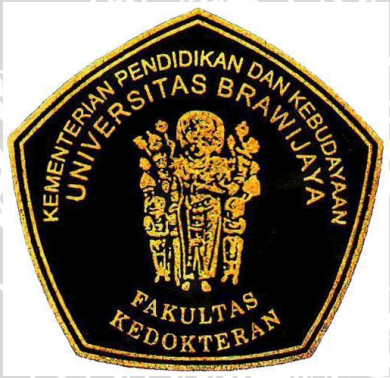
UJI EFEKTIVITAS ETANOL EKSTRAK DAUN KAYU MANIS

(*Cinnamomum burmannii*) SEBAGAI ANTIMIKROBA TERHADAP BAKTERI

Shigella dysenteriae SECARA *In Vitro*

Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran



Oleh :
I Gusti Ngurah Ryan Sanjaya
0910713015

PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2013

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

UJI EFEKTIVITAS EKSTRAK ETANOL DAUN KAYU MANIS (*Cinnamomum burmannii*) SEBAGAI ANTIMIKROBA TERHADAP BAKTERI *Shigella dysenteriae* SECARA *In Vitro*

Oleh :

I Gusti Ngurah Ryan Sanjaya

NIM : 0910713015

Telah diuji pada
Hari : Rabu
Tanggal : 24 April 2013
dan dinyatakan lulus oleh :

Penguji I

dr. Soemardini, MPd
NIP. 110446417

Penguji II / Pembimbing I

Prof. Dr. dr. Sanarto Santoso, DTM&H.,Sp.MK(K)
NIP. 19481220 198002 1 002

Penguji III / Pembimbing II

dr. Endang Asmaningsih, MS
NIP. 080943206

Mengetahui,
Ketua Program Studi Pendidikan Dokter

Prof.Dr.dr Teguh W. Sardjono, DTM&H,Msc,Sp,ParK
NIP. 19520410 198002 1 001

KATA PENGANTAR

Puji Syukur saya ucapkan kepada Ida Sang Hyang Widhi Wasa, Tuhan Yang Maha Esa. Karena hanya dengan berkah dan rahmat-Nya, penulisan Tugas Akhir ini dapat selesai. Tugas Akhir ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran (S.Ked) pada Program Pendidikan Dokter Umum Universitas Brawijaya Malang.

Dalam proses penulisan Tugas Akhir ini, penulis juga banyak didukung oleh berbagai pihak. Oleh karena itu, pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih kepada:

1. Dr. dr. Karyono M, Sp.PA selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
1. Prof. Dr. dr. Teguh W. Sardjono, DTM&H, MSc, Sp. ParK selaku Ketua Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
2. Prof. Dr. dr. Sanarto Santoso DTM&H.,Sp. MK(K) selaku Dosen Pembimbing pertama yang telah banyak meluangkan waktu ditengah kesibukan beliau untuk membimbing dan mengarahkan penulis dengan sabar dan selalu memberi semangat selama penulisan Tugas Akhir ini.
3. dr. Endang Asmaningsih, MS selaku Dosen Pembimbing kedua yang telah banyak meluangkan waktunya untuk membimbing dan mengarahkan penulis selama penulisan Tugas Akhir ini.
4. dr. Soemardini, MPd selaku Dosen Pengujiatas kesediaannya memberikan masukan dan penilaiannya untuk menyempurnakan Tugas Akhir ini.
5. Dr. dra. Sri Winarsih, Apt, Msi selaku ketua Tim Tugas Akhir yang telah membatu sehingga Tugas Akhir ini dapat terselesaikan.

6. Mas Slamet, Mbak Uci, Mas Hendri, Bu Yati selaku staf Laboratorium Mikrobiologi FKUB untuk keahlian dan ketelatenannya dalam membantu pelaksanaan penelitian.
7. Segenap Anggota Tim Pengelola Tugas Akhir Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya khususnya Dr. Dra. Sri Winarsih, Apt. dan dr. Soemardini, MPd.
8. Terimakasih kepada Ajik, mami dan adikku tercintaserta seluruh keluargaku yang selalu memberikan dukungan terus-menerus agar karya tulis ini cepat selesai.
9. Terima kasih kepada mama alm yang selalu membantu dari sana, semoga mama bangga dan bahagia selalu disana.
10. Terima kasih Sahabat-sahabatku : Agus, Odie, Gung Pram, Tjok, Deby, Indah, Jojo, Lita, Priska dan Ranu serta teman-teman lain yang yang telah memberi semangat yang luar biasa dalam pengerjaan Tugas Akhir ini.
11. Terima kasih Saudara-saudara seperantauanku yaitu : Bli Dek, Poyok, Sum, John, Surya, Bawa, Angga, Diva, Cok Gus, Ranu, Nana dan Crab.
12. Terima Kasih yang spesial untuk Ida Ayu Pradnyaparamitha Dewi yang selalu memberikan motivasi dan semangat dalam proses pengerjaan Tugas Akhir ini.
13. Teman-teman Pendidikan Dokter angkatan 2009 yang selalu kompak dan memberikan suasana yang menyenangkan dalam menuntut ilmu, semoga tetap kompak sampai kita semua lulus menjadi dokter.
14. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu-persatu yang telah membantu selama ini, baik secara langsung maupun tidak langsung.

Akhir kata penulis menyadari bahwa tulisan ini masih jauh dari kesempurnaan, sehingga kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan. Semoga Tugas Akhir ini dapat diterima dan akan bermanfaat bagi penulis khususnya dan bagi pembaca yang membutuhkannya.

Malang, 24 April 2013

Penulis

repository.ub.ac.id

ABSTRAK

Sanjaya, I Gusti Ngurah Ryan. 2012. Uji Efektivitas Ekstrak Etanol daun Kayu Manis *(Cinnamomum burmannii)* Sebagai Antimikroba Terhadap Bakteri *Shigella dysenteriae* secara *In Vitro.* Tugas Akhir, Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Prof. Dr. dr. Sanarto Santoso, DTM&H., Sp. MK(K) .(2) dr. Endang Asmaningsih, MS.

Shigella dysenteriae merupakan bakteri yang paling sering menyebabkan infeksi dan resisten terhadap antibiotika tertentu, oleh karena itu perlu dilakukan penelitian untuk mendapatkan antimikroba alternatif. Salah satunya daun kayu manis yang memiliki kandungan *tannin, flavonoid, dan saponin.* Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ekstrak daun kayu manis sebagai antimikroba terhadap *Shigella dysenteriae* secara *in vitro*. Metode yang digunakan adalah dilusi tabung yang terdiri dari tahap penentuan Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM). Ekstrak daun kayu manis dibuat dengan ekstraksi maserasi menggunakan *etanol* 96%. Konsentrasi ekstrak yang digunakan yaitu 6%; 6,25%; 6,5%; 6,75%; 7% dan 7,25%, sedangkan konsentrasi *Shigella dysenteriae* adalah 10^6 CFU/ml. Hasil statistik *one-way ANOVA* menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan pada perubahan konsentrasi ekstrak *etanol* 96% daun kayu manis terhadap jumlah koloni *Shigella dysenteriae* (p=0,000). Uji korelasi menunjukkan adanya hubungan antara konsentrasi ekstrak dengan jumlah koloni (Korelasi, R = -0,898; p=0,001). Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa ekstrak *etanol* daun kayu manis mempunyai efek antimikroba terhadap *Shigella dysenteriae* secara in vitro dengan Kadar Bunuh Minimum (KBM) adalah 7,25 %.

Kata kunci: *antimikroba, Shigella dysenteriae, daun kayu manis.*

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

ABSTRACT

Sanjaya, I Gusti Ngurah Ryan. 2012. Test Effectivity Etanol of Cinnamon leaf Extract *(Cinnamomum burmannii)* As Antimicrobial Againts *Shigella dysenteriae In Vitro.* Final Assignment, Medical Education, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: (1) Prof. Dr. dr. Sanarto Santoso, DTM&H., Sp. MK(K).(2) dr. Endang Asmaningsih, MS.

*Shigella dysenteriae*is bacteria that most often cause infection and resistant to specific antibiotics. Therefore, it should be conducted a research to get an alternative antimicrobial. One of them is cinnamon leaf which contains *tannin, flavonoid, and saponin.* The objective of this research is to determine cinnamon leaf extract as antimicrobial against *Shigella dysenteriae in vitro*. The research used tube dilution method that consist of determine Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC). Cinnamon extract is made by maceration extraction using *etanol* 96%. The concentration used were 6%; 6,25%; 6,5%; 6,75%; 7% and 7,25%, concentration of *Shigella dysenteriae* is 10^6 CFU/ml. The result of *one-way ANOVA* statistical test showed that there is significant differences in the concentration change of extract *etanol* 96% cinnamon on the amount of colony *Shigella dysenteriae* (p=0,000). Correlation test showed that there is a correlation between concentration of extract with the amount of colony (Correlation, R = -0,898; p=0,001). Based on the result, it can be concluded that extract of cinnamon have antimicrobial effect on *Shigella dysenteriae* by in vitro with Minimum Bactericidal Concentration (MBC) 7,25%.

Keywords: *antimicrobial, Shigella dysenteriae, cinnamon leaf.*

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DAFTAR ISI

Judul..... i

Halaman Pengesahan..... ii

Kata Pengantar..... iii

ABSTRAK..... vi

ABSTRACT vii

Daftar Isi viii

Daftar Gambar xiii

Daftar Tabel..... xiv

Daftar Lampiran xv

Daftar Singkatan xvi

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang 1

1.2 Rumusan Masalah 3

1.3 Tinjauan Penelitian..... 3

1.3.1 Tujuan Umum 3

1.3.2 Tujuan Khusus 3

1.4 Manfaat Penelitian 3

1.4.1 Manfaat Akademik 3

1.4.2 Manfaat Klinis 4

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Shigella dysenteriae* 5

2.1.1 Taksonomi..... 5

2.1.2 Morfologi dan Identifikasi 7

2.1.3 Struktur antigen 7

2.1.4 Toksin 8

2.1.5 Patogenesis dan Patologi..... 9

2.1.6 Patofisiologi..... 10

2.1.7 Manifestasi Klinis..... 11

2.1.8 Diagnostik Laboratorium 12

2.2 Terapi Antimikroba 13

2.2.1 Spektrum Antimikroba 13

2.2.2 Mekanisme Kerja Obat Antimikroba 14

2.2.2.1 Menghambat Sintesa Dinding Sel 14

2.2.2.2 Menghambat Fungsi Membran Sel… 15

2.2.2.3 Menghambat Sintesa Protein 15

2.2.2.4 Menghambat Sintesa Asam Nukleat..... 15

2.2.2.5 Menghambat Metabolisme Sel Bakteri 16

2.2.3 Mekanisme Resistensi Mikroba Terhadap Obat..... 16

2.2.4 Mekanisme Resistensi *Shigella* terhadap Antibiotik. 17

2.2.5 Uji Kepekaan terhadap Antimikroba *In Vitro*… 18

2.2.5.1 Metode Dilusi Tabung……..... 19

2.2.5.2 Metode Difusi Cakram……..... 19

2.3 Tinjauan Umum Tanaman Kayu Manis 20

2.3.1 Taksonomi 20

2.3.2 Tanaman Kayu Manis..... ... 21

2.3.3 Morfologi 22

2.3.4 Kandungan Daun Kayu Manis..... 24

2.3.4.1 Flavonoid……..... 25

2.3.4.2 Saponin…… 26

2.3.4.3 Tannin……..... 27

2.3.4.4 Eugenol……..... 27

2.3.4.5 Minyak Atsiri…… 28

2.3.5 Khasiat Daun Kayu Manis 29

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep dan Hipotesis Penelitian 30

3.2 Hipotesis Penelitian 32

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian 33

4.2 Sampel Penelitian 33

4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian 33

4.4 Variable Penelitian 34

4.4.1 Variable Bebas 34

4.4.2 Variable Tergantung 34

4.5 Definisi Operasional 34

4.6 Alat dan Bahan Penelitian 36

4.6.1 Alat untuk Pembuatan Ekstrak daun Kayu Manis … 36

4.6.2 Bahan untuk Pembuatan Ekstrak daun Kayu Manis. 36

4.6.3 Alat untuk Identifikasi Bakteri 36

4.6.4 Bahan untuk Identifikasi Bakteri..... 37

4.6.5 Alat untuk Tes Kepekaan Bakteri..... 37

4.6.5.1 Alat untuk Dilusi Tabung..... 37

4.6.5.2 Alat untuk Difusi Cakram..... 38

4.6.6 Bahan untuk Tes Kepekaan Bakteri…….. 38

4.7 Prosedur Penelitian 39

4.7.1 Pembuatan Ekstrak Kayu Manis 39

4.7.2 Identifikasi *Shigella dysenteriae* 40

4.7.2.1 Pewarnaan Gram…….. 40

4.7.2.2 Agar *Mac Conkey*……. 41

4.7.2.3 Sistem *Microbact*..... 42

4.7.3 Pembuatan Suspensi *Shigella dysenteriae* 43

4.7.4 Uji Sensitivitas Antimikroba 44

4.7.6 Alur Kerja Penelitian 46

4.8 Analisis Data 47

BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Data Hasil Penelitian 48

5.1.1 Identifikasi bakteri *Shigella dysenteriae*..... 48

5.2 Hasil Pengamatan Kekeruhan dan Perhitungan Jumlah Koloni

Bakteri *Shigella dysenteriae*…… 49

5.3 Analisis Data……. 53

5.3.1 Uji Asumsi Data 55

5.3.2 Uji Normalitas dan Homogenitas Data 56

5.3.3 Analisis One-Way ANOVA 56

5.3.4 Pengujian Berganda (Multiple Comparasions) 56

5.3.5 Pengujian Korelasi 57

5.3.6 Uji Regresi Linier 57

BAB 6 PEMBAHASAN 59

BAB 7 PENUTUP

7.1 Kesimpulan 64

7.2 Saran 64

DAFTAR PUSTAKA 66

Lampiran 68

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1*Shigella* 7

Gambar 2.2 Pohon Kayu Manis..... 22

Gambar 2.3 Kulit batang Kayu Manis 22

Gambar 2.4 Daun Kayu Manis 23

Gambar 2.5 Bunga dan Daun Kayu Manis…… 24

Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian 30

Gambar 4.1 Alur Kerja Penelitian..... 46

Gambar 5.1 Pewarnaan Gram…… 48

Gambar 5.2 Hasil Identifikasi *Shigella dysenteriae* 49

Gambar 5.3 Uji Dilusi Tabung Perbandingan Tingkat Kekeruhan Tiap Konsentrasi Ekstrak Setelah Diinkubasi..... 50

Gambar 5.4 Pertumbuhan Koloni *Shigella dysenteriae* pada Medium NAP 51

Gambar 5.5 Grafik rata-rata jumlah koloni bakteri *Shigella dysenteriae* Dengan kelompok perlakuan konsentrasi ekstrak daun kayu manis …… 53

Gambar L2.1 Mikroskop..... 69

Gambar L2.2 Spektrofotometri..... 69

Gambar L2.3 Vortex 69

Gambar L2.4 Daun Kayu Manis 69

Gambar L3.1 Hasil Inkubasi Kontrol Kuman *Shigella dysenteriae*… 70

Gambar L3.2 Koloni bakteri pada Medium NAP..... 70

DAFTAR TABEL

Tabel 5.1 Hasil Perhitungan Jumlah Koloni *Shigella dysenteriae* Pada Medium NAP 52

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Pernyataan keaslian tulisan..... 68

Lampiran 2 Alat dan bahan..... 69

Lampiran 3 Identifikasi bakteri dan hasil penelitian..... 70

Lampiran 4 Uji statistik..... 71

DAFTAR SINGKATAN

CFU = Colony Forming Unit

OI = Original Inoculum

KBM = Kadar Bunuh Minimum

KHM = Kadar Hambat Minimal

KP = Kontrol Positif

KN = Kontrol Negatif

mL = Mililiter

NAP = Nutrient Agar Plate

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit infeksi merupakan salah satu masalah dalam bidang kesehatan yang terus berkembang dari waktu ke waktu. Infeksi merupakan penyakit yang dapat ditularkan dari satu orang ke orang lain atau dari hewan ke manusia. Infeksi disebabkan oleh bakteri, virus, jamur, protozoa, dan beberapa kelompok minor lain seperti mikoplasma, riketsia, dan klamidia. Ada sekitar 50 spesies bakteri yang bersifat patogenik atau mampu menimbulkan penyakit, contohnya adalah *Shigella dysenteriae* (Gould *and* Brooker, 2003).

