

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

A. Pengolahan Tanaman

1. Hasil determinasi daun sirsak (*Annona muricata* Linn) dan daun alpukat (*Persea americana* Mill)

Tahapan awal dari penelitian ini adalah dengan melakukan determinasi tanaman daun sirsak dan daun alpukat yang bertujuan untuk mengetahui kebenaran tanaman yang digunakan kemudian mencocokkan morfologi tanaman dengan literatur agar menghindari kesalahan pengumpulan tanaman yang digunakan untuk penelitian. Determinasi tanaman dilakukan pada bulan Januari di Laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas MIPA Universitas Sebelas Maret, Surakarta.

Berdasarkan hasil determinasi dinyatakan bahwa benar tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah benar-benar daun sirsak (*Annona muricata* Linn) dan daun alpukat (*Persea americana* Mill).

Hasil determinasi (Berdasarkan lampiran 1) untuk daun sirsak (*Annona muricata* L.) berdasarkan C.A Backer & R.C Bakhuizen van de Brink Jr (1963) yakni sebagai berikut: 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 . Annonaceae. 1b – 10b – 13b – 17a . Annona. 1a. *Annona muricata* L. Hasil determinasi daun sirsak dapat dilihat pada lampiran 1.

Hasil determinasi (Berdasarkan lampiran 2) untuk daun alpukat (*Persea americana* Mill) berdasarkan C.A Backer & R.C Bakhuizen van de Brink Jr (1963) yakni sebagai berikut: 1b – 2b – 3b – 4b – 12b – 13b – 14b – 17b – 18b – 19b – 20b – 21b – 22b – 23b – 24b – 25b – 26b – 27b – 799b – 800b – 801b – 802b – 806b – 807b – 809b – 810b – 811a – 812b – 815b – 816b – 818b – 820b –

821b – 822b – 824b – 825b – 826b – 829b – 830b – 831b – 832b – 833b – 834b – 835a – 836a – 837c – 851a – 852b – 853b – 854a – 855c – 856b – 857a – 858a – 859c – 860b – 872a – 873b. Laurceae. 1b – 2a- 3b – 5b – 8b – 9b – 10a. Persea. 1a – 2b. *Persea americana* Mill. Hasil determinasi daun sirsak dapat dilihat pada lampiran 2.

2. Pengumpulan Simplisia

Daun sirsak dan daun alpukat diambil dari daerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah dibulan Januari 2019. Daun yang diambil dari keduanya adalah yang berwarna hijau tua, daun tidak rusak dan tidak kering. Kedua daun kemudian disortasi dan dicuci dengan air mengalir sampai bersih yang ditandai dengan tidak adanya debu dan kotoran yang menempel pada daun.

3. Pembuatan Serbuk

Daun sirsak dan daun alpukat yang telah dipilih kemudian dikeringkan dengan oven pada suhu 54° C selama 48 jam untuk menghilangkan kadar air yang masih terkandung dalam simplisia serta untuk memudahkan penyerbukan, setelah itu dihitung bobot kering terhadap bobot basah daun sirsak dan daun alpukat yang dapat dilihat pada table 2. Hasil perhitungan bobot kering terhadap bobot basah daun sirsak dan daun alpukat dapat dilihat pada lampiran 5.

Tabel 1. Rendemen bobot kering terhadap bobot basah daun sirsak dan daun alpukat

Daun	Bobot basah	Bobot kering	Presentase
Sirsak	4490 gram	1760 gram	39,20 %
Alpukat	5210 gram	1970 gram	37,81 %

Hasil dari bobot basah daun sirsak 4490 gram, diperoleh bobot kering daun sirsak 1760 gram dan diperoleh presentase rendemen 39,20 % b/b. Hasil untuk bobot basah daun alpukat 5210 gram, diperoleh bobot kering daun alpukat 1970 gram dan di hasilkan presentase rendemen daun alpukat 37,81 % b/b. Daun sirsak dan daun alpukat segar dan kering dapat dilihat pada lampiran 3.

4. Penetapan susut pengeringan serbuk daun sirsak dan daun alpukat

Hasil penetapan susut pengeringan dilakukan sebanyak tiga kali replikasi menggunakan alat *Moisture Balance* dengan suhu 105°C. Penetapan susut pengeringan adalah pengukuran sisa zat setelah pengeringan yang dinyatakan dalam nilai persen atau sampai berat konstan. Dalam hal khusus (jika bahan tidak

mengandung minyak menguap dan sisa pelarut organik menguap) identik dengan kadar air, yaitu kandungan air karena berada di atmosfer atau lingkungan udara terbuka.

