

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI DAN BIOAUTOGRAFI EKSTRAK ETANOL, FRAKSI
NON POLAR, SEMIPOLAR SERTA POLAR DAUN SIRSAK (*Annona muricata* L.)
TERHADAP *Klebsiella pneumoniae* DAN *Staphylococcus epidermidis***

Haryoto*, Yuliana Dwi Jayanti, Henggar Prasetyo Wikan Saputro, Kosworo

Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta Jl. A. Yani Tromol Pos 1, Pabelan Kartasura,
Surakarta 57102

*Corresponding author email: haryoto@ums.ac.id

Abstrak

Penyakit infeksi masih merupakan penyakit utama dan penyebab kematian tertinggi di Indonesia. Salah satu tanaman yang dapat dimanfaatkan sebagai obat adalah tumbuhan sirsak. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui Kadar Hambat Minimum (KHM) ekstrak etanol, fraksi nonpolar, semipolar dan polar daun sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap *Klebsiella pneumoniae* dan *Staphylococcus epidermidis* serta golongan senyawa kimianya yang mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Klebsiella pneumoniae* dan *Staphylococcus epidermidis*. Daun sirsak diekstraksi dengan metode maserasi menggunakan etanol 96%. Uji aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan metode dilusi padat. Untuk mengetahui kandungan senyawa dari ekstrak etanol daun sirsak dilakukan uji Kromatografi Lapis Tipis. Bioautografi dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa yang terdapat dalam ekstrak etanol daun sirsak yang berkhasiat sebagai antibakteri yang ditunjukkan dengan adanya zona jernih pada media yang telah diinokulasi bakteri dan ditempel plat KLT hasil elusi ekstrak etanol daun sirsak. Uji Kromatografi Lapis Tipis menggunakan fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak heksan:etil asetat (7:3). Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun sirsak, fraksi nonpolar, semipolar dan polar mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Klebsiella pneumoniae* dan *Staphylococcus epidermidis* dengan KHM berturut-turut sebesar 2,5% 3%; 3,5%; 4% dan 4,5% b/v. Hasil KLT menunjukkan bahwa golongan senyawa yang terkandung dalam ekstrak etanol daun sirsak adalah polifenol, antron, antranol, triterpenoid saponin, dan steroid saponin. Golongan senyawa dari ekstrak tersebut yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Klebsiella pneumoniae* adalah senyawa golongan saponin, polifenol, dan antakinon. Sedangkan Golongan senyawa dari ekstrak tersebut yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus epidermidis* adalah senyawa golongan polifenol dan antrakinin.

Kata kunci : *Annona muricata* L., antibakteri, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, ekstrak etanol, 3 fraksi dan bioautografi

Submitted on:

Accepted on:

DOI: <https://doi.org/10.25026/jsk.v1i9.60>

PENDAHULUAN

Penyakit infeksi masih merupakan penyakit utama dan penyebab kematian tertinggi di Indonesia (Batubara, 2008). Selain itu, muncul pula masalah resistensi antibiotik yang saat ini menjadi perhatian dunia (Westh *et al.*, 2004). Seiring meningkatnya penyakit infeksi dan jumlah bakteri yang resisten, mendorong para ilmuwan untuk menemukan senyawa antibakteri baru yang poten tetapi tidak menjadikan

bakteri resisten serta lebih terjangkau dari sisi ekonomi (Hertiani *et al.*, 2003).

Jumlah bakteri di alam yang bersifat patogen sangat banyak. Bakteri yang dapat menyebabkan infeksi tersebut di antaranya *Klebsiella pneumoniae* dan *Staphylococcus epidermidis*. *Klebsiella pneumoniae* memiliki antigen O dan antigen K yang keduanya mampu meningkatkan patogenitas. Selain itu, *Klebsiella pneumoniae* mampu memproduksi enzim ESBL (*Extended*

Spectrum Beta Lactamase) yang dapat menyebabkan bakteri kebal dan sulit untuk dilumpuhkan (Danan, 2011; Podschun *et al.*, 1998). Sedangkan *Staphylococcus epidermidis* bertanggung jawab atas banyak kasus sepsis pada bayi yang baru lahir (Isaacs, 2003).