Bakteri *Shigella dysenteriae* dapat menyebabkan penyakit disentri basiler. Habitat alamiah kuman disentri adalah usus besar manusia, dimana kuman tersebut dapat menyebabkan disentri basiler. Disentri basiler adalah infeksi usus besar oleh bakteri patogen genus *Shigella*. Infeksi *Shigella* praktis selalu terbatas pada saluran pencernaan, *Shigella* menimbulkan penyakit yang sangat menular. Dosis infektif kurang dari 10 organisme. Pada beberapa orang, terutama anak kecil dan orang tua, disentri dapat berbahaya, pada kasus ini pasien harus dibawa ke Rumah Sakit.Berat ringannya penyakit dan "*case fatality rate*" tergantung dari fungsi dari inang (umur dan status gizi dari inang) serta tipe dari *Shigella*. *Shigella dysentriae* dapat menyebabkan penyakit serius dan komplikasi berat seperti *toxic megacolon* dan *sindroma uremia hemolitik*. *Shigella dysenteriae* merupakan penyebab penyakit yang menimbulkan epidemi hebat di daerah tropis dan subtropis (Soedarto,1996).

Pengobatan infeksi dapat menggunakan antibiotik yang telah diresepkan secara luas seperti pada saat sekarang ini (Gould *and* Brooker, 2003). Terapi infeksi dengan antibiotik dapat membawa masalah tersendiri, yaitu adanya resistensi bakteri terhadap antibiotik. Sebagian besar resistensi obat pada bakteri usus disebabkan oleh perluasan penularan plasmid resisten pada berbagai genus (WHO Media Center,2009). Studi di Amerika menunjukan bahwa saat ini resistensi *Shigella* terhadap ampicilin mencapai lebih dari 50% galur yang diidolasi dari berbagai negara (American Society for Microbiology). Sehingga perlu upaya mencari alternatif lain dalam pengobatan infeksi, yaitu penggunaan obat dari alam (WHO Media Center,2009).

Pada saat ini banyak sekali pengobatan alami yang belum terbukti secara ilmiah contohnya adalah daun kayu manis *(Cinnamomum burmannii)*. Daun kayu manis banyak dimanfaatkan untuk penyedap pada makanan.Tidak hanya untuk penyedap makanan,sekarang di masyarakakat daun kayu manis juga digunakan untuk pengobatan.Berbagai efek farmakologis yang dimiliki daun kayu manis diantaranya sebagai peluruh keringat (*diaphoretic*), penambah nafsu makan (*stomachiva)*, *carminative,* antibakteri, antijamur, dan lain-lain. Beberapa bahan kimia yang terkandung dalam Daun kayu manis diantaranya minyak atsiri, flavonoid, saponin, *eugenol, cinnamaldehyde, safrol, tannin,* kalsium oksalat, dammar, dan zat penyamak. Kandungan minyak atsiri , flavonoid, saponin diperkirakan dapat menghambat aktivitas dan pertumbuhan bakteri (Dian ,2008).

Berdasarkan uraian tersebut maka daun kayu manis *(Cinnamomum burmannii)* diduga mempunyai efek penghambat terhadap pertumbuhan bakteri. Oleh karena itu perlu pembuktian dengan melakukan penelitian apakah daun

kayu manis *(Cinnamomum burmannii)* mempunyai aktifitas sebagai anti bakteri terhadap pertumbuhan bakteri *Shigella* (Dian ,2008).

1.2 Rumusan Masalah

Apakah ekstrak etanol daun kayu manis *(Cinnamomum burmannii)* efektif sebagai antimikroba terhadap bakteri *Shigella dysentriae* secara *in vitro*?

1.3 Tinjauan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

1.3.1.1. Mengetahui efektifitas ekstrak etanol daun kayu manis *(Cinnamomum burmannii)* sebagai antimikroba terhadap *Shigella dysentriae* secara *in vitro.*

1.3.2 Tujuan Khusus

1.3.2.1. Mengetahui Kadar Hambat Minimum (KHM) ekstrak etanol daun kayu manis *(Cinnamomum burmannii)* terhadap *Shigella dysentriae* secara *in vitro*.

1.3.2.2. Mengetahui Kadar Bunuh Minimum (KBM) ekstrak etanol daun kayu manis *(Cinnamomum burmannii)* terhadap *Shigella dysentriae* secara *in vitro*.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

1.4.1.1. Memberikan informasi yang dapat digunakan sebagai dasar untuk penelitian lebih lanjut mengenai efek antimikroba daun kayu manis *(Cinnamomum burmannii)*.

1.4.1.2. Mengembangkan ilmu pengetahuan, terutama mengenai bahan alam yang dapat digunakan sebagai antimikroba.

1.4.2 Manfaat Klinis

1.4.2.1. Melalui penelitian ini diharapkan dapat diperoleh pengobatan alternatif dengan menggunakan bahan alam di sekitar kita dengan efek samping yang lebih minimal dibandingkan obat sintesis yang dijual dipasaran.

1.4.2.2. Menambah koleksi bahan antimikroba alam

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Shigella dysenteriae

Shigella merupakan penyebab disentri basiler yang ditemukan oleh ahli mikrobiologi Jepang Kiyoshi Shiga pada tahun 1898. Terdapat 4 spesies yaitu *Shigella Dysenteriae* yang umum terjadi di negara tropis (berat), *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* (sedang) dan *Shigella sonnei* (ringan). Shigella termasuk dalam anggota famili Enterobacteriaceae. Bakteri bersifat nonmotil, tidak membentuk spora, berbentuk batang Gram negatif, katalase positif, oksidase negatif, dan fakultatif anaerob. Produksi asam tanpa gas dari glukosa, bersifat mesofil dengan suhu pertumbuhan antara 10 – 45 C, pH optimum 6 – 8 dan peka terhadap panas. Di daerah tropis yang tersering ditemukan ialah Shigella dysenteri dan *Shigella flexneri*, sedangkan *Shigella sonnei* lebih sering dijumpai di daerah sub tropis atau daerah industri *(Jawetz et al, 2004).*

2.1.1 Taksonomi

Berdasarkan Todar's Online Textbook of Bacteriology, *Shigella dysenteriae* digolongkan dalam taksonomi sebagai berikut :

Kingdom : Bacteria

Divisi : Proteobacteria

Kelas : Gamma Proteobacteria

Ordo : Enterobacteriales

Family : Enterobacteriaceae

Genus : *Shigella*

Spesies : *Shigella dysenteriae* (Todar, 2008)

Genus Shigella mempunyai empat spesies, yaitu:

- *Shigella dysenteriae : banyak menyebabkan disentri basiler di negara berkembang.*
- *Shigella flexneri : bakteri ini juga menyebabkan banyak kasus shigellosis di Negara berkembang.*
- *Shigella sonnei : bakteri ini menyebabkan paling banyak kasus shigellosis di Negara maju.*
- *Shigella boydii (Dzen dkk, 2003).*

Secara genetik, bakteri Shigella tidak dapat dibedakan dengan E. coli. Kebanyakan ahli taksonomi meyakini bahwa kedua organisme ini merupakan spesies yang sama. Namun,karena kebanyakan galur Shigella menyebabkan disentri basiler, sedangkan E. coli tidak. Shigella dibagi menjadi empat serogroup, yaitu :

- *Serogroup A : S. dysenteriae*
- *Serogroup B : S. flexneri*
- *Serogroup C : S. boydii , dan*
- *Serogroup D : S. sonnei*

Serogroup A, B, C secara biokimia ada kemiripan, sementara serogroup D berbeda. Semua Shigella dapat menyebabkan disentri basiler, tetapi beratnya penyakit, mortalitas dan epidemiologinya, bervariasi pada masing-masing spesies (Brooks et al , 2007).

2.1.2 Morfologi dan Identifikasi

Shigella dysenteriae merupakan bakteri bentuk cocobasil bersifat nonmotil, tidak membentuk spora, berbentuk batang Gram negatif, katalase positif, oksidase negatif, dan fakultatif anaerob. Produksi asam tanpa gas dari glukosa, bersifat mesofil dengan suhu pertumbuhan antara 10 – 45 C, pH optimum 6 – 8 dan peka terhadap panas. Dapat terjadi pada biakan muda. Bakteri ini bersifat anaerob fakultatif tetapi paling baik tumbuh secara aerob. Koloninya konveks, bulat, transparan dengan pinggir-pinggir utuh mencapai diameter kira-kira 2mm dalam 24 jam. Bakteri ini sering ditemukan pada perbenihan diferensial karena ketidakmampuannya meragikan laktosa (Nathania, 2008).

(A) (B)

Gambar A : Pewarnaan Gram (batang Gram Negatif)

Gambar B : Kultur pada medium *Mac Conkey* agar

Gambar 2.1 *Shigella* (Dennis Kunkel Microscopy, 2004)

2.1.3 Struktur Antigen

Shigella mempunyai susunan antigen yang kompleks. Terdapat banyak tumpang tindih dalam sifat serologis berbagai spesies. Sebagian besar bakteri ini mempunyai antigen O yang juga dimiliki oleh bakteri enterik lainnya. Antigen

somatic O dari *Shigella* adalah lipopolisakarida. Kekhususan serologiknya tergantung pada polisakarida. Terdapat lebih dari 40 serotipe. Sedangkan klasifikasi *Shigella* didasarkan pada sifat-sifat biokimia dan antigeniknya (Dzen dkk, 2003).

Shigella dibagi empat grup berdasarkan antigen O mayor yang diberi tanda A, B, C, dan D. Saat ini, ada 12 tipe serologis dari grup A, 6 tipe serologis dari grup B, 18 tipe serologis dari grup C, dan 1 tipe serologis dari grup D. Beberapa galur memiliki antigen K, yang tidak penting untuk *serotyping*, tetapi dapat mengganggu reaksi serologis dari antigen O. Gangguan ini dapat dihilangkan dengan memanaskan suspensi bakteri sebelum dilakukan reaksi (Dzen dkk, 2003).

Fimbria terdapat pada serotipe 1 sampai 5 dari serogrup B tetapi tidak pada serotipe 6 atau *Shigella* yang lain. Semua antigen fimbrial secara imunologis identik. Karena semua *Shigella* nonmotil, maka bakteri ini tidak memiliki antigen H (Dzen dkk, 2003).

2.1.4 Toksin

Shigella menghasilkan toksin yang disebut Shigatoksin. Shigella mengadakan multiplikasi tanpa invasi di dalam jejunum kemudian memproduksi toksin. Toksin ini kemudian berikatan dengan reseptor dan menyebabkan aktivasi proses sekresi. Diare cair yang tampak pada awal penyakit merupakan tanda dari sifat enterotoksik shigatoksin. Selanjutnya,perjalanan penyakit melibatkan usus besar dan invasi jaringan di mana aksi shigatoksin akan memperberat gejalanya. Efek enterotoksik shigatoksin lebih pada penghambatan absorpsi elektrolit, glukosa, dan asam amino dari lumen intestinal (Dzen dkk, 2003).

2.1.5 Patogenesis dan Patologi

Mekanisme terjadinya diare akibat kuman enteropatogen termasuk yang diakibatkan *Shigella* meliputi perlekatan bakteri pada sel epitel kemudian berkembang, kemudian invasi ke dalam mukosa. Satu bakteri dapat menggunakan satu atau lebih mekanisme tersebut untuk mengatasi pertahanan mukosa usus. Bakteri *Shigella* selain melakukan invasi melalui membran basolateral usus untuk masuk ke epitel, juga menghasilkan toksin shiga yang bersifat sitotoksik (Houghton Mifflin Company, 2006).

Pada autolisis, semua *Shigella* mengeluarkan toksin liposakaridanya. Endotoksin ini mungkin berpengaruh pada iritasi dinding usus. *Shigella dysenteriae* tipe 1 (*shiga bacillus*) memproduksi eksotoksin yang tidak tahan panas yang mempengaruhi usus dan susunan saraf pusat. Eksotoksin merupakan sebuah protein yang antigenik (merangsang produksi antitoksin) dan mematikan pada binatang percobaan. Berlaku seperti enterotoksin, mereka menyebabkan diare seperti *E. coli* verotoksin, mungkin dengan mekanisme yang sama. Pada manusia, eksotoksin juga menghambat penyerapan gula dan asam amino pada usus kecil. Berlaku seperti ”neurotoksin”, materi ini menyebabkan rasa sakit yang hebat dan infeksi *Shigella dysenteriae* yang fatal dan pada reaksi susunan saraf pusat yang diamati pada penderita disentri (Brooks *et al*, 2004).

Eksotoksin yang diproduksi oleh *Shigella dysenteriae* tipe 1 ini sangat berpotensi untuk meningkatkan kerusakan vaskuler lokal dan dapat menyebabkan apoptopsis pada sel-sel tertentu. Distribusi sistemik dari toksin ini dapat mengakibatkan mikroangiopati pada ginjal yang dapat menyebabkan terjadinya HUS (*Haemolytic Uremic Syndrome*) (Gillespie, 2006).

2.1.6 Patofisiologi

Sebanyak 200 basil Shigella masuk ke dalam usus dapat mengakibatkan infeksi dan Shigella dapat bertahan terhadap keasaman sekresi lambung selama 4 jam. Sesudah masuk melalui mulut dan mencapai usus, bakteri invasif ini di dalam usus besar memperbanyak diri. Shigella sebagai penyebab diare mempunyai 3 faktor virulensi yaitu :

- Dinding polisakarida sebagai antigen halus
- Kemampuan mengadakan invasi enterosit dan proliferasi
- Mengeluarkan toksin sesudah menembus sel.(Jawetz *et al*, 2004).

Shigella yang virulen mampu mengadakan penetrasi ke dalam mukosa dan sel epitel, tetapi tidak bisa menembus lamina propria. Perlekatan bakteri pada sel epitel melibatkan kation bervalensi dua yaitu kalsium. Internalisasi bakteri merupakan hasil dari endositosis yang diperantai oleh reseptor atau karena beberapa produk bakteri yang menyebabkan respon hospes. Baik sel hospes maupun sel bakteri harus dalam keadaan metabolisme aktif untukterjadinya internalisasi *Shigella*. Struktur kimiawi dari dinding sel tubuh bakteri ini dapat berfungsi sebagai antigen O (somatik) adalah sesuatu yang penting dalam proses interaksi bakteri shigella dengan sel enterosit. Peradangan mukosa memerlukan hasil metabolit dari kedua bakteri dan enterosit, sehingga merangsang proses endositosis sel-sel yang bukan fagositosik untuk menarik bakteri ke dalam vakuola intrasel, yang mana bakteri akan memperbanyak diri sehingga menyebabkan sel pecah dan bakteri akan menyebar ke sekitarnya serta menimbulkan kerusakan mukosa usus. Sifat invasive dan pembelahan intrasel dari bakteri ini terletak dalam plasmid yang luas dari kromosom bakteri shigella (Jawetz *et al*, 2004).

2.1.7 Manifestasi Klinis

Shigellosis yang merupakan kumpulan gejala yang ditimbulkan oleh bakteri Shigella timbul dengan gejala nyeri abdomen, demam, buang air besar berdarah, dan feses berlendir. Keadaan yang lebih buruk dapat menunjukkan tanda-tanda dehidrasi, kejang, dan meningeal. Selain itu, pada bayi dan orang-orang yang malnutrisi, *Shigella* ini dapat menyebabkan terjadinya sepsis (Gillespie, 2006). Pada disentri shigellosis, pada permulaan sakit, bisa terdapat nyeri perut, demam, tinja encer. Tinja encer tersebut berhubungan dengan kerja eksotoksin dalam usus halus. Sehari atau beberapa hari kemudian, karena infeksi meliputi ileum dan colon, maka jumlah tinja meningkat, tinja kurang encer tetapi sering mengandung lender dan darah. Tiap gerakan usus disertai dengan 'mengedan' dan tenesmus (spasmus rectum), yang menyebabkan nyeri perut bagian bawah. Lamanya gejala rata-rata pada orang dewasa adalah 7 hari, pada kasus yang lebih parah menetap selama 3-4 minggu. Pada anak-anak dan dewasa kehilangan air dan elektrolit dapat menyebabkan dehidrasi, asidosis, dan bahkan kematian. Manifestasi ekstrakranial shigellosis dapat terjadi, termasuk gejala pernafasan, gejala neurologis seperi meningismus, dan Hemolytik Uremic Syndrome. Artritis oligoartikular asimetris dapat terjadi hingga 3 minggu sejak terjadinya disentri (Houghton Mifflin Company,2006).

Pada fase pemulihan, kebanyakan orang mengeluarkan basil disentri dalam waktu singkat, tetapi beberapa orang tetap menjadi karier usus kronik dan dapat mengalami rekurensi. Setelah sembuh dari infeksi, kebanyakan orang membentuk antibodi sirkulasi terhadap *Shigella*, tetapi antibodi ini tidak mencegah terjadinya reinfeksi (Brooks *et al*, 2004).

2.1.8 Diagnostik Laboratorium

2.1.8.1 Spesimen

Organisme ini pada umumnya ditemukan dalam jumlah yang banyak di mukosa usus atau pada feses. Pemeriksaan sebaiknya dilakukan pada feses segar atau dapat juga dilakukan hapusan rektum yang dapat digunakan untuk biakan. Pada feses yang dalam keadaan basa, *Shigella* dapat bertahan hidup beberapa hari, namun jika keaadaan feses asam maka *Shigella* hanya dapat bertahan beberapa jam saja. Oleh karena itu, feses sebaiknya disimpan dalam cairan *buffer* yaitu gliserol salin 30%. Untuk diagnosis pada area epidemik dapat ditegakkan jika *Shigella* ditemukan pada sumber air di daerah yang bersangkutan (Gillespie, 2006).