Tabel 2. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun sirsak

No	Bobot awal (g)	Susut pengeringan (%)
1	2	5,2
2	2	4,5
3	2	5,0
Rata-rata		4,9

Hasil rata-rata penetapan susut pengeringan serbuk daun sirsak adalah 4,9 %. Nilai ini menyatakan jumlah maksimal senyawa yang mudah menguap atau hilang pada proses pengeringan. Nilai susut pengeringan pada hal ini identik dengan kadar air dan sisa pelarut organik yang menguap. Artinya daun sirsak sudah memenuhi syarat pengeringan simplisia karena kurang dari 10% untuk mencegah terjadinya pembusukan yang disebabkan oleh mikroorganisme dan mencegah perubahan kimiawi yang menurunkan mutu serbuk. Hasil perhitungan penetapan susut pengeringan dapat dilihat pada lampiran 6.

Hasil penetapan susut pengeringan untuk serbuk daun alpukat dilakukan untuk mengetahui sisa zat yang diperoleh setelah dilakukan pengeringan serbuk, nilai % susut pengeringan dapat dilihat pada table 3.

Tabel 3. Hasil penetapan susut pengeringan serbuk daun alpukat

No	Bobot awal (g)	Susut pengeringan (%)
1	2	5,0
2	2	5,5
3	2	5,2
Rata-rata		5,2

Hasil rata-rata akhir dari tiga kali pengulangan penetapan susut pengeringan serbuk daun alpukat adalah 5,2 % hal ini dapat diartikan bahwa serbuk daun alpukat telah memenuhi syarat pengeringan simplisia karena nilai susut pengeringan serbuk daun alpukat adalah dibawah 10 %. Hasil perhitungan penetapan susut pengeringan dapat dilihat pada lampiran 7.

5. Pembuatan ekstrak etanol daun sirsak dan daun alpukat beserta kombinasinya

Tahap pertama pembuatan ekstrak diawali dengan menimbang serbuk daun sirsak dan daun alpukat masing-masing sebanyak 500 gram, untuk variasi kombinasi 1 : 1 ditimbang 250 gram serbuk daun sirsak dan 250 gram serbuk daun alpukat, kombinasi 1 : 3 ditimbang 125 gram serbuk sirsak dan 375 gram serbuk alpukat, kombinasi 3 : 1 ditimbang 375 gram serbuk sirsak dan 125 gram serbuk alpukat kemudian lima variasi serbuk dimasukkan ke dalam botol kaca gelap berbeda untuk proses maserasi. Bahan dalam botol tersebut kemudian ditambahkan pelarut etanol 70% sebanyak 3750 ml (1:7,5) ditutup dan direndam selama 5 hari dengan pengocokkan berulang. Pengocokkan bertujuan agar diperoleh keseimbangan konsentrasi zat tersari dalam cairan penyari. Hasil filtrat disaring dengan kertas saring atau kain flanel. Residu yang diperoleh dibilas dengan sisa pelarut etanol yakni sebanyak 2,5 bagian kemudian didiamkan selama 2 hari dan digojog setiap 6 jam. Filtrat kemudian disaring dan digabungkan dengan filtrat pertama.

Hasil maserasi atau filtrat dipisahkan dengan alat *vacuum rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak pekat dan dimasukkan ke dalam oven pada suhu 54 °C untuk diperoleh ekstrak kental daun sirsak (*Annona muricata*L.) dan daun alpukat (*Persea americana* Mill). Hasil rendemen ekstrak etanol daun sirsak, daun alpukat dan variasi kombinasinya dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Rendemen ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) daun alpukat (*Persea americana* Mill) dan kombinasinya

Daun	Berat serbuk (gram)	Berat ekstrak (gram)	Rendemen %b/b
Sirsak	500	143,599	28,72%
Alpukat	500	143,053	28,61%
1 : 1	500	144,343	28,87%
1 : 3	500	142,581	28,52%
3 : 1	500	143,324	28,66%

Hasil rendemen yang diperoleh dari ekstrak tunggal daun sirsak adalah 28,72% dari ekstrak tunggal daun alpukat 28,61% dan kombinasi 1:1 diperoleh rendemen 28,87% kombinasi 1:3 28,52% kombinasi 3:1 diperoleh rendemen 28,66%, sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun sirsak, ekstrak

etanol daun alpukat dan kombinasinya memiliki hasil ekstrak yang sama-sama pekat karena memiliki nilai rendemen yang tidak jauh berbeda. Kepekatan yang tidak jauh berbeda pada ekstrak daun sirsak, ekstrak daun alpukat dan kombinasinya kemungkinan disebabkan karena ekstrak tanaman tersebut memiliki jumlah kandungan metabolit sekunder yang tidak berbeda jauh. Perhitungan presentase rendemen ekstrak etanol daun sirsak dan daun alpukat dapat dilihat pada lampiran 8.

6. Uji bebas etanol ekstrak daun sirsak dan daun alpukat

Ekstrak daun sirsak dan daun alpukat selanjutnya dilakukan uji bebas etanol. Uji bebas etanol bertujuan untuk mengetahui adanya kandungan etanol dalam ekstrak yang memiliki aktivitas antibakteri. Hasil uji dapat dilihat pada tabel 5.