Karakteristik *Staphylococcus epidermidis* adalah memproduksi kapsul atau lendir yang dihasilkan dalam pembentukan biofilm sehingga terlindungi terhadap serangan dari sistem kekebalan tubuh dan antibiotik. Oleh karena itu, infeksi oleh *Staphylococcus epidermidis* sulit untuk dihentikan (Fitzpatrick, *et al.*, 2005). Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa ekstrak aseton dan etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhosa*, *Shigella flexneri*, *Shigella flexneri 3a*, *Staphylococcus albus*, dan *Staphylococcus aureus* (Taylor, 2002; Prachi *et al.*, 2010).

Selain itu ekstrak air buah sirsak menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Vibrio cholerae* (Vieria *et al.*, 2010). Tanaman sirsak memiliki beberapa kandungan senyawa, salah satunya adalah tanin (Prachi *et al.*, 2010). Menurut Akiyama *et al.*, 2001 menyatakan bahwa asam tanin juga dapat digunakan sebagai agen pembantu yang berguna untuk pengobatan infeksi kulit yang disebabkan oleh *Staphylococcus aureus* selain antibiotik β -lactam.

Berdasarkan hasil penelitian-penelitian tersebut, menarik bila dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui aktivitas ekstrak etanol daun sirsak terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae* dan *Staphylococcus epidermidis*.

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) pada ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) serta golongan senyawa kimianya yang mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Klebsiella pneumoniae* dan *Staphylococcus epidermidis*.

METODOLOGI PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah bejana *stainless steel*, blender, pengaduk kayu, *vacum rotary evaporator* (Heidolph), penangas air, cawan porselen, neraca analitik (Precisa), mikroskop (Olympus CK21), *object glass*, *deck glass*, penjepit, pipet tetes, ose, autoklaf (My life), oven (Memmert) mikropipet (Socorex), *Beaker glass*, bunsen, *blue tips*, *yellow tips*, batang pengaduk, api bunsen, pipa kapiler, *Laminar Air Flow* (LAF) Cabinet, inkubator (Memmert) *chamber*, lampu UV 254 nm dan 366 nm, dan alat-alat gelas lainnya (Pyrex).

Bahan yang digunakan adalah daun sirsak yang diperoleh dari daerah Karanganyar, etanol 96%, *K. pneumoniae* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Surakarta, *S. epidermidis* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta, pelarut (DMSO 100%), media Mueller Hinton (MH) (Oxoid), media *Brain Heart Infusion* (BHI) (Conda Pronadisa), standar Mc. Farland (Remel), akuades, akuades steril, alkohol 70%, formalin 1%, cat Gram A, cat Gram B, cat Gram C, cat Gram D, silika gel GF₂₅₄ (Merck), heksan (p.a. Merck), etil asetat (p.a. Merck), pereaksi semprot yaitu FeCl₃, sitroborat, larutan Liebermann Burchard, KOH etanolik 10%, kertas

saring, aseton, media KIA, media LIA, media MIO, dan media MSA.

Determinasi tanaman.

Determinasi simplisia dilakukan di Laboratorium Biologi, FKIP Universitas Muhammadiyah Surakarta.