Bahan yang sudah didapatkan dapat dibiakkan di *deoxycholate citrate agar* (DCA), *Salmonella–Shigella* (SS) agar atau media *xylose–lysine–deoxycholate* (XLD). Koloni *Shigella* tampak kecil-kecil, pucat, atau merah muda pada DCA. Sedangkan pada XLD, koloni dapat berwarna merah muda atau merah tua namun di daerah tepinya berwarna merah muda atau kuning (Gillespie, 2006).

2.1.8.2 Metode Biakan

Bahan pemeriksaan diinokulasikan pada medium diferensial, yaitu media yang digunakan untuk menumbuhkan mikroba tertentu serta penentuan sifat-sifatnya, misalnya agar *Mac Conkey* , media EMB (*Eosine-Methylene Blue*) agar untuk *Coliform*, media agar darah untuk menumbuhkan bakteri hemolitik. Dapat juga pada medium selektif, media yang hanya dapat ditumbuhi oleh satu atau lebih mikroorganisme tertentu, tetapi akan menghambat atau mematikan jenis

lainnya, misalnya agar enterik *Hektoen*, media SS (*Salmonella-Shigella*) agar untuk *Salmonella* serta *Shigella* yang menekan *Enterobacteriaceae* lain dan organisme gram positif, media agar EMB untuk *Coliform* (Dzen dkk, 2003).

Koloni yang tidak berwarna (*lactose-negative fermenter*) selanjutnya diinokulasi ke medium agar TSI (*Triple Sugar Iron*) digunakan untuk membantu membedakan *Shigella* dan *Salmonella* dari bakteri enterik batang gram negative lain (Todar, 2008). Organisme yang menghasilkan asam tetapi tidak menghasilkan gas pada pangkal dan bagian miring yang basa di medium agar TSI, tidak menghasilkan H_2S, dan tidak motil sebaiknya dilakukan pemeriksaan aglutinasi *slide* dengan antiserum spesifik *Shigella* (Dzen dkk, 2003).

2.1.8.3 Metoda Serologi

Orang normal sering memiliki aglutinin terhadap beberapa spesies *Shigella*. Namun, serangkaian penentuan titer antibodi dapat menunjukkan peningkatan antibodi yang spesifik. Serologi tidak digunakan untuk mendiagnosis infeksi *Shigella* (Brooks *et al*, 2004).

2.2 Terapi Antimikroba

2.2.1 Spektrum Antimikroba

Agen antimikroba yang ideal memperlihatkan prinsip toksisitas selektif, yang berarti bahwa obat tersebut haruslah bersifat sangat toksik untuk mikroba, tetapi relatif tidak toksik untuk hospes. Prinsip toksisitas selektif adalah perbedaan antara struktur sel mikroba dengan sel hospes. Toksisitas selektif juga bersifat relatif, dapat berupa reseptor spesifik untuk perlekatan atau hambatan proses biokimia obat antimikroba terhadap mikroba tetapi tidak

terhadap hospes. Obat antimikroba mempunyai selektif toksisitas yang tinggi oleh karena sel manusia dengan sel bakteri (prokariot) berbeda dalam hal dinding sel, komponen membran sel, struktur ribosom, dan metabolismenya (Dzen dkk, 2003).

Secara umum, obat antimikroba yang ideal mempunyai sifat-sifat sebagai berikut (Dzen dkk, 2003):

1. Menghambat atau membunuh patogen tanpa merusak hospes;
2. Bersifat bakterisidal dan bukan bakteriostatik;
3. Tidak menyebabkan resistensi pada kuman;
4. Berspektrum luas;
5. Tidak bersifat alergenik atau tidak menimbulkan efek samping bila digunakan dalam jangka waktu yang lama;
6. Tetap aktif dalam plasma, cairan tubuh atau eksudat;
7. Larut di dalam air dan stabil;
8. Kadar bakterisidal dalam tubuh cepat dan bertahan untuk waktu lama.

2.2.2 Mekanisme Kerja Obat Antimikroba

Obat antimikroba mempunyai susunan kimiawi dan cara kerja yang berbeda antara obat satu dengan yang lainnya. Antimikroba mengganggu bagian-bagian mikroba yang peka yaitu dinding sel, protein, asam nukleat, dan metabolit intermedier.

2.2.2.1 Menghambat SIntesa Dinding Sel

Dinding sel bakteri berfungsi sebagai pelindung osmotik protoplasma di bawahnya dari trauma baik osmotik maupun mekanik. Tekanan osmotic yang tinggi di dalam sel akan mendorong cairan dari dalam sel bakteri sehingga terjadi

kebocoran dan kematian sel kuman. Hal ini menjadi dasar efek bakterisidal pada bakteri. Contoh antimikroba jenis ini adalah β-laktam (penisilin dan cephalosporin) (Cowman, 1999).

2.2.2.2 Menghambat Fungsi Membran Sel

Membran sel merupakan pembatas membran bagi bebasnya difusi antara lingkungan dalam dan luar sel. Gangguan dalam keutuhan membran sel tersebut dapat menyebabkan terjadinya kebocoran dan kematian sel, mempengaruhi konsentrasi metabolit dan bahan gizi dalam sel, menghambat proses pernafasan dan aktivitas biosinteti tertentu yang secara keseluruhan mempengaruhi kehidupan sel bakteri itu sendiri. Contohnya antimikroba jenis ini adalah polimksin yang berikatan dengan fosfat pada fosfolipid membran sel bakteri sehingga merusak struktur membran sel tersebut (Cowman, 1999).

2.2.2.3 Menghambat Sintesa Protein

Sintesa protein merupakan hasil dari 2 proses utama yaitu transkripsi dan translasi.Sintesa ini terjadi pada ribosom. Streptomisin dapat berikatan dengan ribosom 30S sehingga menyebabkan kode pada mRNA salah dibaca oleh tRNA dan terbentuk protein abnormal dan non fungsional bagi sel bakteri (Cowman, 1999).

2.2.2.4 Menghambat Sintesa Asam Nukleat

Sintesa asam nukleat erat kaitannya dengan proses duplikasi dan transkripsi. Setiap zat yang mengganggu sintesa ini akan mempengaruhi seluruh fase pertumbuhan dan metabolisme sel bakteri. Rifampisin dapat berkaitan

dengan enzim Polymerase-RNA sehingga menghambat sintesis RNA dan DNA oleh enzim tersebut (Cowman, 1999).

2.2.2.5 Menghambat Metabolisme Sel Bakteri

Enzim-enzim yang berperan dalam proses metabolisme seringkali dihambat oleh senyawa-senyawa yang mempunyai struktur mirip dengan substrat asalnya. Senyawa ini bergabung dengan enzim tersebut sehingga mencegah kombinasi substrat-enzim dan reaksi-reaksi katalitik. Sulfonamid berkompetisi dengan PABA *(Para-AminoBenzoic Acid)* untuk diikutsertakan dalam pembentukan asam folat sehingga terbentuk analog asam folat yang non fungsional. Akibatnya kelangsungan hidup bakteri terganggu (Cowman, 1999).

2.2.3 Mekanisme Resistensi Mikroba terhadap Obat

Ada beberapa mekanisme yang menyebabkan suatu populasi bakteri menjadi resisten terhadap obat antimikroba.

- Mikroba memproduksi enzim yang merusak obat

  Contoh : Stafilokokus memproduksi enzim β-laktamase yang memecah cincin β-laktam dari obat penisilin. Bakteri Gram negatif dapat menghasilkan enzim adenilase, asetilase, fosforilase yang merusak obat aminoglikosida, atau menghasilkan enzim asetiltransferase yang merusak kloramfenikol (Dzen dkk, 2003).

- Mikroba mengubah permeabilitas membran selnya

  Resistensi mikroba terhadap obat yang bekerja menghambat sintesis protein, karena golongan obat tersebut perlu menembus membran sel bakteri untuk mencapai titik tangkap kerjanya, yaitu ribosom (Dzen dkk, 2003).

- Mikroba mengubah struktur target obat terhadap mikroba

  Resistensi bakteri terhadap obat aminoglikosida, eritromisin oleh karena terjadi perubahan pada struktur ribosom (Dzen dkk, 2003).

- Mikroba mengembangkan jalan metabolisme baru

  Bakteri yang resisten terhadap sulfonamid mampu mengambil asam folat dari luar selnya (Dzen dkk, 2003).

- Mikroba mengembangkan enzim yang tetap berfungsi untuk metabolismenya, tetapi tidak dipengaruhi oleh obat

  Pada bakteri yang resisten trimetoprim, asam dihidrofolat reduktase dihambat kurang efisien daripada terhadap bakteri yang rentan trimetoprim (Brooks *et al*, 2004).

- Mikroba memperbesar produksi bahan metabolit

  Bakteri yang resisten terhadap sulfonamid mampu menghasilkan PABA dalam jumlah besar. Keadaan ini justru mengakibatkan bakteri-bakteri tergantung terhadap sulfonamid untuk kelangsungan hidupnya. Mekanisme ini disebut dengan '*drug dependence'* (Dzen dkk, 2003).

2.2.4 Mekanisme Resistensi *Shigella* terhadap Antibiotik

Plasmid tertentu yang terdapat di *Shigella* mengandung gen yang bersifat memutasi. Plasmid ini dapat mempengaruhi resisten pada kromosom bakteri. Resisten terhadap obat salah satunya dikarenakan adanya faktor resistensi (Faktor R). Faktor R bisa berpindah ke enteropatogen lain baik secara langsung atau tidak langsung melalui organisme enteric. Peralihan resistensi terhadap mikroba lain juga ditentukan oleh perantaranya yaitu plasmid yang bergerak, sehingga resisten dapat menyebar dengan lebih mudah (Sack *et al,*2001).

Antibiotik TMP (Trimetoprim) dan SMZ (Sulfametoksazol) telah resisten terhadap famili *Enterobacteriaceae*. TMP mengandung senyawa diaminopirimidin, yang bersifat menghambat DHFR (Dihidrofolat Reduktase). Enzim DHFR ini mengkatalisa reduksi dari dihidrofolat menjadi tetrahidrofolat, yang merupakan kofaktor untuk sintesis asam nukleat. Jika terjadi variasi pada DHFR ini maka afinitas pada TMP akan turun. Antibiotik SMZ bersifat menghambat enzim yang terlibat dalam metabolisme asam folat, yaitu DHPS (*dihydroopterate synthase*). Mekanisme resistensi SMZ pada gram negatif dikarenakan perubahan pada DHPS yang disertai dengan penurunan afinitas SMZ (Sack *et al,*2001).

Antibiotik lain yang resisten terhadap bakteri gram negatif, termasuk *Shigella* adalah tetrasiklin. Tetrasiklin mengikat subunit 30S pada ribosom bakteri, mencegah ikatan *aminoacyl-tRNA*, dan menghambat sintesis protein bakteri. Mekanisme resistensi pada *Shigella* ini berhubungan dengan plasmid R. Gen yang dibawah oleh transposon atau plasmid mengodekan protein transmembran untuk mengeluarkan antibiotik tersebut (Sack *et al,*2001).

Selain itu, agen antimikroba sendiri juga berperan dalam resistensi ini. Antimikroba yang kualitasnya buruk, dapat menyebabkan penurunan atau kurangnya keseimbangan biologis pada obat-obat generik. Hal ini dapat menyebabkan konsentrasi serum dalam obat tidak optimal (Sack *et al,*2001).

2.2.5 Uji Kepekaan terhadap Antimikroba *In Vitro*

Penentuan kepekaan bakteri patogen terhadap antimikroba dapat dilakukan dengan salah satu dari dua metode pokok yaitu dilusi atau difusi. Dengan penggunaan bakteri standar dan obat pembanding yang telah diketahui,

metode ini dapat dipergunakan untuk mengukur potensi antibiotik lain dalam sampel atau kepekaan mikroba (Brooks *et al*, 2004).

2.2.5.1 Metode Dilusi Tabung

Cara ini digunakan untuk menentukan kadar hambat minimum (KHM) dan kadar bunuh minimum (KBM) dari obat antimikroba. Prinsip metode ini adalah mengunakan satu seri tabung reaksi yang diisi media cair dan sejumlah tertentu mikroba yang diuji. Kemudian masing-masing tabung diisi dengan obat yang telah diencerkan secara serial. Selanjutnya, seri tabung diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam dan diamati terjadinya kekeruhan pada tabung. Konsentrasi terendah obat pada tabung yang ditunjukkan dengan hasil biakan yang mulai tampak jernih (tidak ada pertumbuhan mikroba) adalah KHM dari obat. Selanjutnya biakan dari semua tabung yang jernih diinokulasikan pada media agar padat, diinkubasikan dan keesokan harinya diamati ada tidaknya koloni yang tumbuh. Konsentrasi terendah obat pada biakan ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan koloni mikroba adalah KBM dari obat terhadap bakteri uji (Dzen *et al*, 2003).

2.2.5.2 Metode Difusi Cakram

Prinsip dari metode difusi cakram adalah sebagai berikut. Obat dijenuhkan ke dalam kertas saring (cakram kertas). Cakram kertas yang mengandung obat tertentu ditanam pada media perbenihan agar padat yang telah dicampur dengan mikroba yang diuji, kemudian diinkubasikan 37ºC selama 18-24 jam. Selanjutnya diamati adanya area (zona) jernih disekitar cakram kertas yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan mikroba (Dzen *et al*, 2003).

Untuk mengevaluasi hasil uji kepekaan tersebut (apakah isolate mikroba sensitif atau resisten terhadap obat), dapat dilakukan dua cara sebagai berikut ini (Dzen *et al,* 2003).

- Cara Kirby Bauer, yaitu dengan cara membandingkan diameter dari area jernih (zona hambat) disekitar cakram dengan tabel standart yang dibuat oleh NCCLS (National *Comitte for Clinical Laboratory Standart)*. Dengan table NCCLS ini dapat diketahui kriteria sensitif, sensitif intermediate dan resisten.
- Cara Joan-Stokes, yaitu dengan cara membandingkan radius zona hambatan yang terjadi antara bakteri kontrol yang sudah diketahui kepekaannya terhaddap obat tersebut dengan isolat bakteri yang diuji.

  Pada cara Joan-Stokes, prosedur uji kepekaan untuk bakteri kontrol dan bakteri uji dilakukan bersama-sama dalam satu piring agar

2.3 Tinjauan Umum Tanaman kayu manis

2.3.1 Taksonomi

Sistematika daun kayu manis menurut Rismunandar dan Paimin (2001), sebagai berikut:

Kingdom : Plantae
Divisi : Gymnospermae
Subdivisi : Spermatophyta
Kelas : Dicotyledonae
Sub kelas : Dialypetalae
Ordo : Policarpicae
Famili : Lauraceae

Genus : Cinnamomum

Spesies : *Cinnamomum burmannii*

2.3.2 Tanaman kayu manis

Kayu manis (*Cinnamomum burmanni)* merupakan tanaman yang berasal dari Indonesia dan Asia Tenggara . Tanaman ini dibudidayakan sebagai rempah–rempah, sebagasi hiasan dan sebagai pohon perindang (Wagner dan Herbst, 1995). Rismunandar dan paimin (2001) menjelaskan hanya empat jenis saja yang terkenal dalam dunia perdagangan ekspor maupun lokal, yaitu :*Cinnamomum burmanii, Cinnamomum zeylanicum, Cinnamomum cassia, Cinnamomum cullilawan* (Rismunandar dan paimin, 2001)

Cinnamomum burmanni ini berasal dari Indonesia. Tanaman akan tumbuh baik pada ketinggian 600–1500 mdpl. Tanaman ini banyak dijumpai di Sumatera Barat, Sumatera Utara, Jambi, Bengkulu dengan tinggi tanaman dapat mencapai 15 m. Tanaman mencapai tinggi 5–6 m dan bercabang lateral. Pemanenan dapat dilakukan umur tiga tahun, kulitnya berwarna abu–abu. Selain kulit, daun dan akarnya pun mengandung minyak atsiri sedangkan *Cinnamomum cassia* merupakan tanaman asli dari Birma dan diperbanyak di Cina selatan. Dalam dunia perdagangan tanaman ini dikenal *Chinese cinnamom*. Warna pucuknya bervariasi dari hijau muda sampai hijau kemerahan, tajuknya berbentuk piramida dan *Cinnamomum cullilawan* hanya dikenal di daerah Ambon dan pulau Seram (Maluku) dengan nama selakat atau selakar. Kayunya termasuk kayu lunak dan berwarna putih sehingga kayunya tidak dapat dimanfaatkan sebagai kayu bangunan Rismunandar dan paimin (2001).