Tabel 5. Hasil uji bebas etanol

Ekstrak	Prosedur	Hasil	Pustaka
Sirsak & alpukat	Ekstrak + H ₂ SO ₄ conc + CH ₃ COOH dipanaskan	Tidak tercium bau ester	Tidak tercium bau ester (Depkes 1977)

Hasil uji bebas etanol pada table diatas menunjukkan bahwa ekstrak daun sirsak dan daun alpukat sudah terbebas dari pelarutnya yaitu etanol yang ditunjukkan dengan tidak adanya bau ester yang khas dari etanol.

7. Identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak daun sirsak dan daun alpukat

Identifikasi kandungan kimia serbuk dan ekstrak, daun sirsak dan daun alpukat dilakukan untuk mengetahui kandungan kimia yang terkandung dalam tanaman tersebut. Identifikasi pada senyawa flavonoid, alkaloid, tannin dan saponin.

Tabel 6. Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak

Kandungan kimia	Tinjauan pustaka	Hasil	
		Sirsak	Alpukat
Flavonoid	Warna merah atau jingga/kuning pada lapisan amil alkohol (Depkes 1978).	Terbentuk warna kuning pada amil alkohol	Terbentuk warna kuning pada lapisan amil alkohol (+)
Alkaloid	Terbentuk keruhan /endapan coklat pada Dragendroff dan terbentuk endapan putih kekuningan pada Mayer (Depkes 1978).	Dragendroff terbentuk endapan coklat	Dragendroff terbentuk endapan coklat (+)
Tanin	Reaksi + bila terbentuk	Berwarna coklat	Berwarna coklat

Kandungan kimia	Tinjauan pustaka	Hasil	
		Sirsak	Alpukat
	warna coklat atau biru kehitaman (Robinson 1995).		(+)
Saponin	Reaksi + bila busa masih terbentuk 1-10 cm setelah penambahan HCl 2N tidak hilang (Depkes 1978).	Terbentuk buih	Terbentuk buih (+)

Hasil tabel 6 menunjukkan identifikasi kandungan kimia terhadap serbuk dan ekstrak daun sirsak dan serbuk daun alpukat menggunakan uji tabung reaksi. Hasil penelitian mengenai kandungan kimia dalam serbuk daun sirsak dan daun alpukat telah sesuai dengan pustaka, sehingga dapat dikatakan bahwa serbuk daun sirsak dan daun alpukat mengandung flavonoid, alkaloid, tannin dan saponin. Hasil identifikasi senyawa kimia dapat dilihat pada lampiran 9.

B. Pengamatan dan Uji Antibakteri

1. Identifikasi bakteri uji *Salmonella typhi* ATCC 13311

1.1. Identifikasi bakteri dengan cawan gores. *Salmonella typhi* ATCC 13311 diinokulasikan pada media SSA dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Berdasarkan pengamatan, koloni yang dihasilkan berbentuk bulat, tepi tajam, permukaan halus, berwarna hitam, dan diameter koloni 1-3 mm. Beberapa kriteria koloni ini ternyata sesuai dengan kriteria dalam proses identifikasi *Salmonella Typhi* (Kundera *et al.* 2014). Hasil identifikasi *S.typhi* dapat dilihat pada lampiran 13.

1.2. Identifikasi pewarnaan. *Salmonellaa typhi* ATCC 13311 merupakan bakteri Gram negatif yang berbentuk batang. Pewarnaan Gram dilakukan untuk memastikan bahwa *Salmonella typhi* ATCC 13311 merupakan bakteri Gram negatif. Pewarnaan Gram dilakukan dengan pemberian zat warna dasar, kristal violet (Gram A) kemudian diberikan larutan iodin (Gram B) kemudian preparat diberikan alkohol (Gram C) sebagai peluntur warna. Sel bakteri Gram positif akan tetap mempertahankan kompleks kristal violet-iodin sehingga tetap berwarna ungu, sedangkan sel bakteri Gram negatif benar-benar hilang warnanya oleh alkohol, selanjutnya diberikan zat warna lawan berupa safranin (Gram D) sehingga *Salmonella typhi* ATCC 13311 akan berwarna merah. Hal ini disebabkan karena dinding sel bakteri Gram negatif mempunyai

kandungan lipida yang tinggi dalam bentuk lipopolisakarida dan lipoprotein (Fardiaz 1992). Lipida pada dinding sel bakteri Gram negatif akan larut oleh alkohol sehingga pori-pori mengembang dan menyebabkan kompleks kristal violet dengan iodin keluar dari sel, akibatnya dinding sel bakteri menjadi tidak berwarna. Dinding sel bakteri yang tidak berwarna tersebut akan menyerap zat warna safranin sehingga sel bakteri akan tampak berwarna merah ketika dilihat dibawah mikroskop (Pelczar & Chan 2007). Hasil pewarnaan bakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 dapat dilihat pada lampiran 14.