Pembuatan ekstrak etanol daun sirsak

Daun sirsak yang digunakan dalam penelitian ini diambil dari daerah Karanganyar. Kemudian dikeringkan menggunakan sinar matahari hingga kering dan disortasi kering dengan cara memisahkan pengotor atau benda asing yang masih tertinggal dalam simplisia. Selanjutnya daun yang telah kering diserbuk menggunakan blender. Ekstrak dibuat dengan cara maserasi menggunakan etanol 96%. Serbuk kering daun sirsak sebanyak 2001,75 g direndam dengan etanol 96% sebanyak 20000 mL. Serbuk direndam sambil sekali-kali diaduk dan didiamkan sampai 24 jam. Maserat dipisahkan dan proses diulangi 2 kali dengan jenis dan jumlah pelarut yang sama. Semua maserat dikumpulkan dan diuapkan dengan *vacum rotary evaporator*. Hasil penguapan menggunakan *vacum rotary evaporator* dilanjutkan menggunakan penangas air untuk memperoleh ekstrak kental. Rendemen yang diperoleh ditimbang dan dicatat.

Uji aktivitas antibakteri dengan metode dilusi padat

Preparasi media

Media untuk uji aktivitas antibakteri: Media yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri (*K. pneumoniae* dan *S. epidermidis*) adalah media MH. Pembuatan media dilakukan dengan cara melarutkan media dalam akuades sesuai dengan petunjuk dari tiap kemasan. Banyaknya media yang ditimbang

untuk tiap literanya untuk media MH adalah 64 g, sedangkan untuk media BHI 37 g, untuk BHI *double strength* dibuat dengan penimbangan 2 kalinya, yaitu 74 g untuk 1 L. Jumlah media yang ditimbang disesuaikan dengan jumlah yang dibutuhkan. Kemudian media disterilkan pada suhu 121°C dengan tekanan 2 atm selama 15 menit.

Pemeliharaan bakteri

Biakan murni mikroba uji yaitu bakteri *K. pneumoniae* dan *S. epidermidis* diambil satu ujung mata ose kemudian digoreskan pada media MH, kemudian media padat yang telah digoresi dengan mikroba diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

Pembuatan suspensi mikroba uji

Bakteri *K. pneumoniae* dan *S. epidermidis* masing-masing diambil satu ujung mata ose dari biakan induk dalam agar, kemudian disuspensikan dalam 1 mL media BHI steril, dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil biakan tersebut diambil 100 µL, kemudian disuspensikan ke dalam 1 mL media BHI steril, diinkubasi selama 3-4 jam pada suhu 37°C. Kemudian konsentrasinya disamakan dengan standar Mc. Farland 108CFU/mL dengan cara mensuspensikannya dalam akuades steril hingga diperoleh kekeruhan yang sama. Untuk mendapatkan suspensi bakteri 106 CFU/mL, maka diambil sebanyak 50 µL bakteri 108 CFU/mL dan disuspensikan dalam 5 mL media BHI double strength steril.

Uji aktivitas antibakteri

Pembuatan larutan stok 20%: Delapan gram ekstrak kental daun sirsak dilarutkan dengan pelarut (DMSO 100%) sampai 40 mL. Konsentrasi ekstrak pada uji aktivitas antibakteri adalah 3,75%, 3,5%, 3,25%, 3%, dan 2,75% seperti

Gambar 5. Larutan ekstrak dengan stok 20% diambil dengan beberapa seri volume kemudian ditambah akuades steril hingga 5 mL. Setelah itu, larutan ekstrak diambil masing-masing 2 mL dalam tabung terpisah, ditambahkan media sebanyak 3 mL yang telah disterilkan sampai volume total masing-masing tabung sebanyak 5 mL, kemudian dikocok hingga benar-benar homogen dan dipadatkan dalam posisi miring. Selanjutnya jika media yang telah dicampur ekstrak telah padat, suspensi mikroba 10⁶ CFU/mL diteteskan sebanyak 25 µL, diratakan dengan ose steril, selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam kemudian diamati pertumbuhan bakterinya. Kadar terkecil yang dapat membunuh mikroba disebut Kadar Hambat Minimum (KHM). Kontrol untuk uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun sirsak terhadap *K. pneumoniae* dan *S. epidermidis* terdiri dari 3 macam: Kontrol media: Media Kontrol pertumbuhan: Media dan suspensi mikroba, Kontrol pelarut: Media dan suspensi mikroba serta pelarut DMSO 100%.