Gambar 2.2 Pohon Kayu manis (National Tropical Batanical Garden, 2011)

2.3.3 Morfologi

Batang kayu manis bercabang-cabang dan kulitnya berwarna kelabu, dijual dalam bentuk kering, setelah dibersihkan kulit bagian luar, kemudian dijemur dan digolongkan menurut panjang asal kulit (dari dahan atau ranting) (Haris, 2005).

Gambar 2.3 Kulit Batang kayu manis (National Tropical Batanical Garden, 2011)

Daun kayu manis duduknya bersilang atau dalam rangkaian spiral. Panjangnya sekitar 9–12 cm dan lebar 3,4–5,4 cm, tergantung jenisnya. Warna pucuknya kemerahan, sedangkan daun tuanya hijau tua. Daunnya merupakan

daun tunggal (kadang-kadang bertulang melengkung) yang duduknya tersebar, kadang-kadang berhadapan, tidak mempunyai penumpu. Daun berpenulangan 3 ; panjang tangkai daun 0.5 cm sampai 1.5 cm. Daunnya berbentuk bulat telur atau elips memanjang dengan ujung membulat atau tumpul meruncing. Bakal buah menumpang atau terdapat dalam lekukan dasar bunganya. Dimana mempunyai 1 bakal biji yang anatrop dengan 2 in-tegumen. Bakal buah menyerupai buah batu. Bijinya tidak memiliki endosperm, dimana lembaga memiliki daun lembaga yang besar didalamnya Rismunandar dan paimin (2001).

Gambar 2.4 Daun kayu manis (National Tropical Batanical Garden, 2011)

Bunganya berkelamin dua atau bunga sempurna dengan warna kuning, ukurannya kecil. Buahnya adalah buah buni, berbiji satu dan berdaging. Bentuknya bulat memanjang, buah muda berwarna hijau tua dan buah tua berwarna ungu tua (Rismunandar dan Paimin, 2001). Bunga berada ditangkai yang yang panjang, lemah, dan kuncupnya lembut, bercabang dan duduk di ketiak dengan cabang yang berambut abu-abu. Merupakan bunga malai. Bunganya berkelamin tunggal dan taju tenda bunga biasanya 2-5 dan panjang 3-5 mm, berwarna putih kekuningan dimana dilihat dari luar terlihat berambut abu-

abu keperak-perakan, Sedikit membuka tetapi tidak rontok dan dalam waktu yang sangat cukup setelah mekar akan sobek melintang. Biasanya tertanam pada tepi sumbu bunga. Bunga ini memiliki 4 ruang sari. Bunga *Cinnamomum burmannii* ini memiliki 12 benang sari dalam 3-4 lingkaran, biasanya tersusun dalam 4 lingkaran terdalam yang steril. Benangsari lingkaran ketiga mempunyai kelenjar di tengah-tengah tangkai sari. Buah adalah buah buni, panjang lebih kurang 1 cm. Didalam lingkaran tersebut terdiri atas sejumlah benang sari yang sama dengan jumlah daun-daun tenda bunga dalam lingkarannya, yang pada lingkaran dalam sering bersifat mandul sebagai staminodium dimana kepala sari membuka dengan katup Rismunandar dan paimin (2001).

Gambar 2.5 Bunga dan Daun kayu manis (National Tropical Batanical Garden, 2011)

2.3.4 Kandungan daun kayu manis

Beberapa bahan kimia yang terkandung di dalam daun kayu manis diantaranya minyak atsiri eugenol, flavonoid, saponin, safrole, sinamaldehide, tannin, kalsium oksalat, damar dan zat penyamak (Hariana, 2007).

2.3.4.1 Flavonoid

Flavonoid adalah suatu kelompok senyawa fenol yang terbanyak terdapat di alam. Senyawa-senyawa ini bertanggung jawab terhadap zat warna merah, ungu, biru, dan sebagian zat warna kuning dalam tumbuhan. Semua *flavonoid* menurut strukturnya merupakan turunan senyawa induk “flavon“ yakni nama sejenis *flavonoid* yang terbesar jumlahnya dan juga lazim ditemukan, yang terdapat berupa tepung putih pada tumbuhan (Champbell, 2002).

Aktivitas *flavonoid* kemungkinan disebabkan oleh kemampuannya untuk mengikat adesin, membentuk kompleks dengan protein ekstraseluler terlarut, dan membentuk kompleks dengan dinding sel bakteri, serta sifat lipofilik *flavonoid* yang mungkin dapat merusak membran mikroba (Cowan, 1999). *Flavonoid* terutama berupa senyawa yang larut dalam air, tetapi dapat diekstraksi dengan etanol (Champbell, 2002).

Istilah *flavonoid* diberikan untuk senyawa-senyawa fenol yang berasal dari kata flavon, yaitu nama dari salah satu *flavonoid* yang terbesar jumlahnya dalam tumbuhan. Senyawa-senyawa flavon ini mempuntai kerangka 2-fenilkroman, dimana posisi orto dari cincin A dan atom karbon yang terikat pada cincin B dari 1.3-diarilpropana dihubungkan oleh jembatan oksigen sehingga membentuk cincin heterosiklik yang baru (cincin C). Senyawa-senyawa *flavonoid* terdiri dari beberapa jenis tergantung pada tingkat oksidasi dari rantai propana dari sistem 1,3-diarilpropana. Flavon, flavonol dan antosianidin adalah jenis yang banyak ditemukan di alam sering sekali disebut sebagai flavonoida utama. Banyaknya senyawa flavonoida ini disebabkan oleh berbagai tingkat alkoksilasi atau glikosilasi dari struktur tersebut (Champbell, 2002).

Sebagian besar *flavonoid* yang terdapat pada tumbuhan terikat pada molekul gula sebagai glikosida, dan dalam bentuk campuran, jarang sekali dijumpai berupa senyawa tunggal. Aktifitas biologis senyawa *flavonoid* terhadap bakteri dilakukan dengan merusak dinding sel dari bakteri yang terdiri atas lipid dan asam amino akan bereaksi dengan gugus alkohol pada senyawa *flavonoid* sehingga dinding sel akan rusak dan senyawa tersebut dapat masuk ke dalam inti sel bakteri. Selanjutnya dengan inti sel bakteri juga senyawa ini akan kontak dengan DNA pada inti sel bakteri dan melalui perbedaan kepolaran antara lipid penyusun DNA dengan gugus alkohol pada senyawa *flavonoid* akan dapat terjadi reaksi sehingga akan merusak struktur lipid dari DNA bakteri sehingga inti sel bakteri juga akan lisis dan bakteri juga akan mengalami lisis dan mati. Mekanisme aktivitas biologis oleh senyawa *flavonoid* ini berbeda dengan yang dilakukan oleh senyawa *alkaloid*, dimana senyawa *flavonoid* dalam merusak sel bakteri memanfaatkan perbedaan kepolaran antara *lipid* penyusun sel bakteri dengan gugus alkohol pada senyawa *flavonoid* (Gunawan, 2009).

2.3.4.2 Saponin

Saponin termasuk fitokimia yang memiliki spektrum aktivitas sebagai antijamur dan antimikroba. Hal ini didasarkan pada kemampuannya membentuk kompleks dengan protein dan dinding sel sehingga terjadi denaturasi protein dan rusaknya dinding sel yang berakibat sel menjadi lisis. *Saponin* diperkirakan berikatan dengan sterol pada membran sel bakteri sehingga terbentuk pori yang mengakibatkan hilangnya integritas membran, sehingga mempengaruhi permeabilitas membran sitoplasma. *Saponin* larut dalam air dan alkohol rendah seperti etanol dan metanol, tetapi tidak larut dalam eter (Dorland, 2002).

2.3.4.3 Tannin

Senyawa tanin adalah senyawa fenolik kompleks yang memiliki berat molekul 500-3000. Tanin disusun oleh senyawa polifenol alami yang merupakan metabolit sekunder tanaman tertentu. Polifenol memiliki spektrum luas dengan sifat kelarutan pada suatu pelarut yang berbeda-beda. Hal ini disebabkan oleh gugus hidroksil pada senyawa tersebut yang dimiliki berbeda jumlah dan posisinya. Karena tanin merupakan persenyawaan polifenol yang mengandung gugus hidroksil maka mekanisme yang sama dengan mekanisme oleh senyawa *flavonoid* yakni dalam merusak sel bakteri memanfaatkan perbedaan kepolaran antara lipid penyusun sel bakteri dengan gugus alkohol pada rantai polifenol dari senyawa tanin. Walaupun struktur kimia dari *flavonoid* dan tanin tidaklah sama namun karena keduanya sama-sama memiliki persenyawaan fenol yang memiliki gugus hidroksil di dalamnya maka mekanisme dalam menginaktifkan bakteri juga dilakukan dengan memanfaatkan perbedaan polaritas antara lipid dengan gugus hidroksil. Apabila sel bakteri semakin banyak mengandung lipid maka akan semakin banyak diperlukan senyawa tanin untuk membuat bakteri tersebut lisis (Champbell, 2002).

2.3.4.4 Eugenol

Eugenol merupakan cairan tidak berwarna atau berwarna kuning-pucat, dapat larut dalam alkohol, eter dan kloroform. Rumus molekul eugenol adalah $C_{10}H_{12}0_2$. Eugenol termasuk senyawa fenol, akan bereaksi dengan alkali hidroksida membentuk senyawa fenolat yang meningkat kelarutannya dalam air.

Data sifat fisika dari eugenol adalah sebagai berikut:

- Berat jenis : 1,0651

- Indeks bias : 1,5410 (20°C)
- Titik didih : 253°C
- Titik nyala : 110°C

Efek eugenol sebagai anti mikroba karena dapat merusak langsung membran sel bakteri (Aisyah, 2011).

2.3.4.5 Minyak Atsiri

Minyak atsiri juga dikenal dengan nama minyak mudah menguap atau minyak terbang. Pengertian atau defenisi minyak atsiri yang ditulis dalam *Encyclopedia of Chemical Technology* menyebutkan bahwa minyak atsiri merupakan senyawa, yang pada umumnya berwujud cairan, yang diperoleh dari bagian tanaman, akar, kulit, batang, daun, buah, biji maupun dari bunga dengan cara penyulingan dengan uap (Sastrohamidjojo, 2004).

Minyak atsiri merupakan zat yang berbau yang terkandung dalam tanaman. Minyak ini disebut juga minyak menguap, minyak eteris, atau minyak essensial karena pada suhu biasa (suhu kamar) mudah menguap di udara terbuka. Istilah essensial dipakai karena minyak atsiri mewakili bau dari tanaman asalnya. Dalam keadaan segar dan murni tanpa pencemaran, minyak atsiri umumnya tidak berwarna. Namun, pada penyimpanan lama minyak atsiri dapat teroksidasi dan membentuk resin serta warnanya berubah menjadi lebih tua (gelap). Untuk mencegah supaya tidak berubah warna, minyak atsiri harus terlindung dari pengaruh cahaya, misalnya disimpan dalam bejana gelas yang berwarna gelap. Bejana tersebut juga diisi sepenuh mungkin sehingga tidak memungkinkan berhubungan langsung dengan oksigen udara, ditutup rapat serta disimpan ditempat yang kering dan sejuk (Gunawan dan Mulyani, 2004).

2.3.5 Khasiat daun kayu manis

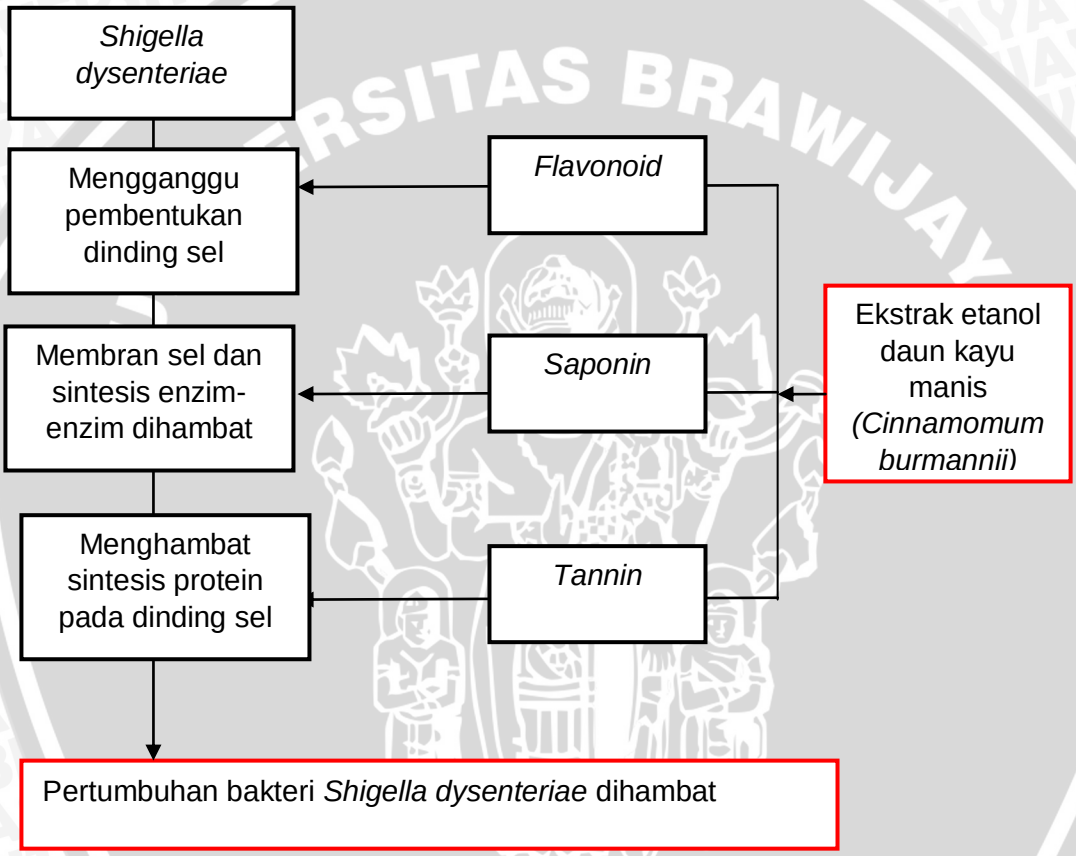
Kandungan dari daun kayu manis mempunyai daya bunuh terhadap mikroorganisme (*antiseptis*), membangkitkan selera atau menguatkan lambung (*stomakik*) juga memiliki efek untuk mengeluarkan angin (*karminatif*). Selain itu minyaknya dapat digunakan dalam industri sebagai obat kumur dan pasta, penyegar bau sabun, deterjen, lotion parfum dan cream. Dalam pengolahan bahan makanan dan minuman minyak daun kayu manis di gunakan sebagai pewangi atau peningkat cita rasa, diantaranya untuk minuman keras, minuman ringan (*softdrink*), agar–agar, kue, kembang gula, bumbu gulai dan sup (Rismunandar dan Paimin, 2001).

Efek farmakologis yang dimiliki daun kayu manis diantara sebagai peluruh kentut (*carminative*), peluruh keringat (*diaphoretic*), antirematik, penambah nafsu makan (*stomachica*) dan penghilang rasa sakit (*analgesic*) (Hariana, 2007).

BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan :

= diteliti

= tidak diteliti

Kandungan dari daun kayu manis diperkirakan berperan sebagai antimikroba terutama adalah *flavonoid, saponin*, dan *tannin.* Aktivitas *flavonoid* kemungkinan disebabkan oleh kemampuannya untuk mengikat adesin, membentuk kompleks dengan protein ekstraseluler terlarut, dan membentuk kompleks dengan dinding sel bakteri, serta sifat lipofilik *flavonoid* yang mungkin dapat merusak membran mikroba (Cowan, 1999). Aktifitas biologis senyawa *flavonoid* terhadap bakteri dilakukan dengan merusak dinding sel dari bakteri yang terdiri atas lipid dan asam amino akan bereaksi dengan gugus alkohol pada senyawa *flavonoid* sehingga dinding sel akan rusak dan senyawa tersebut dapat masuk ke dalam inti sel bakteri. Selanjutnya dengan inti sel bakteri juga senyawa ini akan kontak dengan DNA pada inti sel bakteri dan melalui perbedaan kepolaran antara lipid penyusun DNA dengan gugus alkohol pada senyawa *flavonoid* akan dapat terjadi reaksi sehingga akan merusak struktur lipid dari DNA bakteri sehingga inti sel bakteri juga akan lisis dan bakteri juga akan mengalami lisis dan mati (Champbell, 2002).

Saponin termasuk dalam fitokimia yang memiliki spektrum aktivitas sebagai antijamur dan antimikroba. Hal ini didasarkan pada kemampuannya untuk membentuk kompleks dengan protein dan dinding sel sehingga terjadi denaturasi protein dan rusaknya dinding sel yang berakibat sel menjadi lisis (Davidson, 2005).

