

EFEK ANTIBAKTERI CURCUMIN DAN PROTOCATECHUIC ACID TERHADAP *Klebsiella pneumonia* EXTENDED SPECTRUM BETALACTAMASE YANG DIISOLASI DARI SPUTUM PENDERITA BATUK KRONIS

Agus Prima dan Purwani Tjahya Handajani

Abstrak. *Curcumin* dan *protocatechuic acid* merupakan senyawa *polyphenolic*. Penelitian ini bertujuan melakukan isolasi dan identifikasi bakteri *Klebsiella pneumoniae*-ESBL dari sputum penderita batuk kronis dan mengetahui efek antibakteri *curcumin* dan *protocatechuic acid* terhadap *Klebsiella pneumoniae*-ESBL. Jenis penelitian ini eksperimental laboratorium dengan 2 jenis bahan alami, yaitu *curcumin* dan *protocatechuic acid*. Uji antimikroba dilakukan dengan metode difusi cakram. Data dianalisa dengan ANAVA dan BNJ. Hasil isolasi bakteri 100 spesimen penderita batuk kronis dapat diidentifikasi 9 spesies bakteri dengan *Klebsiella pneumoniae* sebagai bakteri terbanyak yaitu sebesar 27,5%) dan 3 isolat 2,5% diantaranya adalah *Klebsiella pneumoniae*-ESBL. Hasil penelitian *curcumin* dan *protocatechuic acid* menunjukkan *curcumin* dengan konsentrasi 25%, 50% dan 75% menghasilkan zona hambat dengan diameter rata-rata 6 mm, 6 mm dan 6 mm, sedangkan *protocatechuic acid* dengan konsentrasi yang sama menghasilkan zona hambat dengan diameter rata-rata 20,6 mm, 16 mm dan 10,8 mm. Hasil statistik menunjukkan *curcumin* konsentrasi 25%, 50% dan 75% tidak memiliki perbedaan yang nyata dalam menghambat *Klebsiella pneumoniae*-ESBL, *protocatechuic acid* pada konsentrasi 25%, 50% dan 75% menunjukkan perbedaan yang nyata. Hal ini memperlihatkan bahwa *curcumin* tidak memiliki aktivitas antibakteri, *protocatechuic acid* memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Klebsiella pneumoniae*-ESBL dan meropenems 10 µg setara 6,36 µg *protocatechuic acid* 75%. (JKS 2013; 3: 128-138)

Kata kunci : *Curcumin*, *protocatechuic acid*, *klebsiella pneumoniae*, extended spectrum beta lactamase

Abstract. *Curcumin* and *protocatechuic acid* are a phenolic compounds. The aim of this research isolate and identification bacteria *Klebsiella pneumoniae*-ESBL from phlegm patients present with chronic cough and determine effect antibacterial *curcumin* and *protocatechuic acid* to *Klebsiella pneumoniae*-ESBL. This research is Laboratory experiment with 2 natural substance. The examination of antimicrobial activity was done using disc diffusion method. The data analyzed by using ANOVA and BNJ. The result of isolated from 100 specimen patients present with chronic cough can do identification 9 species bacteria with *Klebsiella pneumonia* 27,5% and 7,5% *Klebsiella pneumoniae*-ESBL. The result of this reseach to *curcumin* and *protocatechuic acid* showed that *curcumin* with 25%, 50% and 75% can form the inhibition zone about 6 mm, 6 mm and 6 mm, while *protocatechuic acid* with 25%, 50% and 75% can form the inhibition zone about 20,6 mm, 16 mm and 10,8 mm. The examination of statistic showed that *curcumin* 25%, 50% and 75% does not has significant difference to inhibit growth of *Klebsiella pneumoniae*-ESBL, while *protocatechuic acid* has significant difference. The result that *curcumin* does not has activity antibacterial while *protocatechuic acid* has activity antibacterial to *Klebsiella pneumoniae*-ESBL and meropenems 10 µg equivalent with 6,36 µg *protocatechuic acid* 75%. (JKS 2013; 3: 128-138)

Key word : *Curcumin*, *protocatechuic acid*, *klebsiella pneumoniae*, extended spectrum beta lactamase

Pendahuluan

Curcumin yang terkandung di dalam kunyit (*Curcuma domestica* valetan)

Agus Prima adalah Dosen Bagian Anatomi Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Syiah Kuala Banda Aceh Banda Aceh, Purwani Tjahya Handajani adalah Dosen Bagian Anatomi Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Syiah Kuala Banda Aceh Banda Aceh

merupakan bahan aktif yang dapat berperan sebagai antibakteri.^{1,2} Rai et al. (2008) menyimpulkan bahwa, curcumin mempunyai aktivitas menghambat FtsZ (Filamenting temperature-sensitive mutant Z) yang merupakan protein encoded yang berperan dalam proses proliferasi sel bakteri dan diduga sebagai target penting dari antibiotik. Curcumin yang merupakan

senyawa polyphenolic ini mampu mempengaruhi fungsi membran sel bakteri yang berperan sebagai barrier terhadap enzim otolitik, dengan memodifikasi lipid bilayer membrane sel bakteri.³

