghilangkan pengotor yang menempel pada daun. Daun dikering anginkan dan ditutup dengan kain gelap agar tidak terkena sinar matahari secara langsung selama 6 hari. Cara ini umum digunakan untuk mengeringkan bagian tanaman yang lunak seperti daun. Pengeringan bertujuan untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lama. Daun yang sudah kering kemudian dihaluskan dengan alat penggiling dan diayak

dengan pengayak no 40. Pengayakan bertujuan untuk memperkecil ukuran bahan sehingga dapat memperluas permukaan partikel yang menjadikannya lebih mudah larut (Depkes 1985).

Tabel 1. Persentase bobot kering terhadap bobot basah daun sirsak

Bobot basah (gram)	Bobot kering (gram)	Rendemen (%)
7.000	1.250	17,86

Bobot basah berkaitan dengan transportasi fotosintat (hasil fotosintesis) ke daerah pemanfaatan seperti daun dan batang, sedangkan bobot kering adalah bahan tertinggal pada tanaman setelah dipanaskan baik dengan oven atau dengan panas matahari. Bobot kering tanaman merupakan petunjuk besarnya fotosintat yang dihasilkan selama pertumbuhan. Rendemen digunakan untuk menyatakan jumlah senyawa organik yang terbentuk melalui metabolisme sekunder di dalam tanaman dan berfungsi sebagai cadangan makanan bagi tanaman itu sendiri (Hariyani 2015).

Tabel 1 menunjukkan bobot basah daun sirsak 7.000 gram kemudian setelah dikeringkan dan dijadikan serbuk diperoleh bobot 1.250 gram, sehingga rendemen bobot kering terhadap bobot basah sebesar 17,86% b/b.

4. Penetapan kadar lembab serbuk dan ekstrak daun sirsak

Penetapan kadar lembab daun dan ekstrak daun sirsak menggunakan *Moisture Balance* pada suhu 105⁰C selama 5 menit. Hasil penetapan kadar lembab dapat dilihat pada Tabel 2 dan Tabel 3.

Tabel 2. Hasil penetapan kadar lembab serbuk daun sirsak

No	Bobot serbuk (gram)	Bobot akhir (gram)	Kadar lembab (%)
1	2	1,80	5,5
2	2	1,83	5,0
3	2	1,80	5,5
	Rata – rata	1,81	5,33

Tabel 3. Hasil penetapan kadar lembab ekstrak daun sirsak

No	Bobot serbuk (gram)	Bobot akhir (gram)	Kadar lembab (%)
1	2	1,90	4,5
2	2	1,88	4,0
3	2	1,90	4,3
	Rata – rata	1,89	4,27

Hasil rata – rata kadar lembab serbuk dan ekstrak daun sirsak masing – masing adalah 5,33% dan 4,27%, sehingga telah memenuhi syarat yang telah ditentukan yaitu kurang dari 10%. Kadar lembab serbuk harus kurang dari 10%, karena pada kadar air yang tinggi enzim tertentu masih dapat bekerja menguraikan senyawa aktif, selain itu air merupakan media pertumbuhan bakteri, jamur dan jasad renik lainnya sehingga dapat menurunkan mutu simplisia (Depkes 1985).

5. Pembuatan ekstrak etanol daun sirsak

Data hasil pembuatan ekstrak etanol daun sirsak dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Hasil penetapan rendemen ekstrak etanol daun sirsak

Serbuk (gram)	Ekstrak kental (gram)	Rendemen (%)
1000	103,07	10,31%

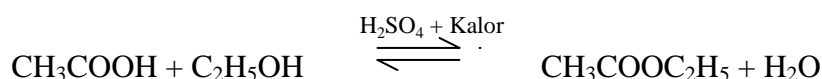
Rendemen merupakan persentase perbandingan berat ekstrak yang diperoleh setelah pemekatan dengan berat simplisia awal. Berdasarkan tabel 3 dapat diketahui dari berat serbuk 1000 gram setelah dimaserasi, dievaporasi dan setelah dilakukan penguapan diperoleh ekstrak kental 103,7 gram, sehingga rendemen yang dihasilkan adalah 10,31%.

6. Uji bebas etanol ekstrak daun sirsak

Uji bebas etanol dilakukan dengan cara esterifikasi yang bertujuan untuk memastikan bahwa dalam ekstrak sudah tidak mengandung pelarut dimana dalam penelitian ini pelarut yang digunakan adalah etanol 70%. Ekstrak uji harus bebas dari pelarut etanol karena etanol memiliki aktivitas membunuh bakteri sehingga dapat mempengaruhi hasil penelitian. Hasil pengujian bebas etanol ekstrak daun sirsak dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil uji bebas etanol ekstrak daun sirsak

Uji esterifikasi	Pustaka	Hasil uji
Ekstrak + asam asetat + asam sulfat kemudian dipanaskan	Tidak tercium bau ester menunjukkan sudah tidak mengandung etanol (Praeparandi 2006)	Tidak tercium bau ester



Esterifikasi merupakan reaksi pembentukan ester dengan cara mereaksikan langsung asam karboksilat dan alkohol, reaksi ini berlangsung lama namun dengan penambahan katalis asam akan mempercepat pembentukan senyawa ester. Prinsip reaksi esterifikasi adalah terjadinya transfer proton dari katalis asam ke atom oksigen karbonil dari asam karboksilat, atom karbonil akan diserang oleh atom oksigen dari alkohol terjadi protonisasi pada gugus hidroksil menghasilkan kompleks teraktivasi diikuti dengan pelepasan molekul air. Produk esterifikasi disebut ester, dimana ester mempunyai aroma yang khas. Berdasarkan Tabel 4 dapat dilihat bahwa setelah penambahan asam asetat dan asam sulfat pada ekstrak yang kemudian dipanaskan tidak tercium bau ester. Hasil tersebut menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun sirsak yang digunakan pada penelitian ini positif bebas etanol.