Tanin merupakan persenyawaan polifenol yang mengandung gugus hidroksil maka mekanisme yang sama dengan mekanisme oleh senyawa *flavonoid* yakni dalam merusak sel bakteri memanfaatkan perbedaan kepolaran antara lipid penyusun sel bakteri dengan gugus alkohol pada rantai polifenol dari senyawa tanin. Walaupun struktur kimia dari *flavonoid* dan tanin tidaklah sama

namun karena keduanya sama-sama memiliki persenyawaan fenol yang memiliki gugus hidroksil di dalamnya maka mekanisme dalam menginaktifkan bakteri juga dilakukan dengan memanfaatkan perbedaan polaritas antara lipid dengan gugus hidroksil. Apabila sel bakteri semakin banyak mengandung lipid maka akan semakin banyak diperlukan senyawa tanin untuk membuat bakteri tersebut lisis (Champbell, 2002).

3.2 Hipotesis Penelitian

Ekstrak etanol daun kayu manis *(Cinnamomum burmannii)* memiliki efek antimikroba terhadap *Shigella dysenteriae* secara *in vitro*.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental dengan menggunakan metode dilusi tabung untuk mengetahui konsentrasi ekstrak daun kayu manis sebagai antimikroba terhadap *Shigella dysenteriae* secara *in vitro*. Tujuan dari penggunaan metode dilusi tabung adalah mengetahui KHM (Kadar Hambat Minimum) dan KBM (Kadar Bunuh Minimum). Metode ini terdiri dari 2 tahap yaitu, tahap pengujian kemampuan ekstrak terhadap isolat *Shigella dysenteriae* dengan menggunakan medium *broth* untuk menentukan KHM dan tahap penggoresan pada media NAP *(Nutrient Agar Plate)* untuk mengetahui KBM. Penentuan KHM dapat juga dilakukan dengan menggunakan difusi cakram, jika keadaan ekstrak yang digunakan terlalu keruh.

4.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun kayu manis dan menggunakan bakteri uji *Shigella dysenteriae* yang dimiliki oleh Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada tahun 2012.

4.4 Variabel Penelitian

Variabel penelitian terdiri atas variabel bebas dan variabel tergantung.

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak etanol daun kayu manis yang dibuat dengan konsentrasi kadar ekstrak antara lain : 0,78%; 1,56%; 3,125%; 6,25%; 12,5%; 25% berdasarkan eksplorasi awal atau penelitian pendahuluan.

4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah kekeruhan pada larutan dalam tabung, diameter zona hambatan pada metode difusi cakram untuk menentukan KHM dan jumlah koloni *Shigella dysenteriae* pada media agar padat (NAP) untuk menentukan KBM.

4.5 Definisi Operasional

- Ekstrak daun kayu manis adalah daun kayu manis yang diperoleh dari pak arya salah satu penjual daun kayu manis. Kemudian daun kayu manis dijadikan ekstrak cair dengan konsentrasi akhir 1000 mg/ml. Ekstrak yang digunakan adalah ekstrak cair yang diperoleh melalui ekstraksi menggunakan etanol 96 %.
- Bakteri *Shigella dysenteriae* adalah isolat yang berasal dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

- Kadar Hambat Minimal (KHM) adalah kadar atau konsentrasi terendah larutan ekstrak etanol daun kayu manis yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri uji (*Shigella dysenteriae),* ditandai dengan tidak terdapatnya kekeruhan pada larutan ekstrak etanol daun kayu manis dan suspensi bakteri *Shigella dysenteriae* dalam tabung.
- Kadar Bunuh Minimal (KBM) adalah kadar atau konsentrasi terendah larutan ekstrak etanol daun kayu manis yang mampu membunuh bakteri uji (*Shigella dysenteriae)*, ditandai dengan jumlah koloni ≤ 0,1 % OI (*Original Inoculum*) pada medium NAP, yang sebelumnya telah dilakukan penggoresan sebanyak satu ose larutan ekstrak etanol daun kayu manis yang telah diberi bakteri *Shigella dysenteriae*.
- Jumlah koloni adalah jumlah koloni *Shigella dysenteriae* yang tumbuh pada media NAP setelah dilakukan inkubasi pada suhu ± 37°C selama 18-24jam.
- *Original Inoculum* (OI) adalah inokulum bakteri *Shigella dysenteriae* dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml yang diinokulasikan pada media NAP dan digunakan untuk mencari kategori KBM.
- Kontrol kuman adalah kuman tanpa larutan ekstrak etanol daun kayu manis (konsentrasi ekstrak 0 mg/ml) yang dapat digunakan untuk mengetahui apakah kuman yang digunakan terkontaminasi dengan kuman lain.
- Kontrol bahan adalah bahan berupa larutan ekstrak etanol daun kayu manis untuk mengetahui apakah bahan yang digunakan steril atau tidak.

4.6 Alat dan Bahan

4.6.1 Alat untuk Pembuatan Ekstrak etanol daun kayu manis

- Oven
- Timbangan
- Gelas Erlenmeyer
- Kertas saring
- Pendingin spiral/*rotator evaporator*
- Corong gelas
- Labu penampang *etanol*
- Labu evaporator
- Selang water pump
- Water pump
- Water bath
- Vacum pump

4.6.2 Bahan untuk Pembuatan Ekstrak etanol daun kayu manis

- Daun kayu manis
- Etanol 96 %
- Aquades

4.6.3 Alat untuk Identifikasi Bakteri

- Ose
- Pipet
- Kertas penghisap, minyak imersi
- Mikroskop

- Tabung reaksi
- Lampu spiritus

4.6.4 Bahan untuk Identifikasi Bakteri

- Isolat *Shigella dysenteriae* pewarna gram (kristal violet, lugol, alkohol 96 %, safranin)
- *Nutrient Broth*
- Medium agar *Mac Conkey*
- Kit untuk identifikasi biokimia dengan sistem *microbact*

4.6.5 Alat untuk Tes Kepekaan Bakteri

4.6.5.1 Alat untuk Dilusi Tabung

- Tabung reaksi steril
- Rak tabung
- Ose dengan ukuran 1 µl
- Mikropipet 1 ml
- *Blue tip*
- Lampu spiritus
- Label
- *Vortex*
- Spektrofotometer
- Korek api
- Kapas
- Inkubator
- *Colony counter*

4.6.5.2 Alat untuk Difusi Cakram

- Mikropipet 1 ml
- *Blue tip*
- *Yellow tip*
- Cakram kosong steril
- *Eppendorf*
- Lampu Spiritus
- Label
- *Vortex*
- Spektrofotometer
- Korek api
- Kapas
- Inkubator

4.6.6 Bahan untuk Tes Kepekaan Bakteri

- Perbenihan cair bakteri *Shigella dysenteriae*
- NaCl
- Ekstrak etanol daun kayu manis
- Medium *Nutrient Broth*
- Medium NAP
- Aquades steril

4.7 Prosedur penelitian

4.7.1 Pembuatan Ekstrak etanol daun kayu manis

1) Daun kayu dikeringkan kemudian dihaluskan dengan blender dan timbang sebanyak 100 gram (sample kering). Ini bertujuan agar senyawa aktif yang terkandung dalam daun kayu manis dapat larut dalam *etanol 96%.*
2) Masukkan 100 gram hasil blenderan ke dalam gelas erlenmeyer ukuran 1 liter lalu rendam dengan hasil *etanol 96%* sampai volume 1000cc.
3) Kocok sampai benar-benar tercampur kurang lebih 30 menit dan diamkan 1 malam sampai mengendap.
4) Setelah itu, lapisan paling atas dari larutan campuran *etanol 96%* dan daun kayu manis diambil dan diletakkan dalam gelas ekstraksi kemudian di evaporasi dengan menggunakan *rotary evaporator.*
5) Pasang evaporator pada tiang permanen agar dapat tergantung dengan kemiringan 30-40^{o} terhadap meja percobaan, dengan susunan dari bawah ke atas : Alat pemanas air, labu penampung hasil, *rotatory evaporator*, dan tabung pendingin.
6) Tabung pendingin dihubungkan engan alat pompa sirkulasi air dingin dengan bak penampung air dingin melalui pipa plastik, tabung pendingin juga terhubung dengan pompa vakum dan penampung hasil penguapan.
7) Labu penampung hasil evaporasi diisi dengan hasil ekstraksi, kemudian dirangkai kembali.
8) *Rotatory evapotaror,* alat pompa sirkulasi air dingin dan alat pompa vakum dinyalakan.
9) Pemanas aquades dinyalakan juga sehingga hasil ekstraksi dalam tabung penampung evaporasi ikut mendidih dan pelarut *etanol* mulai menguap.

10) Hasil penguapan *etanol* akan dikondensasikan menuju labu penampung *etanol* sehingga tercampur dengan hasil evaporasi, sedangkan uap lain tersedot pompa vakum.

11) Setelah kental maka prose evaporasi dihentikan dan hasil evaporasi diambil.

12) Setelah evaporasi selesai, ekstrak dioven kembali dengan suhu 80^{o}C selama 2 jam karena titik didih *etanol* adalah 80^{o}C. Hal ini bertujuan untuk menghilangkan sisa-sisa *etanol 96%* yang mungkin masih tersisa dalam ekstrak.

4.7.2 Identifikasi *Shigella dysenteriae*

4.7.2.1 Pewarnaan Gram

Pewarnaan gram bertujuan untuk menyaring bakteri *Shigella dysenteriae* yang termasuk di dalam famili *Enterobacteriaceae* yang bersifat gram negatif.

Prosedur pewarnaan:

- Gelas obyek dibersihkan dengan kapas steril, kemudian dilewatkan di atas api untuk menghilangkan lemak. Lalu dibiarkan dingin.
- Satu tetes aquades steril atau larutan salin steril diteteskan pada gelas obyek.
- Dengan ose jarum yang steril, diambil sedikit koloni *Shigella dysenteriae* yang tumbuh pada medium padat kemudian disuspensikan dengan satu tetes aquades steril atau larutan salin steril yang sudah diteteskan terlebih dahulu pada gelas obyek. Hapusan sebaiknya dibuat tipis.

- Hapusan dibiarkan kering di udara. Setelah kering, hapusan difiksasi dengan cara melewatkan sediaan diatas api sebanyak tiga kali. Sediaan siap diwarnai.
- Sediaan dituangi kristal violet selama 1 menit, kemudian sisa kristal violet dibuang, lalu sediaan dibilas dengan air.
- Sediaan dituangi lugol selama 1 menit, kemudian sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air.
- Sediaan dituangi alkohol 96 % selama 5 - 10 detik atau sampai warna cat luntur, kemudian sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air.
- Sediaan dituangi safranin selama 30 detik, kemudian sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air.
- Dikeringkan dengan kertas penghisap.
- Dilihat di bawah mikroskop dengan perbesaran lensa obyektif 100 kali, ditambahkan juga minyak imersi.
- Hasil positif: bakteri *Shigella dysenteriae* berbentuk batang dan tercat merah (Gram negatif).

4.7.2.2 Agar *Mac Conkey*

Agar *Mac Conkey* merupakan medium diferensial untuk bakteri yang meragikan dan tidak meragikan laktosa.

Prosedurnya:

- Dilakukan inokulasi bakteri *Shigella dysenteriae* dengan metode penggoresan pada medium *Mac Conkey* agar.
- Diinkubasi pada inkubator dengan suhu ± 37°C selama 18 - 24 jam dan diamati hasilnya.

- Pengamatan mikroskopis dikatakan hasil positif jika pada pengamatan pada media agar, ditemukan morfologi koloni bakteri *Shigella dysenteriae* yang berbentuk konveks, bulat, transparan dengan tepi yang utuh dan mencapai diameter sekitar 2 mm dalam 24 jam, serta khas pada medium didapatkan koloni tidak berwarna (*non lactose fermenter*).

4.7.2.3 Sistem *Microbact*

Sistem *microbact* biasanya digunakan untuk mengidentifikasi *Enterobacteriaceae* dan bakteri batang gram-negatif lainnya. *Microbact* memiliki 2 *strip* yang diberi label 12A dan 12B. Dimana *strip* 12A digunakan untuk mengidentifikasi oksidase-negatif, nitrat-positif glukosa fermenter. *Strip* ini mengandung data untuk 14 genus dan 34 spesies dari *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., atau *Serratia* spp.. Sedangkan strip 12B digunakan untuk mengidentifikasi oksidase-positif, nitrat-negatif glukosa non fermenter. *Shigella* merupakan salah satu anggota dari famili *Enterobacteriaceae,* jadi pada penelitian ini digunakan *strip* 12A.

Langkah-langkah yang dilakukan untuk tes biokimiawi ini dengan menggunakan sistem *microbact* yaitu:

- Hal pertama yang dilakukan adalah tes oksidase. Jika tes oksidase negatif maka organisme tersebut tidak bisa diidentifikasi hanya menggunakan *microbact strip* 12A (12E) , tapi harus diidentifikasi menggunakan *microbact strip* 24E (12A (12E) + 12B).
- Selanjutnya adalah tes biokimiawi dengan *microbact* strip 12A. Bakteri 1 ose diambil dari *Mac Conkey* dan dicampurkan dengan NaCl 0,9 % kemudian divorteks. Turbiditas yang digunakan adalah 10^8 CFU/ml.

- Dari suspensi bakteri yang telah dibuat diteteskan 10µl ke dalam tiap sumuran yang telah mengandung substrat tertentu.
- Sumuran tersebut diinkubasi dalam suhu ± 37°C selama 18-24 jam, kemudian dilakukan pembacaan dengan menggunakan program tertentu di komputer. Hasil yang didapatkan dapat di lihat pada gambar 5.3.

4.7.3 Pembuatan Suspensi *Shigella dysenteriae*

Cara membuat larutan *Shigella dysenteriae* dengan kepadatan akhir 10^6 CFU/ml yaitu:

- Koloni diambil dari lempeng agar *Mac Conkey,* kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril yang berisi *Nutrient Broth* 9 ml.
- Tabung reaksi lalu diinkubasi dalam inkubator pada suhu ± 37ºC selama 18 - 24 jam.
- Setelah itu dilakukan spektrofotometri pada tabung reaksi di atas dengan panjang gelombang 625 nm untuk mengetahui OD (Optical Density) dari suspensi tersebut.
- Untuk mendapatkan konsentrasi bakteri sebesar 10^8 CFU/ml (sesuai standar McFarland 0,5) yang setara dengan OD=0,1, maka dilakukan perhitungan sebagai berikut :

$$\mathbf{N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2}$$

Keterangan :

N_1 = Hasil spektrofotometri

V_1 = Volume bakteri yang akan ditambah pengencer

N_2 = OD = 0,1 setara dengan 10^8 CFU/ml

V_2 = Volume suspensi bakteri uji (10 ml)

Dari hasil perhitungan tersebut diperoleh volume bakteri (x ml) yang akan ditambah pengencer sampai total volume 10 ml untuk mendapatkan konsentrasi 10^8 CFU/ml.

- Dilakukan pengenceran suspensi bakteri dengan konsentrasi 10^8 CFU/ml sebanyak 100 kali untuk mendapatkan konsentrasi bakteri 10^6 CFU/ml, caranya:

  Dari 10 ml bakteri dengan konsentrasi 10^8 CFU/ml diambil 1 ml larutan kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang telah diisi 9 ml *Nutrient broth* sehingga konsentrasi bakteri menjadi 10^7 CFU/ml. Lalu dari larutan dengan konsentrasi bakteri 10^7 CFU/ml tersebut diambil 1 ml larutan kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang telah diisi 9 ml *Nutrient broth* sehingga konsentrasi bakteri menjadi 10^6 CFU/ml (Dzen dkk, 2003).