Rosela (*Hibiscus sabdariffa* Linn) juga mengandung senyawa polyphenolic yang memiliki aktivitas antibakteri atau dapat menghambat pertumbuhan bakteri secara in vitro.⁴ Senyawa polyphenolic tersebut adalah *protocatechuic acid*. *Protocatechuic acid* (3,4-dihydroxybenzoic acid) dapat mengalami oksidase menjadi senyawa *p-hidroxybenzoic acid* yang dapat berperan menghancurkan bakteri genus *Vibrio* dan *Pseudomonas*. Efek dari antibakteri *protocatechuic acid* yang dapat melakukan infiltrasi ke dalam sel bakteri, menyebabkan bakteri ini lebih cepat mengakibatkan lisis pada sel bakteri.^{5,6}

Curcumin dan *protocatechuic acid* yang merupakan senyawa polyphenolic memiliki kerja yang sama dengan mekanisme kerja antimikroba, yaitu melalui penghambatan fungsi membran sel bakteri dan penghambatan sintesis protein pada sel bakteri.^{7,2,8} Menurut Pérez (1992) bahwa, senyawa polyphenolic ini memiliki aktivitas antibakteri dan memiliki daya hambat yang baik dalam konsentrasi yang kecil.⁷

Bakteri yang merupakan organisme bersel tunggal sering menginfeksi manusia melalui saluran pernafasan sebagai jalan utama bakteri memasuki tubuh.⁸ Infeksi bakteri pada saluran nafas sering menimbulkan gejala batuk yang dapat berlangsung lebih dari 8 minggu, yang disebut batuk kronis. Penyebab batuk kronis ini sering disensitisasi oleh *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* dan *Enterobacter*.⁹⁻¹¹

Klebsiella pneumoniae merupakan spesies basil Gram negatif yang memiliki kemampuan memproduksi enzim β -lactamase yang mampu menghidrolisis cincin β -lactam *cephalosporin*, *penicillin* dan *aztreonam* yang disebut bakteri

Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL).^{8,12}

Prevalensi bakteri-ESBL mengalami peningkatan di seluruh dunia dengan *Klebsiella pneumoniae* sebagai persentase tertinggi yaitu sebesar 31,1%, *Escherichia coli* 8,6% dan *Proteus mirabilis* 6,3% (Tzouveleakis *et al.*, 1993; Jones *et al.*, 2009). Bakteri-ESBL ditemukan sebesar 5-8 % di Asia dan 12-24% di Indonesia.¹³

Berdasarkan uraian di atas, maka penelitian ini bertujuan untuk melihat efektivitas *curcumin* dan *protocatechuic acid* sebagai antibakteri terhadap *Klebsiella pneumoniae*-ESBL yang diisolasi dari sputum penderita batuk kronis.

Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium yang dirancang dengan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 2 jenis bahan alami sebagai perlakuan, yaitu *curcumin* dan *protocatechuic acid* yang masing-masing dibagi dalam 5 kelompok terdiri dari 2 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan. Tiap-tiap kelompok diulang sebanyak 5 kali.

Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan, gelas kimia, erlenmeyer, cawan petri, gelas ukur, kawat ose, spatula, pinset, lampu, bunsen, autoklaf, inkubator, kaca objek, desinfektan, rak untuk pengecetan slide, reagen untuk pewarnaan, pengukuran waktu, api spiritus dan air yang mengalir berupa air leding, hand spon, pot sputum steril, mikroskop, labu tingga leher, alat maserasi, desiccators, tabung reaksi, tabung ukur, tabung kromatografi kolom, vacuum, pisau, oven dan pemanas.

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah sputum, aquades, larutan, alkohol, methylene blue, minyak emersi, xylene (xylol), cakram antibiotik kosong, cakram

antibiotik *meropenems*, kertas lensa, kertas label, tisu, media Mac Conkey (MAC), Müller Hinton Agar (MHA), plat kromatografi, etil asetat, timbal asetat, n-heksan, etanol, silica, besi sulfur, asam klorida, charcoal aktif, alkohol, ferric klorida, calcium clorida, bensin dan aquades.

Sterilisasi Bahan dan Peralatan

Sterilisasi adalah suatu proses untuk mematikan semua mikroorganisme yang terdapat pada suatu benda. Sterilisasi yang digunakan adalah sterilisasi basah yang dilakukan di dalam autoklaf dengan menggunakan air pada suhu 121°C selama 15 menit.

Pembuatan Media Mac Conkey

Mac Conkey merupakan media selektif untuk basil gram negatif yang mengandung laktosa, garam empedu dan merah netral. Cara pembuatannya adalah serbuk MAC ditimbang sebanyak 18,89 gram, dimasukkan ke dalam Erlenmeyer dan ditambahkan 400 ml aquades, lalu dipanaskan hingga larut. Setelah itu disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan dibiarkan dingin kira-kira pada suhu 45 °C. Selanjutnya dituangkan ke dalam petri yang steril sebanyak kira-kira 20 ml, setelah mengeras, cawan petri dibalik dan diinkubasi pada suhu 35°C selama 24 jam.

