

POTENSI ANTIBAKTERI EKSTRAK DAUN SRIKAYA (*Annona squamosa*) TERFERMENTASI BAKTERI ENDOGEN ASAM LAKTAT TERHADAP *Staphylococcus aureus*

ANTIBACTERIAL POTENTIAL OF SRIKAYA LEAF EXTRACT (*Annona squamosa*) FERMENTED BY LACTIC ACID ENDOGEN BACTERIA AGAINST *Staphylococcus aureus*

¹Rosa Juwita Hesturini*, ²Dewi Venda Erlina, ³Dini Rizkiawati, ⁴Dewy Resty Basuki, ⁵Pri Hardini

[#]Fakultas Farmasi, Institut Ilmu Kesehatan Bhakti Wiyata

Info Artikel

Sejarah Artikel :

Submitted: 10 Maret 2024

Accepted: 15 Mei 2024

Publish Online: 31 Mei 2024

Kata Kunci:

Annona squamosa, Antibakteri, Asam Laktat, Fermentasi,

Keywords:

Annona squamosa, Antibacterial, Lactat Acid, Fermentation

Abstrak

Latar belakang: Tanaman srikaya (*Annona squamosa*) adalah salah satu tanaman pilihan karena adanya kandungan flavonoid, terpenoid dan alkaloid yang diduga memiliki aktivitas secara mikrobiologi (Manoi dan balitro, 2009). Proses fermentasi menggunakan bakteri (BAL) bakteri asam laktat mencegah tumbuhnya bakteri patogen, menurunkan pH serta mengubah gula menjadi berbagai asam organik sebagai antibakteri. **Tujuan:** Untuk mengetahui zona hambat EDS yang telah difermentasi asam laktat melawan bakteri patogen *Staphylococcus aureus* dibandingkan dengan ekstrak tanpa fermentasi. **Metode:** Terdiri dari tiga tahapan yaitu pertama ekstraksi maserasi daun srikaya. Tahap kedua yaitu pembuatan fermentasi asam laktat dengan menggunakan bakteri *Lactobacillus bulgaricus* 10% (v/v) pada ekstrak konsentrasi 100% (b/v), 75% (b/v), dan 50% (b/v). Tahap ketiga yaitu uji antibiotik dengan metode difusi cara sumuran. **Hasil:** Perbedaan secara bermakna ditunjukkan pada uji *Anova* nilai *Sig.* < 0,05. Analisa hasil *Post Hoc* menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna pada ekstrak fermentasi 80% dibandingkan dengan semua kelompok perlakuan dengan nilai *Sig.* < 0,05. **Simpulan:** EDS terfermentasi bakteri asam laktat memiliki aktivitas antibakteri lebih optimal dibandingkan dengan EDS tanpa fermentasi BAL dengan persentase peningkatan 25%.

Abstract

Background: The sugar apple plant (*Annona squamosa*) is one of the selected plants because it contains flavonoids, terpenoids and alkaloids which are thought to have microbiological activity (Manoi, 2009). The fermentation process using lactic acid bacteria (LAB) prevents the growth of pathogenic bacteria, lowers the pH and converts sugar into various organic acids as antibacterials. **Objective:** To determine the inhibition zone of EDS that has been fermented with lactic acid against the pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus* compared to extracts without fermentation. **Method:** Consists of three stages, namely the first, maceration extraction of srikaya leaves. The second stage is making lactic acid fermentation using 10% (v/v) *Lactobacillus bulgaricus* bacteria in extract concentrations of 100% (w/v), 75% (w/v), and 50% (w/v). The third stage is the antibiotic test using the well diffusion method. **Results:** Significant differences were shown in the *Anova* test with *Sig* value. < 0.05. *Post Hoc* analysis of the results showed that there was a significant difference in the 80% fermentation extract compared to all treatment groups with a *Sig* value. < 0.05. **Conclusion:** EDS fermented by lactic acid bacteria has more optimal antibacterial activity compared to EDS without LAB fermentation with a percentage increase of 25%.