Kromatografi Lapis Tipis

Ekstrak etanol daun sirsak dilarutkan dengan metanol. Larutan sampel ditotolkan pada plat KLT yaitu silika gel GF 254 sebagai fase diam yang telah diaktifkan sebelumnya pada suhu 100°C selama 1 jam, kemudian totalan tersebut dielusi dengan fase gerak heksan : etil asetat (7:3) v/v. Plat tersebut kemudian dikeringkan dan diangin-anginkan kemudian diamati di bawah sinar tampak, UV 254 nm, UV 366 nm dan dengan beberapa pereaksi semprot sitroborat, Liebermann-Burchard (LB), KOH etanolik 10 %, dan FeCl₃ untuk mengidentifikasi golongan senyawa yang terdapat dalam ekstrak.

Bioautografi

Senyawa aktif yang memiliki aktivitas sebagai antibakteri dideteksi dengan metode bioautografi dengan cara dibuat konsentrasi 3%. Kemudian ditotolkan di plat KLT sebanyak 2 µL dan dielusi dengan fase gerak heksan : etil asetat (7:3) v/v. setelah itu, plat KLT diletakkan pada permukaan media MH dalam petri yang telah diinokulasi dengan bakteri *K. pneumoniae* dan *S. epidermidis* selama 20 menit. Setelah itu, diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. bila bercak-bercak pada plat KLT tersebut memiliki aktivitas antibakteri maka dengan adanya difusi golongan senyawa aktif akan terbentuk zona jernih yang merupakan zona hambatan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil ekstraksi: Daun sirsak yang digunakan diambil dari daerah Jumapolo, Karanganyar. Hasil determinasi daun memastikan bahwa daun yang digunakan berasal dari tanaman sirsak (*Annona muricata* L.). Daun sirsak dibuat menjadi simplisia kering kemudian diserbuk yang bertujuan untuk memperluas permukaan simplisia ketika kontak dengan cairan penyari. Selanjutnya serbuk simplisia dimaserasi dengan pelarut etanol 96%. Hasil maserasi simplisia sebanyak 2001,75 gram menghasilkan 598,66 gram ekstrak kering etanol. Ekstrak kering difraksinasi dengan menggunakan KCV, sehingga terbentuk fraksi non polar, semi polar dan polar.

Hasil Uji Aktivitas Antibakteri: Metode yang digunakan dalam uji aktivitas antibakteri adalah dilusi padat. Metode dilusi padat mempunyai keunggulan dibandingkan dengan metode dilusi cair, yaitu satu konsentrasi dapat digunakan untuk beberapa mikroba uji. Parameter yang digunakan dalam uji aktivitas antibakteri menggunakan metode dilusi padat adalah KHM (Kadar

Hambat Minimum). Nilai KHM adalah konsentrasi terkecil dari ekstrak etanol daun sirsak yang dapat membunuh mikroba.

Validitas uji antibakteri ini diperkuat dengan penggunaan 3 kontrol. Kontrol media (K1) bertujuan untuk mengetahui sterilitas media yang digunakan. Kontrol pertumbuhan (K2) bertujuan untuk mengetahui bakteri atau jamur dapat tumbuh baik pada media atau tidak. Kontrol pelarut (K3) bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri DMSO yang digunakan sebagai pelarut DMSO 100% sebagai pelarut digunakan untuk membantu melarutkan ekstrak, sehingga ekstrak dapat terdispersi merata. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun sirsak dilakukan terhadap 5 seri konsentrasi ekstrak.