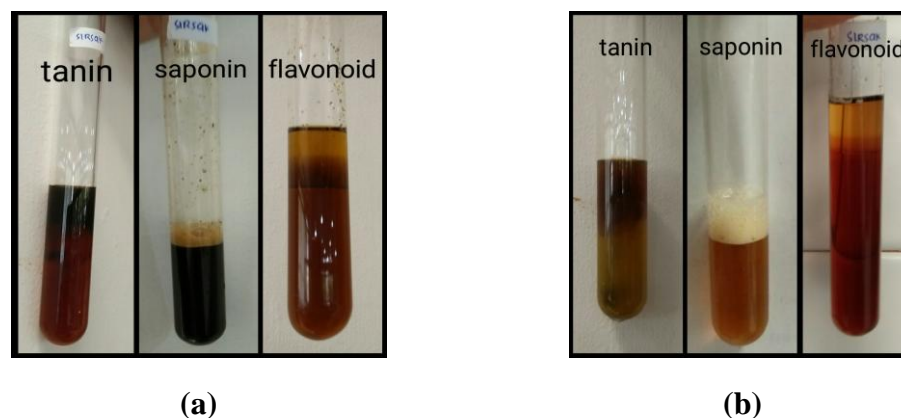
7. Identifikasi kandungan senyawa kimia serbuk dan ekstrak etanol daun sirsak

Identifikasi kandungan senyawa kimia dilakukan pada serbuk dan ekstrak daun sirsak. Hasil identifikasi dapat dilihat pada Tabel 6 dan Gambar 4.

Tabel 6. Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia serbuk dan ekstrak daun sirsak secara kualitatif

Senyawa	Pustaka	Interpretasi hasil	
		Serbuk	Ekstrak
Flavonoid	Reaksi positif jika terbentuk warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Depkes 1995)	(+)	(+)
Saponin	Reaksi positif jika terbentuk buih yang mantap selama 10 menit dan tidak hilang dengan penambahan 1 tetes HCl 2N (Depkes 1989)	(+)	(+)
Tanin	Reaksi positif jika terbentuk warna coklat kehijauan atau biru kehitaman (Robinson 1995)	(+)	(+)

Keterangan :
 + : ada senyawa
 - : tidak ada senyawa



Gambar 4. Hasil identifikasi kandungan senyawa pada serbuk (a) dan ekstrak (b) daun sirsak

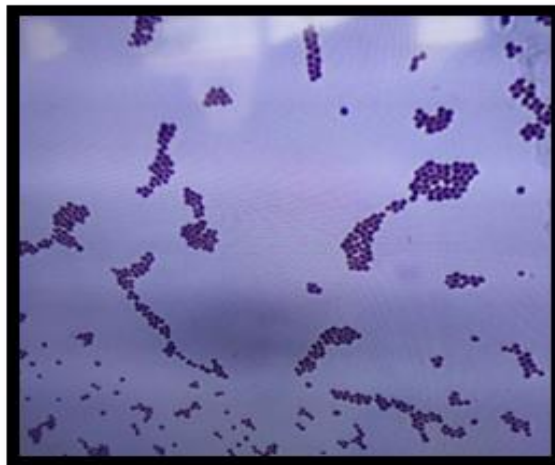
Identifikasi kandungan senyawa kimia dilakukan untuk mengetahui senyawa kimia yang terkandung pada daun sirsak. Berdasarkan tabel 5 dapat diketahui bahwa daun sirsak positif mengandung flavonoid, saponin, tanin dan alkaloid baik pada serbuk maupun pada ekstrak. Hasil ini sama dengan penelitian yang dilakukan oleh Vijayameena dkk (2013) dan Tuna dkk (2016) bahwa ekstrak etanol daun sirsak mengandung senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, saponin, tanin, selain ketiga senyawa tersebut daun sirsak mengandung alkaloid dan steroid yang diduga juga mempunyai aktivitas antibakteri.

8. Identifikasi bakteri MRSA

Identifikasi bakteri MRSA dilakukan secara mikroskopis, makroskopis, uji biokimia dan uji sensitivitas terhadap beberapa antibiotik. Identifikasi secara mikroskopis dilakukan dengan metode pewarnaan Gram A (cat kristal violet), Gram B (lugol iodin), Gram C (peluntur), dan Gram D (cat safranin) kemudian diamati dibawah mikroskop sampai perbesaran 100 kali. Hasil identifikasi bakteri secara mikroskopis dapat dilihat pada Tabel 7 dan Gambar.

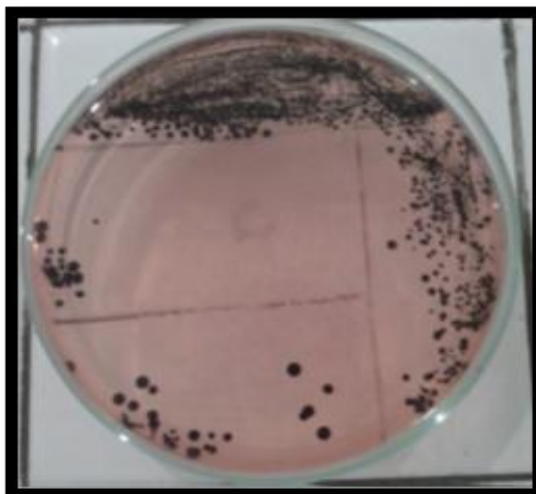
Tabel 7. Hasil identifikasi bakteri uji secara mikroskopis

Ciri – ciri	Hasil
Bentuk	Bulat
Susunan	Bergerombol
Warna	Ungu
Pewarna	Gram A, B, C, D
Sifat	Gram positif



Gambar 5. Hasil identifikasi bakteri MRSA secara mikroskopis

Berdasarkan Tabel 7 dan Gambar 5 dapat diketahui bahwa bakteri uji berbentuk bulat, bergerombol dan berwarna ungu sehingga dapat dikatakan bahwa bakteri tersebut adalah MRSA. Warna ungu yang terlihat menunjukkan sifat bakteri Gram positif, dimana pada bakteri Gram positif memiliki peptidoglikan yang lebih tebal dibandingkan dengan bakteri Gram negatif sehingga dapat mengikat kompleks zat warna kristal violet dan menyebabkannya tidak luntur setelah ditetesi Gram C (Bonang dan Koeswoyo 1982).



Gambar 6. Hasil identifikasi bakteri MRSA secara makroskopis pada media VJA

Hasil identifikasi bakteri uji secara makroskopis pada media VJA yaitu koloni berwarna hitam dengan warna kuning disekitar media. *S. aureus* dapat memfermentasi manitol menjadi asam dan dengan adanya indikator fenol red

yang terkandung dalam media menyebabkan media disekitar koloni menjadi berwarna kuning. Kalium tellurit yang ditambahkan pada media VJA akan direduksi oleh *S. aureus* menjadi metalik tellurit sehingga koloni akan berwarna hitam (Jawezt *et al* 2012).

Identifikasi bakteri MRSA secara biokimia dilakukan dengan tiga uji yaitu katalase, koagulase dan hemolisin. Hasil identifikasi dapat dilihat pada Tabel 8 dan Gambar 7.