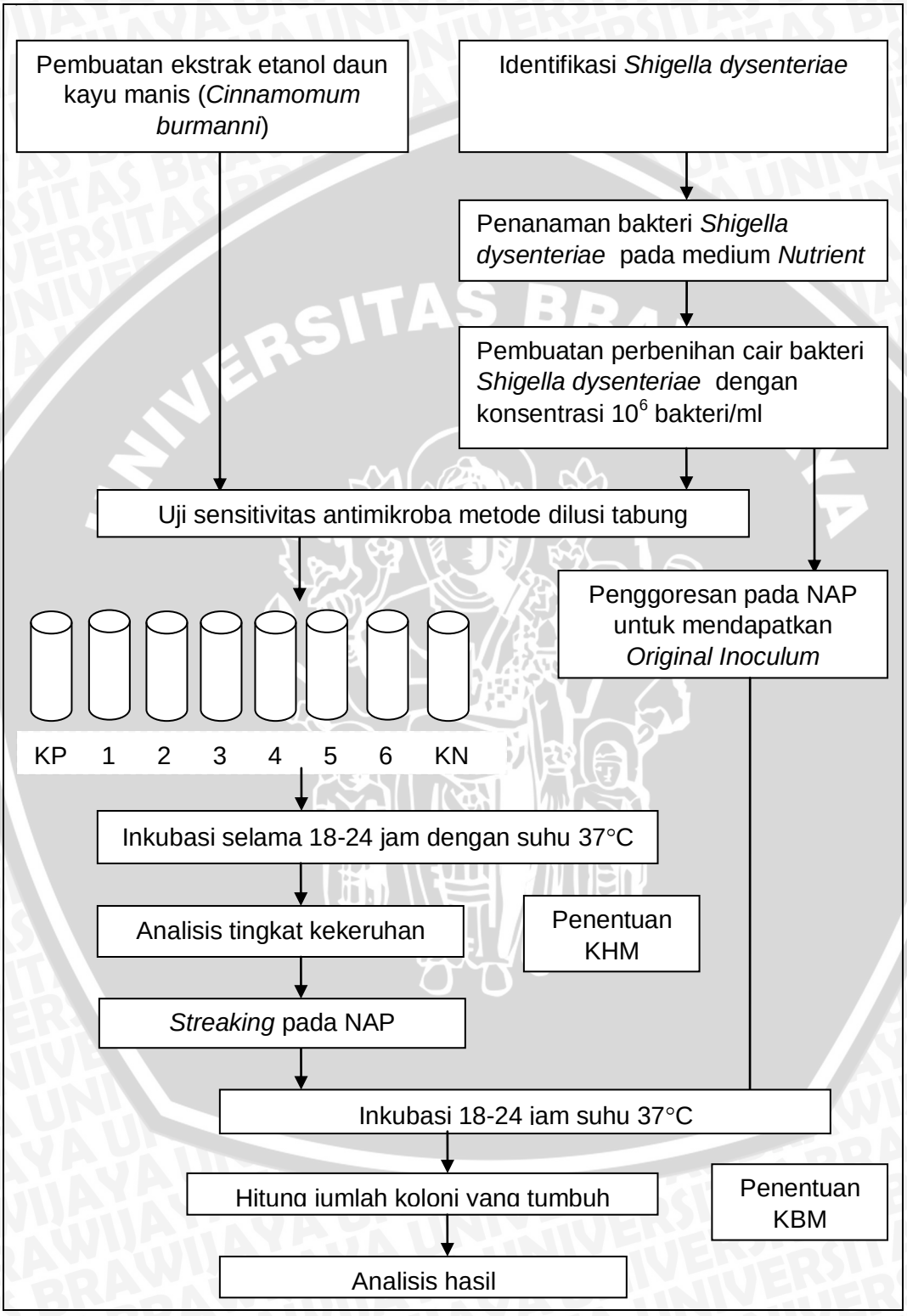
4.7.4 Uji Sensitivitas Antimikroba

1) Ekstrak etanol daun kayu manis disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit agar larutan ekstrak menjadi homogen dan tidak mengendap. Untuk perlakuan yang diambil adalah larutannya.
2) Sediakan 8 tabung reaksi steril kemudian diberi label 0% , 0,78%; 1,56%; 3,125%; 6,25%; 12,5%; 25% dan KB (kontrol bahan). Kontrol bahan adalah ekstrak. Konsentrasi ekstrak 0% adalah biakan bakteri *Shigella dysenteriae* dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml.
3) Tabung reaksi 1 diisi dengan 2 ml suspense bakteri.
4) Tabung 2, 3, 4, 5, 6, dan 7 diisi dengan aquades steril sebanyak 0,992 ml; 0,984 ml; 0,969 ml; 0,937 ml; 0,875 ml; 0,750 ml kemudian diisikan

dengan ekstrak etanol daun kayu manis sebanyak 0,008 ml; 0,016 ml; 0,031 ml; 0,063 ml; 0,125 ml; 0,250 ml.

5) Selanjutnya ditambahkan suspense bakteri sebanyak 1 ml pada tabung 2-7 sedangkan pada tabung 8 sebagai control bahan ditambahkan 2 ml ekstrak etanol daun kayu manis.
6) Dari tabung reaksi 1 diambil larutan sebanyak 1 *ose* kemudian dilakukan penggoresan pada NAP untuk membuat *original inoculum*.
7) Tabung 1-8 diinkubasi selama 18-24 jam dengan suhu 37-37,5°C.
8) Hari ke-2 semua tabung dikeluarkan dari incubator. Tabung no. 2-7 dibandingkan kekeruhannya dengan tabung no. 1 untuk menentukan KHM lalu dari tabung no. 1-8 diambil larutan sebanyak 1 *ose* kemudian dilakukan penggoresan pada 8 NAP.
9) Untuk mengetahui KBM dilakukan penggoresan tabung hasil inkubasi hari k-2 pada NAP kemudian diinkubasi selama 18-24 jam dengan suhu 37-37,5°C.
10) Jumlah koloni pada masing-masing NAP dihitung dengan *colony counter.* Konsentrasi terendah dengan jumlah koloni kurang dari 0,1% *original inokulum* adalah KBM.

4.7.5 Alur kerja penelitian



Gambar 4.1 Alur Kerja Penelitian

4.8 Analisis Data

Dari data penelitian yang diperoleh dapat dibuat analisis statistiknya. Data penelitiannya adalah jumlah koloni *Shigella dysenteriae* dan analisis data yang digunakan adalah *one-way* ANOVA. Dengan menggunaan *one-way* ANOVA, maka akan diketahui apakah ada perbedaan pengaruh dari berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun kayu manis terhadap jumlah koloni *Shigella dysenteriae*. Dilanjutkan dengan analisis *Post Hoc test* (*Tukey's Test*), untuk mengetahui mengetahui konsentrasi ekstrak etanol daun kayu manis yang menyebabkan jumlah koloni bakteri *Shigella dysenteriae* yang dihasilkan pada medium NAP cenderung berbeda secara signifikan atau tidak.

Setelah itu dilakukan uji statistik korelasi regresi yang bertujuan untuk menentukan arah hubungan dan besarnya pengaruh antara pemberian konsentrasi ekstrak etanol daun kayu manis terhadap pertumbuhan *Shigella dysenteriae* secara *in vitro*.

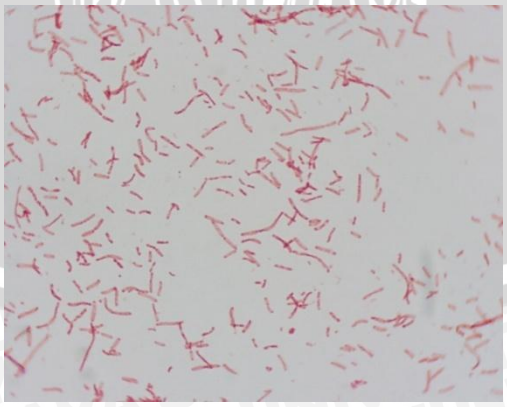
BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

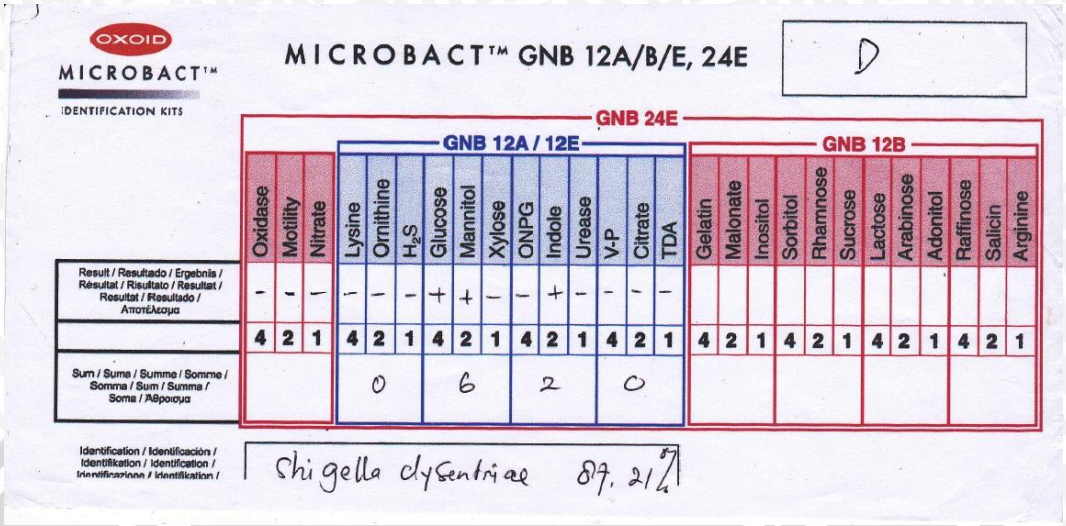
5.1 Data Hasil Penelitian

5.1.1 Identifikasi bakteri *Shigella dysenteriae*

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Shigella dysenteriae* milik Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Sebelum melakukan penelitian, dilakukan identifikasi ulang yang meliputi pewarnaan gram dan uji biokimiawi dengan menggunakan *microbact identification kit*. Sebelum dilakukan uji *microbact*, bakteri diuji oksidase dengan menggoreskan koloni bakteri pada stick oksidase dan dibiarkan 5 menit. Hasilnya menunjukan oksidase negatif, yaitu dengan tidak adanya perubahan warna stick menjadi biru tua. Setelah itu dilanjutkan uji *microbact* dengan memasukan *suspense* bakteri ke dalam 12A/E sumuran *microbact* system dan diinkubasi selama 18 jam pada suhu 37^0C. Hasil identifikasi bakteri dapat dilihat pada gambar 5.1 dan Gambar 5.2



Gambar 5.1 Pewarnaan Gram (bentuk batang, gram negatif, dan berwarna merah)



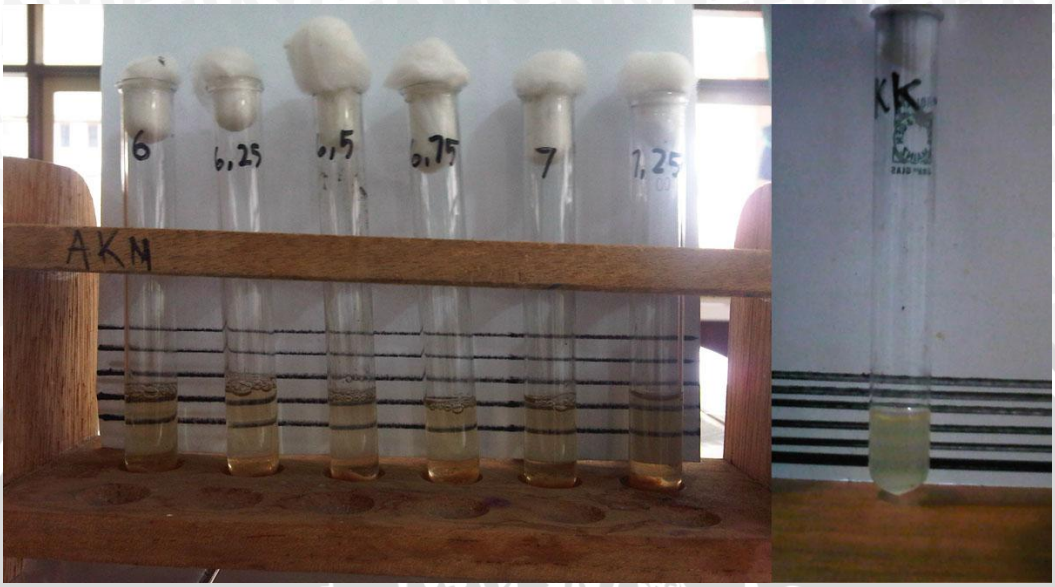
Gambar 5.2 Hasil Identifikasi *Shigella dysenteriae* dengan *Microbact system* (Akurasi bakteri *Shigella dysenteriae* sebesar 87,21%)

5.2 Hasil Pengamatan Kekeruhan dan Perhitungan Jumlah Koloni Bakteri *Shigella dysenteriae*

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan enam macam konsentrasi ekstrak etanol daun kayu manis, dengan variasi konsentrasi 6%; 6,25%; 6,5%; 6,75%; 7%; 7,25%, serta konsentrasi 0% (bakteri tanpa ekstrak) dan konsentrasi 100% (bahan ekstrak) sebagai kontrol positif dan negatif. Pengamatan pertumbuhan bakteri untuk menentukan KHM menggunakan dilusi tabung dengan cara mengamati tingkat kekeruhan pada masing-masing tabung yang dibantu kertas putih bergaris garis hitam yang diposisikan tepat di belakang tabung.

Pada tabung dengan konsentrasi ekstrak paling tinggi merupakan tabung yang paling jernih. Hal ini disebabkan oleh sudah tidak adanya koloni bakteri *Shigella dysenteriae* pada tabung konsentrasi tertinggi. Sedangkan untuk konsentrasi dibawahnya terlihat semakin kurang jernih, demikian seterusnya.

Perbandingan tingkat kejernihan pada masing-masing konsentrasi dapat dilihat pada Gambar 5.1.

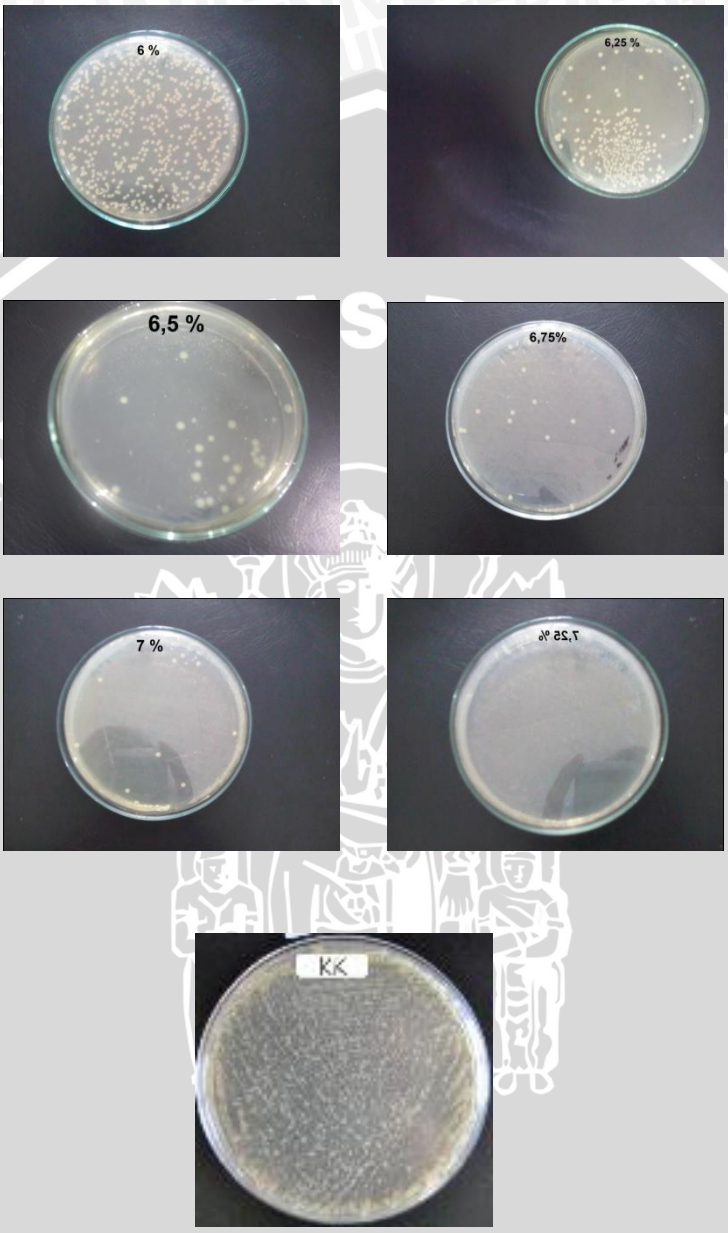


Gambar 5.3. Uji Dilusi Tabung Perbandingan Tingkat Kekeruhan Tiap Konsentrasi Ekstrak Setelah Diinkubasi

Dari Gambar 5.1. setelah diinkubasi pada suhu 37^{0}C selama 24 jam dapat dilihat bahwa dari konsentrasi 6% sampai dengan 7,25% tidak tampak perbedaan warna yang signifikan karena semua konsentrasi terlihat jernih dan cenderung sama. Maka Kadar Hambat Minimal (KHM) dari ekstrak etanol daun kayu manis terhadap bakteri *Shigella dysenteriae* tidak dapat ditentukan.

Masing-masing konsentrasi kemudian di streaking pada NAP (Nutrient Agar Plate) kemudian di inkubasikan pada suhu 37 ^{o}C selama 18-24 jam. Setelah diinkubasi, maka dilakukan pengamatan dan perhitungan jumlah pertumbuhan koloni bakteri pada masing-masing *plate*.

