

**EFEKTIVITAS EKSTRAK ETANOL DAUN SIRIH MERAH
(*Piper crocatum* Ruiz & Pav) SEBAGAI ANTIBAKTERI
TERHADAP *Salmonella* Typhi SECARA *In Vitro***

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran Umum**



Oleh :

**YULIZA RAHMAYANTI
NIM : 115070107111025**

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2014**

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

EFEKTIVITAS EKSTRAK ETANOL
DAUN SIRIH MERAH (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) SEBAGAI
ANTIBAKTERI TERHADAP *Salmonella* Typhi SECARA *In Vitro*

Oleh:

Yuliza Rahmayanti
NIM: 115070107111025

Telah diuji pada:
Hari : Senin
Tanggal : 24 November 2014

Dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji I

dr. Obed T.K. Paundralingga, M.Sc.
NIP. 19850512 200912 1 008

Penguji II/Pembimbing I

Penguji III/Pembimbing II

Dr. Dra. Sri Winarsih, Apt., M.Si.
NIP. 19540823 198103 2 001

Aswaty Nur, S.Si., M.Kes.
NIK. 130682600

Mengetahui,
Ketua Program Studi

Prof. Dr. dr. Teguh W.S., DTM&H., M.Sc., Sp.ParK
NIP. 19520410 198002 1 001

KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah SWT yang telah memberi petunjuk dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir dengan judul “Efektivitas Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum Ruiz&Pav*) Sebagai Antibakteri terhadap *Salmonella Typhi* Secara *In Vitro*”. Tugas Akhir ini diajukan untuk memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan Program Sarjana (S-1) Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

Proses penulisan Tugas Akhir ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu dengan segala kerendahan hati, ucapan terima kasih yang tak terhingga wajib saya berikan kepada:

1. Dr.dr. Karyono Mintaroem, Sp.PA, dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah memberi saya kesempatan menuntut ilmu di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
2. Prof.Dr.dr. Teguh W.S., DTM&H.,M.Sc.,Sp.Park, Kepala Jurusan Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah memberi saya kesempatan menuntut ilmu di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
3. dr. Obed T.K. Paundralingga, M.Sc. yang bersedia menjadi ketua tim penguji Tugas Akhir serta memberikan masukan untuk Tugas Akhir saya.
4. Dr. Dra. Sri Winarsih, Apt.,M.Si. sebagai pembimbing pertama yang telah memberikan bimbingan, saran, dan masukan mulai dari pencetusan ide, pembuatan proposal, pelaksanaan penelitian, hingga penyusunan Tugas Akhir ini selesai.

5. Aswaty Nur, S.Si.,M.Kes. sebagai pembimbing kedua yang telah memberikan bimbingan, saran, dan masukan, sehingga saya dapat menyelesaikan Tugas Akhir ini.
6. Kedua orang tua saya, dr. H. Zawawi, Sp.PD dan Hj. Ni Sulistijowati. Kakak-kakak saya dr. Arif Setiawan dan Ir. Iman Kurniawan beserta keluarga besar yang selalu memberikan semangat dan dukungan baik moral maupun material dalam proses penyelesaian Tugas Akhir ini.
7. Teman baik saya yang selalu memberikan dukungan kepada saya dalam menyelesaikan Tugas Akhir saya serta doa-doanya, yaitu Zuhrotus Sholichah, Melany, Yulia Nugrahanitya, dan Dita Kartika S.
8. Para personil laboratorium Mikrobiologi FKUB, Mas Slamet, Mbak Uci, Mas Hendri, Bu Yatik yang telah membantu dalam proses penelitian dan administrasi.
9. Segenap anggota Tim Pengelola Tugas Akhir FKUB.
10. Seluruh rekan-rekan mahasiswa Pendidikan Dokter 2011 yang telah menjadi inspirasi saya untuk segera menyelesaikan Tugas Akhir ini.
11. Semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan Tugas Akhir ini yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa penulisan ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis tetap membuka diri untuk kritik dan saran yang membangun. Akhir kata penulis mengucapkan banyak terima kasih, semoga Tugas Akhir ini bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang, 24 November 2014

Penulis

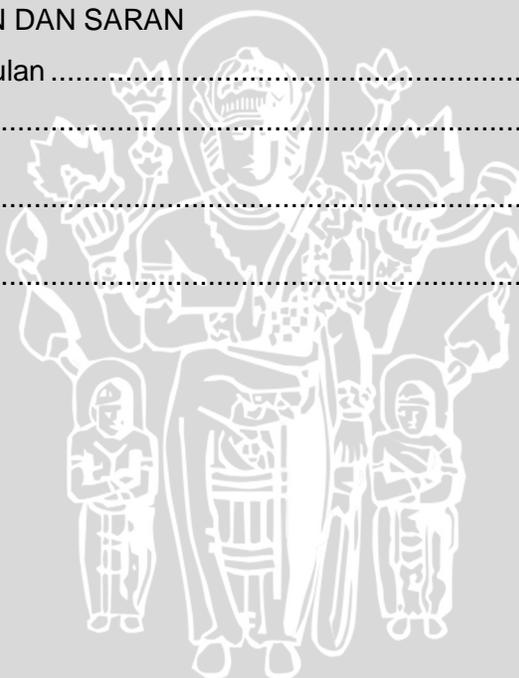
DAFTAR ISI

JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
KATA PENGANTAR	iii
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR SINGKATAN	xii
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.3.1 Tujuan Umum	4
1.3.2 Tujuan Khusus	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
1.4.1 Manfaat Akademik	4
1.4.2 Manfaat Klinis	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 <i>Salmonella</i> Typhi	6
2.1.1 Morfologi <i>Salmonella</i> Typhi	6
2.1.2 Identifikasi Diagnosis Laboratorik <i>Salmonella</i> Typhi	6
2.1.2.1 Reaksi Serologis	7
2.1.2.2 Reaksi Biokimia	8
2.1.2.3 Perbenihan	9
2.1.2.3.1 Spesimen	9
2.1.2.3.2 Metode Bakteriologi Isolasi <i>Salmonella</i>	9

2.1.3	Taksonomi <i>Salmonella</i> Typhi	10
2.1.4	Struktur Antigen <i>Salmonella</i> Typhi	11
2.1.5	Penentu Patogenitas <i>Salmonella</i> Typhi	12
2.1.5.1	Faktor Permukaan	13
2.1.5.2	Endotoksin	14
2.1.5.3	Enterotoksin	14
2.1.5.4	Sitotoksin	14
2.1.5.5	Daya Invasi	15
2.1.6	Patogenesis Infeksi <i>Salmonella</i> Typhi	15
2.1.7	Manifestasi Klinis <i>Salmonella</i> Typhi	17
2.1.7.1	Demam Enterik (Demam Tifoid)	17
2.1.7.2	Bakterimia (Septisemia) dengan lesi fokal	18
2.1.7.3	Enterokolitis (Gastroenteritis)	18
2.1.8	Diagnosis Demam Tifoid	19
2.1.9	Pengobatan Infeksi <i>Salmonella</i> Typhi (Demam tifoid)	20
2.1.10	<i>Salmonella</i> mengalami resistensi dengan Antibiotik	21
2.2	Tanaman Sirih Merah (<i>Piper crocatum</i>)	22
2.2.1	Asal Usul Tanaman Sirih Merah	22
2.2.2	Morfologi dan Identifikasi Tanaman Sirih merah	23
2.2.3	Taksonomi Tanaman Sirih Merah	23
2.2.4	Kandungan Kimia Tanaman Sirih Merah	24
2.2.4.1	Flavonoid	25
2.2.4.2	Tanin	26
2.2.4.3	Alkaloid	27
2.2.4.4	Minyak atsiri	28
2.2.5	Ekstraksi Senyawa Aktif Bahan Alami	28
2.2.6	Pemakaian Dalam Pengobatan	29
2.3	Cara Kerja Antimikroba	29
2.3.1	Menghambat Sintesis Dinding Sel	30
2.3.2	Menghambat Fungsi Membran Sel	31
2.3.3	Menghambat Sintesis Protein	31
2.3.4	Menghambat Sintesis Asam Nukleat	31
2.3.5	Menghambat Metabolisme Sel Bakteri	31
2.4	Uji Sensitivitas Bakteri terhadap Antimikroba	32

2.4.1	Metode Dilusi Tabung	32
2.4.2	Metode Dilusi Agar	33
2.4.3	Metode Difusi Cakram	33
2.4.3.1	Metode Kirby Bauer	34
2.4.3.2	Metode Joan-stokes.....	34
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN		
3.1	Kerangka Konsep Penelitian	35
3.2	Keterangan Skema Kerangka Konsep Penelitian	36
3.3	Hipotesis Penelitian.....	37
BAB 4 METODE PENELITIAN		
4.1	Desain Penelitian	38
4.2	Tempat dan Waktu Penelitian	38
4.3	Sampel Penelitian	38
4.4	Variabel Penelitian	39
4.4.1	Variabel Bebas	39
4.4.2	Variabel Tergantung.....	39
4.5	Definisi Operasional.....	40
4.6	Alat dan Bahan Penelitian	41
4.6.1	Alat-alat untuk Pembuatan Ekstrak Daun Sirih Merah	41
4.6.2	Bahan-bahan untuk Pembuatan Ekstrak Daun Sirih Merah	41
4.6.3	Alat dan Bahan untuk Pewarnaan Gram Bakteri	41
4.6.4	Alat dan Bahan untuk Uji Dilusi Tabung	41
4.7	Rancangan Operasional Penelitian	42
4.7.1	Pembuatan Ekstrak Sirih Merah	42
4.7.2	Identifikasi Bakteri <i>Salmonella</i> Typhi	43
4.7.2.1	Pewarnaan Gram.....	43
4.7.2.2	Penanaman pada BSA (<i>Bismuth Sulfite Agar</i>).....	44
4.7.2.3	Tes Identifikasi Bakteri dengan Microbact 12A	44
4.7.3	Perbenihan Cair Bakteri Kepadatan 10^6 bakteri/ml.....	45
4.7.4	Uji Sensitivitas Antimikroba	46
4.7.5	Alur Kerja Penelitian.....	48
4.8	Analisis Data.....	50

BAB 5	HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA	
5.1	Hasil Penelitian	51
5.1.1	Ekstrak Daun Sirih Merah	51
5.1.2	Hasil Identifikasi S.Typhi.....	51
5.1.3	Hasil Pengamatan KHM	54
5.1.4	Hasil Pengukuran KBM.....	56
5.2	Analisis Data	61
BAB 6	PEMBAHASAN	
6.1	Pembahasan Hasil Penelitian	67
6.2	Implikasi terhadap Bidang Kedokteran	69
6.3	Keterbatasan Penelitian	70
BAB 7	KESIMPULAN DAN SARAN	
7.1	Kesimpulan	70
7.2	Saran	71
DAFTAR PUSTAKA.....		72
LAMPIRAN		77



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Mikroskopis Identifikasi Pewarnaan Gram <i>S.Typhi</i>	11
Gambar 2.2	Morfologi Daun Sirih Merah	23
Gambar 3.1	Kerangka Konsep Penelitian	35
Gambar 4.1	Alur Penelitian.....	49
Gambar 5.1	Mikroskopis Identifikasi Pewarnaan Gram <i>S.Typhi</i>	52
Gambar 5.2	Identifikasi pada Medium <i>Bismuth Sulfite Agar</i>	52
Gambar 5.3	Identifikasi pada Medium <i>MacConkey</i>	53
Gambar 5.4	Hasil Tes Microbact 12A	54
Gambar 5.5	Perbandingan Tingkat Kekeruhan pada tiap Konsentrasi	55
Gambar 5.6	Pertumbuhan Koloni <i>S.Typhi</i> pada Medium NAP	57
Gambar 5.7	Grafik Pertumbuhan Jumlah Koloni <i>S.Typhi</i>	60
Gambar 5.8	Grafik Regresi Konsentrasi Ekstrak terhadap Jumlah Koloni.....	65

DAFTAR TABEL

Tabel 5.1	Jumlah Koloni S.Typhi pada Berbagai Konsentrasi	57
Tabel 5.2	Ringkasan Nilai Signifikansi Mann Whitney	64



DAFTAR SINGKATAN

KHM = Kadar Bunuh Minimal

KHM = Kadar Hambat Minimal

NAP = *Nutrient Agar Plate*

MDR = *Multiple Drug Resistent*

OI = *Original Inoculum*

KK = Kontrol Kuman

KB = Kontrol Bahan

KN = Kontrol Negatif

KP = Kontrol Positif



ABSTRAK

Rahmayanti, Y. 2014. **Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) Sebagai Antibakteri terhadap *Salmonella Typhi* secara *in Vitro***. Tugas Akhir, Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing : (1) Dr. Dra. Sri Winarsih, Apt., M.Si. (2) Aswaty Nur, S.Si., M.Kes.

Salmonella Typhi adalah salah satu patogen penyebab penyakit demam tifoid. *S.Typhi* dilaporkan telah resisten terhadap beberapa obat antibakteri sehingga perlu dilakukan penelitian untuk menemukan alternatif terapi lain. Salah satu alternatif terapinya adalah menggunakan bahan alami sebagai bahan antibakteri, yaitu daun sirih merah (*Piper crocatum*). Kandungan aktif yang diduga bermanfaat sebagai antibakteri adalah flavonoid, alkaloid, tanin, dan minyak atsiri. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi antibakteri ekstrak etanol daun sirih merah terhadap *S.Typhi*. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan menggunakan dilusi tabung untuk menentukan KHM dan KBM. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat *S.Typhi* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang, Jawa Timur. Konsentrasi yang digunakan dalam penelitian yaitu 26%, 28%, 30%, 32%, 34%, dan 36% dengan empat kali pengulangan, sedangkan konsentrasi *S.Typhi* adalah 10^6 CFU/ml. Hasil uji statistik menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun sirih merah, secara signifikan dapat menghambat pertumbuhan *S.Typhi* (Kruskal Wallis, $p < 0.05$) dan terdapat hubungan antara peningkatan konsentrasi ekstrak etanol daun sirih merah dengan penurunan jumlah pertumbuhan koloni *S.Typhi* ($R = -0.992$). KHM ekstrak etanol daun sirih merah terhadap *S.Typhi* adalah 30% dan KBM-nya adalah 36%. Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun sirih merah memiliki efek antibakteri terhadap *S.Typhi* secara *in vitro*.

Kata kunci : daun sirih merah (*Piper crocatum*), antibakteri, *Salmonella Typhi* .

ABSTRACT

Rahmayanti, Y. 2014. **Ethanollic Extract of Red Betel Leaves (*Piper crocatum*) As An Antibacterial Againts *Salmonella Typhi in Vitro***. Final Assignment, Medical Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: (1) Dr. Dra. Sri Winarsih, Apt, M.Si. (2) Aswaty Nur, S.Si, M.Kes.

Salmonella Typhi is one of the pathogen cause typhoid fever. S.Typhi is reported resistant to the several antimicrobial drugs and need to be conducted to find other alternative therapy. One of alternative therapy is the use of natural material of the *Piper crocatum* leaves. The active substance suspected in the *Piper crocatum* leaves having antibacterial effect are, flavonoid, alkaloid, tanin, and atsiri oil. The experiment aimed to understanding the antibacterial effect of ethanolic extract *piper crocatum* leaf againts S.Typhi. The experiment of laboratoric experimental is used tube dilution test to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericide Concentration (MBC). The sample used in this experiment was S.Typhi obtained from the laboratory of Microbiology, Faculty of Medicine, Brawijaya University, Malang. East of Java. The extract concentration used were 26%, 28%, 30%, 32%, 34%, and 36% with four repetition, while the concentration of S.Typhi was 10^6 CFU/ml. The statistic analysis showed that ethanolic extract of *Piper crocatum* can inhibit the growth of S.Typhi significantly (Kruskal Wallis, $p < 0.05$) and there was a relationship between the increasing of ethanolic extract of *Piper crocatum* leaves with the decreasing of S.Typhi colony number ($R = -0.992$). MIC of ethanolic extract of *piper crocatum* leaves againts S.Typhi was 30% and MBC was 36%. In conclusion, that the ethanolic extract of *Piper crocatum* leaves has an antibacterial effect againts S.Typhi *in vitro*.

Keywords : antibacterial, *Salmonella Typhi*, *Piper crocatum* Leaf

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Salmonella Typhi merupakan bakteri penyebab terjadinya demam tifoid atau *typhus abdominalis* (Gupte, 2006). Demam tifoid memiliki gejala seperti demam yang bersifat bertahap makin meningkat setiap hari, pusing, mual, menurunnya nafsu makan dan diare (Nasronudin, 2011). Infeksi S.Typhi biasanya berkaitan dengan masalah higienis dan sanitasi dari lingkungan. Infeksi S.Typhi adalah infeksi yang menular. Penularannya dapat melalui jalan oral yaitu melalui makanan dan minuman yang tidak higienis (terkontaminasi) sehingga akan masuk ke saluran pencernaan lalu menuju ke kelenjar getah bening dan masuk ke saluran darah (bakterimia) kemudian berkembang biak dan melakukan penyerangan ke berbagai organ (Listorti *et al.*, 2001).

Angka kejadian demam tifoid diketahui lebih tinggi pada negara sedang berkembang didaerah tropis seperti di Indonesia (Tjipto *et al.*, 2009). Indonesia merupakan salah satu dari 5 negara asia yang dianggap endemik demam tifoid. Insiden demam tifoid yang terjadi di Indonesia apabila ditinjau dari segi usia yang terbanyak pada usia 3 tahun sampai 15 tahun (WHO,2008). Angka kejadian demam tifoid di Indonesia masih tinggi. Demam tifoid termasuk urutan ketiga dalam daftar penyakit terbanyak pada pasien rawat inap di Rumah Sakit. Kasus demam tifoid ada sekitar 55.098 kasus dengan CFR (*Case Fatality Rate*) sebesar 2,06% (Kemenkes RI, 2012). Demam tifoid sangat berbahaya karena jika tidak diobati dengan baik maka akan jatuh pada kondisi delirium, penurunan kesadaran, perdarahan usus, perforasi usus dan berujung pada kematian

(Brusch *et al.*, 2012). Meskipun gejala demam tifoid mulai hilang, orang yang terinfeksi masih berpotensi membawa *S.Typhi*. Dengan demikian, penyakit bisa kembali menginfeksi, atau bisa menularkan ke orang lain (Judarwanto, 2012).

Untuk mengatasi masalah infeksi bakteri tersebut biasanya digunakan terapi dengan pemberian obat antibiotik. Beberapa pemberian antibakteri telah membuat bakteri menjadi kebal dan tidak efektif lagi dalam membunuh bakteri. Hal tersebut dikarenakan bakteri terus berkembang dan melawan obat antimikroba sehingga dapat tetap bertahan hidup dalam tubuh manusia (Alam, 2011).

Laporan pertama terkait resistensi *S.Typhi* terhadap *chloramphenicol* adalah pada tahun 1974. Dua puluh tahun kemudian dilaporkan telah terjadi resistensi terhadap kloramfenikol, ampicillin, dan sulfametoxazol-trimetoprim, atau dikenal sebagai MDR (*Multi-Drug Resistance*) *S.Typhi*. Banyak dilaporkan resistensi terhadap lini kedua terapi *S.Typhi* yaitu sefalosporin generasi ke-3 dan golongan quinolon (Alam, 2011). Sedangkan Laporan resistensi terhadap lini pertama pengobatan demam tifoid di Indonesia telah dilaporkan sejak tahun 1998 (Hadinegoro, 1998).

Penelitian-penelitian untuk menemukan obat baru yang efektif terhadap bakteri banyak dilakukan dan kebanyakan dari penelitian tersebut memanfaatkan bahan alami. Didalam bahan alami disebutkan terdapat sejumlah kandungan kimia berguna sebagai bahan antibakteri yang efektif terhadap bakteri dan aman bagi manusia. Masyarakat saat ini juga sudah banyak memanfaatkan bahan alami atau herbal sebagai pengobatan alternatif (Wahyuningsih, 2011).

Indonesia merupakan negara tropis dan mempunyai beraneka ragam jenis tumbuhan yang dapat dimanfaatkan sebagai pengobatan. Salah satu

tanaman obat yang banyak tumbuh di Indonesia dan akhir-akhir ini banyak dimanfaatkan adalah sirih merah (*Piper crocatum*). Sirih merah yang dikenal sebagai tanaman hias ternyata bermanfaat dalam pengobatan berbagai macam penyakit. Seperti untuk pengobatan diabetes militus, batu ginjal, hepatitis, mencegah stroke, kanker, hipertensi, maag, dan nyeri sendi (Sudewo, 2006).