Tabel 8. Hasil identifikasi bakteri dengan uji katalase dan koagulase

Jenis uji	Pustaka	Hasil	Keterangan
Uji katalase	Positif MRSA jika terbentuk gelembung gas (Jawezt <i>et al</i> 2012)	Terbentuk gelembung gas	(+)
Uji koagulase	Positif MRSA jika terjadi gumpalan (Jawezt <i>et al</i> 2012)	Terjadi gumpalan	(+)
Uji hemolisin	Positif MRSA jika terjadi hemolisis bening disekitar koloni (Jawezt <i>et al</i> 2012)	Terjadi hemolisis bening	(+)



(a)



(b)



(c)

Gambar 7. Hasil identifikasi bakteri MRSA pada uji katalase (a) uji koagulase (b) dan uji hemolisin (c)

Berdasarkan hasil uji katalase, bakteri uji membentuk gelembung gas. MRSA menghasilkan katalase yang mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen. Uji positif katalase digunakan untuk mendeteksi adanya enzim sitokrom peroksidase yang berperan pada daya tahan bakteri terhadap proses fagositosis. Hasil uji koagulase menunjukkan pada bakteri uji terjadi gumpalan. MRSA koagulase positif dianggap patogenik bagi manusia, karena MRSA memiliki protein menyerupai enzim yang dapat membekukan plasma beroksalat atau bersitrat. Hemolisin merupakan toksin yang membentuk suatu zona hemolisis disekitar koloni bakteri. Hasil uji hemolisis menunjukkan adanya zona hemolisis bening disekitar koloni, maka dapat diketahui bahwa bakteri MRSA mempunyai toksin dan dianggap patogen karena dapat merusak sel darah manusia (Jawezt *et al* 2012).

Antibiotik yang digunakan untuk menguji sensitivitas bakteri MRSA adalah vankomisin 30 µg, oksasilin 5 µg dan sefoksitin 30 µg. Hasil uji sensitivitas dapat dilihat pada Tabel 9.

Tabel 9. Hasil uji sensitivitas bakteri MRSA

Antibiotik	Diameter zona hambat (mm)	Keterangan
Vankomisin 30 µg	25	Sensitif
Oksasilin 5 µg	0	Resisten
Sefoksitin 30 µg	0	Resisten



Gambar 8. Hasil uji sensitivitas bakteri MRSA terhadap antibiotik

Ketiga antibiotik tersebut digunakan dalam penelitian ini mengacu pada kategori yang diberikan oleh CLSI. Oksasilin dan sefoksitin merupakan antibiotik grup A, atau antibiotik yang harus diperiksa sensitivitasnya ketika ditemukan bakteri *S. aureus*. Sementara vankomisin merupakan antibiotik grup B, yang harus diperiksa ketika terjadi resistensi terhadap golongan A. Berdasarkan Tabel 9 dapat dilihat bahwa bakteri uji masih sensitif terhadap vankomisin namun resisten terhadap oksasilin dan sefoksitin (CLSI 2016).

MRSA diuji sensitivitasnya terhadap oksasilin dan bukan metisilin. Oksasilin dipilih karena secara kimia masih satu derivat dengan metisilin sehingga mempunyai mekanisme kerja yang sama dengan metisilin tetapi oksasilin lebih stabil terhadap asam, selain itu metisilin telah lama tidak beredar di pasaran. Sefoksitin merupakan sefalosporin generasi kedua yang juga digunakan untuk mendeteksi MRSA. Sefoksitin merupakan inducer sistem pengaturan gen *mecA* sehingga dapat digunakan sebagai *surrogate marker* untuk mendeteksi gen *mecA* pada MRSA. Pada hasil uji menunjukkan bahwa tidak ada daya hambat yang terbentuk pada antibiotik oksasilin dan sefoksitin, hal ini menunjukkan bahwa bakteri uji resisten terhadap kedua antibiotik tersebut. Vankomisin merupakan salah satu antibiotik yang masih aktif membunuh bakteri MRSA. Vankomisin 30 µg mampu menghambat MRSA dengan diameter 25 mm, nilai tersebut jika dibandingkan dengan tabel *Kirby-Bauer* maka MRSA masih sensitif terhadap

vankomisin. Hasil tersebut membedakan MRSA dengan *Vancomycin Resistant Staphylococcus aureus* (VRSA). Berdasarkan semua hasil identifikasi dapat disimpulkan bahwa bakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah *S. aureus* resisten atau MRSA (Zurita *et al* 2010).

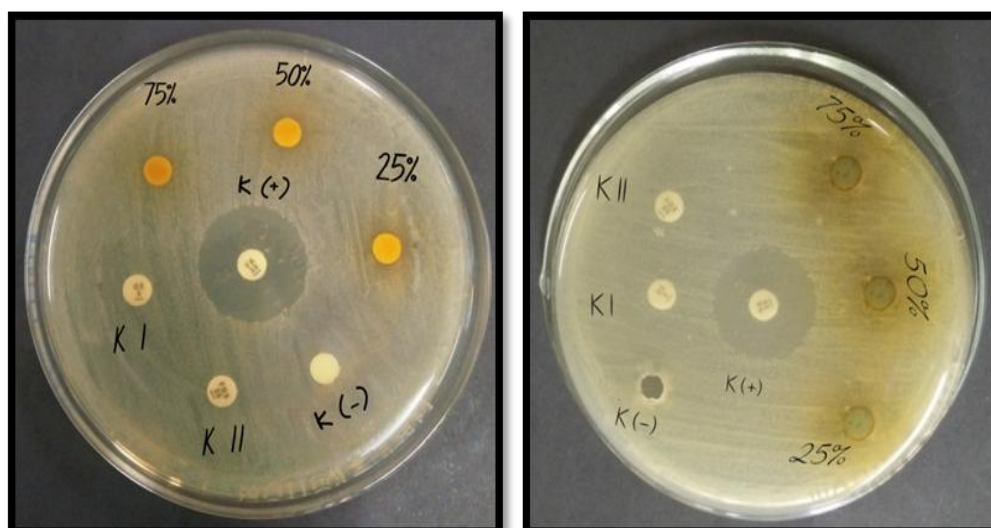
9. Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak daun sirsak terhadap MRSA secara difusi cakram, difusi sumuran dan dilusi

Tabel 10. Hasil uji aktifitas antibakteri ekstrak daun sirsak terhadap MRSA secara difusi

No	Sampel	Diameter zona hambat (mm)	
		Metode Cakram (20 µl)	Metode Sumuran (50 µl)
1	Kontrol (-)	0	0
2	Ekstrak konsentrasi 25%	0	0
3	Ekstrak konsentrasi 50%	0	0
4	Ekstrak konsentrasi 75%	0	0
5	kontrol (+)	25	25
6	Kontrol pembanding I	0	0
7	Kontrol pembanding II	0	0