1.3. Identifikasi uji biokimia. Hasil identifikasi bakteri uji *Salmonella typhi* ATCC 13311 secara biokimia dapat dilihat pada tabel 7.

Tabel 7. Identifikasi uji biokimia *Salmonella typhi* ATCC 13311

Media uji	Hasil	Pustaka (Kundera <i>et al.</i> 2014)
SIM	+ - +	+ - +
KIA	K/A S ⁺	K/A S ⁺
Urea	-	-
Citrat	-	-

Keterangan :

SIM	: Sulfida Indol Motility	A	: Acid (asam)
KIA	: Kligler Iron Agar	K	: Alkali (basa)
Urea		S	: Sulfida (hitam)
Citrat		G	: Gas
+	: Reaksi positif		
-	: Reaksi negatif		

Hasil uji pada medium SIM untuk mengetahui terbentuknya sulfida, indol, dan motilitas. Uji sulfida (+) artinya *S.typhi* dapat mereduksi thiosulfat sehingga menghasilkan hydrogen sulfat yang menyebabkan media menjadi berwarna hitam. Uji indol (-) karena tidak terbentuk cincin merah pada media setelah ditambah reagen Erlich A dan B 3 tetes, *Salmonella typhi* ATCC 13311 tidak membentuk cincin indol karena tidak terjadi pemecahan asam amino triptopan oleh enzim triptonase menjadi indol & asam piruvat sehingga menunjukkan bakteri tidak memakai triptopan sebagai salah satu sumber karbon sehingga tidak terjadi reaksi antara indol dan parametil amino bensaldehid yang akan membentuk rosindol yang berwarna merah. Uji motilitas (+) karena terjadi pertumbuhan bakteri yang menyebar pada bekas tusukan, hal ini menunjukkan adanya pergerakan dari bakteri yang diinokulasikan, yang berarti bahwa bakteri ini memiliki flagel.

Hasil uji pada medium KIA untuk mengetahui fermentasi karbohidrat, ada tidaknya gas dan pembentukan sulfida. Hasil yang diperoleh menunjukkan K/AS⁺, K/A artinya pada lereng dan dasar media berwarna merah sedikit kuning, hal ini menunjukkan bahwa bakteri dapat memfermentasi laktosa. S (+) artinya H₂S positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna hitam pada media, karena bakteri mampu mendesulfurasi asam amino dan methion yang akan menghasilkan H₂S dan H₂S akan bereaksi dengan Fe⁺⁺ yang terdapat pada media sehingga terbentuk warna hitam. Medium KIA mengandung laktosa dan dektrosa dalam konsentrasi 1% laktosa, 0,1% dektrosa dan phenol red sebagai indikator yang menyebabkan perubahan warna merah menjadi kuning dalam suasana asam. Medium KIA juga mengandung sodium thiosulfate yaitu susunan untuk penghasil H₂S.

Hasil uji urea pada bakteri *S.typhi* adalah negatif yaitu ditandai dengan tidak terbentuknya perubahan warna merah muda pada media uji. Prinsip uji urease yaitu media urea terdegradasi menjadi amoniak menyebabkan lingkungan basa, maka media menjadi merah muda dimana sebagian besar bakteri golongan enteric dapat mendegrasi urea, tetapi lambat. Fungsi uji urease adalah mendeteksi bakteri yang dapat mendegradasi urea dengan cepat.

Hasil uji pada medium citrat untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal. Hasil menunjukkan negatif ditandai dengan tidak terbentuknya warna biru pada media citrat. Hal ini dikarenakan *Salmonella typhi* ATCC 13311 tidak menggunakan citrat sebagai sumber karbon yang menyebabkan suasana menjadi basa sehingga terjadi peningkatan pH dan mengubah warna medium dari hijau menjadi biru karena pada medium citrat terdapat indikator BTB (*Bromo thymol blue*) yang merupakan indikator pH. Hasil uji identifikasi biokimia *Salmonella typhi* ATCC 13311 dapat dilihat pada lampiran 15.

2. Uji aktivitas antibakteri daun sirsak dan daun alpukat beserta kombinasinya dengan metode difusi

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret, Surakarta menggunakan metode difusi. Metode difusi bertujuan untuk mengetahui diameter zona hambat di sekitar

sumuran yang dinyatakan dalam mm, daerah yang jernih di sekitar sumuran menandakan bahwa kandungan kimia dari daun sirsak dan daun alpukat memiliki daya hambat terhadap *Salmonella typhi* ATCC 13311.