Sirih merah mengandung senyawa kimia flavonoid, alkaloid, polifenol, tanin, dan minyak atsiri yang diketahui memiliki sifat antibakteri terhadap bakteri Gram positif maupun bakteri Gram negatif. Senyawa flavonoid dan polifenolat bersifat antioksidan, antidiabetik, antikanker, dan antiseptik, sedangkan senyawa alkaloid mempunyai sifat anti neoplastik yang ampuh dalam menghambat kanker (Juliantina *et al.*, 2009). Meskipun *S.Typhi* juga tergolong bakteri Gram negatif namun masih belum ada penelitian yang membuktikan efek antimikroba sirih merah terhadap *S.Typhi* secara tertulis. Selain itu, *S. Typhi* merupakan golongan bakteri yang ditetapkan sebagai acuan atau standar bakteri untuk mengevaluasi potensi disinfektan untuk golongan Gram negatif sedangkan untuk Gram positif adalah *Streptococcus Aureus* (Mehrota, 2009)

Berdasarkan uraian diatas diduga bahwa sirih merah memiliki potensi sebagai antibakteri terhadap *S.Typhi* selain karena harga yang cukup terjangkau dan aman. Oleh karena itu, ingin diteliti lebih lanjut tentang kemungkinan sirih merah sebagai antibakteri alternatif terhadap *S.Typhi*, yaitu dengan menggunakan ekstrak etanol sirih merah (*Piper crocatum*) kemudian diuji kepekaan bakteri *S.Typhi* terhadap ekstrak etanol sirih merah secara *in-vitro*. Dan penelitian ini diharapkan sirih merah nantinya dapat digunakan sebagai alternatif pengobatan untuk penyakit infeksi yang ditimbulkan oleh *S.Typhi*.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah ekstrak daun sirih merah efektif sebagai antibakteri terhadap *S.Typhi* secara *in-vitro*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan bahwa ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum*) efektif sebagai antibakteri terhadap *S.Typhi*.

1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus penelitian ini adalah :

- 1 Mengetahui hubungan konsentrasi ekstrak daun sirih merah dengan tingkat pertumbuhan *S.Typhi* secara *in vitro*.
- 2 Mengetahui Kadar Hambat Minimum (KHM) ekstrak daun sirih merah terhadap *S.Typhi* secara *in vitro*.
- 3 Mengetahui Kadar Bunuh Minimum (KBM) ekstrak daun sirih merah terhadap *S.Typhi* secara *in vitro*.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademis

- 1 Memberi peluang kepada mahasiswa untuk menghasilkan karya ilmiah dan dalam masa yang sama dapat melatih mahasiswa dengan penelitian laboratorik sebagai persiapan kompetensi di masa mendatang.
- 2 Memberikan informasi sebagai dasar penelitian lebih lanjut mengenai efek antibakteri daun sirih merah.
- 3 Mengembangkan ilmu pengetahuan mengenai penggunaan bahan alam sebagai bahan antibakteri.

1.4.2 Manfaat Klinis

- 1 Memperoleh pengobatan alternatif yang murah bahan bakunya, aman dan sangat bermanfaat bagi masyarakat luas terutama pada pengobatan terapi infeksi S.Typhi.
- 2 Menambah koleksi bahan antibakteri yang berasal dari bahan alami.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Salmonella Typhi*

2.1.1 Morfologi *Salmonella Typhi*

Salmonella Typhi merupakan bakteri gram-negatif. Bakteri ini berbentuk batang dengan diameter 0,7-1,5 μm dan panjangnya 2-5 μm . *S.Typhi* merupakan bakteri fakultatif anaerob (mampu bertahan hidup dengan atau tanpa oksigen). Motilitas bakteri ini bergantung pada *peritrichous flagella* (Hammack, 2012). *Salmonella* resisten terhadap bahan kimia tertentu, misalnya hijau brilian, natrium tetrasetat, natrium deoksikolat, yang dapat menghambat bakteri enterik lain. Oleh karena itu, senyawa-senyawa tersebut berguna untuk inklusi isolat salmonella dari feses pada medium (Brooks *et al.*, 2007). Bakteri ini tidak berspora, tidak berkapsul, memfermentasikan glukosa, mereduksi nitrat menjadi nitrit, dan mensintesis flagella peritrikus dalam keadaan motil (Fox *et al.*, 2006).

Salmonella digolongkan kedalam bakteri gram negatif sebab *salmonella* adalah jenis bakteri yang tidak dapat mempertahankan zat metal ungu pada pewarnaan gram dan semua gram negatif berwarna merah atau merah muda. Sifat patogen bakteri ini berkaitan dengan komponen pada dinding sel gram negatif terutama lapisan lipopolisakarida atau endotoksin (Hammack, 2012).

2.1.2 Diagnosis Laboratorik *Salmonella Typhi*

Identifikasi *S.Typhi* secara garis besar yaitu jika ada produksi fermentasi *non-lactose* koloni pucat pada agar *MacConkey*. Pada medium *Bismuth Sulfite Agar* tampak *black jet colonies* (koloni hitam). Anaerogenik (fermentasi berupa glukosa, manitol, dan maltosa, hanya membentuk asam tanpa ada gas), motil,

katalase positif, uji oksidasi negatif, H₂S positif, indole negatif serta mengalami aglutinasi positif dengan antiserum tifoid O (group D) (Parija, 2009).

2.1.2.1 Reaksi Serologis

Teknik serologis digunakan untuk mengidentifikasi biakan yang tidak diketahui dengan serum yang telah diketahui dan juga dapat menentukan titer antibodi pasien yang tidak diketahui penyakitnya. Ada 2 tes aglutinasi yang dapat dilakukan yaitu tes aglutinasi pada slide dan tes aglutinasi pengenceran tabung (tes widal) (Brooks *et al.*, 2007).

Tes Aglutinasi pada slide, pada pemeriksaan ini, serum yang telah diketahui dan dibiakan yang tidak diketahui dicampur diatas slide. Bila terjadi gumpalan, dapat dilihat dalam beberapa menit. Terdapat alat yang meng-aglutinasi dan menentukan serogroup dari salmonella melalui antigen O-nya: A, B, C₁, C₂, D, dan E yang dijual bebas di pasaran. Serogroup D merupakan serogroup *S.Typhi* (Brooks *et al.*, 2007). Jika suspek *S.Typhi* adalah bila tidak ada gas yang dibentuk dari glukosa, dan identifikasi *S.Typhi* ditegakkan oleh adanya aglutinasi dengan serum antigen D (Parija, 2009).

Tes aglutinasi pengenceran tabung (tes widal), aglutinasi serum meningkat tajam selama minggu kedua dan ketiga pada infeksi *Salmonella*. Sedikitnya, 2 spesimen serum yang diambil dengan selang waktu 7-10 hari, dibutuhkan untuk membuktikan adanya kenaikan titer antibodi. Tes widal adalah untuk menegakan diagnosa terhadap infeksi yang disebabkan oleh *S.Typhi* (demam tifoid). Pengenceran serial (dua kali lipat) dari serum yang tidak diketahui diuji dengan antigen salmonella (Brooks *et al.*, 2007). Prinsipnya adalah reaksi aglutinasi, yaitu terjadinya penggumpalan antara antibodi di dalam serum

penderita dengan reagen yang berisi antigen H dan antigen O dari kuman S.Typhi (Parija, 2009).

Interprestasi hasilnya adalah sebagai berikut:(Brooks *et al.*, 2007):

1. Titer O, yang tinggi atau meningkat ($\geq 1:160$) menandakan adanya infeksi aktif.
2. Titer H, yang tinggi atau meningkat ($\geq 1:160$) menunjukkan riwayat imunisasi atau infeksi di masa lampau.
3. Titer antibodi yang tinggi terhadap antigen Vi timbul pada beberapa carrier.

Hasil pemeriksaan serologis pada infeksi *Salmonella* harus diinterpretasikan dengan hati-hati. Kemungkinan adanya antibodi yang bereaksi saling silang, membatasi penggunaan serologi dalam diagnosis infeksi salmonella (Brooks *et al.*, 2007).

2.1.2.2 Reaksi Biokimia

S.Typhi merupakan bakteri gram negatif yang bersifat fakultatif anaerob. Suhu optimal tumbuh adalah 37°C. D-Glukosa dan karbohidrat lainnya dikatabolisme sehingga memproduksi asam dan biasanya gas (Bergey's *et al.*, 1994).

Selanjutnya dilakukan tes IMViC (indole, methyl-red, Voges-proskauer, citrate), tes urease, dan tes motilitas. Tes biokimia menunjukkan oksidase negatif, katalase positif, indole dan Voges-Proskauer negatif, methyl red dan Simmons citrate positif. Tes lain menunjukkan lysine dan ornithine decarboxylase positif dan bervariasi pada reaksi arginin dyhidrolase. S. Typhi memproduksi H₂S, tidak menhidrolisis urea, tumbuh pada KCN dan bervariasi dalam penggunaan malonate. Bakteri ini memproduksi nitrat. Karbohidrat yang biasa difermentasikan

meliputi L-arabinose, maltose, D-manitol, L-rhamnose, D-sorbitol, dan D-xylose (Bergey's *et al.*, 1994).

2.1.2.3 Perbenihan

2.1.2.3.1 Spesimen

Darah yang diperlukan untuk kultur harus diambil secara berulang. Jika terdapat demam enterik dan septisemia, kultur darah biasanya positif pada minggu pertama penyakit. Kultur urin biasanya positif dalam minggu kedua (Dzen *et al.*, 2010).

Kultur sumsum tulang sangat sensitif, sebagaimana di beberapa kasus positif tapi bisa saja kultur darah negatif. Hasil positif juga bisa di pengaruhi oleh konsumsi antibiotik (Parija, 2009).

Spesimen tinja juga harus diambil berulang. Pada demam enterik hasil positif didapat setelah dua atau tiga minggu penyakitnya. Kultur positif berasal dari spesimen *duodenal drainage* menunjukkan adanya *Salmonella* dalam saluran (Dzen *et al.*, 2010). Kultur dari spesimen darah sering digunakan dalam prosedur penetapan diagnosis demam tifoid (Parija, 2009).

2.1.2.3.2 Metode Bakteriologi untuk Isolasi *Salmonella*

Pembiakan pada medium diferensial, yaitu menggunakan medium EMB, MacConkey, atau deosikolat memungkinkan deteksi cepat organisme yang tidak memfermentasikan laktosa (*Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, dan lain-lain). Medium ini juga dapat menghambat organisme Gram positif. Pada agar MacConcey, salmonella akan memproduksi *Pale colourless colonies* (koloni berwarna

pucat), karena tidak memfermentasikan laktosa (Brooks *et al.*, 2007; Dzen *et al.*, 2010; Parija, 2009).

Medium Bismuth Sulfite (*Wilson and Blair's bismuth sulfite*) memungkinkan deteksi cepat khusus *Salmonella* yang membentuk koloni hitam atau *black jet colony* disertai *metallic sheen* (karena produksi H₂S) merupakan pembiakan pada medium selektif (Dzen *et al.*, 2010 : Parija, 2009)

Pembiakan medium yang diperkaya, menggunakan (biasanya) spesimen tinja yang ditanam pada medium selenit F atau kaldu tetrasonat. Kedua medium tersebut menghambat replikasi normal flora usus dan memungkinkan multiplikasi *Salmonella*. Setelah inkubasi selama 1-2 hari, kemudian ditanam pada medium diferensial dan medium selektif (Dzen *et al.*, 2010)

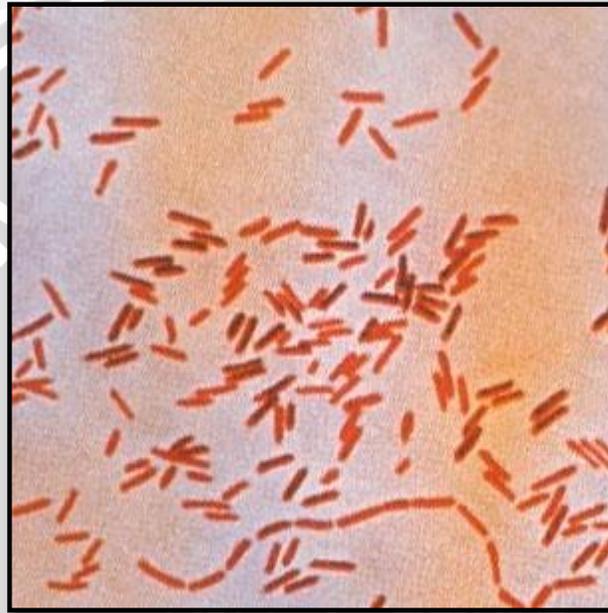
XLD (*Xylose Lysine Deoxycholate agar*) adalah medium selektif untuk mengisolasi *Salmonella Spp.* Pada medium ini akan menghasilkan *pink colonies* dengan *Black centers* dimana ini merupakan hasil dari produksi H₂S (Parija, 2009). Pada medium selektif *Salmonella-Shigella Agar (SSA)*, pertumbuhan *Salmonella* dan *Shigella* melebihi *Enterobacteriaceae* lain (Brooks *et al.*, 2009).

2.1.3 Taksonomi *Salmonella Typhi*

Taksonomi *S. Typhi* adalah sebagai berikut: (Todar, 2008)

- Kingdom : Bacteria
- Phylum : Proteobacteria
- Class : Gamma Proteobacteria
- Order : Enterobacteriales

Family : Enterobacteriaceae
Genus : Salmonella
Spesies : *Salmonella enterica* subspecies *enteric* serotipe Typhi
atau *Salmonella* Typhi



Gambar 2.1. S.Typhi, pewarnaan Gram negatif, berbentuk batang (Todar,2008).

2.1.4 Struktur Antigen *Salmonella* Typhi

S.Typhi memiliki antigen somatik O, flagella A, capsular Vi (Bergeys *et al.*, 1994.). Antigen capsular Vi peranannya kecil dalam klasifikasi, tetapi mempunyai kepentingan patogenitas. Antigen Vi dapat mencegah destruksi intraseluler didalam sel hospes. Antigen ini jarang ditemukan pada serotipe *Salmonella* lain (Dzen *et al.*, 2010).

Antigen O dan H adalah antigen utama yang digunakan untuk penggolongan *Salmonella*. Antigen O mirip dengan antigen O dari *Enterobacteriaceae* yang lain, tetapi antigen H berbeda karena adanya

mekanisme *diphase*. Antigen H dapat muncul sebagai salah satu atau dua dari fase antigenik mayor yaitu fase-1 yang merupakan fase yang spesifik; atau fase-2 yang merupakan fase nonspesifik. Antigen H fase-1 dimiliki oleh hanya beberapa organisme dan bereaksi hanya dengan antisera homolog, sedangkan antigen H fase 2 dimiliki oleh banyak mikroorganisme dan bereaksi dengan antisera heterolog (Dzen *et al.*, 2010).

Antigen O merupakan rantai samping dari unit-unit gula yang diproyeksikan dari lapisan terluar lipopolisakarida dinding sel bakteri (Parija, 2009). Antigen ini bersifat hidrofilik dan memungkinkan bakteri untuk membentuk suspensi yang stabil dan homogen pada larutan salin (Wray *et al.*, 2000). Antigen O bersifat tahan panas, tidak terpengaruh oleh pemanasan pada suhu 100°C selama 2-5 jam, stabil dalam alkohol, pada perlakuan dengan 96% etanol pada suhu 37°C selama 4 jam (Parija, 2009).

Antigen H terdapat pada protein flagella. Hanya organisme yang berflagella yang memiliki antigen H. Antigen H pada *Salmonella* adalah antigen yang spesifik, karena dapat berubah-ubah menjadi antigen H fase 1 atau fase 2. Organisme tersebut dapat menggunakan antigen ini untuk mengelabui respon imun (Parija, 2009).

2.1.5 Penentu Patogenitas *Salmonella* Typhi

Salmonella adalah organisme yang memproduksi berbagai faktor virulensi. Termasuk antigen permukaan, faktor-faktor yang berperan pada invasi, endotoksin, sitotoksin, dan enterotoksin. Peranan faktor virulensi tersebut berbeda-beda dalam patogenesis infeksi *Salmonella*, tergantung pada serotipe *Salmonella* yang menyebabkan infeksi, karena *Salmonella* dapat menimbulkan sindroma yang berbeda pada hospes yang lain. Misalnya *S.Typhi* menimbulkan

penyakit pada manusia, sedangkan pada hewan tidak menimbulkan penyakit bila diberikan peroral. *Salmonella* memiliki kemampuan untuk hidup secara intraseluler dan juga mampu tumbuh dalam lingkungan ekstraseluler maka organisme ini disebut sebagai *facultative intracellular parasites* (Dzen *et al.*, 2010).

2.1.5.1 Faktor Permukaan

S. Typhi dapat menyebabkan penyakit pada manusia, tetapi tidak pada hewan apabila rute infeksi melalui peroral. Respon hospes yang berbeda ini kemungkinan disebabkan perbedaan kemampuan berbagai organisme tersebut untuk hidup secara intraseluler dalam sel fagosit. Kemampuan *Salmonella* untuk menempel pada reseptor sel hospes kemungkinan karena adanya *O antigenic side chains*, atau pada serotipe Typhi oleh karena adanya antigen Vi. Perbedaan dalam kecepatan fagisitosis juga dipengaruhi oleh adanya antigen Vi. Fisiologi dari antigen Vi belum ditentukan, namun telah ditunjukkan bahwa galur Typhi dengan antigen Vi tidak di fagisitosis oleh sel-sel PMN secepat organisme tanpa antigen Vi, karena penurunan ikatan C3b oleh antigen Vi (Dzen *et al.*, 2010).

Pada *S. Typhi* disebutkan adanya fimbria tipe-1 dan diduga satu-satunya molekul adhesin pada *S. Typhi*. Namun demikian, suatu penelitian yang lain menyebutkan bahwa *S. Typhi* memiliki adhesin lain yang bukan fimbria dan adhesin tersebut berasal dari *Outer Membran Protein* (OMP) dengan berat molekul sekitar 36kDa, yang kemudian disebut AdhO36. AdhO36 ini bersifat imunogenik dan mampu

menginduksi respon imun mukosal dengan terbentuknya sisa protektif pada mencit (Dzen *et al.*, 2010).

2.1.5.2 Endotoksin

Endotoksin bertanggung jawab atas banyaknya manifestasi sistemik dari penyakit yang disebabkan oleh *Salmonella* (Parija, 2009). Endotoksin berperan pada patogenesis infeksi *Salmonella*, terutama pada stadium bakteremia dari demam enterik. Dalam hal ini, endotoksin bertanggung jawab atas terjadinya demam yang tampak pada penderita penyakit ini. Endotoksin (senyawa LPS) pada awalnya berikatan dengan protein tertentu dalam sirkulasi, kemudian mengadakan interaksi dengan reseptor pada makrofag dan monosit serta sel-sel RES. IL-1, TNF, dan sitokin yang lain dilepaskan, serta komplemen dan rangkaian koagulasi diaktifkan (Dzen *et al.*, 2010).

2.1.5.3 Enterotoksin

Enterotoksin perannya dalam patogenesis penyakit belum terlalu jelas. Enterotoksin pada *Salmonella* mirip dengan enterotoksin yang ada pada *E. Coli*. Target utama dari enterotoksin *E. Coli* adalah kolon, sedangkan enterotoksin pada *Salmonella* adalah usus kecil (Dzen *et al.*, 2010).

2.1.5.4 Sitotoksin

Salmonella juga memproduksi sitotoksin yang berbeda dengan enterotoksin. Toksin ini tampaknya berperan pada membran terluar bakteri, dimana toksin ini berperan penting dalam invasi dan pertahanan terhadap destruksi sel, namun serotipe Typhi memproduksi sitotoksin

paling sedikit. Perbedaan ini mungkin disebabkan oleh perbedaan spektrum penyakit yang disebabkan oleh berbagai serotipe *Salmonella*. Mekanisme kerja dari sitotoksin ini adalah sebagai penghambat sintesis protein pada biakan sel Vero (Dzen *et al.*, 2010).

2.1.5.5 Daya Invasi

Salmonella yang virulen bisa menembus lapisan sel epitel usus halus. Namun demikian, *Salmonella* tidak hanya tinggal dalam lapisan epitel, melainkan bisa mengadakan penetrasi ke jaringan subepitelial. Bukti-bukti baru menunjukkan bahwa organisme ini menyintesis protein-protein baru bila ditumbuhkan bersama-sama sel mamalia dan protein baru ini diperlukan untuk perlekatan dan penetrasi pada mamalia tersebut. Kemampuan untuk tetap hidup dalam makrofag disebabkan oleh produk protein yang bisa mempertahankan diri terhadap mekanisme pembunuhan bergantung oksigen maupun yang tidak bergantung oksigen dari sel fagosit profesional. Mekanisme yang bergantung oksigen termasuk produksi hidrogen peroksida dan superoksida, sedangkan yang tidak bergantung oksigen termasuk produksi bahan antibakterial, yaitu suatu protein kationik yang disebut defensins. Juga enzim-enzim misalnya *lysozomal enzymes*. Kontrol genetik dari protein yang memproteksi bakteri terhadap defensins terletak pada *phoP locus* (Dzen *et al.*, 2010).