Keterangan :

- Kontrol (-) : DMSO 1%
- Kontrol (+) : Vankomisin 30 µg
- Kontrol pembanding I : Oksasilin 5 µg
- Kontrol pembanding II : Sefoksitin 30 µg



(a)

(b)

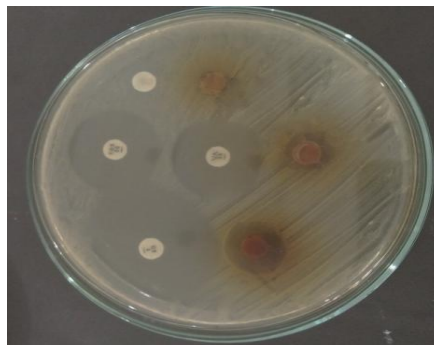
Gambar 9. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak daun sirsak dengan metode cakram (a) dan sumuran (b)

Tabel 11. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak daun sirsak terhadap *S. aureus* ATCC 25932 secara difusi cakram

No	Sampel	Diameter zona hambat (mm)
1	Kontrol (-)	0
2	Ekstrak konsentrasi 25%	0
3	Ekstrak konsentrasi 50%	9
4	Ekstrak konsentrasi 75%	14
5	Kontrol (+)	26
6	Kontrol pembanding I	35
7	Kontrol pembanding II	25

Keterangan :

Kontrol (-)	: DMSO 1%
Kontrol (+)	: Vankomisin 30 µg
Kontrol pembanding I	: Oksasilin 5 µg
Kontrol pembanding II	: Sefoksitin 30 µg



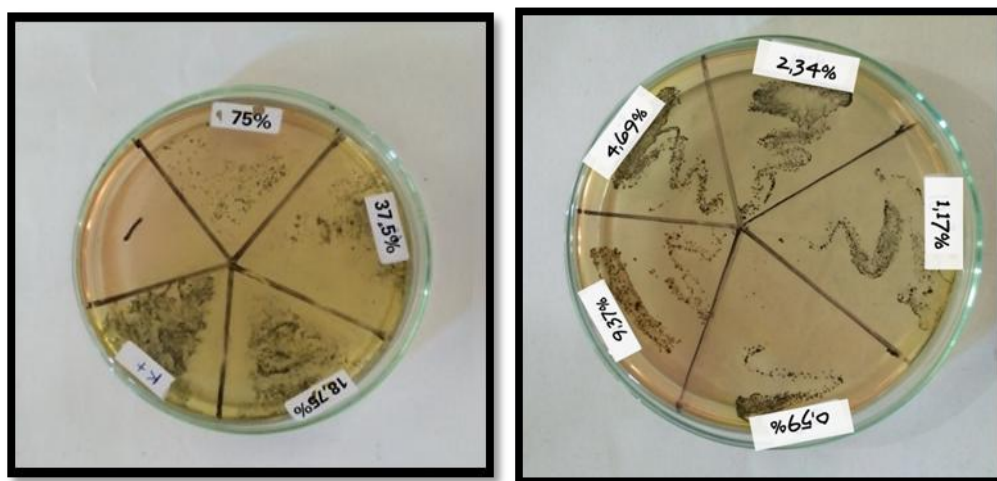
Gambar 10. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak daun sirsak terhadap *S.aureus* ATCC 25932

Tabel 12. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak daun sirsak terhadap MRSA secara dilusi

No	Konsentrasi (%)	Konsentrasi Bunuh Minimum		
		I	II	III
1	Kontrol (-)	-	-	-
2	75	+	+	+
3	37,5	+	+	+
4	18,75	+	+	+
5	9,37	+	+	+
6	4,69	+	+	+
7	2,34	+	+	+
8	1,17	+	+	+
9	0,59	+	+	+
10	Kontrol (+)	+	+	+

Keterangan :

Kontrol (-)	: Ekstrak konsentrasi 75%
Kontrol (+)	: Suspensi bakteri MRSA
(+)	: Ada pertumbuhan bakteri
(-)	: Tidak ada pertumbuhan bakteri



Gambar 11. Hasil uji dilusi yang diinokulasi pada media VJA

Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol 70% daun sirsak dengan metode difusi cakram dan sumuran, menggunakan tiga variasi konsentrasi yaitu 25%, 50% dan 75% dengan tiga kali replikasi. Kontrol negatif DMSO 1%, kontrol positif antibiotik vankomisin 30 μg dan kontrol pembanding antibiotik oksasilin 5 μg dan sefoksitin 30 μg . DMSO 1% yang digunakan sebagai pelarut ekstrak tidak menunjukkan adanya zona hambat, sehingga dapat diketahui bahwa DMSO 1% tidak berpengaruh dalam aktivitas ekstrak dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Vankomisin sebagai kontrol positif mempunyai daya hambat terhadap MRSA sebesar 25 mm. Mekanisme kerja vankomisin sebagai antibakteri dengan menghambat dinding sel pada bakteri yang peka melalui pengikatan berafinitas tinggi ke D-alanil-D-alanin terminal pada unit – unit prekursor dinding sel. Oksasilin dan sefoksitin sebagai kontrol pembanding tidak mempunyai aktivitas daya hambat atau bakteri uji telah resisten terhadap kedua antibiotik tersebut. Oksasilin dan sefoksitin mempunyai mekanisme kerja antibakteri yang sama yaitu berikatan dengan PBP spesifik yang berperan sebagai reseptor obat pada bakteri, menghambat sintesis dinding sel dengan menghambat transpeptidasi dan peptidoglikan serta mengaktifasi enzim – enzim autolitik dalam dinding sel yang dapat menimbulkan lesi – lesi yang menyebabkan kematian sel. Resistensi yang terjadi dikarenakan pada bakteri MRSA telah mengalami perubahan genetik yang

membuat ikatannya terhadap antibiotik betalaktam rendah (Goodman dan Gilman 2010).