Tabel 8. Hasil uji aktivitas antibakteri *Salmonella typhi* ATCC 13311 metode difusi

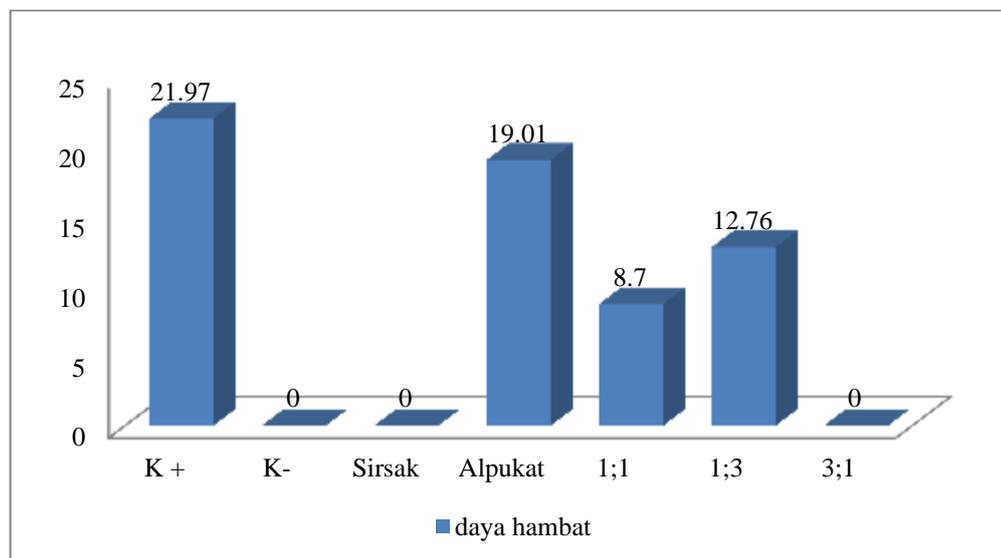
Perlakuan	Diameter daya hambat (mm)			Rata – rata (mm) ± SD
	Replikasi			
	1	2	3	
K +	22,14	21,64	22,12	21,97 ± 0,283
K -	0	0	0	0 ± 0
Sirsak	0	0	0	0 ± 0
Alpukat	19,76	18,83	18,45	19,01 ± 0,673
1 : 1	9,89	7,42	8,81	8,70 ± 1,238
1 : 3	13,48	12,83	11,96	12,76 ± 0,762
3 : 1	0	0	0	0 ± 0

Keterangan : K + : Kloramfenikol
 K - : Tween 80 10%
 1 : 1 : 250 gram serbuk sirsak + 250 gram serbuk alpukat
 1 : 3 : 125 gram serbuk sirsak + 375 gram serbuk alpukat
 3 : 1 : 375 gram serbuk sirsak + 125 gram serbuk alpukat

Hasil rata-rata dari uji difusi pada tabel 8 menunjukkan bahwa kloramfenikol memiliki nilai tertinggi sebesar 21,97 mm, ekstrak tunggal alpukat dengan nilai rata-rata 19,01 mm, perbandingan 1 : 3 nilai rata-rata 12,76 mm, perbandingan 1 : 1 nilai rata-rata 8,70, sedangkan ekstrak tunggal sirsak dan perbandingan 3 : 1 menunjukkan nilai rata-rata 0 yang berarti ekstrak tersebut tidak memiliki aktivitas daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi*. Konsentrasi ekstrak yang dibuat adalah 50% menggunakan Tween 80 10% sebagai pelarut.

Aktivitas antibakteri dari ekstrak tunggal daun alpukat, perbandingan kombinasi 1 : 1 dan 1 : 3 dapat terjadi karena adanya kandungan senyawa alkaloid, flavonoid, saponin dan tannin yang telah dibuktikan dengan uji identifikasi. Senyawa flavonoid bekerja dengan cara merusak dinding sel bakteri, mikrosom, dan lisosom sebagai hasil interaksi antara flavonoid dengan DNA bakteri, flavonoid merupakan turunan senyawa fenol memiliki efek antimikroba dengan mendenaturasi ikatan protein pada membran sel, sehingga membran sel menjadi lisis (Lumbessy 2013). Mekanisme kerja alkaloid sebagai antimikroba dengan menghambat topoisomerase, menyisip pada DNA, dan menghambat sintesis DNA, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh atau lisis

sel, dan menyebabkan kematian sel tersebut (Sarinastiti 2018). Mekanisme kerja tanin sebagai antibakteri adalah menghambat enzim *reverse* transkriptase dan DNA topoisomerase sehingga sel bakteri tidak dapat terbentuk, tanin juga memiliki target pada polipeptida dinding sel sehingga pembentukan dinding sel kurang sempurna. Hal ini menyebabkan sel bakteri menjadi lisis karena tekanan osmotik maupun fisik sehingga sel bakteri akan mati (Akbar 2016). Mekanisme kerja saponin sebagai antibakteri yaitu dengan mengubah permeabilitas dinding sel, saponin dapat bergabung dengan sel membran bakteri untuk kemudian menyebabkan perubahan morfologi sel, sehingga terjadi lisis sel (Sarinastiti 2018).