Pembuatan Müller-Hinton Agar

Müller-Hinton Agar merupakan media yang digunakan untuk pengujian sensitivitas antibiotik dengan metode difusi agar. Cara pembuatannya adalah serbuk MHA ditimbang sebanyak 15,2 gram dan ditambahkan 400 ml aquades, lalu dipanaskan hingga larut. Setelah itu disterilkan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dan dimasukkan ke dalam bak air kira-kira pada suhu 45°C selama 5 menit, lalu dibiarkan selama 0,5-1 jam untuk mendinginkannya. Selanjutnya dituangkan ke dalam petri yang steril sebanyak kira-

kira 20 ml, setelah mengeras, cawan petri dibalik dan diinkubasi pada suhu 35°C selama 24 jam.

Pembuatan Gas Hidrogen Sulfida

Pembuatan gas hidrogen sulfida dilakukan dengan mencampurkan besi sulfur kedalam asam klorida. Reaksi yang terjadi akan menimbulkan gas hidrogen sulfida. Prosedur pelaksanaan dilakukan dengan mempersiapkan wadah yang telah dimasukkan hidrogen klorida sebanyak 200 cc, kemudian ke dalam wadah tersebut dimasukkan besi sulfur dan ditutup yang rapat dengan menggunakan penutup yang terbuat dari kaca. Hal ini diharuskan karena hidrogen klorida sangat korosif. Setelah terjadi reaksi silang antara besi sulfur dan hidrogen klorida, maka akan terbentuk senyawa hidrogen sulfida (H_2S) yang berbau busuk. Hidrogen sulfida tersebut selanjutnya dialirkan ke dalam labu yang berisi sampel dan membiarkannya hingga terjadi proses pembusukan.⁶

Pemisahan Senyawa Petroleum

Proses pemisahan senyawa petroleum eter dari bensin dilakukan dengan menggunakan metode distilasi, yaitu metode pemisahan senyawa berdasarkan titik didih senyawa tersebut. Bensin salah satunya mengandung senyawa petroleum eter yang memiliki titik didih 30°C-40°C sehingga pemisahan senyawa petroleum eter dilakukan dengan mendistilasi bensin pada suhu 30°C-40°C.

Pengambilan Sputum

Isolat bakteri diambil dari sputum penderita batuk kronik di Laboratorium Mikrobiologi Klinik Instalasi Patologi Klinik RSUDZA. Sebelum mengeluarkan sputum, pasien diminta untuk mencuci mulut atau berkumur. Pengambilan sputum dilakukan dengan cara mengajurkan pasien untuk menarik nafas yang dalam lalu membatukkan sputum keluar secara dalam dari dada, lalu sputum ditampung di dalam pot steril yang berdiameter lebar. Sputum

yang baik harus berjumlah 3-5 ml, kental, purulen dan bukan ludah.

Isolasi Bakteri

Sputum diambil dengan menggunakan ose steril dan digoreskan pada media mac conkey, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Bakteri yang tumbuh diisolasi ke dalam masing-masing media yang sama komposisinya namun berbeda cawannya dengan mengambil satu koloni yang terpisah, sehingga diperoleh isolat murni dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.⁸

Identifikasi Bakteri

Bakteri yang tumbuh di dalam media inokulasi diidentifikasi secara makroskopis berdasarkan bentuk koloni, warna koloni, permukaan dan tepian koloni. Kemudian hasil identifikasi tersebut, dilakukan pemeriksaan mikroskopis untuk dikelompokkan ke dalam gram positif atau gram negatif dan menilai tingkat patogenitas dari bakteri tersebut.

Pemeriksaan mikroskopis dilakukan dengan cara pewarnaan gram. Pewarnaan gram adalah pewarnaan yang sering dilakukan untuk mengidentifikasi bakteri dengan melihat bentuk dan warna bakteri Gram positif atau bakteri Gram negatif. *Klebsiella pneumoniae* akan menunjukkan warna merah bata dan berbentuk basil.

Klebsiella pneumoniae akan memberikan hasil negatif untuk tes oksidase. Uji oksidase dilakukan dengan cara, suhu kotak dibiarkan sama dengan suhu kamar, lalu diambil satu koloni di permukaan agar. Kemudian dikeluarkan satu lidi dari kotak dan dipegang lidi pada ujung lidi yang berwarna merah, lalu diputarkan lidi di atas koloni dan diusapkan pada segumpal bakteri. Setelah itu melihat perubahan warna setelah 30 detik atau boleh maksimum selama 3 menit. Perubahan warna menjadi warna ungu menunjukkan hasil yang positif, sedangkan perubahan warna menjadi warna merah menunjukkan hasil yang negatif.

Tes API 20E dilakukan dengan cara, suspensi bakteri dimasukkan ke dalam 5 ml aquades yang disetarakan dengan 0,5 McFarland dan dimasukkan air sampai lekukan penuh, lalu diteteskan satu tetes ke dalam lubang kecil NO₃ sampai PNPG dan ditambahkan suspensi sampai ke dasar lubang. Kemudian ditambahkan 4 tetes dari suspensi salin ke dalam satu ampule media API AUX. Ditambahkan minyak steril di atas tes GLU, ADH dan URE. Baki ditutup, diinkubasi dengan suhu 30°C selama 48 jam dan diinkubasi dengan media murni dengan suhu 30°C selama 24 jam, lalu dicek kemurniannya. Jika ada kontaminasi tidak boleh dilaporkan hasil tes.

