

TESIS

**EFEK EKSTRAK ETANOL DAUN SIRSAK (*Annona muricata L.*)
TERHADAP HAMBATAN PERTUMBUHAN DAN PERUBAHAN
STRUKTUR DINDING SEL BAKTERI *Acinetobacter baumannii***



USWATUN HASANAH

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN TROPIS
JENJANG MAGISTER FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

2015

TESIS

**EFEK EKSTRAK ETANOL DAUN SIRSAK (*Annona muricata L.*)
TERHADAP HAMBATAN PERTUMBUHAN DAN PERUBAHAN
STRUKTUR DINDING SEL BAKTERI *Acinetobacter baumannii***



USWATUN HASANAH

NIM. 011214253009

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN TROPIS
JENJANG MAGISTER FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

2015

**EFEK EKSTRAK ETANOL DAUN SIRSAK (*Annona muricata L.*)
TERHADAP HAMBATAN PERTUMBUHAN DAN PERUBAHAN
STRUKTUR DINDING SEL BAKTERI *Acinetobacter baumannii***

TESIS

Untuk memperoleh Gelar Magister

Dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Tropis

Pada Jenjang Magister Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

USWATUN HASANAH

NIM. 011214253009

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN TROPIS
JENJANG MAGISTER FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

2015

Lembar Pengesahan

**TESIS INI TELAH DISETUJUI,
TANGGAL 13 FEBRUARI 2015**

Pembimbing I

Prof. Dr. Achmad Basori, Apt., Ms
NIP : 19500401 197802 1 001

Pembimbing II

Kartuti Debora, dr., M.S., Sp.MK(K)
NIP : 195006251978022001

Mengetahui
Koordinator Program Studi Ilmu Kedokteran Tropis
Jenjang Magister Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

Dr. Juniastuti, dr., M.Kes
NIP. 19710624 199802 2 001

PENETAPAN PANITIA PENGUJI TESIS

Telah diuji pada

Tanggal 13 Februari 2015

Panitia penguji,

1. Prof. Dr. Achmad Basori, Apt., Ms
2. Kartuti Debora, dr., M.S., Sp.MK (K)
3. Dr. Sunarni Zakaria, dr., M.Kes
4. Prof. Dr. I Ketut Sudiana, MSi
5. Djohar Nuswantoro, dr., MPH

UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah Robbil'Aalamiin. Puji syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa atas segala limpahan rahmat, taufik, serta hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan penyusunan Tesis yang berjudul "Efek Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata L.*) terhadap Hambatan Pertumbuhan dan Perubahan Struktur Dinding Sel Bakteri *Acinetobacter baumannii*". Dengan penuh rasa hormat dan ketulusan hati, penulis mengucapkan terimakasih kepada segenap pihak yang secara langsung maupun tidak langsung telah membantu dalam penelitian dan penulisan Tesis ini. Ucapan terimakasih terutama kepada:

Prof. Dr. Achmad Basori, Apt., Ms selaku pembimbing I dan Ibu Kartuti Debora, dr., M.S., Sp.MK (K) selaku pembimbing II, atas segala bantuan, waktu, nasihat, bimbingan dan arahan yang diberikan kepada penulis dengan penuh perhatian dan sabar dalam penyusunan tesis ini.

Tim penguji Dr. Sunarni Zakaria, dr., M.Kes., Prof. Dr. I Ketut Sudiana, MSi., dan Djohar Nuswantoro, dr., MPH selaku penguji yang telah banyak memberikan saran dan kritik yang membangun kepada penulis untuk perbaikan penelitian dan Tesis.

Dr. Juniastuti, dr., M.Kes selaku ketua jurusan Ilmu Kedokteran Tropis (IKT) yang telah memberikan dukungan dan pengarahan kepada penulis. Tim laboratorium instalasi Mikrobiologi Klinik RS. Dr. Soetomo Surabaya dan Tim di UPT. Mikroskop Elektron FK Unair Surabaya, yang telah banyak memberi bantuan teknis dalam pelaksanaan penelitian.