Gambar 1. Histogram uji aktivitas antibakteri dengan difusi

Hasil kombinasi perbandingan 1 : 1 daun sirsak dan daun alpukat berdasarkan tabel 9 memiliki aktivitas antibakteri yang lebih kecil dibandingkan dengan aktivitas dari kombinasi perbandingan 1 : 3. Hasil dikatakan sinergis apabila hasil kombinasi memiliki efek terapeutik yang lebih besar dibandingkan dengan penggunaan tunggal, sebaliknya hasil dikatakan antagonis apabila hasil kombinasi memiliki efek terapeutik yang lebih kecil atau saling meniadakan antara antibakteri yang digunakan. Menurut Adwan *et al.* (2010), hasil kombinasi biasanya bersifat sinergis atau aditif apabila antara kombinasi ekstrak memiliki mekanisme aksi yang berbeda. Diketahui pada ekstrak daun sirsak dan daun alpukat sama-sama memiliki kandungan golongan senyawa berupa flavonoid,

alkaloid, tannin dan saponin yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri, sehingga adanya persamaan mekanisme kerja dari senyawa antibakteri oleh kedua tanaman tersebut berpengaruh pada rusaknya dinding sel bakteri sehingga kombinasi tidak menghasilkan efek sinergis maupun aditif (Amman *et al.* 2011). Menurut Adwan dan Mhanna (2008), kombinasi lebih baik dilakukan pada ekstrak yang telah difraksi atau dari senyawa murni tanaman daripada menggunakan ekstrak kasar. Hal ini dikarenakan pada ekstrak kasar masih terdapat banyak senyawa yang dimungkinkan dapat bereaksi satu dengan yang lain sehingga dapat mempengaruhi aktivitasnya. Pada penelitian ini digunakan ekstrak kasar daun sirsak dan daun alpukat sehingga kombinasi tidak memiliki aktivitas antibakteri yang sinergis. Berdasarkan uraian tersebut maka kombinasi antara ekstrak etanol daun sirsak dan daun alpukat memberikan efek yang antagonis terhadap bakteri *S.typhi*. Hal ini dapat disebabkan adanya mekanisme yang sama antara senyawa yang bertanggung jawab sebagai antibakteri pada ekstrak etanol daun sirsak dan daun alpukat, sehingga menyebabkan penurunan aktivitas antibakteri. Selain itu dapat juga disebabkan karena adanya senyawa lain dari ekstrak kasar daun sirsak dan daun alpukat yang saling bereaksi sehingga membentuk senyawa yang tidak aktif (Adwan dan Mhanna, 2008).

Biji buah alpukat secara tradisional banyak digunakan sebagai sumber fitoterapeutik untuk mengatasi infeksi parasit dan mikosis. Diketahui biji alpukat mengandung senyawa fitosterol, triterpen, asam lemak, asam furanoik, dimer flavonol, proantosianidin, dan asam absisat (Sulistyowati & Yachya, 2015). Selain itu, bijinya juga diketahui dapat digunakan sebagai antiradang, menghilangkan rasa sakit, menyembuhkan sariawan mulut, mengobati sakit gigi, mengatasi diabetes melitus, sebagai antibakteri dan kencing manis (Sarinastiti, 2018).

Kandungan senyawa metabolit sekunder golongan flavonoid dalam biji alpukat memiliki beberapa mekanisme kerja sebagai antimikroba diantaranya, *Licochalcone A* dapat menghambat penggabungan perkusor radioaktif menjadi makromolekul (DNA, RNA dan protein), menghambat konsumsi oksigen, menghambat aktivitas NADH-sitokrom c reductase, sehingga pembentukan energi yang seharusnya dibutuhkan tidak dapat terbentuk akhirnya menyebabkan

kematian sel. *Sophoraflavonone G* memberikan dampak pada membran sel bakteri. Jenis flavonoid ini mengganggu tingkat kestabilan lapisan membran bagian dalam dan luar. Hal ini terjadi akibat flavonoid menyerang daerah membran sel yang bersifat hidrofobik maupun hidrofilik. *Cathesin* dapat berpenetrasi ke lapisan membran lipid sehingga mengganggu fungsi dari lapisan membran tersebut. *Cathesin* dapat juga menyebabkan fusi pada membran luar dan dalam sehingga terjadi kebocoran dan agregasi dari material. Semua mekanisme tersebut pada akhirnya dapat meningkatkan permeabilitas sel sehingga sel bakteri akan lisis (Sarinastiti, 2018).