Penentuan *Klebsiella pneumoniae*-ESBL

Cakram kertas yang berisi antibiotik diletakkan di permukaan medium padat yang sebelumnya telah diinokulasi *Klebsiella pneumoniae*. Setelah diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan diamati pertumbuhan bakteri, diameter zona hambat sekitar cakram dipergunakan untuk mengukur kekuatan hambat obat terhadap bakteri uji berdasarkan CLSI (Clinical Laboratory Standart International). *Klebsiella pneumoniae*-ESBL menunjukkan hasil yang resisten terhadap antibiotik golongan Beta-Lactamase, kecuali carbapenems dan monobactam.^{8,14}

Pembuatan Ekstrak Curcumin

Rimpang kunyit (induk kunyit) yang segar dibersihkan dan dipotong kecil-kecil. Kemudian kunyit tersebut ditimbang sebanyak 500 gram. 500 gram kunyit yang telah kering selanjutnya dilakukan maserasi dengan campuran etanol 100% sebanyak 1,5 liter.

Pemisahan dilakukan dengan menggunakan kromatografi kolom dengan fase diam silica gel GF₂₅₄ dan fase gerak n-Heksan : Etil asetat (6:4) dan dianalisis dengan menggunakan kromatografi lapis tipis (KLT). Pada kromatografi lapis tipis (KLT) akan terlihat 3 spot warna kuning divisible, mulai dari R_f tinggi : *curcumin*,

demetoxicurcumin dan bisdemetoksicurcumin. Tidak perlu pereaksi semprot karena curcuminoid ada divisible. Tabung yang mengandung curcumin dievaporasi dan diperoleh curcumin murni (bukan campuran curcuminoid).

Pemisahan Protocatechuic Acid dari Rosela (*Hibiscus sabdariffa* Linn)

Pemisahan protocatechuic acid dilakukan dengan mengamati perubahan warna pada saat terjadi pengendapan atau presipitasi dengan mencampurkan liquor tertentu, sehingga diperoleh asam dihydroxyphenolic atau diketahui sebagai protocatechuic acid. Rosela yang telah dikeringkan selanjutnya direndam dalam suhu 30°C selama 2 jam dan diaduk. Jika terjadi presipitasi maka diputar dengan menggunakan tangan dan dicampurkan dengan hidrogen sulfida. Pencampuran dibiarkan selama 24 jam untuk memperoleh hasil yang sempurna. Sulfida akan menghilangkan dan filtrat akan bebas dari hidrogen dengan menggunakan aspirasi atau vacum. Larutan kemudian dipekatkan dengan suhu 40-50 derajat sampai menjadi 80-85% solid. Selanjutnya getah yang merupakan zat toxic dihilangkan dengan menambahkan 100% etanol. Larutan alkohol dipekatkan dengan suhu 35°C. Larutan yang diperoleh ditambahkan dengan dengan petroleum eter dan 20% alkohol. Selanjutnya larutan tersebut dipanaskan dengan suhu 60-80°C. Hasil yang diperoleh dimasukkan kedalam wadah lebar dan didesiccator dengan

menggunakan calcium klorida selama 24 jam. Hasil yang diperoleh diuji dengan ferric klorida untuk memastikan adanya senyawa fenolic. Senyawa fenolic tersebut diketahui sebagai protocatechuic Acid.⁶

Uji Antibakteri Curcumin dan Protocatechuic Acid

Metode yang digunakan untuk pengujian ini adalah metode difusi agar dengan media MHA steril. Suspensi bakteri dipersiapkan dengan cara memasukkan bakteri tersebut ke dalam 5 ml aquades yang disetarakan dengan 0,5 McFarland. Suspensi *Klebsiellapneumoniae*-ESBL diinokulasikan di atas permukaan media, lalu diratakan dengan menggunakan batang penyebar. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan diamati pertumbuhan bakteri pada setiap konsentrasi. Diameter zona hambat yang terbentuk diukur untuk menilai kekuatan daya hambat senyawa.

Hasil dan Pembahasan

Hasil Isolasi dan Identifikasi Bakteri

Hasil isolasi mikroorganisme dari 100 BP (Bahan Pemeriksaan) berupa sputum penderita batuk kronis yang diperoleh dari Poli Paru dan Rawat Inap Paru yang dikirim ke Laboratorium Mikrobiologi RSUDZA, diperoleh 33 BP (33%) terisolasi bakteri, 5 BP (5%) terisolasi jamur, 1 BP (1%) terisolasi bakteri dan jamur, sementara itu 61 BP (61%) lainnya tidak terisolasi mikroorganisme (Tabel 1).