Konsentrasi ekstrak etanol daun sirsak yang diuji adalah 2,5%; 3%; 3,5%; 4%; dan 4,5%. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun sirsak terhadap *K. pneumoniae* dan *S. epidermidis* memiliki nilai KHM berturut-turut sebesar 2,5; 3; 3,5%. Fraksi Non polar memiliki nilai KHM sebesar 4; 4,5; 4,5%; sedangkan fraksi Semi polar mempunyai KHM berturut-turut 2,5; 3; 3,5%; selanjutnya fraksi Polar memiliki KHM

sebesar 2,5; 2,5 dan 3% (Tabel 1).

Aktivitas antibakteri terhadap bakteri *K. pneumoniae* dan *S. epidermidis* pada penelitian ini lebih rendah dibanding penelitian-penelitian sebelumnya. Prachi *et al.* (2010) melaporkan ekstrak metanol daun sirsak asal India pada konsentrasi 0,9 % memiliki aktivitas antibakteri terhadap *K. pneumoniae* NCIM No. 2719 dengan nilai KHM 17 mm menggunakan metode *agar cup*. Aktivitas antibakteri fraksi polar ekstrak etanol daun sirsak lebih tinggi dibandingkan ekstrak etanolnya sehingga kemungkinan senyawa yang bersifat antibakteri adalah senyawa polar (Kosworo, 2012). Saputro (2012) dan Septianingrum (2012) melaporkan fraksi semipolar dan nonpolar ekstrak etanol daun sirsak efektif membunuh *K. pneumoniae* dan *S. epidermidis* pada konsentrasi berturut-turut 3,5% dan 4%. Hasil uji aktivitas antibakteri menunjukkan bahwa potensi antibakteri ekstrak etanol daun sirsak adalah *K. pneumoniae* > *S. epidermidis*. Hal tersebut kemungkinan dapat disebabkan oleh kemampuan *S. epidermidis* memproduksi kapsul atau lendir dalam pembentukan biofilm sehingga terlindung dari serangan antibakteri (Mack *et al.*, 2006).

Tabel 1. Hasil Uji Antibakteri Ekstrak Etanol, Fraksi Non Polar, Semi Polar dan Polar Daun Sirsak

Konsentrasi (%b/v)	<i>Klebsiella pneumoniae</i>				<i>Staphylococcus epidermidis</i>			
	Ekstrak	Non polar	Semi polar	Polar	Ekstrak	Non polar	Semi polar	Polar
2,5	+	-	+	+	+	-	+	+
3	+	-	+	-	+	-	+	+
3,5	-	-	-	-	+	-	+	-
4	-	+	-	-	-	-	-	-
4,5	-	+	-	-	-	+	-	-
K1	-	-	-	-	-	-	-	-
K2	+	+	+	+	+	+	+	+
K3	+	+	+	+	+	+	+	+

Keterangan :

(+) : tidak terhambat pertumbuhan bakteri

(-) : terdapat hambatan pertumbuhan mikroba

K2 : kontrol pertumbuhan

K1 : kontrol media

K3 : kontrol pelarut DMSO 100%

Hasil Uji Kromatografi Lapis Tipis: Identifikasi golongan senyawa dalam ekstrak dilakukan dengan menggunakan kromatografi lapis tipis. Fase gerak yang digunakan adalah heksan:etil asetat (7:3) v/v. Bercak yang mempunyai harga Rf 0,62 dengan reagen semprot sitroborat pengamatan pada UV 366 nm tidak berfluoresensi kuning sehinggamungkin bukan merupakan senyawa flavonoid. Bercak dengan Rf 0,80 merupakan senyawa saponin tipe triterpenoid karena pada UV 366 nm setelah disemprot pereaksi Liebermann- Burchard bercak berfluoresensi merah. Bercak dengan Rf 0,85 merupakan senyawa steroid karena pada UV 366 nm setelah disemprot Liebermann- Burchard bercak berfluoresensi biru. Bercak dengan nilai Rf 0,31 dan 0,62 merupakan antrakinin karena pada sinar tampak setelah disemprot KOH etanolik 10% bercak berwarna kuning. Bercak dengan nilai Rf 0,38; 0,50; 0,65 dan 0,77 merupakan polifenol karena pada sinar tampak setelah disemprot FeCl₃ bercak berwarna abu-abu.