Pengujian aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun sirsak secara difusi cakram menggunakan kertas cakram dengan daya tampung 20 μ l. Hasil menunjukkan bahwa ketiga konsentrasi yang diujikan tidak mempunyai daya hambat terhadap bakteri MRSA. Pengujian dengan metode sumuran berdaya tampung 50 μ l juga tidak menunjukkan adanya daya hambat pada ketiga konsentrasi tersebut. Ekstrak daun sirsak dengan variasi konsentrasi yang sama juga diujikan terhadap bakteri *S.aureus* ATCC 25932 secara difusi cakram, hasilnya pada konsentrasi 25% tidak mempunyai daya hambat dan pada konsentrasi 50% dan 75% mempunyai daya hambat dengan diameter masing – masing 9 mm dan 14 mm. Perbedaan hasil pengujian antara MRSA dengan *S. aureus* mungkin terkait perubahan genetik yang terjadi pada bakteri MRSA. DNA pada bakteri MRSA mendapatkan sisipan elemen SCC mec yang mengandung *mecA* dimana gen *mecA* tersebut menyandi PBP2 menjadi PBP2a yang afinitasnya rendah terhadap betalaktam. Perubahan genetik yang terjadi pada MRSA dan tidak terjadi pada *S. aureus* mungkin menyebabkan zat aktif dari ekstrak daun sirsak tidak mampu mengikat protein bakteri MRSA, akibatnya reaksi transpeptidase dan transglikolase pada bakteri tidak terpengaruh, sehingga bakteri MRSA tetap dapat mensintesis peptidoglikan dan tetap hidup.

Metode dilusi yang digunakan adalah metode dilusi cair. Metode ini bertujuan untuk mengetahui Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) suatu antibakteri. Pada penelitian ini seri pengenceran dimulai dari konsentrasi 75% kemudian diencerkan dua kalinya sampai konsentrasi 0,59%, setelah itu dinkubasi pada 37⁰C selama 24 jam. Nilai KHM dilihat dari tabung jernih pada konsentrasi pengenceran terendah. Pada penelitian ini nilai KHM tidak bisa ditentukan, hal tersebut dikarenakan ekstrak yang digunakan keruh sehingga akan sulit melihat tabung yang masih jernih. Nilai KBM ditentukan dengan menginokulasi semua tabung seri pengenceran beserta kontrol positif dan kontrol negatif pada media selektif MRSA yaitu VJA.

Berdasarkan hasil pengamatan, semua konsentrasi pengenceran positif ditumbuhi bakteri MRSA. Hasil tersebut menunjukkan bahwa ekstrak etanol 70% daun sirsak juga tidak memiliki daya bunuh terhadap bakteri MRSA.

Menurut penelitian Patel dkk (2015) dan Moghadamtousi dkk (2015) daun sirsak memiliki kandung flavonoid jenis flavonol seperti kuersetin, kamferol dan flavan seperti katekin dan epikatekin. Penelitian Gatto dkk (2002) menyatakan bahwa senyawa kuersetin dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif namun tidak mampu menghambat bakteri patogen. Ini dikaitkan dengan aktivitas akilasi dari cincin C menyebabkan interaksi yang tidak adekuat antara molekul senyawa dengan membran sel target. Hasil pengujian dari ketiga metode tidak menunjukkan adanya perbedaan hasil, ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol 70% daun sirsak tidak mempunyai aktivitas antibakteri karena tidak mampu menghambat atau membunuh pertumbuhan bakteri MRSA.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa :

Pertama, ekstrak etanol 70% daun sirsak konsentrasi 25%, 50%, 75% tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri MRSA.

Kedua, ekstrak etanol 70% daun sirsak tidak dapat membunuh pertumbuhan bakteri MRSA.

B. Saran

Pertama, diharapkan dapat dilakukan pengujian aktivitas antibakteri daun sirsak terhadap bakteri MRSA dengan menggunakan pelarut dan metode ekstraksi yang berbeda, sehingga diperoleh senyawa yang berbeda dengan metode maserasi.

Kedua, diharapkan dapat dilakukan pengujian aktivitas antibakteri dengan menggunakan bagian lain dari tanaman sirsak seperti pada akar atau buah terhadap MRSA.

DAFTAR PUSTAKA

- [AMRIN] Antimicrobial Resistance in Indonesia, Prevalence and Prevention. 2009. Audit of Antibiotic Prescribing in Two Governmental Teaching Hospital in Indonesia. *Department of internal Medicine*.14(7):698-707
- [DEPKES RI]. 1985. *Cara Pembuatan Simplisia*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia
- [DEPKES RI]. 1989. *Materia Medika Indonesia. Jilid V*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- [DEPKES RI]. 1995. *Materia Medika Indonesia. Jilid VI*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- [DEPKES RI]. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- [DEPKES RI]. 2001. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia I Jilid II*. Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Departemen Kesehatan Republik Indonesia. hal 313-314.
- Abdulsalami MS *et al.* 2016. Comparative Antibacterial Study of Aqueous and Ethanolic Leaf Extracts of *Annona Muricata*. *Journal of Natural Sciences Research* 6(3).
- Abdurahman D. 2008. *Biologi Kelompok Pertanian dan Kesehatan*. Bandung: Grafindo Media Pratama. hlm 63.
- Bakung, CT. 2014. Studi Penggunaan Antibiotik pada Pasien ISPA Rawat Jalan di rumah Sakit Professor dr. Aloi Saboe Kota Gorontalo [Thesis]. Universitas Negri Gorontalo.
- Bonang G, Koeswoyo. 1982. *Mikrobiologi Kedokteran Untuk Laboratorium dan Klinik*, Jakarta:Gramedia.
- Cesur S, Demiroz AP. 2013. Antibiotics And The Mechanisms Of Resistance To Antibiotic. *Medical Journal of Islamic World Academy of Sciences* 21(4): 138-142.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2016. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26th ed. CLSI supplement M100S (ISBN 1-56238-923-8 [Print]; ISBN 1-56238-924-6 [Electronic]). Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA.

- Cushnie TPT, A.J Lamb. 2005. Antimicrobial Activity of Flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 26: 343 – 356.
- Darmandi. 2008. 1001 Resep Herbal. Jakarta; Penebar Swadaya. hlm 425-427.
- Erikawati D, Santasaningsih, Santoso S. 2016. Tingginya prevalensi pada Isolat Klinik Periode 2010-2014 di RSUD Dr. Saiful Anwar Malang, Indonesia. *Jurnal Kedokteran Brawijaya* 29(2).
- Fardiaz, Srikandi. 2001. *Mikrobiologi Pangan*. Bogor. Pusat Antar Universitas Pangan dan Gizi, Institut Pertanian Bogor. hlm 190.
- Farouq. 2003. Ekstrak sebagai Salah Satu Pengembangan Bentuk Obat Tradisional. Seminar POKJANAS TOI XXIII. Universitas Pancasila, Jakarta. hlm 12.
- Fathurrachman, D.A. 2014. Pengaruh Konsentrasi Pelarut Terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata L*) dengan Metode Perendaman Radikal Bebas DPPH [skripsi]. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan:UIN Syarif Hidayatullah.
- Gajalakshmi S, Vijayalakshmi S, Rajeswari DV. 2012. Phytochemical and Pharmacological Properties of *Annona Muricata*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 4(2).
- Ganiswarna. 2005. *Farmakologi dan Terapi. Edisi IV*. Jakarta: Gaya Baru. Hlm. 571-575.
- Ganiswarna. 2007. *Farmakologi dan Terapi. Edisi V*. Jakarta: Gaya Baru. Hlm. 585-598.
- Garrity G.M *et al*. 2007. *Taxonomic Outline of the Bacteria and Archaea*, Release 7.7. Michigan:Michigan State University Board of Trustees.
- Gatto, M.T *et al*. 2002. Antimicrobial and anti-lipase activity of quercetin and its C2-C16 3-O-acyl-esters. *Biorg Med Chem* 10, 269–272.
- Goodman & Gilman. 2010. *Manual Farmakologi dan Terapi*. Brunton LL, Parker KL, editor; Sukandar EY, Adnyana IK, Sigit JI, Sasongko LDN, Anggadiredja K, alih bahasa; Manurung J, Aini N, Hadinata AH, Fazriyah Y, Vidhayanti H, editor edisi bahasa Indonesia. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Hadioetomo RS. 1985. *Mikrobiologi Dasar Dalam Praktek Teknik dan Prosedur Dasar Laboratorium*, Jakarta: PT. Gramedia.