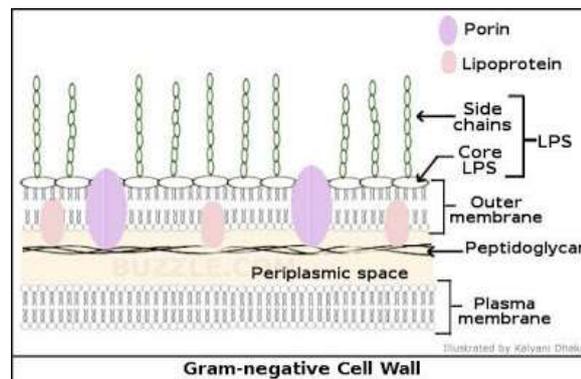
Penelitian oleh (Sarinastiti, 2018), menyatakan bahwa perbandingan aktivitas antibakteri antara ekstrak daun dan biji alpukat efektif dalam menhambat pertumbuhan *S. aureus* dan juga dapat menghambat *E. coli* dengan konsentrasi efektif sebesar 80%. Menurut (Amman *et al.* 2011) menyatakan bahwa biasanya hasil kombinasi antar senyawa bisa sinergis apabila antar senyawa tersebut memiliki mekanisme aksi yang berbeda. Berdasarkan penjelasan tersebut untuk mendapat hasil kombinasi yang sinergis dapat dilakukan penelitian terhadap kombinasi ekstrak daun dan biji alpukat sebagai antibakteri karena diduga masing-masing tanaman daun maupun biji alpukat memiliki kandungan senyawa kimia serta mekanisme kerja yang berbeda sebagai antibakteri.

Tidak adanya aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol daun sirsak diduga dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya meliputi konsentrasi ekstrak, kadar senyawa metabolit sekunder terlarut, karakteristik dan sifat virulensi bakteri yang dihambat. Pelarut etanol yang digunakan dalam proses ekstraksi merupakan pelarut umum yang bersifat semipolar, dapat melarutkan senyawa polar maupun senyawa nonpolar. Hasil skrining fitokimia didapatkan bahwa ekstrak etanol daun sirsak mengandung senyawa metabolit sekunder berupa alkaloid, flavanoid, saponin dan tanin. Metode yang digunakan untuk menguji kandungan senyawa metabolit sekunder pada penelitian ini bersifat kualitatif, artinya hanya mendeteksi ada atau tidaknya kandungan senyawa metabolit sekunder, sehingga kadar masing-masing senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam daun sirsak tidak dapat diketahui. Perbedaan kandungan senyawa metabolit sekunder

juga dapat terjadi dikarenakan perbedaan lingkungan tempat tumbuh tanaman, genetik, metode budidaya, waktu pengumpulan, serta pengolahan pasca panen. Senyawa metabolit sekunder dalam suatu tumbuhan dapat bervariasi karena kondisi lingkungannya, jenis varietas, kondisi fisiologis (tua atau muda) dan juga sifat kimianya (Apriyuslim *et al.* 2015).

Ekstrak tunggal daun sirsak dan kombinasi 3 : 1 berdasarkan hasil uji difusi tidak memiliki zona hambat terhadap pertumbuhan bakteri *S.typhi*. Hal ini dapat berkaitan dengan ketahanan suatu bakteri yaitu struktur dinding selnya terhadap senyawa antibakteri, bakteri Gram negatif khususnya *S.typhi* lapisan membran luar dinding sel mengandung lipoprotein, fosfolipid dan lipopolisakarida sedangkan lapisan dalam berupa lapisan peptidoglikan tipis dengan kandungan lipid tinggi (11-22 %). Lipid ini memiliki sifat impermeable dan berfungsi mencegah masuknya bahan kimia dari luar, adanya sistem seleksi terhadap zat-zat asing pada lapisan lipopolisakarida menyebabkan senyawa antibakteri sulit masuk ke dalam sel dan menentukan sasaran untuk bekerja (Brooks *et al.* 2008).

Faktor lain yang dapat mempengaruhi tidak bekerjanya senyawa antibakteri dari ekstrak tanaman antara lain permeabilitas membran luar dinding sel bakteri dan faktor virulensi dari bakteri. Permeabilitas membran luar dinding sel bakteri Gram negatif ditentukan oleh adanya protein tertentu yang disebut porin. Porin memungkinkan difusi pasif komponen hidrofilik dengan berat molekul rendah seperti gula, asam amino, dan beberapa jenis ion, namun impermeabel terhadap molekul berukuran besar. Molekul antibakteri berukuran besar relatif lambat saat menembus membran luar yang menyebabkan bakteri Gram negatif relatif lebih resisten terhadap senyawa antibakteri. Faktor virulensi bakteri menggambarkan kekuatan suatu strain dalam pertahanan terhadap pemberian zat antibakteri. Struktur dan faktor virulensi bakteri *Salmonella typhi* meliputi, enterotoksin, endotoksin di lapis LPS, antigen O, antigen H, antigen Vi, flagella, dan fimbriae (Apriyuslim *et al.* 2015).