Hasil Uji Bioautografi : Bila dilihat pada media MH, pertumbuhan *K.pneumoniae* tampak jernih pada Rf 0,38; 0,50; 0,62; dan 0,80. Berdasarkan hasil KLT, bercak pada Rf 0,80 merupakan senyawa golongan saponin yaitu triterpenoid saponin yang mempunyai aktivitas antibakteri dengan cara mengubah permeabilitas membran terkait dengan perubahan dalam homeostatis antara kompartemen intraseluler dan ekstraseluler (Melzig *et al.*, 2001). Bercak pada Rf 0,50 dan 0,38 merupakan senyawa polifenol. Bercak pada Rf 0,62 adalah senyawa golongan antrakinin yaitu antron dan antranol.

Hasil bioautografi pada media MH yang diinokulasi dengan *Staphylococcus epidermidis* didapatkan zona jernih pada Rf 0,31; 0,38; 0,50; dan 0,65. Diameter zona jernih yang berada pada Rf 0,38; 0,50; dan 0,65 merupakan senyawa golongan polifenol. Sedangkan bercak pada Rf 0,31 merupakan senyawa golongan antrakinin.

Tabel 2. Hasil Analisis KLT Ekstrak Etanol Daun Sirsak dengan Fase Gerak Heksan:Etil Asetat (7:3)

Bercak	Rf	Deteksi						Dugaan Senyawa
		Pengamatan		Sitroborat	LB	KOH Etanol 10%	FeCl ₃	
		UV 254	UV 366	UV 366	UV 366	ST	ST	
1	0,31	Pemadaman	F. Merah	-	-	Kuning	-	Antron dan Antranol
2	0,38	Pemadaman	F. Ungu	-	-	-	Ab	Polifenol
3	0,50	Pemadaman	F. Ungu	-	-	-	Ab	Polifenol
4	0,62	Pemadaman	-	-	-	Kuning	-	Antron dan Antranol
5	0,65	Pemadaman	F. Ungu	-	-	-	Ab	Polifenol
6	0,77	Pemadaman	F. Ungu	-	-	-	Ab	Polifenol
7	0,80	-	-	-	F. Merah	-	KKc	Triterpenoid saponin
8	0,85	-	-	-	F. Biru	-	-	Steroid saponin

Keterangan:

Ab: abu-abu, F: fluoresensi, ST: sinar tampak, dan KKc: kuning kecoklatan

*: sumber Wagner dan Baldt (1996)

KESIMPULAN

Ekstrak etanol, fraksi non polar, semi polar dan polar daun sirsak (*Annona muricata* L.) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Klebsiella pneumoniae* dan *Staphylococcus epidermidis* dengan Kadar Bunuh Minimum (KBM) berturut-turut sebesar 2,5% 3%; 3,5%; 4% dan 4,5%. Hasil Kromatografi Lapis Tipis menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) mengandung senyawa steroid saponin, triterpenoid saponin, polifenol, antron, dan antranol. Seyawa golongan saponin, polifenol, dan antrakinin memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Klebsiella pneumoniae*. Sedangkan, golongan senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus epidermidis* yaitu golongan antrakinin dan polifenol..