- Hariyani, Widaryanto E, Herlina N. 2015. Pengaruh Umur Panen terhadap Rendemen dan Kualitas Minyak Atsiri Tanaman Nilam. *Jurnal Produksi Tanaman* 3:205-211.
- Hayati, Z., Azwar. dan Puspita, I. 2012. Pola dan Sensitivitas Antibiotik Bakteri yang Berpotensi sebagai Penyebab Infeksi Nosokomial di Ruang Rawat Bedah RSUD ZA Banda Aceh. *Jurnal Kedokteran Yarsi* Vol. 20, No. 3.
- Hidayati A, Perwitasari DA. 2011. Persepsi Pengunjung Apotek Mengenai Penggunaan Obat Bahan Alam Sebagai Alternatif Pengobatan di Kelurahan Muja Muju Kecamatan Umbulharjo Kota Yogyakarta. [Skripsi]. Fakultas Farmasi, Universitas Ahmad Dahlan.
- Horne KC *et al.* 2009. Prospective Comparison of the Clinical Impacts of Heterogeneous Vancomycin-Intermediate Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Vancomycin-Susceptible MRSA. *American Society for Microbiology* 53(8).
- Ismarani. 2012. Potensi Senyawa Tanin dalam Menunjang Produksi Ramah Lingkungan. *Jurnal Agribisnis dan Pengembangan Wilayah*. 3:46.
- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 2005. *Mikrobiologi Untuk Profesi Kesehatan*. Bonang G, penerjemah. Jakarta:Penerbit Universitas Indonesia.
- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 2012. *Mikrobiologi Kedokteran Jawetz, Melnick, & Adelberg* Edisi XXV. Nugroho AW, penerjemah. Jakarta:Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Kumalasari H. 2012. Validasi Metoda Pengukuran Kadar Air Bubuk Perisa Menggunakan *Moisture Analyzer* Halogen HB43-S sebagai Alternatif Metoda Oven dan Karl Fischer. [Tesis]. Institut Pertanian Bogor.
- Kumar A *et al.* 2016. MRSA: An Emerging Threat to Mankind. *International Journal of Research in Pure and Applied Microbiology* 6(1): 1-3.
- Kusuma SA. 2009. *Staphylococcus aureus*. [KTI]. Fakultas Farmasi Universitas Padjajaran.
- Memmi G *et al.* 2008. *Staphylococcus aureus* PBP4 Is Essential for Betalactam Resistance in Community-Acquired Methicillin-Resistant Strains. *American Society for Microbiology* 52(11).
- Moghadamtousi SZ *et al.* 2015. *Annona muricata* (Annonaceae): A review of Its Traditional Uses, Isolated Acetogenins and Biological Activities. *International Journal of Molecular Sciences* ISSN 1422-0067.
- Nuria MC, Faizatun A, Sumantri. 2009. Uji Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*

- ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, dan *Salmonella typhi* ATCC 1408. *Jurnal Ilmu – ilmu Pertanian*. 5: 26 – 37.
- Oyedeji *et al.* 2015. Biocidal and Phytochemical Analysis of Leaf Extracts of *Annona muricata* (Linn.). *international Journal of Sciences:Basic and Applied Research (IJSBAR)* 24(7).
- Patel S, Patel JK. 2016. *A Review On a Miracle Fruits of Annona muricata*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 5(1):137-148.
- Praeparandi. 2006. *Card System Analisa Kimia Farmasi Kualitatif*. Bandung : Seksi Diktat Stenhl. Hlm 9.
- Prastowo, Eko Andri. 2013. *Standarisasi Simplisia*. Surabaya : Universitas Airlangga.
- Radji M. 2002. *Buku Ajar Mikrobiologi Panduan Mahasiswa Farmasi & Kedokteran*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Robinson T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tingkat Tinggi*. Bandung : Institut Teknologi Bandung.
- Sriyanti DP, Wijayani A. 2008. *Teknik Kultur Jaringan*. Cetakan ke-9. Yogyakarta : Penerbit Kanisius. hlm 86.
- Syafira AU, Apriliana E. 2016. Ekstraksi Daun Sirsak (*Annona muricata*) sebagai Antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Propionibacterium acnes*. *Majority* 5(1).
- Tuna MR, Kepel BJ, Leman MA. 2015. Uji Daya Hambat Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* secara In Vitro. *Jurnal Ilmiah Farmasi UNSRAT* 4(4).
- Vijayameena C, Subhashini G, Loganayagi M, Ramesh B. 2013. Phytochemical Screening and Assessment of Antibacterial Activity For The Bioactive Compounds in *Annona muricata*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 2(1).
- Wisdom, S. G. O., Ugoh, S. C. and Mohammed, B. 2014. Phytochemical Screening and Antimicrobial Activities of *Annona muricata* (L) leafextract. *American Journal of Biological, chemical and Pharmacheutical Sciences* 2(1).
- Yim G, Thanker MN, Koteva K, Wright G. 2014. Glycopeptide Antibiotic Biosynthesis. *The Journal Of Antibiotics* 67(31).
- Zurita J, Mejia C, Blanco MG. 2010. Diagnosis and Susceptibility Testing of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* In Latin America. *Braz J Infect Dis 2010; Vol 14 (Supl 2):S97-S10*.