PENDAHULUAN

Penggunaan bahan alam sebagai obat di Indonesia telah dilakukan secara turun temurun, salah satunya adalah srikaya. Daun srikaya telah digunakan secara empirik sebagai hepatoprotektif, antitumor, antioksidan dan antidiabetik yang diduga karena adanya alkaloid, glikosida, flavonoid, saponin, tanin, karbohidrat, fenolik, pitosterol, dan asam amino sebagai senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan (Barve, 2011). Salah satu hasil sintesis tanaman yaitu flavonoid yang memiliki fungsi sebagai senyawa pertahanan terhadap infeksi yang disebabkan oleh mikroorganisme dan diketahui memiliki aktivitas yang baik sebagai antimikroba. Aktivitas bakteriostatik flavonoid dengan cara mendenaturasi protein sel bakteri sehingga akan terjadi kerusakan membran sitoplasma (Apriani, 2013). Ekstrak dari daun srikaya merah dan hijau terbukti kandungan flavonoidnya dapat digunakan sebagai antibakteri dengan konsentrasi terbaik adalah 75% (Erlina dkk., 2018).

Proses fermentasi untuk pangan mulai berkembang secara modern maupun tradisional. Fermentasi dapat mengubah substrat menjadi produk dengan adanya mikroba dan bakteri. Bakteri yang dapat digunakan untuk fermentasi makanan salah satunya adalah bakteri asam laktat (BAL). Bakteri yang tergolong gram positif ini tidak menghasilkan spora namun dapat memproduksi asam laktat selama proses fermentasi sebagai hasil metabolik utama (Ramesh, 2015). BAL mengendalikan pertumbuhan bakteri patogen dengan memproduksi metabolit sekunder. Metabolit sekunder dari BAL yaitu diasetil dan asam organik seperti asam propionat dan asam laktat serta hidrogen peroksida (Desniar, 2012).

Pernyataan diatas memberikan dugaan bahwa penambahan bakteri *Lactobacillus bulgaricus* pada ekstrak daun srikaya (EDS) dapat meningkatkan daya hambat terhadap bakteri patogen. Tujuan penelitian untuk mengetahui aktivitas antibakteri dengan parameter terukur yaitu zona hambat terhadap *Staphylococcus aureus* oleh ekstrak yang telah difermentasi asam laktat.

METODE PENELITIAN

Persiapan EDS, Fermentasi BAL, dan Bakteri Uji

Daun srikaya diambil dan dilakukan sortasi basah dan kering kemudian dihaluskan dan dilakukan proses ekstraksi dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%, yang dilanjutkan dengan remaserasi. Filtrat dikumpulkan dan diuapkan diatas *waterbath* dan *rotary evaporator* hingga didapatkan ekstrak kental. Ekstrak kental di uji skrining fitokimia flavonoid. Proses fermentasi dengan mengambil satu ose bakteri *Lactobacillus bulgaricus* dari kultur persediaan yang selanjutnya diinokulasi pada media MRS agar. Proses inkubasi dilakukan selama 24 jam pada suhu 37°C. Pembuatan *starter yoghurt* dengan mengambil bakteri dengan umur 24 jam (sebanyak satu ose) yang kemudian diinokulasi pada *MRS broth steril* 10 ml diinkubasikan 24 jam pada suhu 37°C. Kontrol negatif dibuat dari 1,5 gram susu skim yang telah dilarutkan aquadest sebanyak 10 ml, dan dilakukan pasteurisasi selama 15 menit dengan suhu 80-85°C. Setelah dingin (42-45°C) ditambahkan 10% (v/v) starter probiotik, dan ekstrak dengan variasi konsentrasi 60%, 70% dan 80%. PH yogurt diuji sebelum inkubasi dan setelah inkubasi. Bakteri uji dibuat dengan menginokulasi satu ose bakteri *Staphylococcus aureus* diambil dari kultur induk pada media *nutrien* agar dan diinkubasi selama 24 jam disuhu 37°C. Kemudian dilakukan pencampuran suspensi dalam larutan NaCl steril dan diukur derajat kekeruhannya menggunakan standar *Mc. Faland* sebelum digunakan sebagai inokulum dalam pengujian.