2.1.6 Patogenesis Infeksi *Salmonella Typhi*

Tingkat keparahan penyakit pada individual yang terinfeksi oleh salmonella bergantung pada faktor-faktor virulensi dari strain yang menginfeksi serta pada host manusia. Contohnya pada orang di usia ekstrim seperti orang

sangat muda atau sangat tua berada pada resiko meningkat pada keadaan bakterimia. Sama halnya dengan orang yang imunitas tubuhnya rendah, keganasan, dan penyakit lupus juga berisiko tinggi terhadap bakterimia (Parija, 2009).

Bakteri *S.Typhi* masuk kedalam tubuh manusia melalui oral yaitu dengan cara ditularkan melalui makanan yang terkontaminasi *S.Typhi*. Bakteri yang masuk sebagian akan dimusnahkan dalam lambung oleh asam lambung tetapi ada sebagian yang lolos menuju usus dan berkembang biak. Jika respon imun humoral mukosa usus (IgA) kurang baik, maka bakteri ini akan menembus sel epitel (terutama sel M, dimana sel-M atau microfold cell merupakan epitel usus yang banyak mengandung limfosit, sedikit sel goblet, berbentuk kuboid serta memiliki lipatan-lipatan atau microfold dan bukan sel mikrovili) dan selanjutnya menuju lamina propia. Dilamina propria bakteri berkembang biak dan kemudian difagosit oleh makrofag. Didalam makrofag sendiri, bakteri terus berkembang biak dan menuju plak payeru ileum distal, lalu menuju aliran kelenjar getah bening mesentrika, duktus torasikus dan kemudian masuk kedalam sirkulasi darah (bakterimia pertama bersifat asimtomatik) dan menyebar keseluruh organ retikuloendothelial tubuh (terutama hati dan limpa). Diorgan-organ tersebut bakteri akan keluar dari makrofag dan berkembang biak diluar sel dan masuk ke sirkulasi darah (bakterimia kedua yang bersifat simtomatik). Didalam hati, bakteri masuk ke kandung empedu melalui duktus hepaticus kanan dan duktus hepaticus kiri, lalu melewati duktus hepaticus komunis (merupakan gabungan duktus hepaticus kanan dan kiri) kemudian terdapat percabangan ke kandung empedu yaitu melalui duktus sistikus, bakteri berkembang biak dikandung empedu, dan bersama cairan empedu di ekskresikan ke dalam lumen usus

melalui duktus koledokus (merupakan gabungan dari duktus sistikus yang berasal dari kandung empedu dan duktus hepatikus komunis yang berasal dari hepar), selanjutnya duktus koledokus bersatu dengan duktus pankreatikus utama dimana kedua duktus ini akan bersama-sama bermuara di papila vateri yang berperan sebagai pintu keluar menuju lumen duodenum dan diatur oleh klep yang disebut sfingter oddi. Sebagian bakteri akan dikeluarkan melalui feses dan sebagian kembali menembus usus dan masuk sirkulasi darah. Kemudian terjadi pelepasan mediator inflamasi dan kemudian akan menimbulkan gejala reaksi inflamasi sistemik akibat makrofag yang hiperaktif. Selain menimbulkan gejala inflamasi sistemik, hipereaktif makrofag juga menyebabkan induksi reaksi hipersensitivitas tipe lambat, hiperplasia jaringan organ dan nekrosis organ. Perdarahan saluran cerna dapat terjadi karena adanya nekrosis dan hiperplasi akibat akumulasi sel-sel mononuclear di dinding usus. Proses patologis jaringan limfoid ini dapat berkembang hingga menembus lapisan mukosa dan otot dan dapat mengakibatkan perforasi (Widodo, 2009 ; Widjaja, 2009).

2.1.7 Manifestasi Klinis *Salmonella*

Salmonella menimbulkan tiga macam penyakit utama pada manusia yaitu demam enterik (demam tifoid), bakterimia dengan lesi fokal, dan enterokolitis (Murray *et al.*, 2013).

2.1.7.1 Demam Enterik (Demam Tifoid)

Karier *S.Typhi* merupakan satu-satunya sumber dari organisme ini. Karier *S.Typhi* adalah penderita yang baru sembuh dari sakit yang mengekskresikan mikroorganisme ini untuk waktu yang pendek atau pada kronik karier dapat mengeluarkan organisme ini sampai lebih dari satu tahun. Kebanyakan karier *S.Typhi* adalah wanita (Chaurasia *et al.*, 2009).

S.Typhi yang tertelan akan mencapai usus halus, masuk ke aliran limfatik dan kemudian masuk ke aliran darah. Organisme ini dibawa oleh darah ke berbagai organ, termasuk usus. S.Typhi bermultiplikasi di jaringan limfoid usus dan disekresikan didalam feses. S.Typhi menimbulkan gejala demam, malaise, sakit kepala, konstipasi, bradikardi, dan mialgia (Brooks *et al.*, 2007).

2.1.7.2 Bakterimia (Septisemia) dengan lesi fokal

Semua spesies *Salmonella* dapat menyebabkan bakterimia, dan yang tersering biasanya adalah *S. Choleraesuis*, *S. Paratyphi*, dan *S.Typhi*. pasien anak-anak dan pasien geriatri serta pasien dengan keadaan HIV memiliki kemungkinan besar terkena keadan bakterimia. Infeksi supuratif lokal seperti osteomyelitis, abscess, endocarditis, arthritis, dan meningitis dapat terjadi pada 10% pasien. (Greenwood *et al.*, 2012). Septisemia ditandai dengan demam, menggigil, anoreksia, dan anemia. Septisemia ini berhubungan dengan adanya osteomyelitis pada penderita dengan riwayat *sickle cell anemia*. Bakterimia kronik juga dapat dijumpai pada penderita dengan schistosomiasis (Dzen *et al.*, 2010).

2.1.7.3 Enterokolitis (Gastroenteritis)

Gastroenteritis atau enterokolitis merupakan infeksi pada kolon dan biasanya terjadi setelah 18-24 jam setelah masuknya organisme salmonella (Dzen *et al.*, 2010). Infeksi *Salmonella* merupakan infeksi yang sering terjadi, biasanya di sebabkan oleh serotipe *typhimurium* dan *enteritidis*. Delapan hingga 48 jam setelah tertelannya salmonela, timbul mual, sakit kepala, muntah, dan diare hebat, dengan beberapa leukosit

didalam feses (Brooks *et al.*, 2007). Umumnya penyakit ini bersifat sembuh secara spontan (*self limited*), berakhir setelah 2-5 hari. Pada kebanyakan kasus, penderitanya tidak memerlukan perhatian medis dan gejala-gejala tersebut sering disebut sebagai *stomach flu*. Pada kasus berat yang terjadi pada bayi dan orang tua, memerlukan perhatian akan kemungkinan terjadi dehidrasi dan ketidakseimbangan elektrolit (Dzen *et al.*, 2010). Gejala lain kadang disertai dengan keram perut, myalgia, dan nyeri kepala. Demam yang jarang melebihi 39°C, terjadi pada kira-kira setengah dari pasien yang terinfeksi. Diagnosis laboratorinya dibuat dengan mengisolasi *Salmonella* yaitu mengkultur menggunakan spesimen feses (Parija, 2009).

2.1.8 Diagnosis Penyakit Demam Tifoid

Selama minggu pertama infeksi, gejalanya adalah lethargi, demam, malaise dan nyeri-nyeri tubuh lain. Konstipasi lebih sering terjadi daripada diare. Selama waktu ini, *S.Typhi* mengadakan penetrasi ke dalam dinding usus dan menginfeksi sistem limfatik regional serta masuk ke peredaran darah dan menginfeksi sistem retikuloendothelial yang lain. Pada kedua tempat ini, *Salmonella* akan dimakan oleh sel monosit tapi tidak terbunuh (Dzen *et al.*, 2010).

Kemudian pada minggu kedua infeksi, *Salmonella* masuk kembali kedalam aliran darah, dan menyebabkan bakterimia yang kedua serta terjadi infeksi pada saluran empedu dan organ-organ lain. Penderita tampak sakit berat dengan panas tinggi 40°C dan sering disertai delirium (Dzen *et al.*, 2010). Kadang disertai malaise, bradikardi, dan myalgia. Demam meningkat sampai plateau yang tinggi dan terjadi pembesaran limfa dan hati. Meski jarang, pada

beberapa kasus terlihat bintik-bintik merah (*rose spots*) yang timbul sebentar pada kulit abdomen atau dada. Ditemukan sel darah putih dengan jumlah normal atau menurun (Brooks *et al.*, 2007). Organisme kembali menginfeksi traktus intestinalis dari kandung empedu dan bisa menyebabkan nekrosis dari *peyer's patches* (Dzen *et al.*, 2010).

Setelah minggu ketiga, penderita tampak lelah dan masih panas, tetapi menunjukkan adanya perbaikan apabila tidak mengalami komplikasi. Komplikasi yang terjadi dapat berupa perforasi usus, perdarahan hebat, tromboflebitis, kolesistitis, pneumonia, dan pembentukan abses. Dengan terapi penunjang beberapa pasien dapat sembuh dan sekitar 20% dari penderita akan mengalami kekambuhan, 2-10% dari penderita mengalami kematian (Dzen *et al.*, 2010).

Imunitas terhadap *S.Typhi* biasanya menimbulkan imunitas dalam tingkat tertentu. Infeksi ulang biasanya dapat terjadi tetapi biasanya manifestasi klinisnya lebih ringan daripada infeksi yang pertama kali. Adanya antibodi terhadap O dan Vi dalam sirkulasi berhubungan dengan resistensi terhadap penyakit dan infeksi. Namun kekambuhan dapat terjadi dalam 2-3 minggu setelah penyembuhan meskipun telah terbentuk antibodi. Antibodi IgA sekretorik dapat mencegah penempelan pada epitel usus (Brooks *et al.*, 2007).

2.1.9 Pengobatan infeksi *Salmonella Typhi* (Demam Tifoid)

Terapi antibakteri untuk infeksi *Salmonella* lini pertama adalah dengan menggunakan *ampicilin*, *trimetoprim-sulfametoxazol*, atau *cephalosporin* generasi ke-3 (Hawkey *et al.*, 2006). Selain itu, *chloramphenicol* juga merupakan obat pilihan untuk demam tifoid. *chloramphenicol* diberikan secara per oral atau secara IV 25mg/kg sampai 14-21 hari (Fauci *et al.*, 2008). Pada saat ini mulai muncul strain yang resisten terhadap kloramfenikol, ampicilin, dan trimetoprim-

sulfametoxazol atau dikenal sebagai MDR-Typhi (Moehariono *et al.*, 2012). Pengobatan antibiotik untuk MDR-Typhi menggunakan golongan fluoroquinolon, *extended spectrum cephalosporin* dan azitromycin (Mastroeni *et al.*, 2006). Beberapa penderita karier kronik dapat diobati hanya dengan menggunakan antibiotik ampisilin yang dikombinasikan dengan probenecid atau dengan menggunakan ciprofoxacin (Domino, 2007).

2.1.10 *Salmonella* terhadap resistensi dengan beberapa Antibiotik

Resistensi terhadap banyak obat yang ditransmisikan secara genetik oleh plasmid berbagai bakteri enterik merupakan masalah pada infeksi *Salmonella*. Uji sensitivitas merupakan pemeriksaan penunjang yang penting untuk memilih antibiotik yang sesuai (Brooks *et al.*, 2007).

Multidrug-Resistant Typhoid fever (MDRT) didefinisikan sebagai demam tifoid yang disebabkan oleh strain *S.Typhi* yang resisten terhadap semua terapi lini pertama yaitu *cholamphenicol*, *ampicillin*, dan *co-trimoxazole*. Dan sebagian besar kasus ditemukan diantara wisatawan yang kembali dari daerah yang telah menjadi endemik terhadap MDR strain *S.Typhi* (Zaki, 2011).

Mekanisme resistensi yang berkembang pada *S.Typhi* terbagi menjadi 2 jalur mekanisme. Mekanisme yang pertama diperantarai oleh plasmid bakteri (*Plasmid-mediated mechanism*). Plasmid merupakan potongan replikasi DNA yang mengandung ekstra kromosom dan dapat membawa serta mentransfer gen resistensi multiple dari satu bakteri ke bakteri lainnya. Plasmid dari kelompok ketidakcocokan (inc)HI1 merupakan vektor penting resistensi antibiotik pada *S.typhi*. Mekanisme yang kedua yaitu diperantarai oleh kromosom DNA (*Chromosomal DNA-mediated mechanism*). Pada proses tersebut terjadi mutasi pada regio DNA yang mengkode DNA-gyrase sehingga mengakibatkan

gangguan pada proses masuknya antimikroba ke dalam sel karena terjadi perubahan dan fungsi dari sel target dari antimikroba terganggu. Sehingga kerja antimikroba pada sel sasaran dalam menghambat pertumbuhan bakteri juga tidak efektif. Namun, mekanisme lain seperti penurunan permeabilitas dan penghabisan aktif agen antimikroba juga mungkin terlibat (Zaki, 2011).

2.2 Tanaman Sirih Merah (*Piper crocatum*)

2.2.1 Asal Usul Tanaman Sirih Merah

Tanaman sirih memiliki banyak spesies dan memiliki jenis yang beragam. Semua jenis tanaman sirih memiliki ciri yang hampir sama yaitu tanaman merambat dengan bentuk daun yang menyerupai hati dan bertangkai yang tumbuh selang-seling dari batangnya. Salah satu jenis tanaman sirih yaitu sirih merah. Sirih merah ini sudah digunakan sejak dulu oleh beberapa masyarakat, terutama yang berada di pulau Jawa. Sirih merah ini telah digunakan sebagai alternatif pengobatan untuk mengobati berbagai jenis penyakit. Sirih merah ini juga merupakan bagian dari acara adat. Penggunaan sirih merah ini digunakan dalam bentuk simplisia, dekok, maupun ekstrak (Hariana, 2008).

Sirih merah juga telah menjadi salah satu tanaman obat yang digunakan di Kraton Yogyakarta. Sirih merah merupakan tanaman yang tergolong mudah untuk ditemui karena Sirih merah merupakan salah satu tanaman hias. Sirih merah memiliki penampilannya yang menarik, dan permukaan daunnya merah keperakan dan mengkilap. Dari beberapa pengalaman, diketahui sirih merah memiliki khasiat untuk berbagai penyakit, misalnya seperti diabetes militus, hipertensi, batu ginjal, menurunkan kolestrol, mencegah stroke, asam urat, hipertensi, radang liver, radang prostat, keputihan, maag, kelelahan, nyeri sendi dan memperhalus kulit. Potensi sirih merah sebagai tanaman obat multifungsi

sangat besar sehingga perlu ditingkatkan dalam penggunaannya sebagai bahan obat modern (Hariana,2008).

2.2.2 Morfologi dan Identifikasi Tanaman Sirih Merah

Tanaman sirih merah tumbuh menjalar. Sirih merah memiliki batang bulat berwarna hijau keunguan dan tidak berbunga, panjang 2,1-6,2 cm. Daunnya tunggal, kaku dan bertangkai membentuk jantung dengan bagian atas meruncing, bertepi rata dan permukaan mengkilap atau tidak berbulu. Panjang daunnya mencapai 15-20 cm. Warna daun bagian atas berwarna hijau bercorak garis-garis merah jambu kemerahan. Bagian bawah daun berwarna hijau merah tua keunguan. Daunnya berlendir, memiliki rasa yang sangat pahit, dan beraroma wangi khas sirih. Batangnya bersulur dan beruas dengan jarak buku 5-10 cm. Pada tiap buku terdapat satu daun (Puji Astuti *et al.*, 2011).



Gambar 2.2 Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) (Mus, 2012).

2.2.3 Taksonomi Tanaman Sirih Merah

Kingdom : Plantae

Subkingdom : Tracheobionta

Super divisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Sub kelas	: Magnoliidae
Ordo	: Piperales
Famili	: Piperaceae
Genus	: Piper
Spesies	: <i>Piper crocatum Ruiz & Pav.</i> (Mus, 2012)

2.2.4 Kandungan Kimia Tanaman Sirih Merah

Sirih merah mengandung kandungan kimia seperti Flavonoid, polifenol, alkaloid, tanin, minyak atsiri, saponin, hidroksikaficol, kavicol, kavibetol, allylprokatekol, eugenol, p-cymene, cineole, coryofelen, kadimen, ekstragol, terpenana, dan fenil propoda. Banyaknya kandungan kimia yang bermanfaat didalam sirih merah menyebabkan sirih merah ini memiliki manfaat dalam banyak pengobatan (Murti *et al.*, 2012). Efek antimikroba daun sirih merah diduga disebabkan karena daun sirih merah mengandung senyawa aktif flavonoid, alkaloid, tannin, senyawa polifenolat dan minyak atsiri (Latifah, 2010). Dilaporkan alko-koloid dan flavonoid memiliki aktivitas hipoglikemik atau penurunan kadar glukosa darah. Selain itu karvakrol dapat bersifat sebagai disinfektan, antijamur sehingga bisa digunakan untuk obat antiseptik pada bau mulut dan keputihan. Eugenol dapat digunakan untuk mengurangi rasa sakit sedangkan tannin dapat digunakan untuk mengobati sakit perut (Murti *et al.*, 2012). Sirih merah mengandung senyawa kimia flavonoid, alkaloid, polifenol, tanin, dan minyak atsiri yang diketahui memiliki sifat antibakteri terhadap bakteri gram positif maupun bakteri gram negatif (Juliantina *et al.*, 2009).

2.2.4.1 Flavonoid

Flavonoid bisa diekstraksi dengan menggunakan pelarut air, metanol, dan etanol (Darusman, 2007). Efek flavonoid sebagai antimikroba diduga karena kemampuannya berikatan dengan protein ekstraseluler dan membran sitoplasma dari kuman. Semakin lipofilik suatu flavonoid, maka semakin kuat daya rusak flavonoid tersebut terhadap membran sitoplasma kuman (Tsuchiya *et al.*, 1996). Senyawa flavonoid merupakan zat warna merah, ungu, dan biru, serta sebagian zat warna kuning terdapat dalam tanaman. Beberapa kemungkinan fungsi flavonoid bagi tumbuhan adalah sebagai zat pengatur tumbuh, pengatur proses fotosintesi, sebagai zat antimikroba, antivirus, dan antiinsektisida. Flavonoid sengaja dihasilkan jaringan tumbuhan sebagai respon terhadap infeksi atau luka yang kemudian berfungsi menghambat fungsi penyerangannya (Kristianti, 2008).

Flavonoid diketahui disintesis oleh tanaman dalam responsnya terhadap infeksi mikroba sehingga tidak mengherankan kalau mereka efektif secara *in vitro* terhadap sejumlah mikroorganisme. Aktivitas flavonoid kemungkinan disebabkan oleh kemampuannya untuk membentuk kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut, dan dengan dinding sel. Flavonoid merupakan salah satu golongan fenol alam yang terbesar. Flavonoid mempunyai sifat yang khas yaitu bau yang sangat tajam, sebagian besar merupakan pigmen warna kuning, larut air dan pelarut organik, mudah terurai pada temperatur tinggi (Melderer, 2002).

Flavon, flavonoid, dan flavonol, ketiganya diketahui disintesis oleh tanaman dalam responnya terhadap infeksi mikroba. Senyawa flavonoid mampu menghambat enzim topoisomerase II pada bakteri serta berikatan dengan protein bakteri. DNA gyrase termasuk salah satu dari enzim kelas topoisomerase II (Melderer, 2002). Flavonoid dapat membentuk kompleks dengan protein ekstraseluler bakteri sehingga terjadi denaturasi protein. Semakin lipofilik suatu flavonoid, kemampuannya dalam merusak dinding sel bakteri semakin kuat (Cowan, 1999). Flavonoid yang bersifat lipofilik mempunyai kemampuan akan merusak membran sel mikroba. Rusaknya membran dan dinding sel akan menyebabkan metabolit penting di dalam sel akan keluar, akibatnya terjadi kematian sel (Latifa, 2010). Senyawa flavonoid bisa diekstraksi menggunakan pelarut etanol (Sabir, 2005).

2.2.4.2 Tanin

Tanin merupakan salah satu senyawa kimiawi yang termasuk dalam golongan polifenol yang diduga dapat mengikat salah satu protein yang dimiliki bakteri yaitu adhesin dan apabila hal ini terjadi maka dapat merusak ketersediaan reseptor pada permukaan sel bakteri (Agnol *et al.*, 2003). Mekanisme antimikroba tannin berkaitan dengan kemampuan tannin membentuk kompleks dengan protein polipeptida dinding sel bakteri sehingga terjadi gangguan pada dinding bakteri dan bakteri lisis. Selain itu tannin juga memiliki sifat dapat menginaktifkan adhesin sehingga bakteri tidak dapat melekat pada sel inang dan menginaktifkan enzim protease. Kedua mekanisme tersebut akan menghambat kemampuan bakteri menginvasi jaringan inang (Cowan, 1999).