L

A

M

P




I

R

A

N

Lampiran 1. Surat keterangan hasil determinasi tanaman

	KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI UNIVERSITAS SEBELAS MARET FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM LAB. PROGRAM STUDI BIOLOGI
	Jl. Ir. Sutami 36A Kentingan Surakarta 57126 Telp. (0271) 663375 Fax (0271) 663375 http://www.biology.mipa.uns.ac.id , E-mail biologi@mipa.uns.ac.id
<hr/>	
Nomor	: 190/UN27.9.6.4/Lab/2016
Hal	: Hasil Determinasi Tumbuhan
Lampiran	: -
Nama Pemesan	: Dwi Sulistyowati
NIM	: 19133928A
Alamat	: Program Studi S1 Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta
HASIL DETERMINASI TUMBUHAN	
Nama Sampel	: <i>Annona muricata</i> L.
Familia	: Annonaceae
Hasil Determinasi menurut C.A. Backer & R.C. Bakhuizen van den Brink, Jr. (1963) : 1b-2b-3b-4b-12b-13b-14b-17b-18b-19b-20b-21b-22b-23b-24b-25b-26b-27a-28b-29b-30b-31a-32a-33a-34a-35a-36d-37b-38b-39b-41b-42b-44b-45b-46e-50b-51b-53b-54b-56b-57b-58b-59d-72b-73b-74a-75b-76a-77a-78b-103c-104b-106b-107b-186b-287b-288b-289b-298b-302b-308b-309b-310b-311a-312a-313b 1b-10b-13b-17a 1a-2a	
	10. Annonaceae 27. Annona <i>Annona muricata</i> L.
Deskripsi Tumbuhan : Habitus : pohon menahun, tinggi tanaman 3-8 m. Akar : tunggang, putih kotor atau putih kekuningan hingga coklat kekuningan. Batang : batang tegak, bercabang banyak, berbentuk bulat, berkayu, diameter 5-10 cm, permukaan kulit batang halus tetapi kasar dan pecah-pecah seiring bertambahnya umur, terdapat lentisel, berwarna abu-abu kusam atau abu-abu, ranting berwarna coklat. Daun : tunggal, terletak berseling, bentuk memanjang hingga memanjang-lanset, panjang 5.5-18 cm, lebar 2.5-7.6 cm, ujung meruncing pendek, pangkal daun tumpul, tepi daun rata, pertulangan daun menyirip, permukaan atas daun mengkilat dan berwarna hijau tua, permukaan bawah daun kasar dan berwarna hijau muda; panjang tangkai daun 3-10 mm, permukaan halus, berwarna hijau. Bunga : tunggal, berdiri sendiri atau berpasangan dan berhadapan dengan daun, bau tak enak; panjang tangkai bunga 2.5 cm; kelopak bunga berwarna hijau kekuningan, berjumlah 3, berbentuk segitiga, panjang 4 mm; daun mahkota bunga berwarna kuning kehijauan, berjumlah 6 dalam dua lingkaran, 3 bagian luar lebih lebar, berbentuk bulat telur, panjang 3-5 cm, lebar 2-4 cm, tebal 3 mm, berdaging, 3 bagian dalam lebih kecil dan tipis, bulat, cekung dan tepi saling tumpang tindih, panjang 2-4 cm, lebar 1.5-3.5 cm; benang sari berjumlah banyak, dalam beberapa baris, panjang 4-5 mm, berbentuk perisai, tangkai benang sari berambut padat; putik berjumlah banyak dan berwarna putih, diameter 5 mm, dengan stigma lengket dan panjang tangkai putik 2-3 mm. Buah : buah sejati ganda tipe agregat/sinkarp, panjang 14-40 cm, diameter 10-18 cm, berbentuk bulat telur, hati atau lonjong, berwarna hijau tua ketika muda dan hijau kekuningan ketika masak, beratnya mencapai 500 g, ditutupi oleh duri yang panjangnya 6 mm, daging buah berwarna putih dan berair. Biji : bentuk memanjang, panjang 1-2 cm, berat 0.33-0.59 g, berwarna hitam ketika masak.	
Surakarta, 23 Desember 2016	
Penanggungjawab Determinasi Tumbuhan	
	
Suratman, S.Si., M.Si. NIP. 19800705 200212 1 002	
	
Dr. Ratna Setyaningsih, M.Si.	

Lampiran 2. Perhitungan persentase bobot kering terhadap bobot basah daun sirsak

Bobot basah (gram)	Bobot kering (gram)	Persentase
7.000	1.250	17,86%

$$\begin{aligned}
 \text{Rendemen serbuk} &= \frac{\text{bobot kering (g)}}{\text{bobot basah (g)}} \times 100 \% \\
 &= \frac{1250}{7000} \times 100\% \\
 &= 17,86\%
 \end{aligned}$$

Lampiran 3. Perhitungan rendemen ekstrak daun sirsak

Serbuk (gram)	Ekstrak kental (gram)	Rendemen (%)
1.000	103,7	10,37

$$\text{Berat gelas + ekstrak} = 304,7 \text{ gram}$$

$$\text{Berat gelas} = \underline{201 \text{ gram}} \text{ --}$$

$$\text{Berat ekstrak} = 103,7 \text{ gram}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Rendemen ekstrak} &= \frac{\text{bobot ekstrak kental (g)}}{\text{bobot serbuk (g)}} \times 100 \% \\
 &= \frac{103,07}{1000} \times 100 \% \\
 &= 10,37\%
 \end{aligned}$$

Lampiran 4. Perhitungan penimbangan bahan

Larutan stok ekstrak konsentrasi 75% = % $^b/v$ = 75 gram/100 ml
= 0,75 gram/ml

Larutan stok ekstrak konsentrasi 50% = % $^b/v$ = 50 gram/100 ml
= 0,5 gram/ml

Larutan stok ekstrak konsentrasi 25% = % $^b/v$ = 25 gram/100 ml
= 0,25 gram/ml

Larutan stok DMSO 1% = % $^v/v$ = 1 ml/100 ml

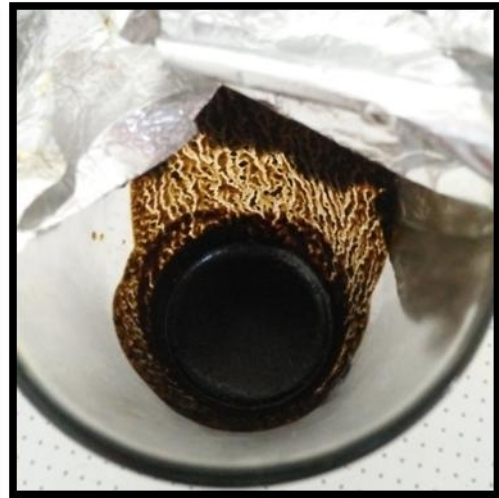
Lampiran 5. Foto tanaman sirsak , serbuk dan ekstrak kental daun sirsak (*Annona muricata* L)