Tabel 1 Hasil Isolasi Mikroorganisme dari Sputum Batuk Kronis

Mikro-organisme	Frekuensi BP	Persentase (%)
Bakteri	33	37
Jamur	5	4
Bakteri + jamur	1	1
Tidak tumbuh	61	58
Total	100	100

Hasil di atas menunjukkan bahwa infeksi yang menyebabkan batuk kronis umumnya hanya disebabkan oleh satu jenis mikroorganisme, yaitu infeksi bakteri atau

infeksi jamur. Selain itu, hasil di atas juga menunjukkan terdapat 58 BP (58%) yang tidak terdapat pertumbuhan mikroorganisme. Hal ini diduga dalam

sputum tersebut mengandung mikroorganisme yang tidak dapat tumbuh pada media agar yang digunakan, namun dapat tumbuh pada media khusus lain. Hasil isolasi bakteri dari 38 BP batuk kronis diperoleh 40 isolat. Dari hasil tersebut dapat diidentifikasi 9 spesies bakteri penyebab batuk kronis, yaitu *Klebsiella pneumoniae* 11 isolat (27,5%),

Staphylococcus aureus 9 isolat (22,25%), *Acinetobacter* 6 isolat (15%), *Pseudomonas aeruginosa* 5 isolat (12,5%), *Streptococcus* sp 4 isolat (10%), *Streptococcus viridians* 2 isolat (5%), *Staphylococcus* sp 1 isolat (2,5%), *Enterobacter* 1 isolat (2,5%) dan *Klebsiella ozaenae* 1 isolat (2,5%) (Tabel 2).

Tabel 2 Hasil Identifikasi Bakteri yang Terisolasi dari Sputum Batuk Kronis

No	Bakteri Yang Terisolasi	Jumlah Isolat	Persentase (%)
1	<i>Klebsiella Pneumonia</i>	11	27,5
2	<i>Staphylococcus aureus</i>	9	22,5
3	<i>Acinetobacter</i>	6	15
4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5	12,5
5	<i>Streptococcus</i> sp	4	10
6	<i>Streptococcus viridans</i>	2	5
7	<i>Enterobacter</i>	1	2,5
8	<i>Klebsiella Ozaenae</i>	1	2,5
9	<i>Staphylococcus</i> sp	1	2,5
Total		40	100

Hasil di atas menunjukkan bahwa, *Klebsiella pneumoniae* adalah bakteri yang paling banyak menyebabkan batuk kronis. Hal ini sesuai dengan Lin *et al.* (2010) yang mendapatkan bahwa, *Klebsiella pneumoniae* merupakan bakteri utama yang menyebabkan infeksi pneumonia yang dapat menimbulkan batuk kronis dengan persentase sebesar 55,1%, kemudian disusul dengan *Streptococcus pneumoniae* 27,3% dan 17,6% merupakan multiple infeksi bakteri patogen. Menurut Ko *et al.* (2002) melaporkan bahwa, *Klebsiella pneumoniae* merupakan bakteri yang predominan menyebabkan infeksi pneumonia yang diobservasi di 9 rumah sakit United States, Eropa, Argentina dan Australia

Hasil Penentuan *Klebsiella pneumoniae*-ESBL

Hasil uji resistensi terhadap 11 isolat *Klebsiella pneumoniae* menunjukkan bahwa, *Klebsiella pneumoniae* yang resisten terhadap CAZ (Ceftazidime) dan CTX (Cefotaxim) masing-masing berjumlah 3 isolat (27,3%) dan 4 isolat (36,4%). *Klebsiella pneumoniae* yang resisten terhadap CAZ dan CTX yang merupakan *Klebsiella pneumoniae*-ESBL berjumlah 3 isolat (2,5%). Bakteri ini digunakan sebagai bakteri uji dalam penelitian ini (Tabel 3). Bakteri-ESBL merupakan bakteri yang resisten terhadap ceftazidime, cefotaxim dan ceftriaxone, kecuali *meropenem*.¹⁵ Enzim-ESBL yang dihasilkan oleh bakteri mampu menghidrolisis cincin β -lactam *penicillin*, *cephalosporin*.¹²

Tabel 3 Hasil Uji Sensitivitas *Klebsiella pneumoniae*

	Sensitivitas									
	AMP		AMC		CAZ		CTX		ME M	
	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	10	2	9	8	3	7	4	9	2

Keterangan : S= sensitif, R=resisten

Hasil Uji Efek Antibakteri Curcumin

Hasil pemisahan senyawa dengan menggunakan kromatografi kolom diperoleh 53 fraksi. Lima puluh tiga fraksi

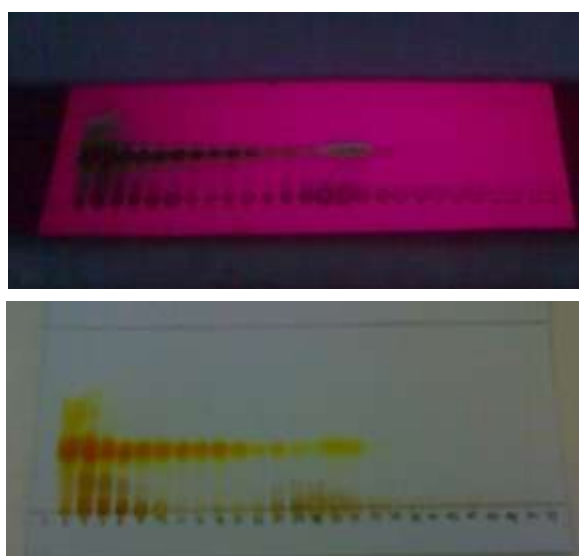
dengan pola kromatogram yang sama digabung sehingga diperoleh 3 fraksi (Tabel 4).