Secara khusus penulis ingin mengucapkan terimakasih kepada ayahanda (Alm) Moh. Rofi'i, ibunda Siti Ramlah, Suami Nanang Kuswoyo, my angel Sagita Putri Ramadhina & Nadine Syahzanani Syaida dan kakak2 Dr. H. Marzuqi Rafi'i., MBA., M.Si., Nurhasanah, Dr.H. Ahmad Hariyanto, Drs. M.Si., Siti Zainab., S.Pd., M.Si, Taufiq Hidayat, SKM., M.Kes., terima kasih telah memberikan doa, dukungan, pengorbanan baik secara moril maupun materil kepada penulis selama menempuh pendidikan di jurusan Ilmu Kedokteran Tropis (IKT).

Terima kasih kepada Swaidatul Masluhiyah AF, Mas Andi Hendra Susanto S.kom, Ahmad Junaidi, S.Pd., M.Pd. dan Moh. Nuruddin Mahmud., S.Kep. atas semangat, motivasi, dukungan, kebersamaan, dan doa yang telah diberikan kepada penulis selama kuliah hingga menyelesaikan Tesis.

Penulis menyadari bahwa penulisan Tesis ini masih jauh dari kesempurnaan, oleh karena itu kritik dan saran yang konstruktif dari semua pihak sangat diharapkan demi penyempurnaan selanjutnya. Penulis memohon maaf atas segala kekurangan dan kesalahan dalam penyusunan Tesis ini. Semoga Tesis ini bermanfaat bagi semua pihak dan pengembangan ide selanjutnya. Amin

RINGKASAN

EFEK EKSTRAK ETANOL DAUN SIRSAK (*Annona muricata L.*) TERHADAP HAMBATAN PERTUMBUHAN DAN PERUBAHAN STRUKTUR DINDING SEL BAKTERI *Acinetobacter baumannii*

Uswatun Hasanah

Acinetobacter merupakan salah satu bakteri patogen utama penyebab infeksi nosokomial. Kejadian infeksi bakteri gram negatif sebesar 25,8% disebabkan oleh bakteri *Acinetobacter baumannii* (Moehario *et al.*, 2009). Golongan obat *carbapenem* merupakan antimikroba utama yang digunakan untuk mengobati infeksi *Acinetobacter*. Pada saat ini kejadian resistensi bakteri *Acinetobacter baumannii* terhadap *carbapenem* mengalami peningkatan sebesar 40% pada tahun 2004 (Kraniotaki *et al.*, 2006.). Peningkatan angka mortalitas pasien yang terinfeksi *multidrug-resistant Acinetobacter* mencapai 68% dengan prevalensi kematian pasien dengan kolonisasi bakteri *A.baumannii* lebih tinggi dibandingkan tanpa kolonisasi bakteri *A.baumannii* (Maragakis dan Perl, 2008 ; Falagas *et al.*, 2006). Resistensi bakteri *Acinetobacter sp.* terhadap banyak antimikroba menyebabkan terapi menjadi sulit dan mahal (Brooks *et al.*, 2007). Antimikroba paten yang baru selain mahal juga memiliki efek samping seperti nefrotoksik dan neurotoksik (Hachem *et al.*, 2007). Berdasarkan standar *Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI)*, *colistin* dapat digunakan sebagai antibiotik alternatif pengganti *carbapenem* untuk *A.baumannii* yang hanya dapat diberikan secara per oral. Pemberian *colistin* tidak efisien apabila diberikan kepada penderita dengan infeksi sistemik. Oleh karena itu, penelitian terhadap bahan antimikroba baru yang efektif, murah, dan mudah didapat perlu dilakukan..