Uji Aktivitas Antibakteri

Uji antibakteri EDS menggunakan metode difusi lubang/sumuran yaitu dengan mengambil satu ose bakteri *Staphylococcus aureus* kemudian diinokulasikan di media nutrisi agar pada cawan petri yang telah dibuat lubang sumuran. Larutan uji EDS tanpa fermentasi dengan konsentrasi 60%, 70% dan 80%, EDS terfermentasi BAL dengan konsentrasi ekstrak 60%, 70% dan 80%, larutan susu skim (kontrol negatif) dan levofloxacin (kontrol negatif), diambil sebanyak 50 μ l dan diaplikasikan pada sumuran, kemudian lakukan inkubasi selama 24 jam dengan suhu 37⁰C. Parameter diameter zona hambat diukur dengan jangka sorong, dan dilakukan pengukuran pada daerah jernih disekitar sumuran.

Analisa Statistik

Analisa data dengan uji *One Way Anova* dan Tukey (HSD) dengan derajat kepercayaan 0,95 ($\alpha = 0,05$), analisa ini dilakukan untuk mengetahui adanya perbedaan pada data satu kelompok dengan kelompok perlakuan lain.

HASIL PENELITIAN**Hasil Uji Karakteristik pada Simplisia dan EDS****Tabel 1. Karakteristik pada simplisia dan EDS**

Karakteristik	Simplisia	Ekstrak
Bentuk	Elips panjang, tepi rata, pangkal asimetrik dan ujung meruncing	Kental
Warna	Hijau tua	Hijau kehitaman
Bau	Khas	Khas
Rasa	Pahit	Pahit

Hasil Skrining Fitokimia EDS

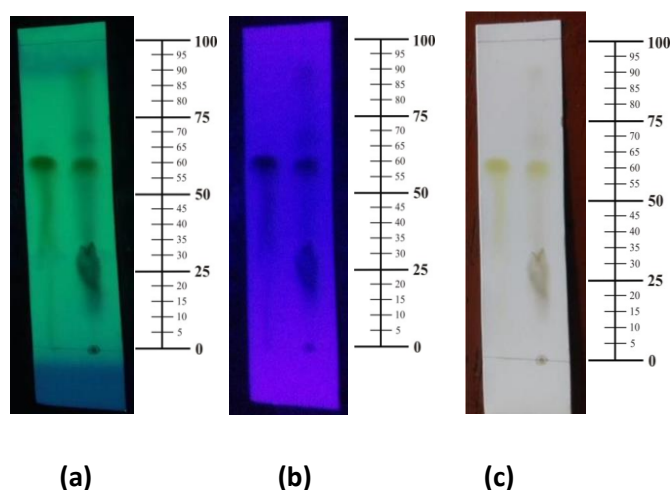
Hasil dari pengujian kandungan senyawa dengan pereaksi warna pada EDS dinyatakan positif terdapat flavonoid. Hasil uji flavonoid dapat dilihat pada tabel 2.