Tabel 4 Fraksi n-Heksan:Etil Asetat (6:4) *Curcumin* Rimpang Kunyit

Fraksi Gabungan	Warna	Rf
A (Fraksi 3-19)	Kuning tua	0,36-0,4
B (Fraksi 20-33)	Kuning	0,3-0,34
C (Fraksi 34-53)	Putih kekuningan	0,1-0,14

Fraksi-fraksi yang diuji tersebut adalah fraksi 3 sampai fraksi 19, karena menunjukkan nilai Rf yang lebih tinggi dengan noda visibel yang sama yang merupakan senyawa *curcumin* (Gambar 1).

Pada kromatografi lapis tipis (KLT) ekstrak kunyit akan memperlihatkan 3 spot warna kuning divisible, mulai dari Rf tinggi, yaitu *curcumin*, *demetoxicurcumin* dan *bisdemetoxicurcumin*.⁴



Gambar 1 Hasil Analisa dengan KLT

Hasil pengukuran zona hambat *curcumin* terhadap pertumbuhan *Klebsiella pneumoniae*-ESBL pada perlakuan P_{C-1} , P_{C-2} dan P_{C-3} dengan konsentrasi 75%, 50% dan 25% masing-masing menghasilkan zona hambat dengan diameter rata-rata 6 mm, 6 mm dan 6 mm, sementara itu diameter rata-rata zona hambat yang terbentuk pada perlakuan P_{C-4} (*meropenems* sebagai kontrol positif) adalah 32,4 mm dan pada perlakuan P_{C-0} (aquades sebagai kontrol negatif) adalah 5 mm (Tabel 6).

Hasil analisa data menggunakan ANAVA 5% terhadap diameter zona hambat *curcumin* diperoleh hasil $F_{hitung} = 1546$ dan $F_{tabel} = 2,87$ (Tabel 8). Hasil ini

menunjukkan bahwa F_{hitung} lebih besar dari pada F_{tabel} pada taraf 5%, sehingga membuktikan bahwa adanya perbedaan yang nyata *curcumin* dalam menghambat pertumbuhan *Klebsiella pneumoniae*-ESBL. Selanjutnya berdasarkan koefisien keragaman yang diperoleh yaitu 2,84% maka dilakukan uji lanjutan Beda Nyata Jujur (BNJ) pada taraf 5%, sehingga diperoleh $W_{0,05}$ adalah 1,269 (Tabel 5).

Tabel 5 Rata-rata Diameter Zona Hambat *Curcumin* Terhadap *Klebsiella pneumoniae*-ESBL

Perlakuan	Q _{0,05}
P _{C-0}	5 ^a ±0,00
P _{C-1}	6 ^a ±0,00
P _{C-2}	6 ^a ±0,00
P _{C-3}	6 ^a ±0,00
P _{C-4}	32,4 ^b ±1,52

Keterangan: *Superscript* Huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan yang sangat nyata (P<0,05)

Berdasarkan tabel di atas terlihat bahwa *curcumin* dengan konsentrasi 75%, 50% dan 25% menunjukkan tidak memiliki perbedaan yang nyata dalam menghambat pertumbuhan *Klebsiella pneumoniae*-ESBL dibandingkan dengan kontrol negatif, namun memiliki perbedaan yang nyata bila dibandingkan dengan kontrol positif. Hal ini menunjukkan bahwa *curcumin* tidak dapat menghambat pertumbuhan *Klebsiella pneumoniae*-ESBL. Bila dilihat dari besar zona hambat yang terbentuk pada setiap konsentrasi, maka tidak ada perbedaan zona hambat. Hal ini tidak sesuai dengan Aggarwal *et al.* (2007) yang menyatakan bahwa *curcumin* memiliki aktivitas antibakteri. *Curcumin* yang terkandung di dalam kunyit juga telah diteliti oleh Niamsa dan Sittiwet (2009) yang menunjukkan bahwa *curcumin* yang terkandung di dalam ekstrak kunyit memiliki aktivitas antibakteri terhadap

bakteri *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 dengan zona hambat 13,9±0,9 pada konsentrasi 500 gL⁻¹ dan tidak memiliki zona hambat pada konsentrasi 250 gL⁻¹ dan 125 gL⁻¹.

Perbedaan hasil penelitian ini diduga karena *Klebsiella pneumoniae* yang digunakan dalam penelitian ini merupakan *Klebsiella pneumoniae*-ESBL yang memiliki tingkat virulensi yang lebih tinggi dibandingkan dengan *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031. Namun pada beberapa penelitian bahwa *curcumin* yang terkandung di dalam kunyit tidak memiliki efek antibakteri, hal ini dibuktikan dengan tidak adanya daya hambat ekstrak kunyit pada pelarut heksana dan etanol yang memiliki afinitas yang baik terhadap senyawa *curcumin*, namun memiliki aktivitas antibakteri pada pelarut metanol yang memiliki afinitas yang baik terhadap minyak atsiri.¹⁶

Tabel 6 Hasil Uji *Curcumin* Terhadap *Klebsiella pneumoniae*-ESBL

Perlakuan	Ulangan					Jumlah	Rata-rata ± SD
	I	II	III	IV	V		
P _{C-0}	5	5	5	5	5	25	5±0,00
P _{C-1}	6	6	6	6	6	30	6±0,00
P _{C-2}	6	6	6	6	6	30	6±0,00
P _{C-3}	6	6	6	6	6	30	6±0,00
P _{C-4}	30	34	33	33	32	162	32,4±1,52
Jumlah						277	11,08