Sirsak (*Annona muricata L.*) merupakan tanaman yang ditemukan di daerah Amerika dan dapat tumbuh dengan baik di Indonesia dengan ketinggian kurang dari 1000 mdpl (Sousa *et al.*, 2010). Semua bagian dari tanaman sirsak memiliki kegunaan dalam pengobatan. Tanaman sirsak umumnya digunakan sebagai antiparasit, antispasmodik, antikanker, obat penenang, hipotensi, insektisida, obat batuk, demam, dan penyakit kulit (Adewole dan Ojewole, 2006). Seluruh bagian tanaman ini mulai dari buah, biji, bunga, kulit batang, akar dan daunnya dapat dimanfaatkan dalam pengobatan. Daun sirsak mengandung saponin, tanin, alkaloid, dan flavonoid yang dapat berperan sebagai antibakteri (Hutapea, 1993). Potensi antibakteri dari ekstrak etanol daun sirsak belum terbukti dapat menyebabkan kematian atau kerusakan struktur dinding sel bakteri *A.baumannii*.

Tujuan penelitian ini adalah membuktikan efek antibakteri ekstrak etanol daun sirsak terhadap bakteri *A.baumannii* secara *in vitro*, mengetahui hubungan pemberian konsentrasi bertingkat ekstrak etanol daun sirsak terhadap hambatan pertumbuhan bakteri *A.baumannii* secara *in vitro*, dan mengetahui gambaran perubahan struktur dinding sel bakteri *A.baumannii* pada pemberian ekstrak etanol daun sirsak dari beberapa konsentrasi. Dilakukan tiga tahapan penelitian eksperimental laboratories, yaitu: (1). Ekstraksi daun sirsak dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%, (2). Uji antibakteri ekstrak etanol daun sirsak terhadap bakteri *A.baumannii* dengan metode dilusi-agar untuk

mengetahui jumlah koloni bakteri. Ekstrak etanol daun sirsak dicampur ke dalam media *Mueller Hinton Agar*, konsentrasi 2×10^4 $\mu\text{g/ml}$, $1,5 \times 10^4$ $\mu\text{g/ml}$, 1×10^4 $\mu\text{g/ml}$, $0,5 \times 10^4$ $\mu\text{g/ml}$ dan 0 $\mu\text{g/ml}$, (3). Pemeriksaan menggunakan Mikroskop Elektron Skening (MES) untuk mengetahui perubahan struktur dinding sel bakteri *A.baumannii*.

Hasil ekstraksi daun sirsak pekat diperoleh 15,7% rendemen. Uji antibakteri ekstrak etanol daun sirsak terhadap bakteri *A.baumannii* secara dilusi-agar menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun sirsak memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *A.baumannii* dengan rerata KBM ekstrak etanol daun sirsak terhadap bakteri *A.baumannii* adalah 2×10^4 $\mu\text{g/ml}$, sedangkan rerata KHM ekstrak etanol daun sirsak terhadap bakteri *Acinetobacter baumannii* adalah $0,5 \times 10^4$ $\mu\text{g/ml}$. Terdapat hubungan antara pemberian konsentrasi bertingkat ekstrak etanol daun sirsak terhadap hambatan pertumbuhan bakteri *A.baumannii*, dimana semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol daun sirsak maka semakin sedikit jumlah koloni bakteri *A.baumannii*. Perubahan ukuran diameter sel bakteri *A.baumannii* juga mengalami perubahan, dimana peningkatan konsentrasi ekstrak etanol daun sirsak juga menyebabkan perubahan ukuran diameter sel konsentrasi ekstrak etanol daun sirsak menyebabkan ukuran diameter sel bakteri *A.baumannii* semakin kecil. Perubahan ukuran tersebut disebabkan adanya bahan antibakteri ekstrak etanol daun sirsak yang dapat mengkerutkan dinding sel bakteri, sehingga diameter bakteri menjadi lebih kecil dan mengalami kerusakan sel.