Tabel 2. Hasil Uji Fitokimia EDS

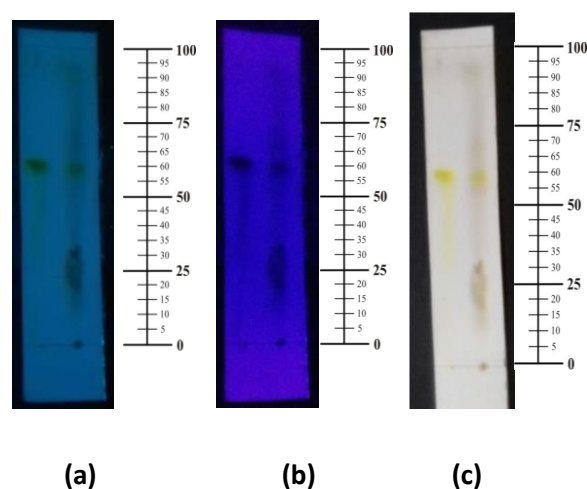
Kandungan senyawa kimia	Pengujian	Hasil positif literatur	Hasil pengujian	Keterangan
Flavonoid	Sampel+air panas, dipanaskan 5 menit, + serbuk Mg + HCl pekat + Alkohol (1:1)	Oranye atau pada lapisan amil alkohol	Oranye pada lapisan amil alkohol	Positif

Hasil Uji KLT EDS

Pengujian KLT dilakukan dengan mengelusi ekstrak dengan pembanding rutin pada plat silika F254 menggunakan fase gerak n-butanol : asam asetat glasial : air (4:1:5) kemudian diamati nodanya pada lampu UV 366 nm dan 254 nm. Hasil uji KLT pada EDS dapat dilihat pada gambar 1 dan 2.



Gambar 1. Hasil uji KLT setelah diuap amonia diamati pada UV 254 nm (a), UV 366 nm (b) dan secara visibel (c)



Gambar 2. Hasil uji KLT setelah disemprot FeCl_3 diamati UV 254 nm (a), UV 366 nm (b) dan secara visibel (c)

Hasil uji pH fermentasi asam laktat pada EDS

Fermentasi BAL yang pada EDS dilakukan dengan menggunakan bakteri *Lactobacillus bulgaricus* 10%. Hasil karakterisasi pH yogurt ditunjukkan pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil uji pH fermentasi asam laktat pada EDS

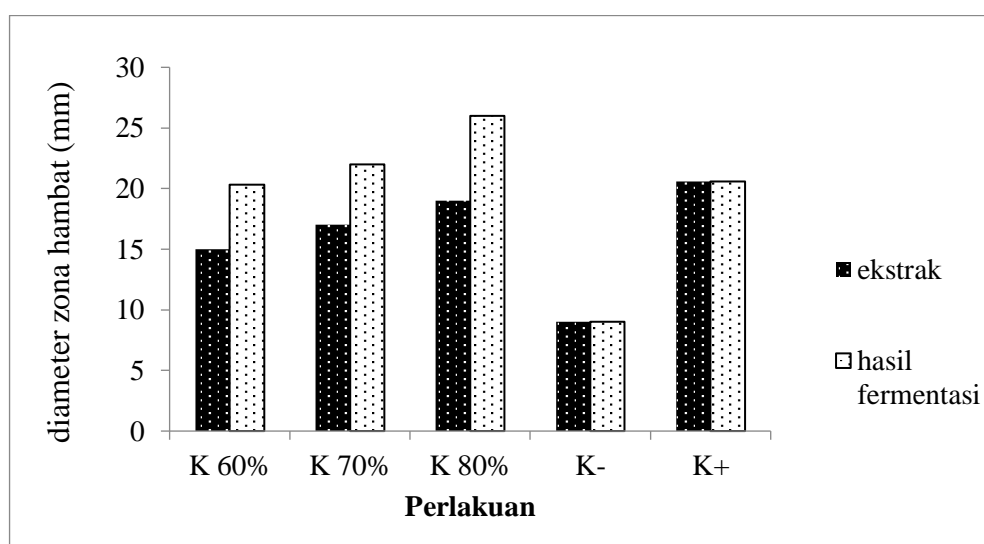
No.	Waktu Pengujian	pH sediaan
1.	Sebelum Inkubasi	5
2.	Setelah Inkubasi	3

Hasil Uji Antibakteri Metode Difusi Teknik Sumuran

Pengujian antibakteri dengan metode difusi lubang pada ekstrak yang difermentasi BAL dan EDS tanpa fermentasi ditunjukkan pada tabel 4 dan gambar 3.