Menurut Ajizah (2004), tanin dapat mengerutkan dinding sel atau membran sel sehingga mengganggu permeabilitas sel itu sendiri dan akibatnya sel tidak akan melakukan aktivitas hidup sehingga pertumbuhannya terhambat atau bahkan mati. Tanin mempunyai daya antibakteri dengan cara mempresipitasi protein, karena diduga tanin mempunyai efek yang sama dengan senyawa fenolik. Efek antibakteri tanin antara lain melalui reaksi dengan membran sel, inaktivasi enzim, dan destruksi atau inaktivasi materi genetik. Tanin dapat larut dalam air. Tanin juga akan larut dalam pelarut organik seperti metanol, etanol, aseton, dan pelarut organik lain.

2.2.4.3 Alkaloid

Alkaloid adalah suatu golongan senyawa organik yang banyak ditemukan di alam. Ciri khas alkaloid adalah bahwa semua alkaloid mengandung paling sedikit satu atom N yang bersifat basa dan pada umumnya merupakan bagian dari cincin heterosiklik. Alkaloid dapat ditemukan ditumbuhan, tetapi kadar alkaloid kurang dari 1%. (Kristanti,2008). Alkaloid memiliki kemampuan sebagai antibakteri. Mekanisme yang diduga adalah dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut (Robinson, 1991). Menurut Dianing (2007), Alkaloid merupakan senyawa nitrogen heterosiklik, yang mengandung basa nitrogen. Mekanisme kerja dari alkaloid dihubungkan dengan kemampuan mereka untuk berinteraksi atau melekatkan diri di antara DNA. Adanya zat yang berada diantara DNA akan menghambat replikasi DNA itu sendiri,

akibatnya terjadi gangguan replikasi DNA yang akhirnya akan menyebabkan kematian sel. Alkaloid bebas biasanya tidak larut dalam air, tetapi mudah larut dalam pelarut organik bersifat polar (Cordell, 1981).

2.2.4.4 Minyak Atsiri

Minyak atsiri yang aktif sebagai antibakteri pada umumnya mengandung gugus fungsi hidroksil (-OH) dan karbonil. Turunan fenol berinteraksi dengan sel bakteri melalui proses absorpsi yang melibatkan ikatan hidrogen (Juliantina *et al.*, 2009). Sebagai senyawa sequesterpenoid, mekanisme antibakteri minyak atsiri (*volatile oil*) diperkirakan melalui proses destruksi membran sel bakteri oleh komponen lipofiliknya (Cowan, 1999). Selain itu minyak atsiri juga bekerja dengan cara mengganggu proses terbentuknya dinding sel sehingga tidak terbentuk atau terbentuk tidak sempurna (Ajizah, 2004). Telah dilaporkan bahwa minyak atsiri (*volatile oil*) yang diisolasi dari daun sirih merah mempunyai efek anti mikroba (Ngaisah, 2010). Minyak Atsiri dapat diekstraksi menggunakan pelarut etanol (Hertiani, 2002). Minyak Atsiri tidak larut air namun larut dalam pelarut organik (Sudaryanti, 1990). Minyak atsiri memiliki titik didih sebesar 140⁰-180⁰C (Harborne, 1987).

2.2.5 Ekstraksi Senyawa Aktif Bahan Alam

Ekstraksi adalah penyarian zat-zat aktif dari bagian tumbuhan, hewan dan beberapa jenis biota laut. Zat-zat aktif terdapat didalam sel namun sel tanaman dan hewan berbeda demikian pula dengan ketebalannya, sehingga diperlukan metode ekstraksi dengan pelarut tertentu dalam mengekstraksinya. Tujuan

ekstraksi bahan alam adalah menarik komponen kimia yang terdapat pada bahan alam. Ekstraksi ini didasarkan pada prinsip perpindahan massa komponen zat ke dalam pelarut. Untuk mengekstraksi senyawa kimia yang ada dalam tumbuhan terlebih dahulu bahan dikeringkan kemudian dihaluskan dengan derajat halus tertentu lalu diekstraksi dengan pelarut yang sesuai. Untuk mendapatkan sari yang kental dapat dilakukan dengan menguapkan hasil ekstraksi dengan bantuan *rotary evaporator*. Pelarut untuk ekstraksi terdiri atas, pelarut non polar, seperti N-heksan, diklorometan, kloroform, benzena, dietil eter. Pelarut polar seperti air, metanol, etanol. Dan terdapat pelarut semipolar seperti aseton, etil asetat, dan lain-lain (Ansel, 2008).

Jenis ekstraksi bahan alam yang sering dilakukan adalah ekstraksi secara panas dengan cara refluks, sokletasi, digesti, infus, dekok dan ekstraksi secara dingin dengan cara maserasi dan perkolasi (Hamdani, 2011).

2.2.6 Pemakaian Dalam Pengobatan

Daun sirih merah diketahui bersifat antibakteri. Sirih merah dapat digunakan untuk berbagai macam pengobatan. Sirih merah dapat menyembuhkan berbagai jenis penyakit seperti diabetes militus, hepatitis, batu ginjal, menurunkan kolesterol, mencegah stroke, asam urat, hipertensi, prostatitis, radang mata, radang liver, keputihan, tukak lambung, kelelahan, nyeri sendi dan memperhalus kulit (Utami, 2013).

2.3 Cara Kerja Antimikroba

Agen antimikroba yang ideal memperlihatkan toksisitas selektif, yang berarti bahwa obat tersebut berbahaya bagi patogen tanpa membahayakan pejamu. Sering kali, toksisitas selektif lebih bersifat relatif dan bukan absolut, ini

berarti bahwa suatu obat dalam suatu konsentrasi tertentu yang dapat ditoleransi oleh pejamu dapat merusak mikroorganisme penyebab infeksi (Brooks *et al.*, 2007).

Obat antimikroba mempunyai susunan kimiawi cara kerja yang antara obat satu dengan obat yang lainnya.

Antimikroba mengganggu bagian-bagian mikroba yang peka, yaitu: menghambat sintesis dinding sel, merusak membran sel, menghambat sintesis protein, menghambat sintesis asam nukleat dan antagonis metabolit (Setiabudy, 2007).

Obat antimikroba sering disebut sebagai bakteriostatik atau bakterisidal. Istilah bakteriostatik menggambarkan suatu obat yang sewaktu-waktu menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Keberhasilan pengobatan ini sering bergantung pada tubuh inang. Lebih jauh, efeknya dapat berubah apabila obat dihentikan, organisme akan tumbuh kembali, dari infeksi atau penyakit akan kambuh. Istilah bakterisidal digunakan untuk obat yang menyebabkan kematian organisme. Walaupun demikian, istilah bakteriostatik dan bakterisidal adalah relatif, bukan absolut. Kadang pengobatan jangka panjang dengan obat-obatan bakteriostatik dapat membunuh populasi tertentu. Sedangkan dengan obat bakterisidal mungkin gagal, baik in-vitro maupun in-vivo (Katzung, 2004).

2.3.1 Menghambat Sintesis Dinding Sel

Dinding sel bakteri bersifat sebagai pelindung osmotik protoplasma di bawahnya dari trauma baik osmotik maupun mekanik. Tekanan osmotik tinggi dalam didalam sel akan mendorong cairan dari dalam sel bakteri sehingga terjadi kebocoran dan kematian sel kuman.

Hal ini menjadi dasar bakterisidal pada bakteri. Contoh antimikroba jenis ini adalah β -laktam (penicilin dan cephalosporin) (Cowan,1999).

2.3.2 Menghambat Fungsi Membran Sel

Membran sel menjaga komposisi internal dari sel dengan cara berfungsi di dalam permeabilitas selektif dan proses transpor aktif. Rusaknya membran sel dapat menyebabkan metabolit penting didalam sel lolos keluar sel dan berakibat kematian sel (Dzen *et al.*, 2010).

2.3.3 Menghambat Sintesis Protein

Sintesis 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 baca oleh tRNA dan terbentuk protein abnormal dan terbentuk non-fungsional bagi sel bakteri (Dzen *et al.*,2010).

2.3.4 Menghambat Sintesis Asam Nukleat

Sintesis asam nukleat erat kaitannya dengan proses duplikasi dan transkripsi. Setiap zat yang mengganggu sintesa ini akan mempengaruhi seluruh fase pertumbuhan dan metabolisme sel bakteri. Rimfamycin dapat berkaitan dengan enzim polimerase-RNA sehingga menghambat sintesis RNA dan DNA oleh enzim tersebut (Cowan, 1999).

2.3.5 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-Amino Benzoid Acid) untuk diikutsertakan dalam pembentukan asam folat sehingga terbentuk analog asam folat yang non fungsional. Akibatnya kelangsungan hidup bakteri terganggu.

2.4 Uji Kepekaan Bakteri terhadap Antimikroba

2.4.1 Metode Dilusi Tabung

Tes ini dikerjakan dengan menggunakan satu seri tabung reaksi yang diisi metode cair dan sejumlah tertentu bakteri yang diuji, kemudian masing-masing tabung diisi dengan antibakteri yang telah diencerkan secara serial. Bakteri yang digunakan adalah bakteri dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml. Ada satu tabung yang hanya diisi bahan aktif tanpa bakteri sebagai kontrol negatif dan ada satu tabung yang hanya diisi oleh bakteri biakan saja sebagai kontrol positif. Selanjutnya, seri tabung diinkubasi 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 bakteri) adalah KHM (Kadar Hambat Minimal) dari obat. Selanjutnya biakan dari semua tabung yang jernih diinokulasikan pada media agar, diinkubasikan dan keesokan harinya diamati ada atau tidaknya koloni bakteri yang tumbuh. Konsentrasi obat pada biakan padat yang ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri adalah KBM (Kadar Bunuh Minimal) dari obat terhadap bakteri uji (Dzen *et al.*, 2010).

2.4.2 Metode Dilusi Agar

Tes ini dikerjakan dengan menggunakan metode dilusi agar (*Agar Dilution test*). Metode dilusi agar, larutan antimikroba yang sudah diencerkan secara serial dicampurkan ke dalam medium agar yang masih cair (tetapi tidak terlalu panas) kemudian agar dibiarkan memadat, dan selanjutnya diinokulasikan dengan bakteri. Dibutuhkan satu cawan untuk kontrol positif tanpa antimikroba. Dengan metode ini, satu atau lebih bakteri terisolasi yang tercampur per cawan (Parija, 2009). Pada dilusi agar, zat antibakteri diletakkan dalam medium agar lalu teteskan bakteri yang akan diuji dengan konsentrasi 10^4 CFU/spot (CLSI, 2006). Pada metode dilusi agar, diperlukan larutan antimikroba dengan kadar menurun yang dibuat menggunakan tehnik pengenceran serial. Selanjutnya diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Setelah diinkubasi, cawan diamati serta dihitung pertumbuhan bakteri (Parija, 2009).

2.4.3 Metode Difusi Cakram

Metode yang paling luas digunakan adalah uji difusi cakram. Tes ini dikerjakan dengan menggunakan cakram kertas saring yang mengandung bahan antimikroba yang telah ditentukan kadarnya. Cakram tersebut kemudian ditempatkan pada media padat yang telah diberi bakteri uji. Setelah diinkubasi, diameter area hambatan dihitung sebagai daya hambat obat terhadap bakteri uji (Brooks *et al.*, 2007).

Untuk mengevaluasi hasil uji kepekaan tersebut (apakah isolat mikroba sensitif atau resisten terhadap obat), dapat dilakukan dengan cara berikut :

2.4.3.1 Metode Kirby Bauer

Yaitu dengan cara membandingkan diameter dari area jernih (zona hambatan) disekitar cakram dengan tabel standar yang dibuat oleh NCCLS (*National Committe for Clinical Laboratory Standard*). Dengan tabel NCCLS ini dapat diketahui kriteria sensitif, sensitif intermediet dan resisten (Dzen *et al.*, 2010).

2.4.3.2 Metode Joan-stokes

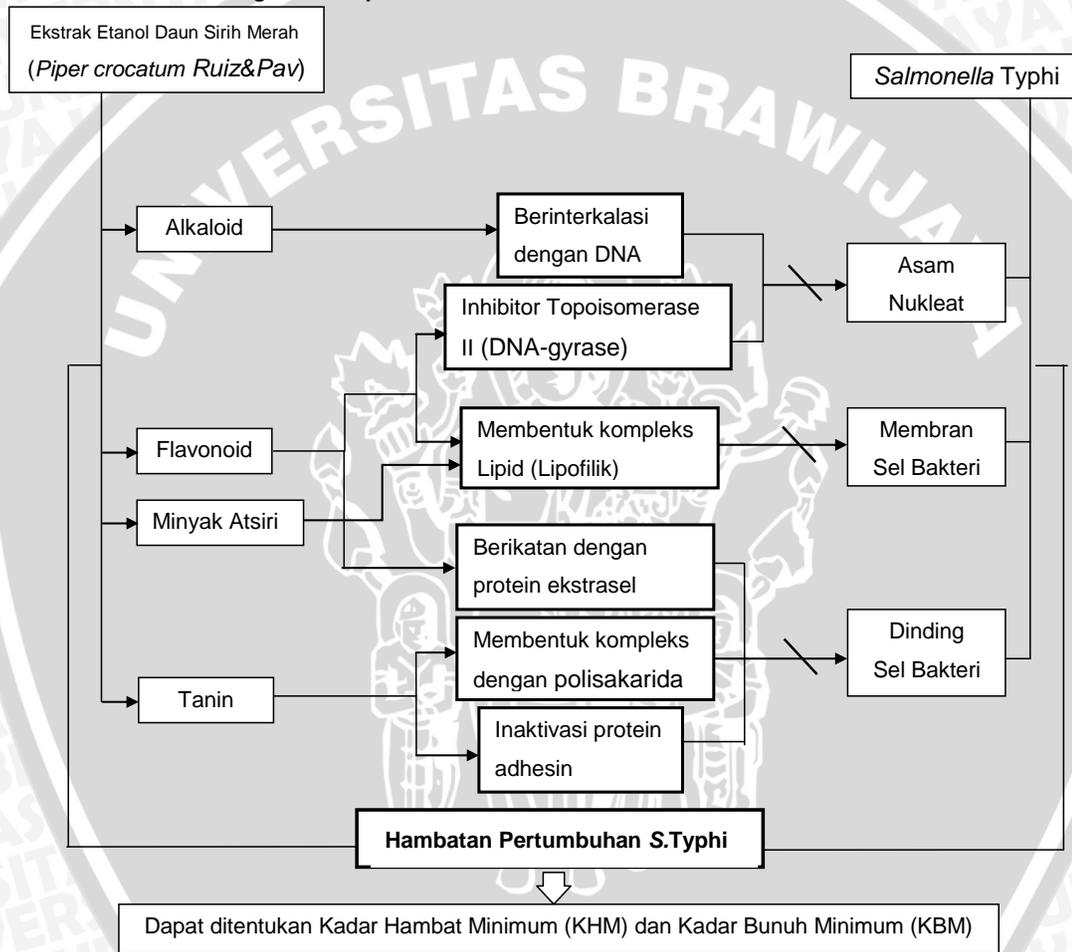
Metode ini dilakukan dengan cara membandingkan radius zona hambatan yang terjadi antara bakteri kontrol yang sudah diketahui kepekaanya terhadap obat tersebut dengan isolat bakteri yang di uji. Pada cara Joan-stokes, prosedur kepekaan untuk bakteri uji kontrol dan bakteri uji dilakukan secara bersama-sama dalam satu piring agar (Dzen *et al.*, 2010). Kriteria pada metode Joan-stokes adalah sebagai berikut:

- Sensitif : yaitu radius zona inhibisi kuman tes lebih luas, sama dengan atau lebih kecil tetapi tidak lebih dari 3mm terhadap kontrol.
- Intermediet : yaitu radius zona inhibisi kuman tes lebih besar dari 3mm, tetapi dibanding kontrol lebih kecil lebih dari 3mm.
- Resisten : yaitu radius zona inhibisi kurang atau sama dengan 3mm (Dzen *et al.*, 2010).

BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1. Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan :

↘ : Menghambat / merusak komponen S.Typhi

3.2 Keterangan Skema Kerangka Konsep Penelitian

Daun sirih merah mengandung senyawa fitokimia yakni flavonoid, alkaloid, tanin dan minyak atsiri. Senyawa-senyawa aktif tersebut larut etanol.

Salmonella Typhi adalah bakteri yang dapat menyebabkan demam tifoid. Demam tifoid merupakan penyakit yang sering terjadi di endemik yang mulai berkembang seperti Indonesia. Infeksi *Salmonella Typhi* berkaitan dengan higene dari makanan atau minuman. Pengobatan demam tifoid yaitu menggunakan antibiotik. Sedangkan beberapa dari antibiotik sudah ditemukan resisten terhadap *Salmonella Typhi* (*Multi-drug Resistance S.Typhi*). Sebagian besar penderita yang terinfeksi *Salmonella* berpotensi untuk menjadi karier *Salmonella* dan bisa mengalami kekambuhan meskipun secara klinis lebih ringan dari infeksi pertama, namun tetap membutuhkan pengobatan antibiotik.

Senyawa flavonoid mampu menghambat enzim topoisomerase II (dimana DNA gyrase termasuk salah satu dari enzim kelas topoisomerase II) pada bakteri dan menyebabkan bakteri mengalami hambatan dalam melakukan replikasi DNA. Flavonid berikatan dengan protein ekstraseluler bakteri kemudian menyebabkan kerusakan dinding sel selain itu flavonoid bekerja membentuk kompleks lipid (lipofilik) menyebabkan kerusakan membran sel bakteri. Alkaloid memiliki kemampuan untuk berinteraksi atau melekatkan diri di antara DNA. Adanya zat yang berada diantara DNA akan menghambat replikasi DNA itu sendiri, akibatnya terjadi gangguan replikasi DNA.

Mekanisme kerja tanin sebagai antibakteri yaitu dengan menginaktifkan adhesin sehingga bakteri tidak dapat melekat pada sel inang. Mekanisme antibakteri tanin berkaitan juga dengan kemampuan tannin membentuk kompleks dengan protein polipeptida dinding sel bakteri sehingga terjadi gangguan pada dinding bakteri dan bakteri lisis. mekanisme antibakteri minyak atsiri (*volatile oil*) diperkirakan melalui proses destruksi membran sel bakteri oleh komponen lipofiliknya.

Kerusakan dinding dan membran sel menyebabkan menyebabkan metabolit penting di dalam sel akan keluar, akibatnya terjadi kematian sel. Gangguan replikasi DNA juga menyebabkan kematian sel karena Setiap zat yang mengganggu sintesis ini akan mempengaruhi seluruh fase pertumbuhan dan metabolisme sel bakteri

3.3 Hipotesis Penelitian

Ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum*) menurunkan jumlah koloni bakteri *Salmonella Typhi* secara *in-vitro*.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental laboratorik. Uji antimikroba dilakukan secara *in vitro* dengan menggunakan *tube dilution test*. Proses pengekstrakan daun sirih merah menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol. *Tube dilution test* meliputi dua tahap, yaitu tahap pengujian bahan pada media *broth* dan tahap penanaman pada medium NAP (*Nutrient Agar Plate*) dengan metode *streaking* (penggoresan) yang bertujuan untuk menentukan KHM (Kadar Hambat Minimal) dan KBM (Kadar Bunuh Minimal).

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang pada bulan Mei s/d Juli 2014.

4.3 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri uji *S. Typhi* yang dimiliki oleh Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

Pada penelitian ini, digunakan 6 macam perlakuan dosis konsentrasi ekstrak daun sirih merah (yang ditentukan melalui penelitian pendahuluan) berbeda serta 1 kontrol positif dan 1 kontrol negatif, sehingga jumlah

pengulangan yang digunakan dalam penelitian ini dihitung dengan rumus estimasi pengulangan sebagai berikut :

$$p(n-1) \geq 15$$

$$6(n-1) \geq 15$$

$$6n - 6 \geq 15$$

$$6 \geq 21$$

$$n \geq 21/6$$

$$n \geq 3,5 \approx 4 \text{ (Ariyani et al., 2007)}$$

Keterangan : n = jumlah pengulangan
p = jumlah perlakuan

Jadi, pada masing-masing perlakuan dalam penelitian ini akan dilakukan 4 kali pengulangan dengan menggunakan 1 isolat *S. Typhi*. Jumlah setiap sampel adalah 10^6 CFU/ml bakteri *S. Typhi*.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah berbagai konsentrasi ekstrak daun sirih merah : 26%, 28%, 30%, 32%, 34%, 36%, KN (kontrol Negatif), dan KP (Kontrol Positif).