Hasil pengamatan dapat dilihat pada sampel Gambar 5.4. berikut



Gambar 5.4. Pertumbuhan koloni *Shigella dysenteriae* pada Medium NAP

Pada tabung dengan konsentrasi ekstrak 0% (kontrol positif) dilakukan pengenceran suspensi bakteri dengan larutan NaCl sebanyak 1000x, Sedangkan pada konsentrasi 6%; 6,25%; 6,5%; 6,75% suspense bakteri diencerkan 10x

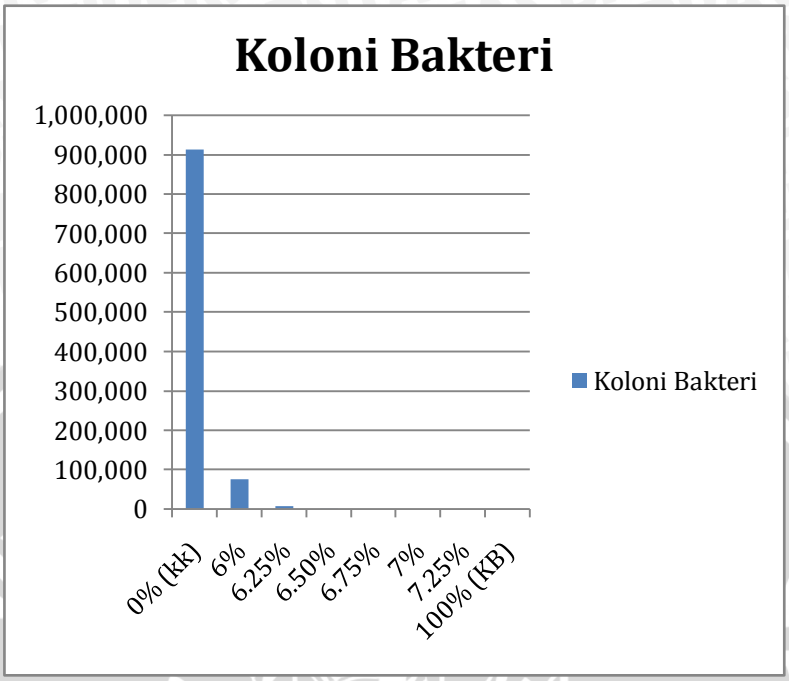
sebelum dilakukan streaking pada NAP. Apabila tidak dilakukan pengenceran maka akan didapatkan pertumbuhan koloni bakteri yang sangat padat dan tidak dapat dihitung secara kuantitatif pada *colony counter*, oleh sebab itu pengenceran ini bertujuan untuk memudahkan dalam perhitungan jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada NAP dengan konsentrasi ekstrak sebenarnya. Untuk mengetahui jumlah koloni bakteri pada berbagai kelompok perlakuan maka disajikan dalam tabel 5.1.

Konsentrasi Ekstrak	Pengulangan			Jumlah Koloni*	Rata-Rata Koloni
	1	2	3		
0% (kk) **	317000	301000	295000	913,000	304,333.33
6% *	28100	25500	22700	76,300	25,433.33
6.25% *	3500	2900	2400	8,800	2,933.33
6.50% *	390	300	230	920	306.67
6.75% *	180	130	60	370	123.33
7%	30	24	19	73	24.33
7,25%	0	0	0	0	0.00

Tabel 5.1. Hasil Perhitungan Jumlah Koloni *Shigella dysenteriae* pada Medium NAP

keterangan : ** = dikalikan pengenceran 1000x
* = dikalikan pengenceran 10x

Dari pertumbuhan koloni bakteri *Shigella dysenteriae* tersebut dapat ditentukan KBM dari ekstrak etanol daun kayu manis ini yaitu pada konsentrasi 7,25 % dimana pada konsentrasi ini tidak didapatkan pertumbuhan koloni sama sekali. Dapat terlihat pola dimana semakin tinggi konsentrasi ekstrak, jumlah koloni bakteri semakin berkurang. Hal ini tampak lebih jelas pada gambar berikut



Gambar 5.5. Grafik rata-rata jumlah koloni bakteri *Shigella dysenteriae* dengan kelompok perlakuan konsentrasi ekstrak etanol daun kayu manis

Selanjutnya dari hasil penelitian akan di analisis dengan ANOVA untuk mengetahui adanya perbedaan sensitivitas tiap variasi konsentrasi ekstrak etanol daun kayu manis terhadap pertumbuhan koloni bakteri *Shigella dysenteriae*, serta pengujian dengan korelasi dan regresi untuk mengetahui lebih jauh mengenai pengaruh pemberian ekstrak etanol daun kayu manis tersebut terhadap pertumbuhan koloni bakteri *Shigella dysenteriae.*

5.3 Analisis Data

Data jumlah koloni bakteri terlebih dahulu diuji untuk normalitas dan homogenitasnya sebagai uji pra-syarat agar bisa dilakukan uji beda parametrik One way anova. Jika dari hasil uji homogenitas menyatakan bahwa data penelitian homogen ($p>0.05$) dan uji normalitas Kolmogorov-Smirnov

menunjukkan distribusi data yang normal (p>0.05) , maka dapat dilakukan uji beda parametrik One way anova. Untuk uji homogenitas menggunakan uji *homogenity of varience* (uji levene) dengan tujuan untuk mengetahui apakah data yang digunakan mempunyai ragam yang sama. Pada hasil pengujian menunjukkan nilai dari levene test sebesar 4,882 dengan nilai signifikasi sebesar 0,012 yang lebih besar dari alpha 0,05. Oleh karena itu nilai p > 0,05, maka homogenitas diterima dan dapat disimpulkan bahwa data yang digunakan mempunyai ragam yang homogen.

Selain uji kehomogenan ragam juga dilakukan pengujian normalitas data untuk mengetahui apakah data yang diuji mempunyai distribusi yang normal atau tidak dengan menggunakan uji Kolmogorof Smirnof test. Dari hasil pengujian normalitas menujukkan nilai dari Kolmogorof Smirnof test dengan nilai signifikan (p) sebesar 0,329. Oleh karena nilai p > 0,05, maka Ho diterima dan dapat disimpulkan bahwa data yang digunakan mempunyai distribusi yang tersebar normal. Dengan demikian data bisa diolah dengan menggunakan uji beda parametrik one way anova karena kedua asumsi terpenuhi.

Uji beda parametrik one way anova dilakukan guna mengetahui apakah terdapat perbedaan jumlah koloni bakteri *Shigella dysenteriae* setelah terpapar oleh ekstrak etanol daun kayu manis dengan berbagai konsentrasi. Dikatakan terdapat perbedaan jumlah koloni yang bermakna jika p > 0,05. Dari uji beda one way anova, terdapat perbedaan yang bermakna atau signifikan jumlah koloni bakteri setelah terpapar oleh ekstrak etanol daun kayu manis pada berbagai konsentrasi (p = 0.001) atau dengan kata lain perbedaan konsentrasi ekstrak mengakibatkan perbedaan jumlah koloni bakteri.

Selanjutnya dilakukan uji multi komparasi Pos Hoc Tukey guna melihat apakah terdapat perbedaan jumlah koloni bakteri antara dua macam dosis yang berbeda. Terdapat perbedaan jumlah koloni yang bermakna pada semua kelompok perlakuan jika dibandingkan antar kelompok perlakuan. Dengan kata lain terdapat penurunan jumlah koloni bakteri yang signifikan seiring dengan peningkatan dosis ekstrak.

Uji korelasi parametrik Pearson menunjukkan hasil signifikan (P-value) = 0.000 ($p < 0.05$) dan correlation coefficient -0.656 yang berarti terdapat korelasi bermakna antara variabel konsentrasi ekstrak dengan variabel jumlah koloni bakteri yang termasuk korelasi sangat kuat ($r > 0.794$). Spearman correlation coefficient (r) bernilai negatif berarti korelasinya berbanding terbalik, yang artinya semakin tinggi konsentrasi ekstrak, maka semakin rendah jumlah koloni bakteri. Note : r = correlation coefficient, show the strength of correlation. Weak correlation ($r < 0.005$), moderate correlation ($r = 0.500$-0.599), strong correlation ($r > 0.799$).

Uji regresi linier merupakan uji statistik yang dilakukan untuk mengetahui seberapa besar pengaruh variabel independen (ekstrak dengan berbagai konsentrasi) terhadap variabel dependen (jumlah koloni bakteri). Hasil persamaan garis linier yang didapat adalah :

5.3.1 Uji Asumsi Data

Sebelum dilakukan analisis data terhadap efek pemberian ekstrak etanol daun kayu manis terhadap jumlah koloni bakteri *Shigella dysenteriae*, diperlukan pemeriksaan terhadap jumlah koloni bakteri terlebih dahulu untuk normalitas dan homogenitasnya sebagai uji prasyarat agar dapat dilakukan uji *One Way Anova*.

5.3.2 Uji Normalitas dan Homogenitas Data

Jika dari hasil uji normalitas Kolmogorov-Smirnov menunjukkan distribusi data yang normal (p>0,05) dan uji homogenitas menyatakan bahwa data penelitian homogen (p>0,05), maka dapat dilakukan uji *One way anova*. Berdasarkan hasil uji normalitas Kolmogorov Smirnof, distribusi data jumlah koloni bakteri adalah normal (p = 0,329) dan berdasarkan hasil uji homogenitas, data homogen (p = 0.012). Sehingga data jumlah koloni bakteri dapat dianalisa dengan uji *one way anova*.

5.3.3 Analisis *One Way ANOVA*

Uji *one way anova* dilakukan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan jumlah koloni bakteri setelah terpapar oleh ekstrak dengan berbagai konsentrasi. Dikatakan terdapat perbedaan jumlah koloni yang bermakna jika p < 0,05. Dari uji one way anova, terdapat perbedaan yang bermakna atau signifikan jumlah koloni bakteri (p = 0.000) atau dengan kata lain perbedaan konsentrasi ekstrak mengakibatkan perbedaan jumlah koloni bakteri.

5.3.4 Pengujian Berganda *(Multiple Comparasions)*

Selanjutnya dilakukan uji multi komparasi Pos Hoc Tukey untuk melihat apakah terdapat perbedaan jumlah koloni bakteri antara dua macam dosis yang berbeda. Dikatakan ada perbedaan jumlah koloni yang bermakna apabila nilai p<0,05.

Terdapat perbedaan jumlah koloni bakteri yang bermakna antara semua kelompok jika dibandingkan satu per satu terhadap konsentrasi 0% (p<0.05). Namun tidak terdapat perbedaan jumlah koloni yang bermakna antar konsentrasi

6% dengan konsentrasi 6,25% (p = 0.760) dan antara konsentrasi 6,25% jika dibandingkan dengan 6,5%, 6,75%, 7%, dan 7,25%. Yang berarti mulai dari dosis 6,25% tidak terdapat penurunan dosis yang bermakna pada peningkatan konsentrasi berikutnya (p>0.05).

5.3.5 Pengujian Korelasi

Uji korelasi parametric Pearson dilakukan untuk menganalisa hubungan antara variabel dependen (jumlah koloni bakteri) dan variabel independen (konsentrasi ekstrak). Dikatakan terdapat hubungan atau korelasi yang bermakna jika nilai p < 0.05. Hasil uji korelasi Pearson menunjukkan nilai signifikansi (*P-value*) = 0,001 (p<0,05) dan *correlation coefficient* -0.656 yang berarti terdapat korelasi bermakna antara dua variable (konsentrasi ekstrak terhadap jumlah koloni bakteri). *Pearson correlation coefficient* (*r*) bernilai negatif berarti korelasinya berbanding terbalik, yang artinya semakin tinggi dosis/konsentrasi ekstrak, maka semakin rendah jumlah koloni bakteri , serta menunjukkan korelasi yang kuat (*r = 0.600-0.799*).

Note : *r = correlation coefficient, shows the strength of correlation. Weak correlation (r < 0.500), moderate correlation (r = 0.500-0.599), strong correlation (r = 0.600-0.799), very strong correlation (r > 0.799)*

5.3.6 Uji Regresi Linier

Uji regresi linier merupakan uji statistic yang dilakukan untuk mengetahui besar pengaruh variable independen (ekstrak dengan berbagai konsentrasi) terhadap variable dependen (jumlah koloni bakteri). Nilai R^2 (R square) dari tabel *Model summary* menunjukan bahwa 43,2% (0,432 x 100%) dari variabel jumlah

koloni bakteri dipengaruhi oleh variable independen yakni paparan ekstrak. Dengan kata lain sebanyak 43,2% bakteri mati dikarenakan oleh paparan ekstrak. Sedangkan 56,8% sisanya kemungkinan mati karena pengaruh paparan ekstrak dan lingkungan.Persamaan garis regresi menggunakan metode kuadrat terkecil *(least square method)* yang di dapat adalah :

$$y = 185683{,}190 - 34522{,}429x$$

Keterangan: y = jumlah koloni bakteri;

x = konsentrasi ekstrak

Dapat diartikan bahwa tanpa dipengaruhi oleh pemberian ekstrak etanol daun kayu manis, maka jumlah koloni bakteri *Shigella dysenteriae* akan cenderung meningkat secara konstan sebesar 185683,190 koloni bakteri. Namun jika mempertimbangkan pengaruh dari perlakuan pemberian ekstrak etanol daun kayu manis, akan didapatkan setiap peningkatan 1% konsentrasi ekstrak akan menurunkan bakteri *Shigella dysenteriae* sebanyak 34522,429 koloni bakteri. Sehingga semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol daun kayu manis yang diberikan, maka akan berpengaruh signifikan dalam menurunkan jumlah koloni bakteri *Shigella dysenteriae.*

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan bakteri *Shigella dysenteriae* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Sebelum bakteri digunakan untuk penelitian, dilakukan beberapa uji identifikasi ulang terhadap *Shigella dysenteriae*. Dari hasil pewarnaan gram didapatkan bakteri gram negative, sel berbentuk batang pendek dan berwarna merah. Sedangkan dari uji Microbact 12A/E didapatkan akurasi bakteri *Shigella dysenteriae* sebesar 87,2% artinya bakteri yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah 87,2% benar-benar *Shigella dysenteriae*.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kayu manis yang di ekstrak dengan metode ekstraksi maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Pada penelitian Arifin, H.,dkk (2006) didapatkan ekstrak etanol daun juwet (Eugenia Cumini Merr.) lebih banyak mengandung flavonoid,bila di ekstraksi dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% dibanding bila menggunakan pelarut air. Hal ini menunjukkan, senyawa aktif yang terkandung dalam daun kayu manis seperti flavonoid dan tannin dapat larut dalam etanol 96%.

Pada penelitian ini, efek antimikroba yang didapatkan bukan berasal dari etanol 96% yang digunakan sebagai pelarut. Hal ini dikarenakan pada proses ekstraksi, etanol 96% telah mengalami proses evaporasi (penguapan) dengan oven pada suhu 80^0 Celcius selama 2 jam, sedangkan titik didih etanol 78^0 Celcius. Sehingga diharapkan dengan proses evaporasi tersebut etanol 96% yang mungkin tersisa didalam ekstrak telah hilang (Siswandono,1995).

Sebelum mendapatkan konsentrasi perlakuan, penulis melakukan tiga tahap penelitian pendahuluan. Dari ketiga tahap tersebut didapatkan konsentrasi 6%; 6,25%; 6,5%; 6,75%; 7%; 7,25% sebagai konsentrasi perlakuan. Dari konsentrasi perlakuan tidak bisa ditentukan Kadar Hambat Minimal (KHM) karena tidak terdapat perbedaan warna yang signifikan dan cenderung sama. Kemudian keenam konsentrasi dilusi tabung digoreskan pada NAP dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37^0 celcius. Hasil penggoresan pada NAP digunakan untuk menentukan kadar bunuh minimal (KBM). Pada NAP nampak pertumbuhan koloni bakteri semakin berkurang dari konsentrasi 6% sampai 7% dan tidak didapatkan pertumbuhan koloni bakteri sama sekali pada konsentrasi 7,25%. Sehingga konsentrasi 7,25% ditentukan sebagai KBM.

Penelitian terhadap bahan alam lain yang digunakan sebagai antimikroba terhadap *shigella dysenteriae*, ternyata telah banyak dilakukan. Pada penelitian Hasniah Harun (2009) yang menggunakan ekstrak etanol mengkudu sebagai antimikroba terhadap shigella dysenteriae dengan metode dilusi tabung, diperoleh KBM pada konsentrasi 25%. Namun, KHM tidak dapat ditentukan karena ekstrak mengkudu berwarna keruh kecoklatan. Penelitian lainnya dilakukan oleh Adnyana I.K., dkk (2004) yang meneliti tentang aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun jambu biji daging buah merah (Psidium guajava L., Myrtaceae) terhadap *Shigella dysenteriae* dengan metode dilusi agar. Pada penelitian ini diperoleh KHM ekstrak etanol daun jambu merah sebesar 70mg/ml.

Pada penelitian ekstrak etanol daun kayu manis sebagai antimikroba terhadap bakteri *shigella dysenteriae* dengan menggunakan metode dilusi tabung diperoleh KBM 7,25% namun KHM tidak dapat ditentukan. Jika dibandingkan maka yang paling efektif untuk menekan pertumbuhan bakteri *Shigella*

dysenteriae dengan menggunakan ekstrak etanol daun kayu manis karena didapatkan KBM sebesar 7,25% namun kelemahan dari ekstrak etanol daun kayu manis ini KHM tidak bisa ditentukan. Dari hasil penelitian diatas dapat menunjukkan bahwa pertumbuhan shigella dysenteriae tidak hanya dapat dihambat oleh ekstrak etanol daun kayu manis saja tetapi ekstrak bahan alam yang lain.