Tabel 4. Hasil Uji Antibakteri Dengan Metode Difusi Teknik Sumuran

% Konsentrasi	Diameter Zona Hambat (mm)			
	EDS Tanpa fermentasi	Kriteria	EDS fermentasi	Kriteria
60%	15 ± 1,0	Resisten	20,3 ± 0,57	Sensitif
70%	17 ± 1,0	Intermediet	22 ± 1,0	Sensitif
80%	19 ± 1,0	Sensitif	26,0 ± 1,0	Sensitif
K (-)	9,0 ± 0,00	Resisten	9,0 ± 0,00	Resisten
K (+)	20,6 ± 0,57	Sensitif	20,6 ± 0,57	Sensitif

**Gambar 3. Grafik Hasil Uji Antibakteri dengan Metode Difusi Teknik Sumuran**

Keterangan :

- K 60% = Konsentrasi 60%
 K 70% = Konsentrasi 70%
 K 80% = Konsentrasi 80%
 K- = Kontrol Negatif
 K+ = Kontrol Positif

PEMBAHASAN

Hasil Uji Organoleptis

Organoleptis daun srikaya diamati secara visual untuk mengetahui karakteristik simplisia dan EDS. Hasil pemeriksaan organoleptis menunjukkan bahwa simplisia berbentuk elips panjang, tepi rata, pangkal asimetrik dan ujung meruncing, warna hijau tua. EDS berbentuk hijau kehitaman berkonsistensi kental dan bau yang khas serta memiliki rasa pahit.

Hasil Skrining Fitokimia EDS

Adanya flavonoid pada sampel ekstrak dapat diketahui jika hasil skrining menunjukkan warna oranye pada lapisan amil alkohol (Marliana, dkk., 2005), hal tersebut sesuai dengan hasil yang didapat dan dinyatakan positif flavonoid (Retnowati, dkk., 2011).

Hasil Uji KLT EDS

Hasil uji KLT yang diamati secara visibel menunjukkan terdapat bercak/spot noda berwarna kuning dari EDS dan senyawa pembanding yang identik dengan nilai R_f 0,6. Hal ini dinyatakan sesuai dengan pustaka bahwa golongan senyawa flavonoida akan memunculkan noda kuning intensif setelah dilakukan derivatisasi pada plat KLT menggunakan uap amonia (Harborne, 1987; Markham, 1988). Sedangkan polifenol akan memunculkan spot atau bercak berwarna hijau, abu-abu, hijau atau biru apabila kromatogram diamati secara visibel dengan penampak bercak $FeCl_3$ (Wagner, dkk., 1984).

Hasil Uji pH Fermentasi Asam Laktat Pada EDS

Hasil uji pH menunjukkan adanya penurunan pH susu dari 5 ke 3. Hal ini merupakan akibat dari proses fermentasi sehingga muncul penumpukan asam laktat yang menghasilkan 2-hydroxy propanoic acid dan hidrogen, sehingga ion hidrogen akan semakin banyak (Sari, 2012), bakteri *Lactobacillus bulgaricus* memproduksi metabolit sekunder seperti bakteriosin yang merupakan metabolit antimikroba. Bakteriosin dalam lingkungan yang asam dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen (Hasan, 2012).

Hasil Uji Antibakteri Dengan Metode Difusi Teknik Sumuran

Diameter zona hambat dari hasil uji dibandingkan menunjukkan terjadinya peningkatan aktivitas antibakteri setelah diberikan perlakuan fermentasi. Peningkatan aktivitas antibakteri yaitu rata-rata 25% pada semua konsentrasi, yang diduga merupakan peran senyawa metabolit sekunder hasil dari BAL pada EDS yang telah difermentasi yang bekerja secara sinergis terhadap daya hambat bakteri, maka dengan itu peningkatan konsentrasi perlakuan akan berpengaruh pada besarnya diameter zona hambat (Ramadhani, 2014).