4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah tingkat kekeruhan bakteri *S. Typhi* yang tumbuh pada medium *broth* (untuk menentukan KHM) dan jumlah koloni bakteri *S. Typhi* yang tumbuh pada medium NAP dengan metode streaking atau penggoresan (untuk menentukan KBM).

4.5 Definisi Operasional

- a. Daun sirih merah (*Piper crocatum*) yang digunakan dalam penelitian ini di beli dari Balai Materia Medika di kota Batu, Malang, Jawa Timur dalam bentuk serbuk. Karakteristik daun yang digunakan yaitu dengan daun yang kurang penyinaran.
- b. Ekstrak daun sirih merah adalah ekstrak cair dari daun sirih merah yang diekstrak menggunakan pelarut etanol 96% melalui proses maserasi dan evaporasi untuk menghilangkan pelarut etanol.
- c. Isolat bakteri *S. Typhi* yang digunakan adalah bakteri dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang berasal dari darah penderita tifoid di Rumah Sakit Saiful Anwar (RSSA) Malang.
- d. *Original Inoculum* adalah inokulum bakteri dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml yang diinokulasikan pada media agar padat sebelum diinkubasi, dan digunakan untuk mencari kategori KBM. Yang disebut KBM (Kadar Bunuh Minimum) adalah konsentrasi minimum ekstrak etanol daun sirih merah yang mampu membunuh pertumbuhan bakteri *S.Typhi*. Hal ini ditandai dengan jumlah pertumbuhan koloni pada NAP yang telah dilakukan penggoresan dengan satu ose larutan ekstrak etanol daun sirih merah yang telah diberi bakteri uji, dengan jumlah kurang dari 0,1% *Original Inoculum*.

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Alat-alat untuk Pembuatan Ekstrak Daun Sirih merah

Alat yang digunakan dalam pembuatan ekstrak daun sirih merah antara lain: penggiling untuk menghaluskan daun sirih merah kering, saringan serbuk 90 mass, timbangan untuk mengukur berat serbuk daun sirih merah, baker glass, kertas saring whatman no.40 untuk penyaringan daun sirih merah yang direndam dengan etanol 96%, gelas elemener, dan vacuum oven untuk evaporasi serta menghilangkan sisa pelarut.

4.6.2 Bahan-bahan untuk Pembuatan Ekstrak Daun Sirih Merah

Bahan yang digunakan dalam pembuatan ekstrak daun sirih merah antara lain daun sirih merah, etanol 96%, dan aquades.

4.6.3 Alat dan Bahan untuk Pewarnaan Gram Bakteri

Alat yang digunakan untuk pewarnaan gram bakteri antara lain gelas objek, kertas penghisap, mikroskop binokuler, ose, minyak emersi, dan air. Bahan yang digunakan adalah isolat *S. Typhi*, kristal violet, lugol, alkohol 96%, dan safranin.

4.6.4 Alat dan Bahan untuk Uji Dilusi Tabung

Alat dan bahan yang digunakan untuk uji dilusi tabung antara lain: tabung reaksi, pipet steril, karet penghisap, inkubator, ekstrak daun sirih merah, vortex, perbenihan cair standard, bunsen, korek api, gelas objek, plate kosong steril, alat penjepit steril, kapas, *colony counter*, *cuvet* dan *spektrofotometri*.

4.7 Rancangan Operasional Penelitian

4.7.1 Pembuatan Ekstrak Daun Sirih Merah

- 1) Daun sirih merah segar sebanyak 1 kg di jemur dalam ruangan penjemuran dimana sinar matahari menjadi sumber panas selama kira-kira 3 hari untuk memperoleh daun sirih merah kering (simplisia).
- 2) Menggiling daun sirih merah kering menggunakan mesin penggiling dengan ukuran besar penyarinya 90 mass. Melakukan penggilingan sebanyak 3 kali.

(Prosedur pembuatan serbuk sirih merah berdasar metode di Balai Materia Batu, Malang, Jawa Timur)
- 3) Menimbang serbuk daun sirih merah seberat 200 gram. Kemudian serbuk daun sirih merah direndam dengan pelarut etanol 96% dalam wadah beker glass dengan perbandingan 1 : 3 (1 kg bahan → 3 liter pelarut etanol 96%)
- 4) Merendam bahan dan mendinginkan pada suhu kamar selama minimal 2x24 jam dengan sesekali diaduk. Setelah 2x24 jam, rendaman dalam baker glass tersebut disaring.
- 5) Menyaring bahan rendaman dengan menggunakan kertas saring whatman no.40, hasil penyaringnya diwadahi dengan elemenyer glass.
- 6) Pelarut yang diperoleh (yang mengandung bahan aktif) di evaporasi untuk menghilangkan sisa pelarut etanol 96% dengan menggunakan vacuum oven.

- 7) Melakukan pengovenan kembali sisa pelarut yang tersisa dengan vacuum oven dengan suhu 40-50°C sehingga benar-benar tidak mengandung pelarut etanol.
(Prosedur pembuatan ekstrak etanol daun sirih merah berdasarkan metode maserasi di Teknik Kimia Polinema Malang, Jawa Timur).

4.7.2 Identifikasi Bakteri *Salmonella Typhi*

4.7.2.1 Pewarnaan Gram

Prosedur pengecatan gram :

1. Membuat sediaan hapusan bakteri pada gelas obyek.
2. Menuang Kristal violet pada sediaan hapusan selama 1 menit, kemudian membuang dan membilas sisa Kristal violet dengan air.
3. Menuang lugol pada sediaan hapusan selama 1 menit, kemudian membuang dan membilas sisa lugol.
4. Menuangi alkohol 96% pada sediaan hapusan selama 5-10 detik atau sampai warna cat luntur kemudian membuang dan membilas sisa alkohol 96% dengan air.
5. Menuang safranin pada sediaan hapusan selama 1/2 menit kemudian membuang dan membilas sisa safranin dengan air.
6. Mengeringkan sediaan hapusan menggunakan kertas penghisap
7. Setelah kering, mengamati dibawah mikroskop dengan lensa obyektif perbesaran 1000x
8. Mengamati bakteri *S.Typhi* di bawah mikroskop berupa bakteri basil (batang) Gram negative

4.7.2.2 Penanaman pada BSA (*Bismuth Sulfite Agar*)

Penanaman bakteri pada *Bismuth Sulfite Agar* (BSA) merupakan media selektif terhadap pertumbuhan *S. Typhi*. Penanaman bakteri pada media tersebut didapatkan gambaran *Black Jet Colony* (terbentuknya koloni hitam) yang merupakan gambaran khas dari *S. Typhi* (Vaishnavi, 2013). Prosedur Identifikasi bakteri pada medium BSA :

1. Menginokulasi bakteri *S. Typhi* dengan metode streaking pada medium *Bismuth Sulfite Agar* (BSA).
2. Menginkubasi sediaan pada inkubator dengan suhu 37°C selama 18-24 jam dan mengamati hasilnya.
3. Koloni bakteri *S. Typhi* pada medium BSA menghasilkan gambaran *Black Jet Colony* (koloni berwarna hitam).

4.7.2.3 Uji Identifikasi Bakteri dengan *Microbact 12A*

Kit Microbact mencakup miniatur tes biokimia 12)12A, 12B, dan 12E) atau 24 (24E). Tes *Kit Microbact* bakteri gram negatif dengan hasil tes oksidase negatif digunakan set 12A (dengan strip) atau 12E (dengan *microplate*). Bakteri Gram negatif dengan hasil tes oksidase positif menggunakan set 12B yang dilengkapi dengan set 12A. Prosedur tes *Kit Microbact* antara lain (oxid, 2003) :

1. Menentukan hasil tes oksidase bakteri yang akan diuji untuk menentukan set *Microbact* yang akan digunakan.
2. Menginkubasi koloni bakteri selama 18-24 jam
3. Mengambil koloni menggunakan ose kemudian dilarutkan kedalam 3-6ml garam fisiologis pada tabung reaksi steril hingga homogen.

4. Membuka penutup lubang *microplate*. Memasukan ± 4 tetes suspensi bakteri ke dalam masing-masing lubang plate.
5. Memasukan ± 2 tetes *mineral oil* (MB1093A) ke dalam lubang plat hitam.
6. Menutup kembali semua lubang plate, kemudian inkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
7. Mengeluarkan *microplate* dari inkubator, kemudian menambahkan reagen yang diperlukan.
8. Hasil uji *Microbact* dapat diinterpretasikan menggunakan program tertentu yang telah disertakan dalam paket *Microbact*.

4.7.3 Pembuatan Perbenihan Cair Bakteri Kepadatan 10^6 bakteri/ml

1. Mengambil koloni *S. Typhi* dengan karakteristik sama dari media *Nutrient Agar Plate* dengan menggunakan ose.
2. Memasukkan ke dalam tabung reaksi steril yang berisi *Nutrient broth*, kemudian lakukan spektrofotometri pada tabung reaksi tersebut dengan panjang gelombang 625nm, untuk mengetahui *optical density* (OD) dari suspensi tersebut.
3. Untuk mendapatkan konsentrasi bakteri sebesar $10^8/\text{mL}$ yang setara dengan OD (*Optical Density*) = 0,1 (Murray *et al.*, 1999), melakukan penghitungan sebagai berikut:

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

Keterangan :

N_1 = Hasil Spektrofotometri

V_1 = Volume bakteri yang akan ditambah dengan pengencer

N_2 = OD (0,1 setara dengan 10^8)

V_2 = Volume suspensi bakteri uji (10 mL)

4. Sehingga diperoleh volume (mL) bakteri yang akan ditambah pengencer untuk mendapatkan bakteri dengan konsentrasi 10^8 /mL sebanyak 10 mL.
5. Melakukan pengenceran dari konsentrasi bakteri 10^8 CFU/ml dengan menambahkan 1ml perbenihan cair (10^8 CFU/ml) ke dalam 9ml NaCl untuk mendapatkan konsentrasi sebesar 10^7 CFU/ml.
6. Kemudian melakukan pengenceran lagi dengan mengambil 1ml perbenihan cair (10^7 CFU/ml) untuk ditambahkan pada 9ml MH *broth* sehingga akhirnya didapatkan konsentrasi bakteri yang diinginkan yaitu sebesar 10^6 CFU/ml.
7. Selanjutnya bakteri telah siap untuk digunakan dalam penelitian

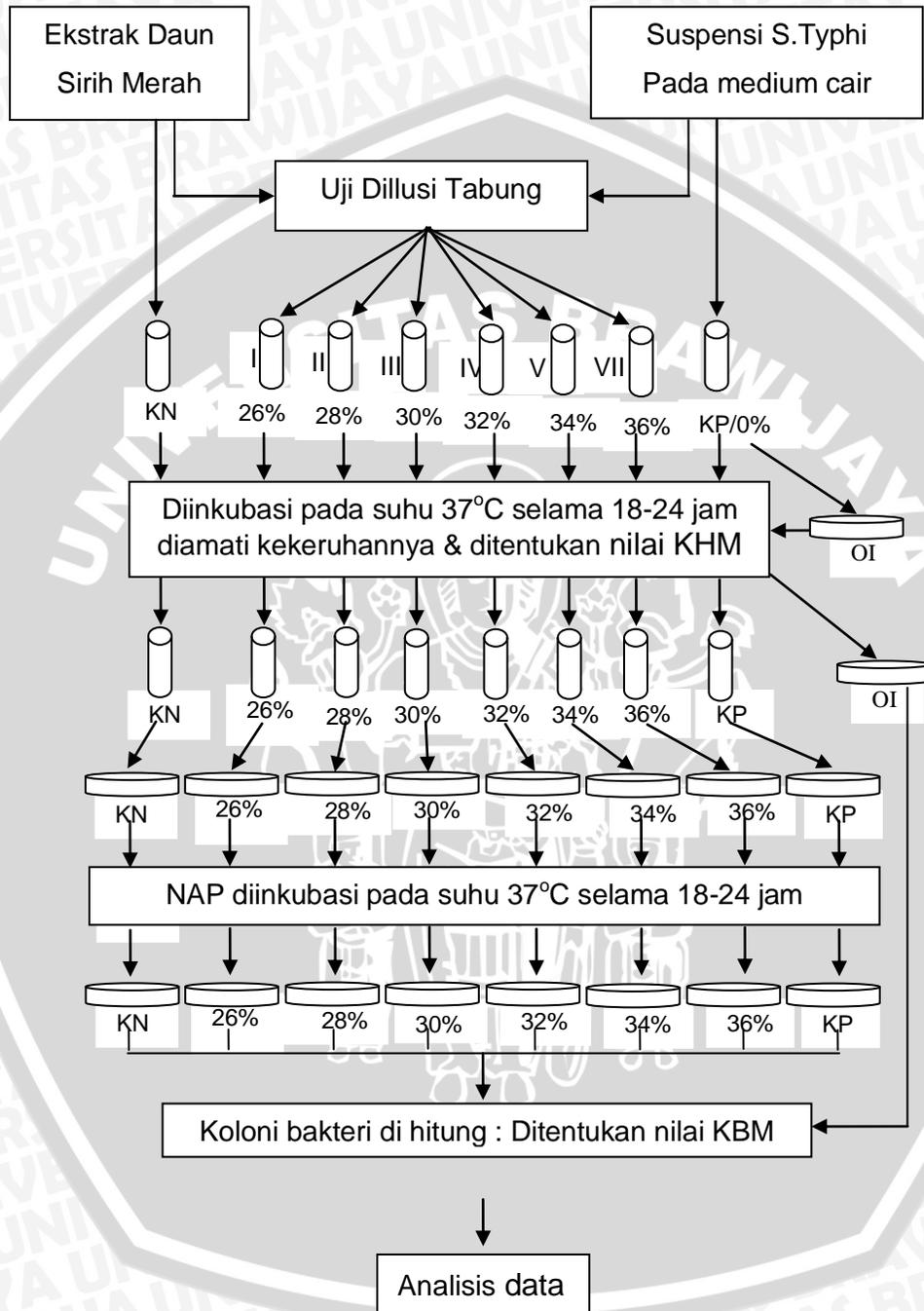
4.7.4 Uji Sensitivitas Antimikroba

- 1) Mensentrifugasi ekstrak etanol daun sirih merah dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit agar larutan ekstrak menjadi homogen dan tidak mengendap. Untuk perlakuan yang diambil adalah larutannya.
- 2) Menyediakan 8 tabung reaksi steril, diantaranya 6 tabung sebagai uji bakteri, 1 tabung sebagai kontrol positif atau kontrol kuman, dan 1 tabung sebagai kontrol negatif atau kontrol bahan.
- 3) Kemudian pada 6 tabung uji bakteri diberi label 26%, 28%, 30%, 32%, 34%, 36%.
- 4) Memasukan 1 ml aquades steril dan 1 mL biakan cair *S. Typhi* dengan konsentrasi bakteri 1×10^6 CFU/ml ke dalam tabung reaksi 1 yang berlabel 0% (KP atau KK).

- 5) Memasukkan 0,74 mL aquades ke tabung reaksi lalu menambahkan 0,26 μ L ekstrak etanol daun sirih merah sehingga mencapai konsentrasi bahan 26% dan memberi label 26% pada tabung reaksi 2.
- 6) Memasukkan 0,72 mL aquades ke tabung reaksi lalu menambahkan 0,28 μ L ekstrak etanol daun sirih merah sehingga mencapai konsentrasi bahan 28% dan memberi label 28% pada tabung reaksi 3.
- 7) Memasukkan 0,7 mL aquades ke tabung reaksi lalu menambahkan 0,3 μ L ekstrak etanol daun sirih merah sehingga mencapai konsentrasi bahan 30% dan memberi label 30% pada tabung reaksi 4.
- 8) Memasukkan 0,68 mL aquades ke tabung reaksi lalu menambahkan 0,32 μ L ekstrak etanol daun sirih merah sehingga mencapai konsentrasi bahan 32% dan memberi label 32% pada tabung reaksi 5.
- 9) Memasukkan 0,66 mL aquades ke tabung reaksi lalu menambahkan 0,34 μ L ekstrak etanol daun sirih merah sehingga mencapai konsentrasi bahan 34% dan memberi label 34% pada tabung reaksi 6.
- 10) Memasukkan 0,64 mL aquades ke tabung reaksi lalu menambahkan 0,36 μ L ekstrak etanol daun sirih merah sehingga mencapai konsentrasi bahan 36% dan memberi label 36% pada tabung reaksi 7.
- 11) Memasukan 1 mL biakan cair *S. Typhi* dengan konsentrasi bakteri 1×10^6 CFU/ml ke dalam setiap tabung reaksi uji bakteri 2-7.
- 12) Memasukan 2 ml ekstrak etanol daun sirih merah pada tabung reaksi 8 yang diberi label kontrol negatif atau kontrol bahan (KN)
- 13) Dari tabung reaksi 1, mengambil larutan sebanyak 1 ose kemudian dilakukan penggoresan pada NAP untuk membuat *original inoculum*.

- 14) Menginkubasi tabung 1-8 dan *original inoculum* selama 18-24 jam dengan suhu 37-37,5°C.
- 15) Hari ke-2, mengeluarkan semua tabung dari inkubator. Tabung reaksi no. 2-7 dibandingkan kekeruhannya dengan tabung reaksi no. 1 untuk menentukan KHM.
- 16) Dari masing-masing tabung reaksi no. 1-8, mengambil larutan sebanyak 1 ose kemudian melakukan penggoresan pada 8 NAP yang berbeda dan memberi label sesuai konsentrasi. Kemudian menginkubasi 18-24 jam pada suhu 37°C untuk mengetahui data KBM.
- 17) Pada hari ketiga didapatkan data KBM dan melakukan pengamatan kuantitatif pada masing-masing konsentrasi dengan cara menghitung jumlah koloni bakteri dengan *colony counter*. KBM ditentukan dari tidak adanya jumlah koloni yang tumbuh pada NAP atau jumlah koloninya kurang dari 0,1% jumlah koloni di *original inoculum*.
- 18) Cara perhitungan koloni bakteri tersebut adalah sebagai berikut: pertama dilakukan pengamatan pertumbuhan koloni pada *plate* secara subjektif apakah koloni sangat banyak atau tidak. Apabila sangat banyak maka dipilih sembilan kotak yang mewakili masing masing *plate*, jumlah koloni yang didapatkan adalah hasil jumlah koloni dalam 9 kotak dibagi 9 kemudian dikalikan dengan luas *plate* dan dikalikan jumlah pengenceran yang dilakukan. Apabila dalam satu *plate* semua koloni dapat terhitung semua, maka tidak perlu dikalikan luas *plate*.
- 19) Konsentrasi terendah dengan jumlah koloni kurang dari 0,1% original inokulum adalah KBM

4.7.5 Alur Kerja Penelitian



Gambar 4.1 Alur Penelitian

Keterangan



: Tabung Reaksi



: Medium NAP



4.8 Analisis Data

Analisis data yang digunakan adalah uji statistik parametrik dikarenakan data hasil penelitian berupa data ratio. Uji statistik yang digunakan diantaranya adalah uji statistik komparasi One-Way ANOVA untuk mengetahui perbedaan pengaruh berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum*) terhadap pertumbuhan bakteri *S.Typhi* sehingga dapat disimpulkan apakah ekstrak daun sirih merah mempunyai pengaruh antibakteri yang signifikan terhadap bakteri *S.Typhi*. Apabila sebaran data tidak homogen maka One-Way ANOVA tidak bisa digunakan, melainkan menggunakan uji komparasi Kruskal-Wallis. Selain itu, dilakukan uji Mann Whitney untuk membandingkan perilaku mana saja yang menyebabkan pertumbuhan *S.Typhi* cenderung berbeda secara signifikan atau tidak berbeda signifikan. Uji korelasi Spearman untuk mengetahui besarnya keeratan hubungan pemberian ekstrak etanol daun sirih merah terhadap pertumbuhan koloni bakteri *S.Typhi*. Dalam penelitian ini, analisis statistik dilakukan dengan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$).

BAB 5**HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA****5.1. Hasil Penelitian****5.1.1. Ekstrak Daun Sirih Merah**

Ekstrak daun sirih merah yang digunakan untuk penelitian ini diperoleh dari 200 gram serbuk kering daun sirih merah dari Balai Materia Medika Kota Batu yang diekstrak dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Didapatkan ekstrak etanol daun sirih merah sebanyak 40cc. Bentuk ekstrak ini cair, berwarna hijau kehitaman dan tidak terdapat endapan.