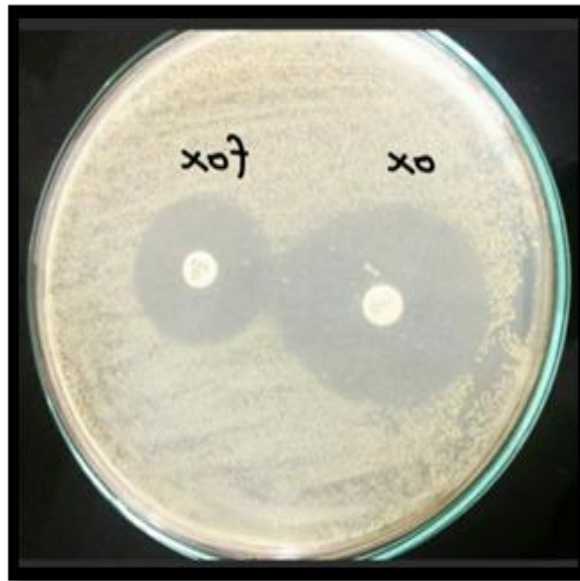
Daun sirsak



Serbuk



Ekstrak

Lampiran 6. Hasil uji sensitivitas bakteri *S.aureus* ATCC 25932

1. Diameter zona hambat oksasilin (ox) = 35 mm
2. Diameter zona hambat sefoksitin (fox) = 25 mm

Lampiran 7. Foto hasil pengenceran pada uji dilusi bakteri MRSA

Lampiran 8. Standar kekeruhan *Mc Farland* dan tabel Interpretative standards *Kirby-Bauer*

Standar kekeruhan *Mc Farland*

Volume dalam MI			Number of Bacteria/ mL/(10 ⁸) represented
Standard	1% BaCL ₂	1% H ₂ SO ₄	
0.5	0.5	99.5	1.5
1	1.0	99.0	3
2	2.0	98.0	6
3	3.0	97.0	9
4	4.0	96.0	12
5	5.0	95.0	15
6	6.0	94.0	18
7	7.0	93.0	21
8	8.0	92.0	24
9	9.0	91.0	27
10	10.0	90.0	30

Tabel Interpretive standards *Kirby-Bauer*

Antibiotic (Antimicrobial Agent)	DISC CODE	Resistant	Intermediate	Susceptible
		< or = mm	mm	= or > mm
Amoxicillin (other)	AMC	<13	14-17	>18
Amoxicillin (Staph)	AMC	19		20
Ampicillin (other)	AM	11	12-13	14
Ampicillin (Staph)	AM	28		29
Carbenicillin (other)	CB	17	18-22	23
Carbenicillin (Pseudomonas)	CB	13	14-16	17
Cefoxitin	FOX	14	15-17	18
Cephalothin	CF	14	15-17	18
Chloramphenicol	C	12	13-17	18
Ciprofloxacin	CIP-5	15	16-20	21
Clindamycin	CC-2	14	15-20	21
Enoxacin (Fluoroquinolone, 2nd gen.)	ENX-10	14	15-17	18
Erythromycin	E	13	14-22	23
Gentamycin	GM	12	13-14	15
Kanamycin	K-30	13	14-17	18
Methicillin (Staph)	M(orDP)	9	10-13	14
Oxacillin (Staph)	OX	10	11-12	13
Penicillin G (Enterococcus)	P	14		15
Penicillin G (Staph)	P	28		29
Streptomycin	S-10	14	15-20	21
Sulfamethoxazole-trimethoprim	SXT	10	11-15	16
Tetracycline	Te-30	14	15-18	19
Tobramycin	NN-10	12	13-14	15
Vancomycin	Va-30	9	10-11	12

Lampiran 9. Formulasi dan pembuatan media

a. Formulasi dan pembuatan *Brain Heart Infusion* (BHI)

Brain infusion	12,5 gram
Heart infusion	5,0 gram
Proteose peptone	10,0 gram
Glucose	2,0 gram
Sodium chloride	5,0 gram
di-sodium hydrogen phosphate	2,5 gram

BHI ditimbang sebanyak 37 gram, dilarutkan dalam Aquadest sebanyak 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituangkan dalam cawan petri pH 7,4 (Bridson 1998).

b. Formulasi dan pembuatan *Vogel jhonson Agar* (VJA)

Peptone from casein	10,0 gram
Yeast extract	5,0 gram
di-potasium hydrogen phosphate	10,0 gram
D(-)mannitol	10,0 gram
Lithium chloride	5,0 gram
Glycine	10,0 gram
Phenol red	0,025 gram
Agar	13,0 gram

VJA ditimbang sebanyak 61 gram, dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituangkan dalam cawan petri pH 7,4.

c. Formulasi dan pembuatan *Mueller Hinton Agar* (MHA)

Beef extract	2,0 gram
Acid Hydrolysate of casein	17,5 gram
Starch	1,5 gram
Agar	17,0 gram

MHA ditimbang sebanyak 38 gram, dilarutkan dalam aquadest sebanyak 1000 ml, dipanaskan sampai larut sempurna, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan dituangkan dalam cawan petri pH 7,4.

d. Formulasi dan pembuatan agar darah

3 tetes darah domba dimasukkan dalam cawan petri steril, ditambah 10 ml media *Nutrient Agar* yang telah dicairkan secara aseptis, ratakan sampai homogen dan diamkan sampai media menjadi padat.

Formulasi <i>Nutrient Agar</i>	(NA)
Ekstrak daging sapi	3,0 gram
Pepton	5,0 gram
Agar	15,0 gram

Lampiran 10. Fota alat kerja



Rotary evaporator



Penggiling



Moisture balance



Neraca ohaus



Inkubator



Oven



Autoklaf



vortex



Pinset



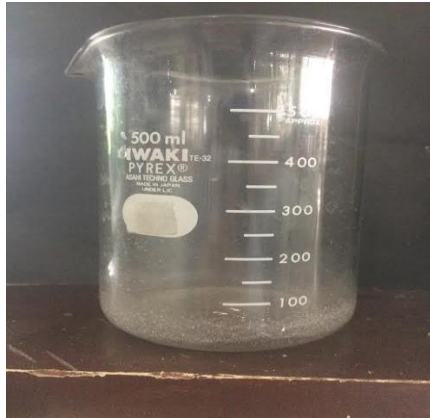
Erlenmeyer



Gelas ukur



Cawan petri



Beaker glass



Tabung reaksi



Pipet ukur



mikroskop



Yellowtip



mikropipet