Aktivitas antibakteri tertinggi dihasilkan pada ekstrak yang difermentasi yaitu pada konsentrasi 80% dengan diameter $26,0 \pm 1,0$. Perbedaan aktivitas antibakteri ini disebabkan karena flavonoid sebagai metabolit sekunder pada daun srikyra bekerja secara sinergis dengan metabolit sekunder dari bakteri asam laktat. Senyawa flavonoid pada EDS diyakini memiliki efek bakteriostatik yang bekerja dengan cara merubah struktur protein dan menghancurkan membran sitoplasma sel bakteri (Retnowati, dkk., 2011). Adanya kompleks ikatan reseptor flavonoid dengan sel mikroba berupa ikatan hidrogen akan terurai setelah melalui membran sel. Senyawa yang dapat masuk dalam membran sel mengakibatkan kondisi koagulasi protein membran sel dan menyebabkan lisis (Soeka, dkk., 2007). Aktivitas lainnya yaitu dengan adanya penghambatan penyusunan DNA dan rRNA dengan proses interkelas.

Aktivitas antibakteri muncul karena adanya gugus hidroksil yang kemudian merusak permeabilitas dinding bakteri dan liposom. Selain itu diketahui pula adanya penghambatan ikatan enzim ATP-ase dan fosfolipase. Penghambatan metabolisme energi juga dapat terjadi jika penghambatan penggunaan oksigen bakteri juga terjadi (Cushnie, 2005).

Proses fermentasi tidak menyebabkan kerusakan kandungan flavonoid pada ekstrak. Lama proses fermentasi sebanding dengan peningkatan nilai total flavonoid, maka nilai total flavonoid juga meningkat. Hal ini karena adanya penambahan gugus fenol yang berasal dari bakteri asam laktat dengan menghasilkan enzim yang akan memproduksi glukosa dan melepaskan

fenolik pada ekstrak (Hernandez, dkk., 2007.) Aktivitas bakteriosin dalam penghambatan sel bakteri yaitu dengan cara terabsorbsinya senyawa oleh mikroba yang rentan pada reseptor spesifik yang selanjutnya dapat menyebabkan perubahan permeabilitas dan integritas membran. Sel akan kehilangan kemampuan membelah diri dan kemudian terjadi lisis. Bakteriosin dapat bekerja pada bakteri patogen spesifik namun tidak akan mengganggu mikrobiota yang menguntungkan.

Bakteriosin sering kali dianggap sebagai antibiotik karena disintesis pada ribosom dan sel inang kebal terhadapnya, namun berbeda dengan antibiotik dikarenakan mekanisme kerja yang berbeda. Kemampuan daya hambat bakteriosin cenderung lebih sempit, bakteri yang dapat dilawan adalah bakteri yang memiliki strain dengan hubungan yang dekat (Ouweland dan Veterlund, 2004).

Analisa data yang diperoleh dengan *One Way Anova* merujuk pada nilai *Sign.* (0,000) < α (0,05) dan uji Tukey yang dilakukan terhadap EDS terfermentasi BAL konsentrasi 80% diketahui memiliki zona hambat paling besar terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan dinyatakan berbeda signifikan dengan perlakuan lainnya (sig (0.000) < α (0,05)).

SIMPULAN

Aktivitas antibakteria EDS terfermentasi BAL lebih optimal dibandingkan dengan ekstrak tanpa fermentasi dengan rata-rata persentase peningkatan 25% pada semua konsentrasi. EDS pada konsentrasi 80% dan difermentasi oleh BAL memberikan aktivitas antibakteri yang tertinggi yaitu $26,0 \pm 1,0$.

SARAN

Kandungan flavonoid yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri hanya dideteksi dengan menggunakan uji kualitatif sehingga pada penelitian selanjutnya diharapkan dapat dilakukan penetapan kandungan total flavonoid secara kuantitatif pada senyawa tersebut sehingga dapat dikorelasikan dengan aktivitasnya.