5.1.2. Hasil Identifikasi S.Typhi

Sebelum melakukan uji efektivitas antibakteri, terlebih dahulu dilakukan identifikasi bakteri S.Typhi yang tersedia di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. S.Typhi yang digunakan adalah hasil isolat yang berasal dari pasien yang terinfeksi S.Typhi dari Malang. Identifikasi bakteri dilakukan melalui 4 tahap, yaitu:

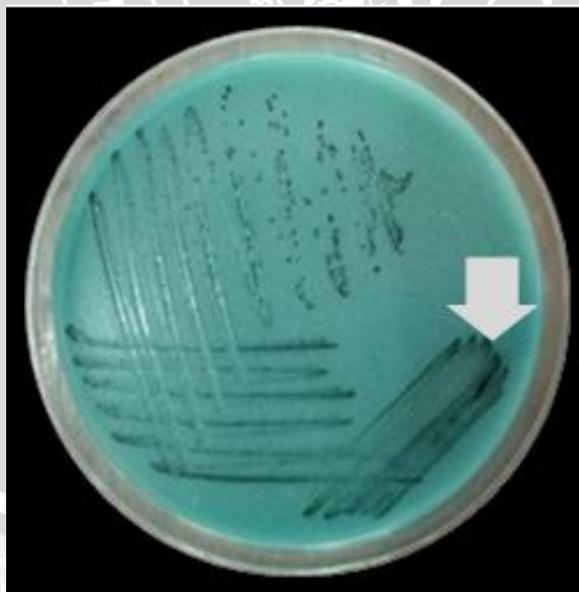
- Pewarnaan Gram
- Penanaman bakteri pada medium Bismuth Sulfite Agar (BSA)
- Penanaman bakteri pada medium MacConkey
- Test Microbact 12.

Tahap pertama adalah Pewarnaan Gram. Dari Perwarnaan Gram, diperoleh hasil batang Gram negatif yang ditandai dengan warna merah pada bakteri (Gambar 5.1).



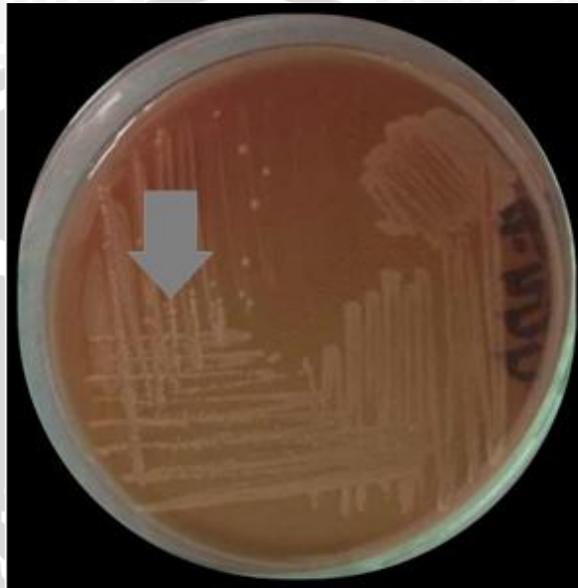
Gambar 5.1. Gambaran Mikroskopik Bakteri S.Typhi (perbesaran 1000x, berbentuk batang, Gram negatif)

Tahap kedua adalah penanaman pada medium *Bismuth Sulfite Agar (BSA)*, pada medium BSA, S.Typhi akan memberikan karakteristik koloni khas, yaitu adanya koloni berwarna hitam (*Black Jet Colony*) oleh karena S.Typhi menghasilkan H_2S (Gambar 5.2).



Gambar 5.2. Bakteri S.Typhi pada Medium *Bismuth Sulfite Agar* (Koloni berwarna hitam atau *Black Jet Colony*), hasil *streaking* ditunjukkan dengan panah.

Tahap ketiga adalah penanaman bakteri pada medium MacConkey. Pada medium ini, *S.Typhi* akan memberikan karakteristik koloni berwarna pucat atau *colourless colonies* (Gambar 5.3).



Gambar 5.3. Gambaran *S.Typhi* pada Medium MacConkey (Koloni berwarna pucat atau *Colourless Colonies*), hasil *streaking* yang ditunjukkan dengan panah.

Gambaran koloni yang pucat pada MacConkey menggambarkan bahwa *S.Typhi* merupakan bakteri yang tidak memfermentasikan laktosa sehingga tidak menghasilkan asam. Maka koloni akan terlihat tidak berwarna atau *colourless colonies*.

Tahap keempat adalah test Microbact 12A. Pada tes ini, *S.Typhi* akan memberikan hasil positif pada lysin, ornitin, glukosa, H_2S , manitol, xylose, dan citrat. Test microbact 12A memberikan hasil negatif pada ONPG, indole, urease, voges-proskauer serta TDA (Gambar 5.4).



Gambar 5.5. Hasil pengamatan Kadar Hambat Minimum (KHM) ekstrak etanol daun sirih merah terhadap *S.Typhi*. Perbandingan tingkat kekeruhan tiap konsentrasi ekstrak pada tabung (26%, 28%, 30%, 32%, 34%, 36%). Pada konsentrasi 30%, tabung terlihat jernih dari konsentrasi sebelumnya (KHM).

Keterangan :

0% adalah KK (kontrol Kuman)

Dari Gambar 5.5 dapat diamati Kadar Hambat Minimum(KHM) yang dilakukan menggunakan uji dilusi tabung. Hasil dari uji dilusi tabung mengamati tingkat kekeruhan ekstrak daun sirih merah terhadap *S.Typhi* pada tiap konsentrasi (26%, 28%, 30%, 32%, 34%, 36%) yang terdapat pada masing-masing tabung. Tingkat kekeruhannya diamati menggunakan kertas putih bergaris yang diletakkan dibelakang tabung. Pada konsentrasi 26% dan 28% masih menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri. Hal tersebut ditunjukkan dengan masih terdapat kekeruhan dikonsentrasi 26% dan 28%. Pada konsentrasi 30%, terlihat sudah jernih dibanding konsentrasi sebelumnya. Hal tersebut menunjukkan bahwa KHM

terdapat pada konsentrasi 30%. KHM digambarkan dengan kejernihan pertama kali dibanding tabung-tabung sebelumnya.

5.1.4. Hasil Pengukuran Kadar Bunuh Minimum (KBM) Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah terhadap Bakteri *S.Typhi*

Setelah tabung diinkubasikan selama 18-24 jam pada suhu 37°C dan diamati tingkat kekeruhan untuk melihat KHM, tiap konsentrasi ekstrak tersebut diinokulasikan pada NAP dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Selanjutnya dilakukan perhitungan koloni yang tumbuh pada masing-masing konsentrasi NAP dengan menggunakan *colony counter* untuk melihat kadar bunuh minimum (KBM) dari ekstrak etanol daun sirih merah.

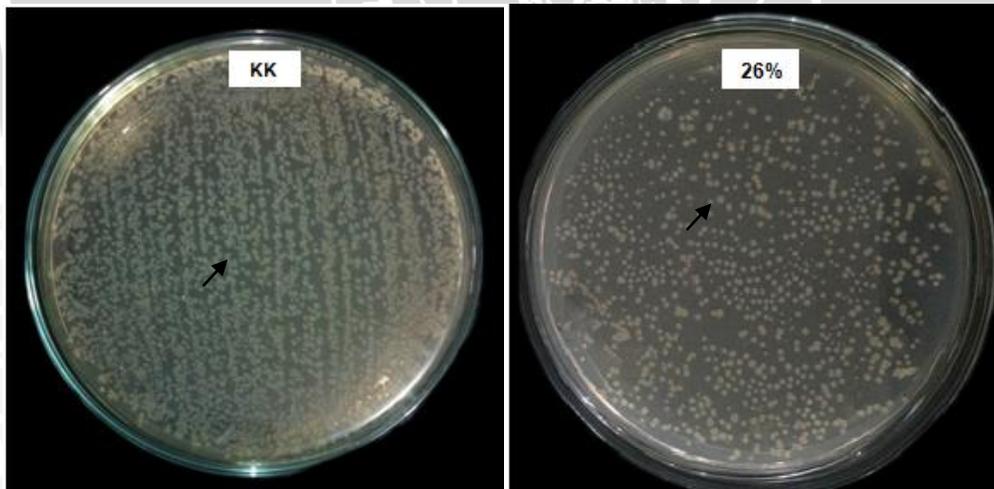
KBM merupakan kadar terendah dari antimikroba yang dapat membunuh bakteri (ditandai dengan tidak tumbuhnya bakteri pada NAP) atau pertumbuhan koloninya kurang dari 0,1% dari jumlah koloni inokulum awal (OI/ *Original Inoculum*) pada medium NAP yang telah dilakukan penggoresan sebanyak satu ose sebelumnya (Dzen et al, 2010)

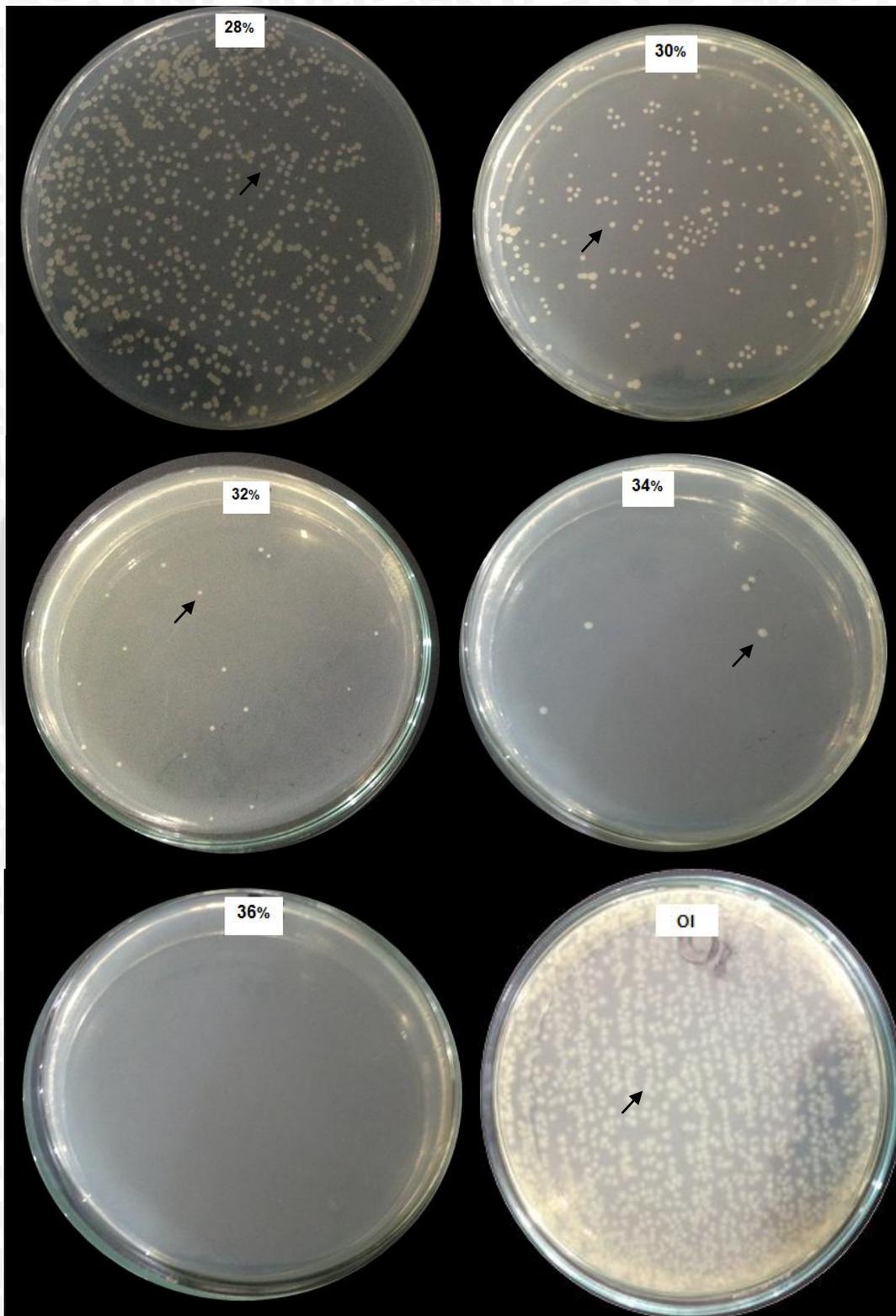
Hasil pengukurannya dapat dilihat pada Tabel 5.1 dan pertumbuhan *S.Typhi* dari perbenihan media NAP dapat diamati pada Gambar 5.6.

Tabel 5.1 Jumlah Koloni S.Typhi pada Berbagai Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah (per Ose)

Konsentrasi Ekstrak	Pengulangan				Rerata Koloni ± SD
	1	2	3	4	
OI	9021	9021	9021	9021	9021 ± 0
0% (KK)	1.793.097	661.284	1.907.550	915.624	1.319.388 ± 623397
26%	5342	2671	5087	4197	4325 ± 1206
28%	1271	1017	1145	1399	1208 ± 164
30%	293	318	343	382	334 ± 37
32%	16	17	24	15	18 ± 4
34%	7	5	7	1	5 ± 2
36%	0	0	0	0	0 ± 0

Keterangan : 1 ose = 10⁻³ CFU/ml
 OI : Original Inoculum
 KK : Kontrol Kuman





Gambar 5.6. Pertumbuhan Koloni S.Typhi pada Media NAP

Keterangan :

OI : Original Inoculum

KK : Kontrol Kuman

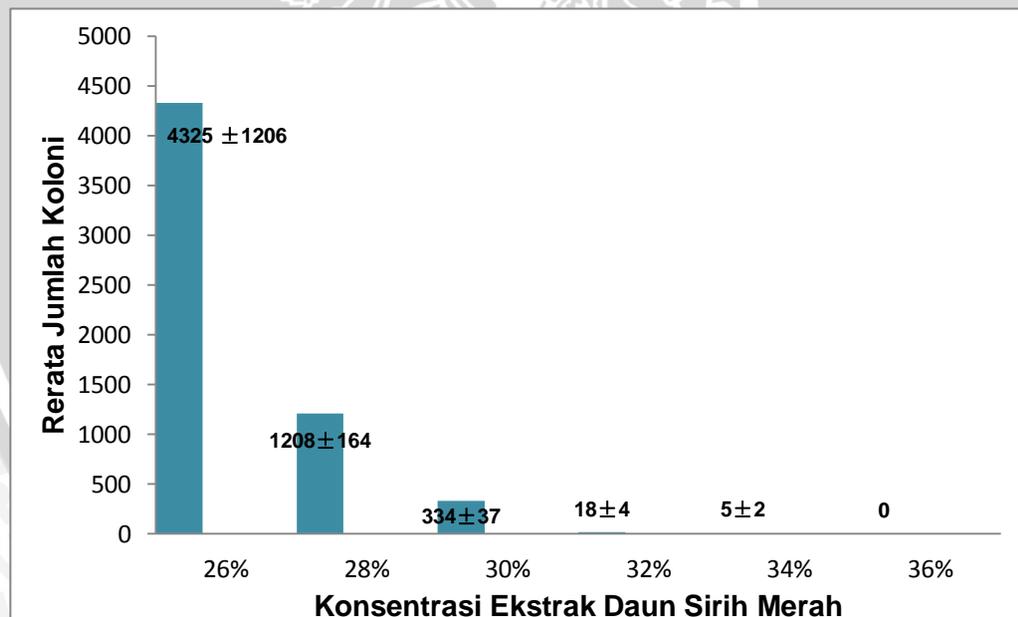
S.Typhi diinokulasikan pada plate dengan konsentrasi ekstrak 0%,26%,28%,30%,32%,34%, dan 36%. S.Typhi diinokulasikan pada plate dengan konsentrasi ekstrak 34% masih terlihat pertumbuhan beberapa bakteri sedangkan pada plate dengan konsentrasi ekstrak 36% sama sekali tidak terlihat pertumbuhan bakteri. Terlihat bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak dapat menurunkan jumlah koloni bakteri yang tumbuh ditunjukkan dengan tanda panah.

Untuk melakukan *True Experiment*, pada tabung dengan konsentrasi ekstrak 0% (kontrol kuman) dilakukan pengenceran suspensi bakteri dengan larutan NaCl sebanyak 1000x, sedangkan pada tabung dengan konsentrasi ekstrak 26% dilakukan pengenceran suspensi bakteri dengan larutan NaCl sebanyak 10x, pada tabung konsentrasi ekstrak sisanya yaitu 28%, 30%, 32%, 34%, 36% tidak dilakukan pengenceran. Pengenceran tersebut dilakukan saat sebelum melakukan streaking pada NAP. Apabila pada konsentrasi ekstrak 0% dan 26% tidak dilakukan pengenceran maka akan didapatkan pertumbuhan koloni bakteri yang sangat tebal dan tidak dapat dihitung secara kuantitatif pada *colony counter*.

Pada cawan petri KK (Kontrol Kuman) didapatkan koloni rata-rata sejumlah 1.319.388 koloni, pada konsentrasi ekstrak 26% didapatkan koloni rerata sejumlah 4325 koloni, pada konsentrasi ekstrak 28% didapatkan koloni rerata sejumlah 1208 koloni, pada konsentrasi ekstrak 30% didapatkan koloni rerata sejumlah 334 koloni, pada konsentrasi ekstrak 32% didapatkan koloni rerata sejumlah 18 koloni, pada

konsentrasi ekstrak 34% didapatkan koloni rerata sejumlah 5 koloni, dan pada konsentrasi ekstrak 36% didapatkan koloni rerata sejumlah 0 koloni. Sedangkan pada OI didapat rerata koloni sebesar 9021 koloni. Dari hasil pengukuran dapat diketahui bahwa terjadi penurunan rerata jumlah pertumbuhan koloni *S.Typhi* seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak etanol daun sirih merah.

Berdasar Gambar 5.6 dan Tabel 5.1 diperoleh nilai KBM pada konsentrasi 36% dimana jumlah koloni yang tumbuh (0 Koloni) memenuhi syarat KBM yaitu $<0,1\%$ dari Original Inoculum (9 koloni). Dapat terlihat pola dimana semakin tinggi konsentrasi ekstrak, jumlah pertumbuhan garfik 5.7 berikut :



Gambar 5.7. Grafik Data Pertumbuhan Rerata Jumlah Koloni *S.Typhi* pada Berbagai Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah

Berdasarkan hasil pengamatan pada Tabel 5.1 didapatkan hasil pengulangan penelitian sebanyak 4 kali. Hasil pengamatan pada medium NAP sebagai berikut. Rerata jumlah koloni bakteri setelah diberikan perlakuan ekstrak daun sirih merah pada konsentrasi 26% (4325 koloni) menurun tajam dibandingkan dengan jumlah rerata koloni bakteri kelompok kontrol positif atau konsentrasi 0% (1.319.388 koloni). Tampak bahwa rerata jumlah pertumbuhan koloni bakteri semakin menurun seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak. Pada konsentrasi 32% jumlah koloni mencapai <0,5% dari jumlah koloni pada konsentrasi 26% sehingga pada konsentrasi selanjutnya yaitu 36% sudah tidak didapatkan pertumbuhan bakteri *S.Typhi*

Setelah itu, hasil penelitian akan di analisis dengan uji komparasi untuk mengetahui perbedaan sensitivitas tiap variasi konsentrasi ekstrak daun sirih merah terhadap bakteri *S.Typhi*, serta pengujian dengan korelasi dan regresi untuk mengetahui lebih jauh mengenai pengaruh pemberian ekstrak daun sirih merah terhadap pertumbuhan koloni *S.Typhi*

5.2. Analisis Data

Pada penelitian ini, pemberian ekstrak etanol daun sirih merah pada pertumbuhan *S.Typhi* dengan menggunakan metode dilusi tabung. Variabel bebas dari penelitian ini adalah ekstrak daun sirih merah yang dibuat dengan konsentrasi kadar ekstrak berbeda sedangkan variabel tergantung dari penelitian ini adalah pertumbuhan koloni pada medium NAP. Data yang diperoleh adalah data kuantitatif dari hasil penghitungan jumlah pertumbuhan bakteri pada medium NAP yang diinkubasikan pada

suhu 37°C selama 24 jam dan kemudian dihitung jumlah koloninya menggunakan colony counter. Analisis data yang digunakan adalah uji hipotesis komparatif dan korelasi. Jumlah pertumbuhan koloni merupakan variabel rasio sehingga uji hipotesis komparatif yang digunakan adalah uji parametrik. Variabel bebas dari penelitian ini tidak berpasangan sehingga uji parametrik yang digunakan adalah kruskal-wallis dikarenakan pada syarat penggunaan uji parametrik ANOVA tidak terpenuhi (distribusi data normal namun data tidak homogen). Kemudian untuk mengetahui pengaruh peningkatan konsentrasi ekstrak daun sirih merah terhadap pertumbuhan *S.Typhi* maka digunakan uji statistik Kolerasi Spearman.

5.2.1. Uji Normalitas Data

Untuk menguji normalitas sebaran data pada sampel ada 2 macam uji yang digunakan, yaitu *Kolmogorov Smirnof* dan *Saphiro Wilk*. Pada jumlah sampel lebih dari 50 sampel, digunakan uji *Kolmogorov Smirnof* dan sebaliknya pada jumlah sampel kurang dari 50, digunakan uji *Saphiro Wilk*. Pada penelitian ini, jumlah sampel kurang dari 50 sampel, digunakan uji *Saphiro Wilk*.