Ekstrak etanol daun kayu manis ternyata tidak hanya mampu bersifat antibakteri terhadap *Shigella dysenteriae*, tetapi juga mampu menghambat pertumbuhan bakteri gram negative yang lain, gram positive dan jamur. Kemampuan antimikroba dari daun kayu manis tidak hanya dari daunnya saja,tetapi juga bagian dari pohon daun kayu manis yang lain seperti kulit pohon daun kayu manis.

Pada penelitian ini, efek antimikroba daun kayu manis terhadap bakteri *Shigella dysenteriae* disebabkan oleh zat-zat aktif yang terkandung dalam daun kayu manis,diantaranya adalah flavonoid,tannin. Flavonoid telah diketahui bahwa disintesis oleh tanaman dalam responnya terhadap infeksi mikroba. Mekanisme Flavonoid sebagai antimikroba kemungkinan disebabkan oleh kemampuannya untuk mengikat adhesion pada permukaan sel mikroba,membentuk kompleks dengan protein ekstraseluler terlarut dan membentuk kompleks dengan polipeptida dinding sel bakteri, serta sifat lipofilik dari flavonoid dapat merusak membrane bakteri sehingga menyebabkan bakteri lisis. Aktivitas tannin sebagai antimikroba memiliki kemiripan dengan flavonoid, kemungkinan berhubungan dengan kemampuannya menginaktivasi adhesion mikroba, transport protein dan membentuk komplek dengan polisakarida dinding sel bakteri.

Berdasarkan pemaparan diatas, dapat ditarik kesimpulan bahwa *Shigella dysenteriae* dapat dihambat pertumbuhannya oleh berbagai macam ekstrak bahan alam,seperti daun kayu manis,daun jambu biji dan buah majapahit. Selain itu daun kayu manis dapat digunakan sebagai antimikroba terhadap gram negative,gram positive dan jamur. Tidak hanya daun kayu manis saja yang berpotensi sebagai antimikroba, tapi bagian lain dari daun kayu manis juga, seperti kulit pohon dan akar pohon.

Keterbatasan pada penelitian ini antara lain pada metode pembuatan ekstrak etanol daun kayu manis yang bersifat sederhana,sehingga proporsi jumlah bahan aktif, bahan aktif apa saja yang menjadi penghambat dan bahan aktif yang berperan besar dalam menghambat pertumbuhan *Shigella dysenteriae* tidak diketahui secara pasti. Selain itu, tidak adanya standarisasi pembuatan ekstrak bahan alam yang kemungkinan dapat mengakibatkan apabila dilakukan di laboratorium yang berbeda, maka ekstrak yang dihasilkan kemungkinan memiliki efek yang berbeda. Variasi biologis dari masing-masing pohon daun kayu manis yang ditanam di suatu daerah mungkin efeknya tidak sama dengan yang ditanam di daerah lainnya. Lamanya penyimpanan ekstrak kemungkinan efek antimikrobanya dapat menurun ataupun meningkat. Oleh karena itu, untuk penelitian-penelitian selanjutnya perlu adanya standarisasi, baik dari pemilihan bahan yang digunakan, alat ekstraksinya serta lamanya masa penyimpanan (jangka waktu ekstrak masih dapat digunakan sebagai antimikroba) sehingga apabila dilakukan penelitian yang sama di tempat yang berbeda akan didapatkan hasil yang sama.

Aplikasi klinis ekstrak etanol daun kayu manis masih memerlukan penelitian lebih lanjut dengan pengujian pada hewan coba (in vivo) maupun

pengujian pada manusia (uji klinik). Penelitian in vivo pada hewan coba bertujuan untuk meneliti sifat farmakodinamik, farmakokinetik, efek toksiknya, dosis infektif dan memperkecil resiko penelitian pada manusia. Pengujian pada manusia (uji klinik) bertujuan untuk memastikan keamanan, dan gambaran efek samping yang dapat timbul dari pemakaian pada manusia. Maka penelitian ini masih sangat dini untuk langsung diterapkan secara klinis dalam bidang pengobatan masyarakat (Setiawati, 2007).

BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa :

1. Ekstrak etanol daun kayu manis efektif sebagai antimikroba terhadap bakteri *Shigella dysenteriae* secara in vitro.
2. Kadar Hambat Minimal (KHM) ekstrak etanol daun kayu manis (*Cinnamomum burmannii*) terhadap bakteri *Shigella dysenteriae* tidak dapat ditentukan karena semua tabung jernih sehingga tidak dapat diinterpretasikan KHMnya.
3. Kadar Bunuh Minimal (KBM) ekstrak etanol daun kayu manis (*Cinnamomum burmannii*) yang dapat membunuh bakteri *Shigella dysenteriae* adalah pada konsentrasi 7,25%.
4. Hasil uji korelasi Pearson menunjukkan nilai signifikansi (*P-value*) = 0,001 ($p<0,05$) dan *correlation coefficient* -0.656 yang berarti semakin besar ekstrak etanol daun kayu manis yang digunakan maka semakin efektif sebagai antimikroba terhadap bakteri *shigella dysenteriae*.

7.2 Saran

Adapun saran yang dapat peneliti berikan dari penelitian ini adalah :

1. Perlu penelitian lebih lanjut untuk mengetahui konsentrasi masing-masing bahan aktif yang terkandung di dalam ekstrak etanol daun kayu manis (*Cinnamomum burmannii*).

2. Perlu penelitian lebih lanjut untuk mengetahui bahan aktif apa yang paling berperan sebagai antimikroba pada ekstrak etanol daun kayu manis (*Cinnamomum burmannii*).
3. Perlu penelitian lebih lanjut untuk mengetahui Kadar Hambat Minimum (KHM) dari ekstrak etanol daun kayu manis (*Cinammomum burmannii*) terhadap *Shigella dysenteriae* dengan metode lain seperti Agar dilution test, metode cakram, dan spektofotometri..
4. Diharapkan dapat dilakukan penelitian lebih lanjut tentang efek antimikroba daun kayu manis (*Cinnamomum burmannii*) pada bakteri lain, *fungi* maupun virus.
5. Perlu ada standarisasi dalam pembuatan ekstrak etanol daun kayu manis (*Cinnamomum burmannii*), maupun dalam pemilihan bahan serta lama masa simpan ekstrak yang masih dapat digunakan sebagai antimikroba.
6. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan metode lain, misalnya dengan cara dekok untuk mengetahui kemampuan daun kayu manis (*Cinnamomum burmannii*) sebagai antimikroba terhadap *Shigella dysenteriae*.

DAFTAR PUSTAKA

Aisyah, S. 2011. Perbedaan Daya Hambat Pasta Gigi yang Mengandung Propolis dan Bunga Cengkeh Terhadap *Streptococcus mutans* (in vitro)

Ayuningtyas, F. 2008. http://mikrobia2.files. wordpress.com/2008/05/klebsiella-pneumoniae.pdf. Diakses tanggal 5 desember 2009.

Brooks, G.F., Butel, J.S., Morse, S.A. 2004. *Mikrobiologi Kedokteran Jawetz, Melnick, & Adelberg: Edisi 23*. Diterjemahkan oleh Huriwati Hartanto, Chaerunisa Rachman, Alife Dimanti, Aryana Diani. Jakarta: EGC. Hal: 258-260.

Champbell. 2002 .*Tanaman Pare*. 197, Erlangga, Jakarta.

Cowman, M.M. 1999. *Plant Product as Antimicrobial Agents*. *Clinical Microbiology Reviews.* http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10515903

Davidson. 2005. *Tanaman herbal.* (Online), (http://www.deherba.com/index.php, diakses tanggal 28 Desember 2010).

Dennis Kunkel Microscopy. 2004. *Shigella dysenteriae.* (Online), (http://www.denniskunkel.com/product_info.php?products_id=787, diakses tanggal 3 Januari 2011).

Dorland. 2002. *Kamus Kedokteran Dorland*, edisi 29, Alih bahasa: Huriawati Hartanto dkk,editor: Huriawati Hartanto dkk. Jakarta: EGC. Hal: 846; 1940.

Dzen, S.J., Roekistiningsih, Santoso, S., Winarsih, S. 2003. *Bakteriologi Medik: Edisi Pertama*. Malang: Bayumedia Publishing. Hal: 216-223.

Gillespie, S.H., Peter, M.H. 2006. *Principles and Practice of Clinical Bacteriology Second Edition.* John Wiley & Sons Ltd, England, p. 356-360.

Gould, Dinah & Brooker Christine, 2003, *Mikrobiologi Terapan untuk Perawat.* Jakarta : ECG

Gunawan, D., Mulyani, S. 2004. Ilmu Obat Alam (Farmakognosi). Jakarta : Swadaya

Harborne, J. B. 1987. Metode Fitokimia. Jilid II. Penerbit ITB. Bandung. 4 – 5.

Hariana, A. 2007. Tumbuhan Obat Dan Khasiatnya. Jakarta : Swadaya

Houghton Mifflin Company. 2006. The American Heritage® Stedman's Medical Dictionary, 2nd Edition, (online), (http://medical-dictionary.thefreedictionary.com/shigellosis, diakses tanggal 14 Februari 2011).

National Tropical Botanical Garden. 2011. http://www.ntbg.org/plants/plant_details.php? plantid=2799

Rismunandar dan Farry B. Paimin. 2001. Daun kayu manis Budi Daya dan Pengolahan, Edidi Revisi. Jakarta : Swadaya

Sack, D.A., Lyke, C., McLaughlin, C., Suwanvanichkij V. 2001. *Antimicrobial resistance in shigellosis, cholera and campylobacteriosis. Johns Hopkins University School of Hygiene and Public Health Baltimore, MD, United States of America.* p. 26-29.

Sastrohamidjojo, H. 2004. Kimia Minyak Atsiri. Yogyakarta : Gama Press

Soedarto,1996, Parasitologi Kedokteran,Jakarta : ECG.

Süßmuth, R., Eberspächer, J., Haag, R., Springer, W. 1999. *Mikrobiologich-Biochemiches Praktikum*. Georg Thieme Verlag-Stuttgat, New York.

Todar, K. 2008. *Todar's Online Textbook of Bacteriology: Shigella and Shigellosis*. (Online), (http://www.textbookofbacteriology.net/Shigella.html, diakses tanggal 9 November 2009).

WHO. 2009. http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs331/en/

LAMPIRAN

Lampiran 1 Pernyataan Keaslian Tulisan

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : I Gusti Ngurah Ryan Sanjaya
NIM : 0910713015
Program Studi : Pendidikan Dokter
Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya,

menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar – benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambil alihan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya sendiri. Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 02 November 2012
Yang membuat pernyataan,

I Gusti Ngurah Ryan Sanjaya
0910713015

Lampiran 2 (L2) Alat Dan Bahan

Gambar L2.1 Mikroskop

Gambar L2.2 Spektrofotometri

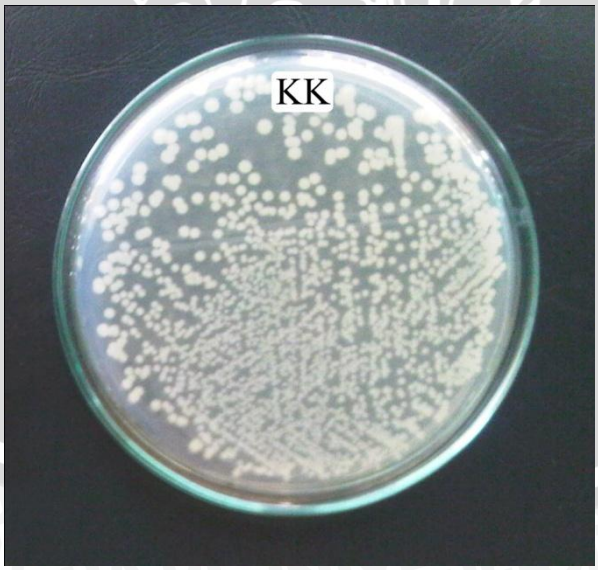
Gambar L2.3 Vortex

Gambar L2.4 Daun kayu manis

Lampiran 3 (L3) Identifikasi Bakteri dan Hasil Penelitian

Gambar L3.1 Hasil Inkubasi Kontrol Kuman Bakteri *Shigella dysenteriae*

Kontrol kuman setelah diinkubasi nampak keruh



Gambar L3.2 Koloni bakteri pada Medium NAP

Koloni bakteri *Shigella dysenteriae* yang tumbuh berwarna kuning

Descriptives

Koloni

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
KK	3	.0018	.00003	.00002	.0017	.0019	.00	.00
6%	3	.0063	.00034	.00019	.0055	.0071	.01	.01
6,25%	3	.0186	.00176	.00101	.0143	.0230	.02	.02
6,5%	3	.0581	.00766	.00442	.0391	.0771	.05	.07
6,75%	3	.0971	.02847	.01644	.0264	.1678	.07	.13
7%	3	.2054	.02345	.01354	.1471	.2636	.18	.23
Total	18	.0646	.07434	.01752	.0276	.1015	.00	.23

Lampiran 4 (L4) Uji Statistik

UJI NORMALITAS KOLMOGOROV SMIRNOV DATA JUMLAH KOLONI

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		koloni
N		18
Normal Parameters[a,b]	Mean	.0646
	Std. Deviation	.07434
Most Extreme Differences	Absolute	.224
	Positive	.224
	Negative	-.199
Kolmogorov-Smirnov Z		.949
Asymp. Sig. (2-tailed)		.329

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

UJI HOMOGENITAS DATA JUMLAH KOLON

Test of Homogeneity of Variances

Koloni

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
4.822	5	12	.012

UJI ONE WAY ANOVA DATA JUMLAH KOLONI

ANOVA

Koloni

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.091	5	.018	76.879	.000
Within Groups	.003	12	.000		
Total	.094	17			

UJI MULTI KOMPARASI POST HOC TUKEY DATA JUMLAH KOLONI

Multiple Comparisons

Koloni

Tukey HSD

(I) konsentrasi	(J) konsentrasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
KK	6%	-.00448	.01257	.999	-.0467	.0377
	6,25%	-.01682	.01257	.760	-.0590	.0254
	6,5%	-.05629*	.01257	.008	-.0985	-.0141

	6,75%	-.09530*	.01257	.000	-.1375	-.0531
	7%	-.20356*	.01257	.000	-.2458	-.1613
6%	KK	.00448	.01257	.999	-.0377	.0467
	6,25%	-.01234	.01257	.915	-.0546	.0299
	6,5%	-.05182*	.01257	.014	-.0940	-.0096
	6,75%	-.09083*	.01257	.000	-.1330	-.0486
	7%	-.19908*	.01257	.000	-.2413	-.1569
6,25%	KK	.01682	.01257	.760	-.0254	.0590
	6%	.01234	.01257	.915	-.0299	.0546
	6,5%	-.03948	.01257	.072	-.0817	.0027
	6,75%	-.07849*	.01257	.000	-.1207	-.0363
	7%	-.18674*	.01257	.000	-.2290	-.1445
6,5%	KK	.05629*	.01257	.008	.0141	.0985
	6%	.05182*	.01257	.014	.0096	.0940
	6,25%	.03948	.01257	.072	-.0027	.0817
	6,75%	-.03901	.01257	.076	-.0812	.0032
	7%	-.14727*	.01257	.000	-.1895	-.1050
6,75%	KK	.09530*	.01257	.000	.0531	.1375
	6%	.09083*	.01257	.000	.0486	.1330
	6,25%	.07849*	.01257	.000	.0363	.1207
	6,5%	.03901	.01257	.076	-.0032	.0812
	7%	-.10826*	.01257	.000	-.1505	-.0660
7%	KK	.20356*	.01257	.000	.1613	.2458
	6%	.19908*	.01257	.000	.1569	.2413
	6,25%	.18674*	.01257	.000	.1445	.2290
	6,5%	.14727*	.01257	.000	.1050	.1895
	6,75%	.10826*	.01257	.000	.0660	.1505

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

UJI KORELASI PEARSON

Correlations

		Konsentrasi	koloni
Konsentrasi	Pearson Correlation	1	.898**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	21	18
koloni	Pearson Correlation	.898**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	18	18

**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Variables Entered/Removed[b]

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	perlakuan[a]	.	Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: koloni

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.656[a]	.431	.401	83482.73159

a. Predictors: (Constant), perlakuan

ANOVA[b]

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	1.001E11	1	1.001E11	14.364	.001[a]
	Residual	1.324E11	19	6.969E9		
	Total	2.325E11	20			

a. Predictors: (Constant), perlakuan

b. Dependent Variable: koloni

Coefficients[a]

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	185683.190	40735.402		4.558	.000
	perlakuan	-34522.429	9108.713	-.656	-3.790	.001

a. Dependent Variable: koloni