REFERENSI

- Apriani. 2013. *Senyawa Flavonoid Yang Bersifat Antibakteri Dari Akway (Drimys Becariana.Gibbs)*. Journal Chem. Prog. Vol. 6 (1).
- Badan Standarisasi Nasional. 2016. *Standar Mutu Susu Bubuk*. Jakarta: Badan Standarisasi Nasional.
- Barve, D., Pandey, N. 2011. *Phytochemical and Pharmacological Review on Annona squamosa Linn.* International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences. Vol. 2(4).
- Desniar, Rusmana, Suwanto, Mubarik. 2013. *Senyawa Antimikroba yang Dihasilkan Oleh Bakteri Asam Laktat Asal Bekasam*. Jurnal Akuatika. Vol. 3(2).
- Harbone, J.B. 1987. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan Terbitan kedua*. Terjemahan: Kosasih Padmawinata dan IwangSoediro. Bandung: Penerbit ITB.
- Hasan, H., Arif H., Musleh, R., 2012. Partial Purification of Bulgarcin Antibacterial from *Lactobacilli* Isolates in Iraqi Kurdish Dairy Product. International Conference on Environment Science and Biotechnology. Hernandez, T., Estrella, I., Perez-Gordo, M., Alegria, E. G., Tenorio, C., RuizLarrea, F., et al. 2007. *Contribution of malolactic fermentation by Oenococcus oeni and Lactobacillus plantarum to the changes in the nonanthocyanin polyphenolic composition of red wine*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55, 5260–5266.

-
- Mabry, T.J, K.R. Markham, dan M.B. Thomas. 1970. *The Systematic Identification of Flavonoids*. New York: Springer Verlag.
- Ouwehand, A.C. 1998. Antimicrobial component from lactic acid bacteria. In: Salminen, S. and A.V. Wright (eds.). *Lactic Acid Bacteria Microbiology And Functional Aspects 2Ed*. New York: Marcell Dekker.
- Ramadhani, Zamrotul Izzah, Isnaeni, Noor. 2014. *Aktivitas Antibakteri Kombinasi Probiotik (Bifidobacterium bifidum dan Lactobacillus acidophilus) dengan Infus Daun Jambu Biji (Psidium guajava)*. Jurnal Berkala Ilmiah Kimia Farmasi. Vol. 3(1).
- Retnowati, Y., Nurhayati B., dan Nona, W.P., 2001. *Pertumbuhan Bakteri Staphylococcus aureus pada Media yang Diekspos dengan Infus Daun Sambiloto (Andrographis paniculata)*. Jurnal Saintek, Vol 6 (2).
- Sari, K., Dian., Sayuti, I., Wulandari, S. (2012). Efektivitas Penambahan Ekstrak Ubi Jalar Ungu (*Ipomoea batatas* var. *Ayamurasaki*) dan Susu Skim Terhadap Kadar Asam Laktat dan pH Yoghurt jagung manis (*Zea mays* L. *Saccharata*) dengan Menggunakan Inokulum *Lactobacillus acidophilus* dan *Bifidobacterium sp.* Program Studi Pendidikan Biologi Jurusan PMIPA. Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Unviersitas Riau.
- Soeka, Yati S., Elidar Naiola, dan Joko S. 2007. *Aktivitas Antimikroba Flavonoid - Glikosida Hasil Sintesis Secara Transglukosilasi Enzimatik*. Jurnal Berita Biologi. Vol 8(6)
- Susanti, D. 2008. *Daya Antibakteri Filtrat Hasil Fermentasi Isolat Lactobacillus sp. Yoghurt A Terhadap Staphylococcus aureus ATCC 25923 dan Eschericia coli ATCC 35218*. Fakultas Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta.
- Wagner, H., Bladt, S., dan Zganski, E. M. 1984. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*, Berlin; Th. A. Scott, Springer Verlag.