Berdasar hasil uji normalitas *Shapiro Wilk*, distribusi data jumlah koloni bakteri adalah normal (karena nilai signifikansi data $p > 0.05$) pada semua kelompok. H_0 (sebaran data tidak normal) ditolak, dan H_1 (sebaran data normal) diterima.

5.2.2. Uji Homogenitas Data

Untuk menguji variasi data, digunakan uji Levene (*Levene Statistic test of homogeneity of variances*). Berdasar hasil uji homogenitas data, data memiliki varians tidak homogen (karena nilai signifikansi data

$p < 0.05$). H_0 (varian data heterogen) diterima, dan H_1 (varian data homogen) ditolak. Selanjutnya, digunakan transformasi data akar kuadrat, dan dilakukan pengulangan uji variansi data yang sama, didapat nilai signifikansi tetap yaitu $p < 0.05$. Sehingga data tetap dinyatakan tidak homogen.

Karena salah satu syarat Uji *One Way ANOVA* tidak terpenuhi (varians tidak homogen) maka analisis data dilanjutkan dengan uji Kruskal Wallis.

5.2.3. Uji Kruskal Wallis

Uji Kruskal Wallis bertujuan untuk mengevaluasi apakah terdapat perbedaan rerata jumlah koloni secara bermakna antar kelompok variasi konsentrasi ekstrak. Hipotesis yang digunakan adalah :

H_0 : Tidak terdapat perbedaan rerata jumlah koloni secara bermakna pada masing-masing kelompok

H_1 : Terdapat perbedaan rerata jumlah koloni secara bermakna pada masing-masing kelompok

Hipotesis nol (H_0) diterima bila $p > 0,05$ dan sebaliknya, H_0 ditolak bila $p < 0,050$. Berdasarkan hasil uji Kruskal Wallis pada Lampiran didapatkan bahwa $p = 0,000$ ($p < 0,050$) sehingga H_0 ditolak dan disimpulkan bahwa terdapat perbedaan rerata jumlah koloni secara bermakna pada masing-masing kelompok.

Untuk mengetahui kelompok manakah yang berbeda secara signifikan, analisis dilanjutkan dengan *Post-hoc Mann-Whitney Test*.

5.2.4. Uji Berganda (Multiple Comparison)

Uji multikomparasi *post hoc Mann Whitney* bertujuan untuk mengetahui perbedaan rerata jumlah koloni bakteri antara 7 macam konsentrasi yang berbeda. Perbedaan jumlah koloni dianggap bermakna apabila $p < 0,05$. Ringkasan uji Mann Whitney ditampilkan pada tabel berikut.

Tabel 5.2
Ringkasan Nilai Signifikansi (p) Uji Mann Whitney

Kons.	0%	26%	28%	30%	32%	34%	36%
0%	-	0,021*	0,021*	0,021*	0,021*	0,020*	0,014*
26%	0,021*	-	0,021*	0,021*	0,021*	0,020*	0,014*
28%	0,021*	0,021*	-	0,021*	0,021*	0,020*	0,014*
30%	0,021*	0,021*	0,021*	-	0,021*	0,020*	0,014*
32%	0,021*	0,021*	0,021*	0,021*	-	0,020*	0,014*
34%	0,020*	0,020*	0,020*	0,020*	0,020*	-	0,013*
36%	0,014*	0,014*	0,014*	0,014*	0,014*	0,013*	-

Keterangan : * = berbeda signifikan

Berdasarkan Tabel 5.2, terdapat perbedaan jumlah koloni bakteri yang bermakna antara semua kelompok jika dibandingkan satu per satu ($p < 0,05$).

5.2.5. Uji Regresi Linier

Uji regresi linier merupakan uji statistik yang dilakukan untuk mengetahui besar pengaruh variabel independen (konsentrasi ekstrak etanol daun sirih merah) terhadap variabel dependen (jumlah koloni bakteri). Persamaan Garis regresi menggunakan metode kuadrat terkecil (*least square method*) yang didapat adalah :

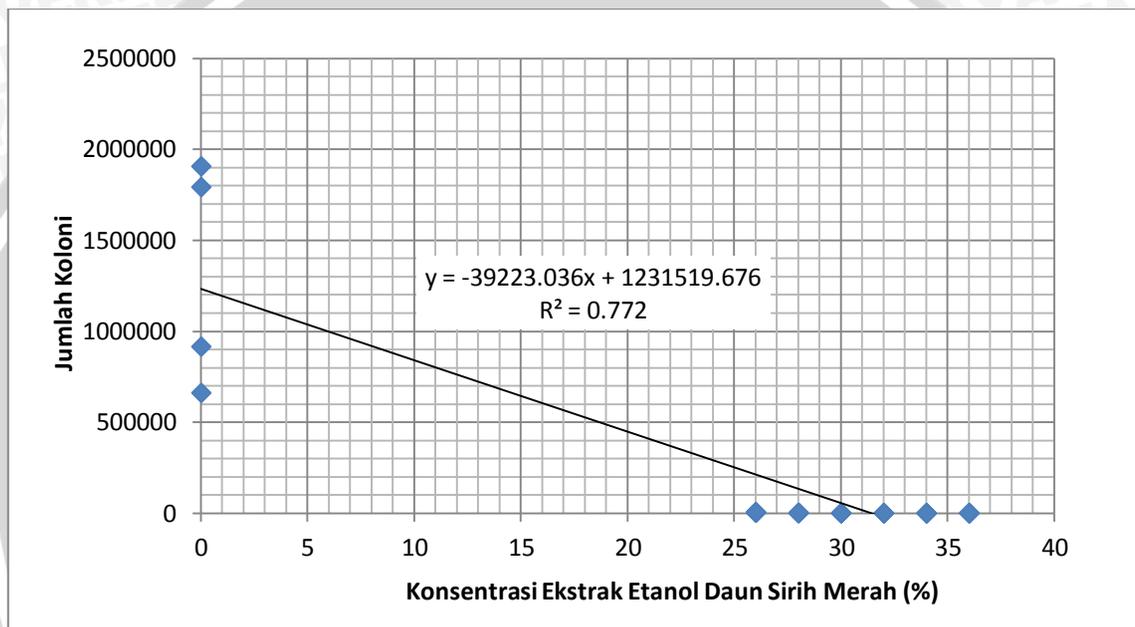
$$Y = 1231519,676 - 39223,036X$$

Keterangan :

Y = Jumlah Koloni Bakteri

X = Konsentrasi Ekstrak

Berikut adalah garis regresi yang terbentuk berdasarkan persamaan regresi:



Gambar 5.8. Grafik Regresi

Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah terhadap Jumlah Koloni

Dari gambar 5.8 terlihat bahwa garis regresi mengarah ke kanan bawah. Hal tersebut menunjukkan adanya linieritas dari pemberian ekstrak terhadap jumlah koloni bakteri dengan gradien negatif. Artinya, peningkatan perlakuan berupa pemberian konsentrasi ekstrak daun sirih merah akan menurunkan jumlah koloni bakteri *S.Typhi* pada konsentrasi yang lebih rendah maupun pada kelompok kontrol.

5.2.6. Uji korelasi Spearman

Uji korelasi Spearman digunakan untuk mengetahui pengaruh peningkatan konsentrasi ekstrak daun sirih merah terhadap pertumbuhan *S.Typhi*

Pemberian ekstrak etanol daun sirih merah sebagai antibakteri terhadap *S.Typhi* (Spearman rho = -0.992, p=0.00) mempunyai hubungan yang signifikan (p <0.05) dengan arah korelasi yang negatif (karena koefisien korelasi bernilai negatif). Artinya pada peningkatan konsentrasi ekstrak etanol daun sirih merah akan cenderung menurunkan pertumbuhan bakteri *S.Typhi* yang dihasilkan pada agar plate dibandingkan dengan konsentrasi yang lebih rendah. Nilai korelasi sebesar -0.992 dapat menunjukkan bahwa korelasi yang sangat kuat antara pemberian ekstrak etanol daun sirih merah dan penurunan pertumbuhan bakteri *S.Typhi* sehingga dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi pemberian konsentrasi ekstrak etanol daun sirih merah mengakibatkan semakin rendah pertumbuhan bakteri *S.Typhi*.

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1. Pembahasan Hasil Penelitian.

Penelitian ekstrak etanol daun sirih merah terhadap *Salmonella* Typhi secara *in-vitro* telah dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun sirih merah berpotensi sebagai penghambat pertumbuhan bakteri *S.Typhi*. Hasil ini ditunjukkan dengan Kadar Hambat Minimum, dimana Kadar Hambat Minimum dilihat dengan melihat tingkat kekeruhan larutan ekstrak etanol daun sirih merah dengan bakteri *S.Typhi* yang hasilnya secara kualitatif yakni pada konsentrasi 30%. KBM ditentukan dengan jumlah pertumbuhan koloni yang tumbuh di medium NAP dan berdasarkan hasil didapat jumlah pertumbuhan bakteri <0.1% dari OI(9 koloni). Oleh karena itu didapat KBM sebesar 36% (0 Koloni). Selain itu, dari hasil penelitian dapat diketahui bahwa semakin besar konsentrasi ekstrak semakin rendah pertumbuhan bakteri *S.Typhi*.

Jika penelitian ini dibandingkan dengan penelitian-penelitian sebelumnya, maka efektivitas ekstrak etanol daun sirih merah terhadap *S.Typhi* lebih efektif dengan dosis KBM dan KHM yang lebih rendah dibandingkan ekstrak lain yang juga menghambat bakteri *S.Typhi*. Hal ini ditunjukkan dengan penelitian yang dilakukan oleh Utami (2011), tentang efek antimikroba ekstrak etanol biji jintan hitam (*Nigella sativa* L.) terhadap *S.Typhi* secara *in-vitro* didapatkan hasil KHM antimikroba tersebut adalah 45% serta KBM adalah 47,5%. Bernadi (2010), tentang uji efektivitas ekstrak etanol batang tanaman brotowali (*Tinospora crispa*) terhadap pertumbuhan bakteri *S.Typhi* secara *in-vitro* didapatkan KHM

antimikroba tersebut 50% dan KBM adalah 90%. Serta menurut penelitian Bangkit (2004), tentang pengaruh larutan dekok daun mahkota dewa (*Phaleria papuana*) sebagai antimikroba terhadap *S.typhi* secara in-vitro didapatkan KBM adalah 50%. Penelitian Usman (2004), tentang pengaruh dekok daun kemangi (*Occimum basilicum*) terhadap pertumbuhan kuman *S.Typhi* secara in-vitro didapatkan KBM adalah 50%.

Efek antibakteri ekstrak etanol daun sirih merah terhadap bakteri *S.Typhi* disebabkan oleh zat-zat seperti flavonoid, alkaloid, tanin, dan minyak atsiri. Senyawa flavonoid mampu menghambat enzim topoisomerase II (dimana DNA gyrase termasuk salah satu dari enzim kelas topoisomerase II) pada bakteri dan menyebabkan bakteri mengalami hambatan dalam melakukan replikasi DNA (Melderer, 2002). Flavonoid berikatan dengan protein ekstraseluler bakteri kemudian menyebabkan kerusakan dinding sel selain itu flavonoid bekerja membentuk kompleks lipid (lipofilik) menyebabkan kerusakan membran sel bakteri (Latifa, 2010).

Mekanisme kerja alkaloid dihubungkan dengan kemampuan mereka untuk berinteraksi atau melekatkan diri di antara DNA. Adanya zat yang berada diantara DNA akan menghambat replikasi DNA itu sendiri, akibatnya terjadi gangguan replikasi DNA (Latifa, 2010).

Mekanisme kerja tanin sebagai antimikroba yaitu dengan menginaktifkan adhesin sehingga bakteri tidak dapat melekat pada sel inang. Mekanisme antimikroba tanin berkaitan juga dengan kemampuan tannin membentuk kompleks dengan protein polipeptida dinding sel bakteri sehingga terjadi gangguan pada dinding bakteri dan bakteri lisis. mekanisme antibakteri minyak

atsiri (*volatile oil*) diperkirakan melalui proses destruksi membran sel bakteri oleh komponen lipofiliknya (Cowan, 1999).

Kerusakan dinding dan membran sel menyebabkan menyebabkan metabolit penting di dalam sel akan keluar, akibatnya terjadi kematian sel. Gangguan replikasi DNA juga menyebabkan kematian sel karena Setiap zat yang mengganggu sintesa ini akan mempengaruhi seluruh fase pertumbuhan dan metabolisme sel bakteri (Latifa, 2010).

6.2. Implikasi Terhadap Bidang Kedokteran.

Hasil penelitian ekstrak etanol daun sirih merah sebagai antibakteri *Salmonella Typhi* berpotensi untuk dijadikan bahan pengobatan penyakit demam tifoid yang disebabkan oleh bakteri *Salmonella Typhi*. Bahan daun sirih merah merupakan bahan yang murah, melimpah ruah dan mudah ditemukan di lingkungan sekitar. Selain itu, dengan adanya hasil penelitian ini dapat menjadikan tanaman sirih merah menjadi bagian dari tanaman apotik hidup yang bisa dikembangkan oleh masyarakat.

6.3. Keterbatasan Penelitian.

Keterbatasan dalam penelitian ini adalah tidak adanya standardisasi pemilihan bahan dalam pembuatan ekstrak etanol daun sirih merah (faktor penyinaran matahari pada saat pertumbuhan) serta lama masa simpan ekstrak yang masih dapat digunakan sebagai antibakteri.

Aplikasi klinis dari penelitian ini memang masih memerlukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui batasan dosis yang aman untuk ekstrak etanol daun sirih merah sebagai antibakteri *S.Typhi* sehingga perlu uji toksisitas agar dapat digunakan sebagai pengobatan alternatif oleh masyarakat.

BAB 7**KESIMPULAN DAN SARAN****7.1. Kesimpulan**

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun sirih merah terbukti efektif sebagai antibakteri terhadap bakteri *S.Typhi* secara *in vitro*.

- 1 Ekstrak daun sirih merah efektif sebagai antibakteri *Salmonella Typhi*
- 2 Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ekstrak etanol daun sirih merah terhadap pertumbuhan *Salmonella Typhi* didapatkan pada konsentrasi 30% dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ekstrak etanol daun sirih merah terhadap pertumbuhan *Salmonella Typhi* didapatkan pada konsentrasi 36%.
- 3 Semakin besar konsentrasi ekstrak daun sirih merah yang akan digunakan maka jumlah bakteri *Salmonella Typhi* yang tumbuh akan semakin menurun

7.2. Saran

Adapun saran yang dapat peneliti berikan dari penelitian ini adalah :

- 1 Perlu ada pemilihan standardisasi pemilihan bahan dalam pembuatan ekstrak etanol daun sirih merah (faktor penyinaran matahari pada saat pertumbuhan) serta lama masa simpan ekstrak yang masih dapat digunakan sebagai antibakteri

- 2 Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui batasan dosis yang aman untuk ekstrak etanol daun sirih merah sebagai antibakteri terhadap S.Typhi agar dapat digunakan sebagai pengobatan alternatif oleh masyarakat luas dengan menggunakan uji toksisitas.
- 3 Perlu penelitian lebih lanjut untuk mengetahui efektivitas ekstrak etanol daun sirih merah terhadap bakteri gram negatif lain dan sebagai anti fungi.



DAFTAR PUSTAKA

- Agnol R.D, Ferraz A, Bernardi A.P, Albring D, Nor C, Sarmento L, Lamb L. 2003. Anti Microbial activity of Some Hypericum Species. Brazil: TANAC SA. p. 511-516.
- Ajizah, A. 2004. Sensitifitas Salmonella Typhimurium Terhadap Ekstrak Daun Psidium Guajava L. *Bioscientiae Vol* 1(1). Halaman 31-38
- Alam, A. Pola Resistensi Salmonella Enterica Serotipe Typhi, Departemen Ilmu Kesehatan Anak RSHS, Tahun 2006-2010. *Sari Pediatri*, 2011; 12(5): 296-301.
- Ansel HC. 2008. Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi.EdisiIV. Jakarta:UI Press.
- Ariyani M, Kusumaningsih T, Rahardjo MB. 2007. Daya Hambat Ekstrak Daun Jambu Menté (*Anacardium occidentale*) Terhadap Pertumbuhan *Streptococcus sanguis*. *Jurnal PDGI*, Mei-Ags 2(57): 45.
- Bangkit. 2004. *Pengaruh Larutan Dekok Daun Mahkota Dewa (phaleria papuana) sebagai Antibakteri terhadap Salmonella Typhi Secara In Vitro*. Tugas Akhir. Tidak diterbitkan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
- Bergey HD, Holt GJ. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th Ed., Lippincot Williams and Wilkins, Philadelphia, Hal. 186-187.
- Benardi M. 2010. *Uji Efektifitas Ekstrak Etanol Batang Tanaman Brotowali (Tinospora crispa) terhadap Pertumbuhan Bakteri Salmonella Typhi Secara In Vitro*. Tugas Akhir. Tidak diterbitkan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
- Brooks GF, Butel J.S., Morses S.A. 2008. *Mikrobiologi Kedokteran*, Edisi 23, EGC, Jakarta, Hal. 260-264.
- Brusch John L. 2012. *Typhoid Fever*. (Online), (<http://emedicine.medscape.com/article/231135-overview#a0101>., diakses tanggal 10 Desember 2013).
- Chaurasia R, Jain A. 2009. *Self Assessment and Review Microbiology Immunology : Revision at a Glance*, 4th Ed., Jaypee Brothers Medical Publisher, India, p. 152-153.
- CLSI. 2006. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility test for Bacteria That Grow Aerobically : *Approved Standart- Seventh Edition*. 26(2): 13-14.
- Cordel, A. 1981. Introduction to Alkaloid, A Biogenetic Approach, A Willey Interscience Publication. New York: John Wiley and Sonc, Inc.

- Cowan, MM. Clinical Microbiology Reviews-Plant Products Antimicrobial Agent. *Ohio Department of Microbiology, Miami University*. 1999: 4(2);564-582.
- Darusman L. 2007. *Riset IPB*, (online), (<http://www.depkes.co.id/index.php>, diakses tanggal 10 November 2013).
- Domino F.J. 2007. *The 5-Minute Clinical Consult*, 1st Ed., Lippincot Williams and Wilkins, Philadhelpia, p. 1277.
- Dzen SM, Winarsih S, Roekitiningsih D, Santoso S, Sumarno, Islam S, Noorhamdani, Murwani S, Santosaningsih D. 2010. *Bakteriologi Medik*. Putra Media Nusantara., Surabaya, hal. 187-237.
- Fauci., Braunwald., Kasper., Hauser., Longo., Jameson., Loscalzo. 2008. *Harrisons Principles of Internal Medicine*. Mc Graw Hill Medical, United State of America, p. 956-960.
- Fox, G.J., Barthold, S., Davisson, M., Newcomer, E.C., Quimby, W.F. 2006. *The Mouse in Biomedical Research*. Diseases American College of Laboratory. Animal Medicine Series, p. 496-497.
- Greenwood D, Barer M, Slack R, Irving W. 2012. *Medical Microbiology : A Guide to Microbial Infections : Pathogenesis, Immunity, Laboratory Investigation and Control*, 18th Ed., Elsevier Saunders, Philadelphia , p. 259-260.
- Gupte S. 2006. *The Short Textbook of Medical Microbiology*, 9th Ed., Jaypee Brothers Medical Publisher, India, p. 218- 212.
- Hadinegoro S. Masalah *multiple drug resistance* pada demam tifoid anak. Dipresentasikan pada simposium New treatment of typhoid fever in children. Jakarta, 26 Agustus 1998.
- Hamdani S. 2012. Metode Ekstraksi, (Online), (<http://catatankimia.com/catatan/metoda-ekstraksi.html>), diakses tanggal 2 Januari 2013.
- Hammack Thomas M.S.,. 2012. *Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganism and Natural Toxins*, 2nd Ed., Center for Food Safety and Applied Nutrition, of the Food and Drug Administration (FDA), USA, p. 9-10.
- Harborne, J.B. 1987. *Metode Fitokimia : Penentuan Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, Edisi 2, diterjemahkan oleh Padmawinata, dan Soediro, Penerbit ITB, Bandung.
- Hariana. 2008. *Tumbuhan Obat dan Khasiatnya*, Edisi III. Penebar Swadaya, Jakarta. Halaman 88-91.
- Hawkey P.M, Gillespie S.H. 2006. *Principle and Practice of Clinical Bacteriology*, 2th Ed., Willey, England, p. 372.