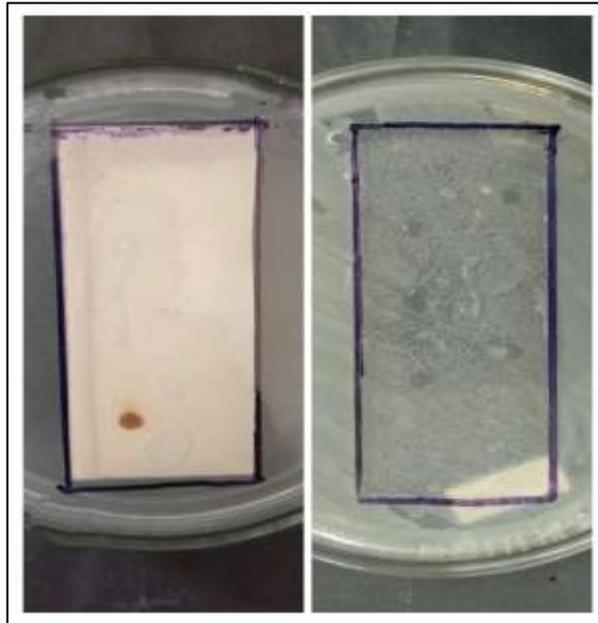
Gambar 2. Struktur sel bakteri Gram negatif (www.sridianti.com)

Hasil penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa pelarut tween 80 10% yang digunakan tidak memiliki kemampuan dalam menghambat bakteri. Selain itu pelarut tween 80 mampu melarutkan semua senyawa yang bersifat polar, semipolar, dan nonpolar. Kontrol positif yang digunakan adalah kloramfenikol, dimana kontrol positif ini sebagai pembanding terhadap aktivitas antimikroba ekstrak, karena antibiotik merupakan senyawa antimikroba yang telah dibuat secara standar (Reapinam 2007). Kloramfenikol bekerja dengan mengikat subunit ribosom 50 S secara reversible, walaupun pengikatan tRNA pada bagian pengenalan kodon ini ternyata menghalangi pengikatan ujung tRNA aminosil yang mengandung asam amino ke tempat akseptor pada subunit ribosom 50 S. Interaksi antara peptidiltransferase dengan substrat asam aminonya tidak dapat terjadi, sehingga pembentukan ikatan peptide terhambat (Dian 2015). Kloramfenikol memiliki aktivitas antibakteri yang lebih besar terhadap bakteri uji dibandingkan ekstrak, yaitu diameter zona hambat yang dihasilkan antibiotik kloramfenikol pada *Salmonella typhi* ATCC 13311 sebesar 21,97 mm. Hasil uji difusi dapat dilihat pada lampiran 17.

3. Uji aktivitas antibakteri dengan Bioautografi

Uji bioautografi merupakan metode sederhana yang digunakan untuk menunjukkan adanya aktivitas antibakteri atau antikapang. Metode ini menggabungkan penggunaan teknik kromatografi lapis tipis dengan respons dari bakteri uji berdasarkan aktivitas biologi dari suatu analit yang dapat berupa antibakteri, antikapang dan antiprotozoal (Darmono *et al.* 2008). Hasil pengamatan pada uji bioautografi yang telah dilakukan terlihat pada media bercak

bening yang diyakani sebagai bukti adanya aktivitas antibakteri dari senyawa ekstrak yang telah ditotolkan pada lempeng. Golongan senyawa yang diujikan dalam penelitian ini adalah flavonoid dan baku pembanding adalah rutin. Hasil uji identifikasi KLT dengan penampakkan sinar uv 366 nm dan 254 nm dapat dilihat pada lampiran 18.



Gambar 3. Hasil uji klt-bioautografi terhadap *Salmonella typhi*

C. Analisis Hasil

Hasil data uji difusi dari tabel 9 diatas kemudian dilakukan analisis data statistik menggunakan SPSS. Pertama data diuji menggunakan *Kolmogorov-Smirnov test* untuk mengetahui apakah data terdistribusi normal, dari data statistik didapat nilai sig $0,863 > (0,05)$ yang artinya data berdistribusi normal. Setelah itu data dilakukan test homegenitas menggunakan *ANOVA one way test* untuk mengetahui apakah data homogen dari data statistik diketahui uji homgenitas varian dari daya hambat tidak dapat dilakukan karena hanya memiliki satu kelompok varian yang dihitung. Oleh karena itu uji dilanjutkan dengan analisis *Krusskall wallis* untuk mengetahui nilai sig data apakah ada perbedaan yang signifikan dari data statistik diketahui nilai sig $0,423 > (0,05)$ yang artinya data daya hambat memiliki perbedaan yang signifikan. Hasil analisis data menggunakan SPSS dapat dilihat pada lampiran 20.