Tabel 7 Hasil Uji *Protocatechuic Acid* Terhadap *Klebsiella pneumoniae*-ESBL

Perlakuan	Ulangan					Jumlah	Rata-rata ± SD
	I	II	III	IV	V		
P _{P-0}	5	5	5	5	5	5	5±0,00
P _{P-1}	23	27	20	16	17	103	20,6±4,50
P _{P-2}	18	18	16	15	13	80	16,0±2,12
P _{P-3}	14	18	16	15	13	76	15,2±1,92
P _{P-4}	33	32	30	33	34	162	32,4±1,52
Jumlah						446	16,84

Tabel 8 Hasil Uji ANAVA Curcumin

Sumber Varian	DB	JK	KT	F Hitung	F Tabel5%
Perlakuan	4	2844,64	711,16	1546**	2,87
Acak	20	9,2	0,46		
Total	24	2853,84			

Tabel 9 Hasil Uji ANAVA Protocatechuic Acid

Sumber Varian	DB	JK	KT	F Hitung	F Tabel5%
Perlakuan	4	1974,16	493,54	75**	2,87
Acak	20	123,2	6,16		
Total	24	2097,36			

Hasil Uji Antibakteri Protocatechuic Acid

Hasil test ferric klorida yang berwarna kuning kehitaman menunjukkan senyawa *protocatechuic acid* (Gambar 2). Senyawa *protocatechuic acid* merupakan senyawa phenolic yang akan menunjukkan test positif (kuning kehitaman) terhadap ferric klorida pada uji fitokimia.⁶

Hasil pengukuran zona hambat *protocatechuic acid* terhadap pertumbuhan

Klebsiella pneumoniae-ESBL pada perlakuan P_{p-1}, P_{p-2} dan P_{p-3} dengan konsentrasi 75%, 50% dan 25% masing-masing menghasilkan zona hambat dengan diameter rata-rata 20,6 mm, 16 mm dan 15,2 mm, sementara itu diameter rata-rata zona hambat yang terbentuk pada perlakuan P_{p-4} (*meropenems* sebagai kontrol positif) adalah 32,4 mm dan pada perlakuan P_{p-0} (alkohol 20% sebagai kontrol negatif) adalah 5 mm (Tabel 7).



Gambar 2 Hasil Positif Terhadap Ferric Klorida

Hasil analisa data menggunakan ANAVA 5% terhadap diameter zona hambat *protocatechuic acid* diperoleh hasil $F_{hitung} = 75$ dan $F_{tabel} = 2,87$ (Tabel 9). Hasil ini menunjukkan F_{hitung} lebih besar dari pada F_{tabel} pada taraf 5%, sehingga membuktikan bahwa adanya perbedaan yang nyata dari

protocatechuic acid dalam menghambat pertumbuhan *Klebsiella pneumoniae*-ESBL. Selanjutnya berdasarkan koefisien keragaman yang diperoleh yaitu 15,27% maka dilakukan uji lanjutan yaitu Uji Dunnet pada taraf 5% , sehingga diperoleh DLSD adalah 4,13 (Tabel 6).

Tabel 6 Rata-rata Diameter Zona Hambat Protocatechuic Acid Terhadap *Klebsiella pneumoniae*-ESBL

Perlakuan	Q _{0,05}
P _{p-0}	5 ^a ±0,00
P _{p-1}	20,6 ^d ±4,50
P _{p-2}	16,0 ^c ±2,12
P _{p-3}	15,2 ^b ±1,92
P _{p-4}	32,4 ^e ±1,52

Keterangan : Superscript Huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan yang sangat nyata (P<0,05)

Berdasarkan tabel di atas terlihat bahwa *protocatechuic acid* dengan konsentrasi 75%, 50% dan 25% menunjukkan perbedaan yang nyata dalam menghambat pertumbuhan *Klebsiella pneumoniae*-ESBL dibandingkan dengan kontrol positif dan negatif. Hal ini menunjukkan bahwa *protocatechuic acid* dapat menghambat pertumbuhan *Klebsiella pneumoniae*-ESBL, namun tidak sebanding dengan *meropenems*. Secara statistik, *meropenems* 10 µg setara dengan 6,36 µg *protocatechuic acid* pada konsentrasi 75% dalam menghambat pertumbuhan *Klebsiella pneumoniae*-ESBL. Bila dilihat dari besar zona hambat yang terbentuk pada setiap konsentrasi, maka semakin tinggi konsentrasi *protocatechuic acid*, semakin besar diameter zona hambat yang terbentuk. Hasil ini sesuai dengan Olaleye (2007) yang menunjukkan bahwa *protocatechuic acid* yang terkandung di dalam rosela memiliki aktivitas antibakteri yang baik dengan zona hambat $40 \pm 0,2$ mm pada 20 mgL^{-1} , $10 \pm 0,2$ pada 1 mgL^{-1} terhadap *Klebsiella pneumoniae* NCIB 408. Hal ini diduga disebabkan oleh senyawa *protocatechuic acid* yang masuk ke dalam sel bakteri mengalami oksidase menjadi senyawa β -carboxymuconic acid yang dapat berperan menghancurkan sel bakteri.^{4,6}