- Hertiani, T. 2002. Minyak Atsiri Hasil Destilasi Ekstrak Etanol Daun Sirih (*Piper betle* L.) dari Beberapa Daerah di Yogyakarta dan Aktivitas Anti Jamur terhadap *Candida albicans*. *Majalah Farmasi Indonesia XIII*(4).
- Judarwanto W. 2012. *demam Tifoid (Tifus), Manifestasi klinis dan Penanganannya*. (Online), (<http://growupclinic.com/2012/02/17/demam-tifoid-tifus-manifestasi-klinis-dan-penanganannya/>), diakses tanggal 10 Desember 2013).
- Juliantina F, Citra D.A.M, Nirwani B, Nurmasitoh T, Bowo E.T. 2009. Manfaat Sirih Merah (*Piper crocatum* Sebagai Agen Anti Bakterial Terhadap Bakteri Gram Positif dan Gram Negatif. *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia*.
- Katzung B. 2004. *Basic and Clinica Pharmacology*, 9th Ed., McGraw-Hill Medical, UK, p. 210-211.
- Kemenkes RI. 2012. Profil Kesehatan Indonesia Tahun 2011, Jakarta. hal. 59-60.
- Kristanti A.N. 2008. *Buku Ajar Fitokimia*, edisi I, Airlangga University Press, Surabaya, hal. 74-76.
- Latifa D. 2010. *Perbandingan Efektivitas Dekok Daun Sirih Hijau (Piper betle) dan Dekok Daun Sirih Merah (Piper crocatum) Terhadap Staphylococcus aureus Secara In Vitro*. Tugas Akhir. Tidak diterbitkan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
- Listorti J.A, Doumani F.M. 2001. Environmental Health: Bridging the Gaps. World Bank Discusion Paper No 422, USA, p. 328-330.
- Mastroeni P, Maskell D. 2006. *Salmonella Infections*, 1st Ed., Cambridge University Press, New York, p. 27-28.
- Mehrota R. 2009. *Principle of Microbiology*, 1st Ed., McGraw Hill, New Delhi, p 140-141.
- Melderer L.V. 2002. *Molecular interaction of the CcdB poison with its bacterial target the DNA gyrase*. IJMM. hal. 291, 537-544.
- Moehariono L.H, Tjoa E, Veronica, Kalay, Abidin A. Antibiotic Susceptibility Patterns of Salmonella Typhi in Jakarta and Surrounding Areas. *Salmonella-A Diversified Superbug*, 2012 ; 1; 91-98.
- Murray, PR; Baron EJ; Pfaller MA; Tenover FC; Tenover RH. 1999. *Manual of Clinical Microbiology* 7th Edition. America Society For Microbiology.
- Murray, Rosenthal, Pfaller. 2013. *Medical Microbiology*, 7th Ed., Elsevier Saunders, Philadelphia , p. 265-266.
- Murti M, Ningrum E.K, Latief A. 2012. Dahsyatnya Khasiat Herbal Untuk Hidup Sehat, *Dunia Sehat*, Jakarta.

- Mus. 2012. *Sirih Merah (Piper crocatum Ruiz & Pav)*. (Online), (<http://plantamor.com/index.php?plant=2092>, diakses tanggal 10 November 2013).
- Nasronudin. 2011. *Penyakit Infeksi di Indonesia Solusi Kini dan Mendatang*, Edisi II, Pusat Penerbitan dan Percetakan Unair, Surabaya, hal. 187-190.
- Ngaisah S. 2010. *Identifikasi dan Uji Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Daun Sirih merah (Piper crocatum Ruiz & Pav) Asal Magelang*. Tugas Akhir. Tidak Diterbitkan, Fakultas MIPA Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Oxoid. 2003. *Manual Identification system*. Microbact Gram-Negatif 12A, 12B, 12E & 24E (<http://www.oxoid.com/pdf/uk/M-bact-Gram-Neg.pdf>, diakses pada tanggal 10 Desember 2013)
- Parija. 2009. *Textbook of Microbiology & Immunology*. Rajkamal Electric Press. India, p. 165-171.
- Puji Astuti I., Munawaroh Esti. Karakteristik Morfologi Daun Sirih Merah : *Piper crocatum Ruitz & Pav* dan *Piper porphyrophyllum* N.E.Br Koleksi Kebun Raya Bogor. *Berk. Panel. Hayati Edisi Khusus*, 2011; 7A: 83-85.
- Robinson, T., 1991, Kandungan OrganikTumbuhan Tingkat Tinggi, ITB, Bandung:132-6.
- Sabir, A. 2005. AKtivitas Antibakteri Flavonoid Propolis Trigona sp Terhadap Bakteri Streptococcus Mutans (In Vitro). *Majalah Kedokteran Gigi (Dent.J)*, Vol 38. No.3 Juli-September 2005: 135-141.
- Setiabudy R. 2007. *Farmakologi dan Terapi*, edisi 5, Balai Penerbit FKUI, Jakarta, hal. 586-587.
- Sudaryanti. 1990. Budidaya dan Penyulingan Nilam. Penebar Swadaya. Jakarta.
- Sudewo B. 2006. Sehat dengan Ramuan Tradisional : Basmi Penyakit dengan Sirih Merah. *Agro Media*, hal. 38-45.
- Todar, K. 2008. *Salmonella and Salmonellosis*. (Online), (http://www.textbookofbacteriology.net/salmonella_5.html., diakses tanggal 10 Desember 2013).
- Tijpto B.W, Kristiana L, Ristrini. Kajian Faktor Pengaruh Terhadap Penyakit Demam Tifoid Pada Balita Indonesia. *Buletin Penelitian Sistem Kesehatan*, 2009; 12(4): 313-340.
- Tsuchiya H, Sato M, Mizaki T, Fujiwara S, Tanigaki S, Ohyama M, Tanaka T, linuma M. Comparative Study on The Antibacterial Activity of Phytochemical Flavones Against MRSA. *J. Ethopharmacol*, 1996; 50(1):27-34.

- Usman. 2004. *Pengaruh Dekok Daun Kemangi (Occimum basilicum) terhadap Pertumbuhan Kuman Salmonella Typhi Secara In Vitro*. Tugas Akhir. Tidak diterbitkan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
- Utami A. 2011. *Efek Antimikroba Ekstrak Etanol Biji Jintan Hitam (Nigella Sativa L.) terhadap Salmonella Typhi Secara In Vitro*. Tugas Akhir. Tidak diterbitkan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
- Utami P, Puspaningtyas D.E. 2013. *The Miracle of Herbs*, Edisi I, Agro Media Pustaka, Jakarta, hal. 169-170.
- Vaishnavi, C. 2013. *Infections of the Gastrointestinal System*. Jaypee Brothers Medical Publishers. India, p. 232-233.
- Wahyuningsih M.S.H. 2011. *Deskriptif Penelitian Dasar Herbal Medicine*. Tesis. Tidak diterbitkan, Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.
- WHO. *A study of typhoid fever in five Asian countries: disease burden and implications for controls*, Press Rellease, WHO/4, April 2008, Office of information, p. 241-320.
- Widjaja, H. 2009. *Anatomi Abdomen*, Edisi I, Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta, hal. 24-24.
- Widodo, D. 2009. *Buku ajar Ilmu Penyakit Dalam*, Pusat Penerbitan Departemen Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta, hal.2797-2805.
- Zaki S.A, Karande S. Multidrug-resistant Typhoid Fever : A Review. *J Infect Dev Ctries*, 2011; 5(5): 324-337.

DAFTAR LAMPIRAN

Using IBM SPSS Statistic Version 22

1. Uji normalitas (untuk jumlah sampel kurang dari 50, digunakan uji *Saphiro Wilk*, sebaran data normal , jika signifikansi >0.05)

Tests of Normality^b

	Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah	Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.
Jumlah Koloni	0%)	.861	4	.265
	26%	.901	4	.437
	28%	.993	4	.974
	30%	.987	4	.944
	32%	.807	4	.115
	34%	.827	4	.161

a. Lilliefors Significance Correction

b. Jumlah Koloni is constant when Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah = 36%. It has been omitted.

Tests of Normality^b

	Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah	Shapiro-Wilk		
		Statistic		Sig.
Log(Koloni)	0%)	.877	4	.325
	26%	.863	4	.273
	28%	.992	4	.965
	30%	.994	4	.977
	32%	.839	4	.193
	34%	.768	4	.056

a. Lilliefors Significance Correction

b. Log(Koloni) is constant when Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah = 36%. It has been omitted.

2. Uji homogenitas (varian data homogen, jika signifikansi >0.05).
menggunakan uji *Levene*. Didapatkan data tidak homogen.

Test of Homogeneity of Variance^a

		Levene Statistic	df 1	df 2	Sig.
Log(Koloni)	Based on Mean	3.688	5	18	.018
	Based on Median	1.469	5	18	.249
	Based on Median and with adjusted df	1.469	5	5.213	.337
	Based on trimmed mean	3.145	5	18	.033

a. Log(Koloni) is constant when Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah = 36%. It has been omitted.

Data di uji homegenitasnya dengan transformasi data akar kuadrat.
Didapat data tidak homogen.

Test of Homogeneity of Variance^a

		Levene Statistic	df 1	df 2	Sig.
Log(Koloni)	Based on Mean	3.688	5	18	.018
	Based on Median	1.469	5	18	.249
	Based on Median and with adjusted df	1.469	5	5.213	.337
	Based on trimmed mean	3.145	5	18	.033

a. Log(Koloni) is constant when Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah = 36%. It has been omitted.

3. Uji *Kruskal Wallis*

Ranks

	Konsentrasi Ekstrak	N	Mean Rank
Jumlah Koloni	0%	4	26.50
	26%	4	22.50
	28%	4	18.50
	30%	4	14.50
	32%	4	10.50
	34%	4	6.50
	36%	4	2.50
	Total		28

Test Statistics^{a,b}

	Jumlah Koloni
Chi-Square	26.563
df	6
Asy mp. Sig.	.000

- a. Kruskal Wallis Test
- b. Grouping Variable: Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah

4. Uji Mann Whitney (perbandingan antar perlakuan yang menghasilkan perubahan yang bermakna, jika nilai signifikansi <0.05)

Ranks

	Konsentrasi Ekstrak	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Jumlah Koloni	0% (4	6.50	26.00
	26%	4	2.50	10.00
	Total	8		

Test Statistics^b

	Jumlah Koloni
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asy mp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah

Ranks

	Konsentrasi Ekstrak	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Jumlah Koloni	0% (4	6.50	26.00
	28%	4	2.50	10.00
	Total	8		

Test Statistics^b

	Jumlah Koloni
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asy mp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah

Ranks

Konsentrasi Ekstrak		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Jumlah Koloni	0%	4	6.50	26.00
	30%	4	2.50	10.00
	Total	8		

Test Statistics^b

	Jumlah Koloni
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah

Ranks

Konsentrasi Ekstrak		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Jumlah Koloni	0%	4	6.50	26.00
	32%	4	2.50	10.00
	Total	8		

Test Statistics^b

	Jumlah Koloni
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah

Ranks

Konsentrasi Ekstrak		N	Mean Rank	Sum of Ranks
Jumlah Koloni	0% (4	6.50	26.00
	34%	4	2.50	10.00
	Total	8		



Test Statistics^b

	Jumlah Koloni
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.323
Asy mp. Sig. (2-tailed)	.020
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah

Ranks

	Konsentrasi Ekstrak	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Jumlah Koloni	0% (KP)	4	6.50	26.00
	36%	4	2.50	10.00
	Total	8		

Test Statistics^b

	Jumlah Koloni
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.460
Asy mp. Sig. (2-tailed)	.014
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah

Ranks

	Konsentrasi Ekstrak	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Jumlah Koloni	26%	4	6.50	26.00
	28%	4	2.50	10.00
	Total	8		

Test Statistics^b

	Jumlah Koloni
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asy mp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah

Ranks

	Konsentrasi Ekstrak	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Jumlah Koloni	26%	4	6.50	26.00
	30%	4	2.50	10.00
	Total	8		

Test Statistics^b

	Jumlah Koloni
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asy mp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah

Ranks

	Konsentrasi Ekstrak	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Jumlah Koloni	26%	4	6.50	26.00
	32%	4	2.50	10.00
	Total	8		

Test Statistics^b

	Jumlah Koloni
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asy mp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah

Ranks

	Konsentrasi Ekstrak	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Jumlah Koloni	26%	4	6.50	26.00
	34%	4	2.50	10.00
	Total	8		



Test Statistics^b

	Jumlah Koloni
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.323
Asymp. Sig. (2-tailed)	.020
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah

Ranks

	Konsentrasi Ekstrak	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Jumlah Koloni	26%	4	6.50	26.00
	36%	4	2.50	10.00
Total		8		

Test Statistics^b

	Jumlah Koloni
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.460
Asymp. Sig. (2-tailed)	.014
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah

Ranks

	Konsentrasi Ekstrak	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Jumlah Koloni	28%	4	6.50	26.00
	30%	4	2.50	10.00
Total		8		



Test Statistics^b

	Jumlah Koloni
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah

Ranks

	Konsentrasi Ekstrak	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Jumlah Koloni	28%	4	6.50	26.00
	32%	4	2.50	10.00
	Total	8		

Test Statistics^b

	Jumlah Koloni
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah

Ranks

	Konsentrasi Ekstrak	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Jumlah Koloni	28%	4	6.50	26.00
	34%	4	2.50	10.00
	Total	8		

Test Statistics^b

	Jumlah Koloni
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.323
Asy mp. Sig. (2-tailed)	.020
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah

Ranks

	Konsentrasi Ekstrak	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Jumlah Koloni	28%	4	6.50	26.00
	36%	4	2.50	10.00
Total		8		

Test Statistics^b

	Jumlah Koloni
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.460
Asy mp. Sig. (2-tailed)	.014
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah

Ranks

	Konsentrasi Ekstrak	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Jumlah Koloni	30%	4	6.50	26.00
	32%	4	2.50	10.00
Total		8		



Test Statistics^b

	Jumlah Koloni
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asy mp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah

Ranks

	Konsentrasi Ekstrak	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Jumlah Koloni	30%	4	6.50	26.00
	34%	4	2.50	10.00
Total		8		

Test Statistics^b

	Jumlah Koloni
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.323
Asy mp. Sig. (2-tailed)	.020
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah

Ranks

	Konsentrasi Ekstrak	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Jumlah Koloni	30%	4	6.50	26.00
	36%	4	2.50	10.00
Total		8		



Test Statistics^b

	Jumlah Koloni
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.460
Asymp. Sig. (2-tailed)	.014
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah

Ranks

	Konsentrasi Ekstrak	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Jumlah Koloni	32%	4	6.50	26.00
	34%	4	2.50	10.00
Total		8		

Test Statistics^b

	Jumlah Koloni
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.323
Asymp. Sig. (2-tailed)	.020
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah

Ranks

	Konsentrasi Ekstrak	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Jumlah Koloni	32%	4	6.50	26.00
	36%	4	2.50	10.00
Total		8		



Test Statistics^b

	Jumlah Koloni
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.460
Asymp. Sig. (2-tailed)	.014
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah

Ranks

	Konsentrasi Ekstrak	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Jumlah Koloni	34%	4	6.50	26.00
	36%	4	2.50	10.00
	Total	8		

Test Statistics^b

	Jumlah Koloni
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.477
Asymp. Sig. (2-tailed)	.013
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^a

- a. Not corrected for ties.
- b. Grouping Variable: Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah

5. Korelasi Spearman (untuk mengukur kekuatan hubungan antara perlakuan dan hasil)

Signifikansi <0.05, hubungan antara perlakuan dan hasil, bermakna signifikan. Rentang nilai Koefisien Korelasi antara 0 sampai 1 atau -1, nilai Koefisien Korelasi = -0,992, berarti hubungan “negatif”, kekuatan “sangat kuat”



Correlations

			Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah	Jumlah Koloni
Spearman's rho	Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah	Correlation Coef ficient	1.000	-,992*
		Sig. (2-tailed)	.	.000
		N	28	28
	Jumlah Koloni	Correlation Coef ficient	-,992*	1.000
		Sig. (2-tailed)	.000	.
		N	28	28

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

Variabel	Rata-rata ± SD	r	Signifikansi	Keterangan
Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah	26,571 ± 11,507	-0,992	0,000	Terdapat hubungan yang signifikan
Jumlah Koloni	189307,6 ± 513677,4			

6. Persiapan Bahan Ekstrak

**DINAS KESEHATAN PROPINSI JAWA TIMUR**
UPT MATERIA MEDICA
Jalan Lahor No.87 Telp. (0341) 593396 Batu (65313)
KOTA BATU

Nomor : 074 / 164 / 101.8 / 2014
Sifat : Biasa
Perihal : Determinasi Tanaman Sirih Merah

Memenuhi permohonan saudara :

Nama : YULIZA RAHMAYANTI
N I M : 115070107111025
Fakultas : Jurusan Pendidikan Dokter
Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

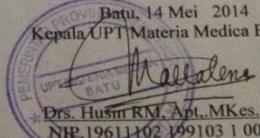
- Perihal determinasi tanaman sirih merah

Kingdom	: Plantae
Sub Kingdom	: (Tracheobionta (tumbuhan berpembuluh)
Super Divisi	: Spermatophyta. (Menghasilkan Biji)
Divisi	: Angiospermae/ Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
Kelas	: Dicotyledonae/ Magnoliopsida (Berkeping dua)
Bangsa	: Piperales
Suku	: Piperaceae
Marga	: Piper
Jenis	: <i>Piper crocatum</i>
Sinonim	: <i>Piper cf fragile</i> Benth
Kunci determinasi	: 1b-2b-3b-4b-6b-7b-9a-41b-42b-43b-54b-59b-61-62b-63a-64a
- Morfologi: Habitus : Perdu, merambat, . Batang : Berkayu, bulat, berbuku-buku, beralur, hijau. Daun Tunggal, ujung meruncing, bulat panjang, pangkal bentuk jantung tepi rata, panjang 5-8 cm, lebar 2-5 cm, bertangkai, permukaan halus, pertulangan menyirip Warna bagian bawahnya merah mengkilap dengan bentuk daun. Akar : Tunggang, buiat, coklat kekuningan.
- Nama Simplicia : *Piperis crocati Folium* / Daun Sirih Merah
- Kandungan kimia : Alkaloid, terpenoid, isprenoid, flavonoid, saponin, cyanogenik, glukosida, glu-casonilate, tanin, senyawa polevenolad dan non protein amino acid.
- Penggunaan : Penelitian

Daftar Pustaka :

- Syamsuhidayat, Sri sugati, Hutapea, Johny Ria. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia* Departemen Kesehatan Republik Indonesia : Badan Penelitian Dan Pengembangan Kesehatan.
- Steenis, CGGJ Van Dr , *FLORA*, 2008, Pradnya Paramita , Jakarta
- Anonim, <http://tehsirihmerah.com/> Sirih merah obat beragam penyakit, diakses tanggal 27 Mei 2010

Demikian determinasi ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batu, 14 Mei 2014
Kepala UPT Materia Medica Batu

Drs. Husni RM, Apt. MKes.
NIP.19611102 199103 1 003

Bukti bahwa daun yang digunakan dari Balai Materia, adalah daun Sirih Merah yang kemudian dijadikan bentuk serbuk yang kemudian dilakukan proses ekstraksi.



POLITEKNIK NEGERI MALANG

JURUSAN TEKNIK KIMIA

Kampus I : Jl. Veteran PO. BOX 04 Telp. (0341) 551341 Malang, 65145
 Kampus II : Jl. Soekarno - Hatta No. 09 Telp (0341) 404424 - 404425 Malang, 65141
 Contact Person : Zulriadi Fik. (0341) 9158630 HP. 0813 3456 8567



TANDA TERIMA CONTOH UJI
 No : 63 / UP-TK / EK / 51 2014

Telah menerima contoh untuk di analisa di Laboratorium Jurusan Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang

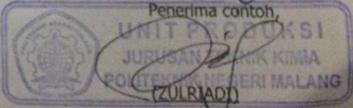
1. Nama pemesan : YULIQA RAHMAYANTI
2. Alamat : FK-00
3. No. Telp/HP : 081233766073
4. Tanggal penerimaan contoh uji : 19-5-14
5. Jenis contoh uji : SIRIH MERAH
6. Sifat fisik contoh
 - a. Bentuk : BUDUK
 - b. Warna : HIRAN TR
 - c. Bau : -
7. Hasil analisa selesai tanggal : 22-5-14

No.	Jenis / Parameter yang diuji	Jumlah	Harga (Rp.)		Metode Analisa	Keterangan
			Satuan	Jumlah		
1	ORTRANG	200 GR 2X	100 000	200 000	M. RAS	ETH 96%

Total	: Rp	200 000
Uang muka	: Rp.	100 000
Sisa	: Rp.	100 000

Malang, 19-5-14

Penerima contoh,



bukti bahwa bahan yang digunakan untuk ekstraksi adalah serbuk daun sirih merah dengan menggunakan pelarut etanol 96% yang kemudian dilakukan ekstraksi dengan teknik maserasi