Morfologi bakteri *A.baumannii* dengan ekstrak etanol daun sirsak pada konsentrasi 0 $\mu\text{g/ml}$ (kontrol) terlihat sel bakteri *A.baumannii* normal dengan bentuk kokobasil. Pada konsentrasi $0,5 \times 10^4$ $\mu\text{g/ml}$ terlihat morfologi sel bakteri *A.baumannii* berbentuk kokobasil dengan ukuran diameter sel yang relatif lebih kecil dibandingkan kontrol. Pada konsentrasi 1×10^4 $\mu\text{g/ml}$ sebagian sel bakteri *A.baumannii* mengalami lisis, ukuran diameter sel menjadi semakin kecil dan jumlah bakteri per lapang pandang lebih sedikit. Pada konsentrasi $1,5 \times 10^4$ $\mu\text{g/ml}$ sebagian besar sel bakteri *A.baumannii* berukuran lebih kecil dibandingkan kontrol, konsentrasi $0,5 \times 10^4$ $\mu\text{g/ml}$ dan 1×10^4 $\mu\text{g/ml}$. Sedangkan pada konsentrasi 2×10^4 $\mu\text{g/ml}$ diduga antibakteri dari ekstrak etanol daun sirsak mampu melisis sel bakteri *A.baumannii* sehingga tidak ditemukan adanya pertumbuhan bakteri *A.baumannii* pada pemeriksaan Mikroskop Elektron Skening (MES). Berdasarkan hasil penelitian ini didapatkan KBM sebesar 2×10^4 $\mu\text{g/ml}$ dan KHM sebesar $0,5 \times 10^4$ $\mu\text{g/ml}$. Nilai KHM ini melebihi ambang batas sebagai agen terapi antibakteri *A.baumannii*, karena aktivitas antibakteri dari suatu ekstrak dinyatakan memiliki aktivitas yang kuat dengan nilai KHM kurang dari 512 $\mu\text{g/mL}$ (Holetz *et al.*, 2002). Oleh karena itu, nilai KHM dari ekstrak etanol daun sirsak ini sangat tinggi. Dimana semakin tinggi nilai KHM menunjukkan potensi antibakterinya semakin lemah.

Berdasarkan hasil penelitian, menunjukkan potensi antibakteri ekstrak etanol daun sirsak yang lemah, akan tetapi tetap perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun sirsak terhadap bakteri selain bakteri *A.baumannii*. Selain itu, perlu dilakukan penelitian lanjutan di bidang farmasi untuk pemurnian, identifikasi dan kuantifikasi senyawa aktif yang memiliki aktivitas antibakteri di dalam daun sirsak serta aktivitas antibakteri dari masing-masing senyawa aktif dari ekstrak etanol daun sirsak.

SUMMARY

THE EFFECT OF ETHANOL EXTRACT OF SOURSOP LEAF (*Annona muricata* L.) ON GROWTH INHIBITION AND STRUCTURE CHANGE OF BACTERIA CELL WALL *Acinetobacter baumannii*

Uswatun Hasanah

Acinetobacter is one of the main pathogenic bacteria causing nosocomial infection. 25.8% of gram negative bacterial infection is caused by *Acinetobacter baumannii* bacteria (Moehario et al., 2009). The group of carbapenem drugs is the main antimicrobial used to cure *Acinetobacter* infection. Currently the bacterial resistance of *Acinetobacter baumannii* against carbapenem has been increasing 40% in 2004 (Kraniotaki et al., 2006). The mortality number of patients infected by multidrug-resistant *Acinetobacter* reached 68% and patients' death prevalence with *A. baumannii* colonization is higher than that without *A. baumannii* colonization (Maragakis and Perl, 2008; Falagas et al., 2006). The resistance of *Acinetobacter* sp. against many antimicrobials causes therapy difficult and costly (Brooks et al., 2007). The new patent antimicrobial is not only expensive but also has unwanted side effects such as: nephrotoxin and neurotoxin (Hachem et al., 2007). Based on Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI), Colistin can be used as *A.baumannii* antibiotic that can be given orally. Giving colistin is not efficient for the patient with systemic infection. That is why, the research on new antimicrobial substance which is effective, cheap, and easily obtainable needs to be executed.

Soursop (*Annona muricata* L.) is a plant found in America and grows well in Indonesian land below 1000 mdpl (Sousa et al., 2010). Every part of soursop plant can be used in medication. This plant is usually used as antiparasite, antispasmodic, anticancer, sedative, hypotension, insecticide, cough medicine, fever, and dermatitis (Adewole and Ojewole, 2006). The leaf contains saponin, tannin, alkaloid, and flavonoid that can function as antibacterial (Hutapea, 1993). The antibacterial potency of the soursop leaf extract hasn't been proven to cause death or destruction on the structure of cell wall of *A.baumannii* bacteria.