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa :

1. *Klebsiella pneumoniae* dapat diisolasi dari sputum penderita batuk kronis di RSUDZA sebanyak 11 isolat dari 100 BP (11%), dari 11 isolat tersebut ditemukan 3 isolat (3%) diantaranya adalah *Klebsiella pneumoniae*-ESBL.
2. *Curcumin* yang diisolasi dari rimpang kunyit baik pada konsentrasi 25%, 50% maupun 75% tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Klebsiella pneumoniae*-ESBL.
3. *Protocatechuic acid* pada konsentrasi 25%, 50% dan 75% menunjukkan

aktivitas antibakteri terhadap *Klebsiella pneumoniae*-ESBL.

4. Semakin tinggi konsentrasi *protocatechuic acid*, maka semakin tinggi zona hambat yang dihasilkan terhadap pertumbuhan *Klebsiella pneumoniae*-ESBL.
5. *Protocatechuic acid* konsentrasi 75% setara dengan 6,36 µg *meropenems* dalam menghambat pertumbuhan *Klebsiella pneumoniae*-ESBL.

Saran

1. Perlu dilakukan isolasi senyawa *protocatechuic acid* dengan metode dengan metode kromatografi untuk menilai efek antibakteri terhadap bakteri-ESBL.
2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui efektifitas antibakteri *protocatechuic acid* secara in vivo.

Daftar Pustaka

1. Aggarwal B.B. SC and MN. The Molecular Targets and Therapeutic Uses of Curcumin in Health and Disease. Springer Science Business Media. 2007 : 1-13.
2. Chattopadhyay I, Biswas K. BU and BR. Turmeric And Curcumin: Biological actions and Medicinal Applications. Current Science. 2004. 87 : 44-53.
3. Hung WC, Chen FY, Lee CC, Sun Y, LM and HH. Membrane-Thinning Effect of Curcumin. Biophysical Journal. 2008 : 94 : 4331-8.
4. Olaleye M.T. Cytotoxicity and Antibacterial Activity of Methanolic extract of Hibiscus sabdariffa. Journal of Medicinal Plants Research. 2007. 1 : 9-13.
5. Lin YT, Jeng YY. CT and FC. Bacteremic community-acquired pneumonia due to *Klebsiella pneumoniae*: Clinical and microbiological characteristics in Taiwan. 2001-2008. BMC Infectious Diseases. 2010. 10 : 307-14.
6. K.P L. The Isolation of Protocatechuic Acid from Pigmented Onion Scales And Its Significance In Relation To Disease Resistance In Onions. J. Biol. Chem. 1929 : 369-75.
7. J P. Phenolic Content And Antibacterial Activity Of Olive Oil Waste Waters.

- Environmental Toxicology and Chemistry. 1992. 11 : 489-95.
8. Brooks G.F. BJS and MS. Microbiologi Kedokteran. EGC : Microbiologi Kedokteran. 2005. p. 155-70.
9. J.M IRS and M. The Diagnosis And Treatment of Cough. The New England Journal of Medicine. 2000. 343 : 1715-21.
10. King P.T. Holdsworthb S.H. Freezera N.J. VE and HP. Microbiologic Follow-Up Study In Adult Bronchiectasis. Res Med Journal. 2007. 101 : 1633-8.
11. Kumar S, Wang L, Fan J, Kraft A, Bose M.E, Tiwari S, Dyke M.V, Haigis R, Luo T, Ghosh M, Tang H, Haghnia M, Mather E.L. WWG and HK. Detection of 11 Common Viral and Bacterial Pathogens Causing Community-Acquired Pneumonia or Sepsis in Asymptomatic Patients by Using a Multiplex Reverse Transcription-PCR Assay with Manual (Enzyme Hybridization) or Detection Automated (Electronic Microar. Journal Of Clinical Microbiology. 2008. 46 : 3063-72.
12. Tumbarello M, Spanu T, Sanguinetti M, Citton R., Montuori E., Leone F. FG and CR. Bloodstream Infections Caused by Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Risk Factors, Molecular Epidemiology, and Clinical Outcome. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2006. 50 : 498-504.
13. RA PDL and B. Extended-Spectrum Beta-Lactamases : a Clinical Update. Clinical Microbiology Reviews. 2005. 18 : 657-86.
14. Stephen J and Cavalieri. Manual of antimicrobial susceptibility testing. American Society for Microbiology. 2005. 1-5.
15. Bush K, Jacoby G.A, Amicosante G, Bonomo R.A, Bradford P.A, Cornaglia G, Garau J, Giamarellou H, Jarlier V, Martinez-Martinez L, Miriagou V, Palzkill T, Pascual A, Rodriguez-Ban˜o J, Rossolini G.M. SW and VA. Comment on : Redefining Extended-Spectrum Beta-lactamases: Balancing Science and Clinical Need. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2009. 64 : 212-6.
16. C NN and S. Antimicrobial Activity of Curcuma longa Aqueous Extract. Journal of Pharmacology and Toxicology. 2009. 1-5.