UCAPAN TERIMA KASIH

Disampaikan kepada Dekan Fakultas Farmasi, dan Ketua LPPM UMS yang telah mensupport penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- [1]. Akiyama, H., Fujji, K., Yamasaki, O., Oono, T., Iwatsuki, K., 2001, Antibacterial Action of Several Tannins Against *Staphylococcus aureus*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48, 4, 487-491.
- [2]. Batubara dan Priyanto, L., 2008, *Farmakologi Dasar*, Depok, Leskonfi.
- [3]. Danan, C. R., 2011, *Klebsiella pneumoniae*, (online), (<http://mikrobia.files.wordpress.com/2008/05/cornelius-danan-r-078114100.pdf>, diakses tanggal 26 Februari 2011).
- [4]. Fitzpatrick, P., Humphreys, H., and O'Gara, J. P., 2005, The Genetics of Staphylococcal Biofilm Formation—will a Greater Understanding of Pathogenesis Lead to Better Management of Device-Related Infection?, *Clinical Microbiology and Infection*, 11, 967–973.
- [5]. Hertiani T., Palupi, I. S., Sanliferianti, Nurwindasari, H. D., 2003, Uji Potensi Antibakteri terhadap *S. aureus*, *E. coli*, *Shigella dysenteriae*, dan *Candida albicans* dari Beberapa Tanaman Obat Tradisional untuk Penyakit Infeksi, *Pharmakon*, 4, 2.
- [6]. Isaacs, D. dan Australasian Study for Neonatal Infections, 2003, A Ten Year, Multicenter Study of Coagulase Negative Staphylococcal Infections in Australasian Neonatal Units, *Arch Dis Child Fetal Neonatal*, 2, 89-93.
- [7]. Kosworo, 2012, Aktivitas Antibakteri dan Bioautografi Fraksi Polar Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap *Klebsiella pneumoniae* dan *Staphylococcus epidermidis*, *Skripsi*, Surakarta, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- [8]. Mack, D., Davies, A., Harris, L., Rohde, H., Horstkotte, M., and Knobloch, J., 2006, Microbial Interactions in *Staphylococcus epidermidis* Biofilm, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387, 399-400.
- [9]. Melzig, M. F., Bader, G., and Loose, R., 2001, Investigations of the Mechanism of Membrane Activity of Selected Triterpenoid Saponins, *Thieme Journal, Planta Med*, 67, 1, 43-48.
- [10]. Podschun, R., and Ullmann, U., 1998, *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens, Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors, *American Society for Microbiology*, 11, 4, 589-603.
- [11]. Prachi, P., Saraswathy., Vora., and Savai., 2010, In Vitro Antimicrobial Activity and Phytochemical Analysis of The Leaves of *Annona muricata*, *International Journal of Pharma Research and Development*, 2, 5, 1-6.
- [12]. Santosa, C. M., Hertiani, T., 2005, Kandungan Senyawa Kimia dan Efek Ekstrak Air Daun Bangun-Bangun (*Coleus amboinicus* L.) Pada Aktivitas Fagositosis Netrofil Tikus Putih (*Rattus norvegicus*), *Majalah Farmasi Indonesia*, 16, 3, 141-148.
- [13]. Saputro, H. P. W ., 2012, Aktivitas Antibakteri dan Bioautografi Fraksi semipolar Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap *Klebsiella pneumoniae* dan *Staphylococcus epidermidis*, *Skripsi*, Surakarta, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta.

- [14]. Septianingrum, R. U. D., 2012, Aktivitas Antibakteri dan Bioautografi Fraksi nonpolar Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap *Klebsiella pneumoniae* dan *Staphylococcus epidermidis*, *Skripsi*, Surakarta, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- [15]. Taylor, L., 2002, *Herbal Secrets of the Rainforest*, Second Ed., Sage Press, Inc.
- [16]. Vieira, G. H. E., Mourao, J. A., Angelo, A. M. Costa., R. A., and Vieira R. H. S. E., 2010, Antibacterial Effect (in vitro) of *Moringa oleifera* and *Annona muricata* Againsts Gram Positive and Gram Negative Bacteria, *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 52, 3, 129-132.
- [17]. Wagner, H., and Bladt, S., 1996, *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*, Second Ed., 350.
- [18]. Westh, H., Zinn, C. S., Rosdahl, V. T., 2004, An International Multicenter Study of Antimicrobial Consumption and Resistance in *Staphylococcus aureus* Isolates From 15 Hospitals in 14 Countries, *Microb Drug Resist*, 10, 169-176.