The purpose of this research is to prove the antibacterial effect of soursop leaf extract on *A.baumannii* bacteria in vitro, knowing the correlation of giving phased concentration of soursop leaf extract on the obstacle of the growth of *A.baumannii* bacteria in vitro, and to find out the change description of the cell wall structure of *A.baumannii* bacteria in giving the extract of soursop leaf in several different concentrations. Three-phase laboratory experimental research has been executed, namely: (1). Soursop leaf extraction with maceration method using ethanol diluter 96%, (2). Antibacterial test of soursop leaf extract on *A.baumannii* bacteria with dilution method- to know the number of bacterial colony. The extract was mixed with Mueller Hinton Agar medium, concentration 2×10^4 $\mu\text{g/ml}$, $1,5 \times 10^4$ $\mu\text{g/ml}$, 1×10^4 $\mu\text{g/ml}$, $0,5 \times 10^4$ $\mu\text{g/ml}$ and $0 \mu\text{g/ml}$, (3). Analyzing with Microscopic Electron Scanning (SEM) to investigate the structure change of the cell wall of *A.baumannii* bacteria.

The result of concentrated soursop leaf extraction was obtained 15.7% rendement. The antibacterial test of soursop leaf extract on *A.baumannii* bacteria

delusively to show that the extract of soursop leaf has antibacterial activity on *A.baumannii* bacteria with Minimum Inhibition Concentration (MIC) of soursop leaf extract on *A.baumannii* bacteria was 2×10^4 $\mu\text{g/ml}$. There was a correlation between giving phased concentration of soursop leaf extract and inhibition of the growth of *A.baumannii* bacteria, where the higher the concentration of the extract was, the fewer the number of the *A.baumannii* bacteria colony would be. The diameter change of *A.baumannii* cell also took place, where the increase of the extract concentration also caused the change in the size of cell diameter. The concentration of soursop leaf extract caused the diameter of *A.baumannii* cell smaller. The change of the size was caused by the presence of antibacterial agent of soursop leaf extract that could shrink the bacteria cell wall so that the diameter of the bacteria became smaller and destructed.

The morphology of *A.baumannii* bacteria with the extract of soursop leaf in concentration 0 $\mu\text{g/ml}$ (control) showed normal *A.baumannii* bacterial cell with cocobasil shape. In concentration $0,5 \times 10^4$ $\mu\text{g/ml}$ showed the morphology of *A.baumannii* bacterial cell with diameter size relatively smaller than that of control. In concentration 1×10^4 $\mu\text{g/ml}$, some of *A.baumannii* bacterial cell were lysis, the diameter became smaller and the number of bacteria in the scope became fewer. In concentration $1,5 \times 10^4$ $\mu\text{g/ml}$, most *A.baumannii* bacterial cells became smaller than those in control, concentration $0,5 \times 10^4$ $\mu\text{g/ml}$ and 1×10^4 $\mu\text{g/ml}$. Meanwhile in concentration 2×10^4 $\mu\text{g/ml}$, it was suspected that the antibacterial of the soursop leaf extract was able to lysis the *A.baumannii* cells so that there was no growth of *A.baumannii* bacterial cells in Microscopic Electron Scanning (SEM) analysis. Based on the result of this investigation, the Minimum Inhibition Concentration (MIC) obtained was 2×10^4 $\mu\text{g/ml}$. The value of this MIC is beyond the qualification of therapeutic agent of *A.baumannii* antibacterial because the antibacterial activity of an extract is said to have strong activity when the MIC value is less than 512 $\mu\text{g/ml}$ (Holetz et al., 2002). The MIC value of this soursop leaf extract is very high where the higher the MIC value, the weaker the antibacterial potency will be.

This research shows that the antibacterial potency of soursop leaf extract is weak, but the further researches on antibacterial activity of soursop leaf extract needs to be done on other bacteria. Besides, further pharmaceutical research for purification, identification and active compound quantification with antibacterial activity in soursop leaf as well as antibacterial activity of each active compound of soursop leaf extract.