

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Banyaknya infeksi *Escherichia coli* (*E.coli*) patogen menarik perhatian para ahli dibidang veteriner. Beberapa kasus penyakit bidang veteriner yang disebabkan oleh bakteri *E.coli* antara lain penyakit kolibasilosis, penyakit ikutan pada *Chronic Respiratory Disease* (CRD), *Infectious Coryza* (Snot), *Swollen Head Syndrome* (SHS), *Infectious Laryngo Trachetis* (ILT) dan Koksidirosis (Akoso, 1993; Gross, 1980). Meningkatnya kasus penyakit infeksi karena adanya penurunan keefektifan antibiotika terhadap bakteri sehingga mengakibatkan resistensi. Hal ini juga mengakibatkan resistensi pada *E.coli* terhadap antibiotika *amoxcylin*, *trimethoprim*, *ampicilin*, *cefaloperazone*, dan *tetracycline* (Bandow *et al.*, 2003). Salah satu alternatif dalam pengobatan penyakit infeksi adalah penggunaan tanaman-tanaman yang memiliki efek antimikroba yaitu daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.). Alasan dari pemakaian tanaman sebagai obat adalah karena pengobatan dengan cara tersebut cukup aman, efektif dan murah (Anonimus, 2000).

Penelitian yang dilakukan Moyo, *et al.* (2012) daun kelor memiliki aktivitas antimikroba terhadap beberapa bakteri Gram negatif diantaranya adalah *Escherichia coli*. Daun kelor mengandung senyawa metabolit sekunder seperti minyak atsiri, polifenol, dan saponin yang memiliki potensi sebagai antibakteria dan antifungal. Fuglie (2001) menyatakan bahwa daun kelor (*M. oleifera* Lamk.) mengandung saponin 5%, tanin 1,4% dan triterpenoid 5%. Tanin, polifenol, dan

saponin telah diketahui dapat merusak sel bakteri dengan cara menghambat sintesis protein dan merusak membran sel (Kasolo *et al.*, 2011; Bukar *et al.*, 2010; Kawo *et al.*, 2009).

Berdasarkan uraian diatas, daun kelor diketahui memiliki efek antimikroba terhadap bakteri *E.coli*. Oleh karena itu, untuk mengetahui efek antimikroba ekstrak n-Heksana daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.) terhadap *Escherichia coli* secara *in vitro* dengan parameter Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM), sehingga diharapkan akan dihasilkan pengobatan alternatif antimikroba.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah ada efek antimikroba ekstrak n-Heksana daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.) terhadap *E.coli* EC-2-PKH secara *in vitro*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui efek antimikroba ekstrak n-Heksana daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.) secara *in vitro*.

1.3.2 Tujuan Khusus

Mengetahui pengaruh konsentrasi ekstrak n-Heksana daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.) dengan didapatkan nilai KHM dan KBM terhadap pertumbuhan jumlah koloni bakteri *E.coli* EC-2-PKH secara *in vitro*.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah:

1. Memperluas wawasan pengetahuan mengenai alternatif antimikroba ekstrak n-Heksana daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.) terhadap bakteri *E.coli* EC-2-PKH secara *in vitro*.
2. Penggunaan ekstrak n-Heksana daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.) sebagai antimikroba terhadap *E.coli* EC-2-PKH secara *in vitro* dapat dikembangkan dimasyarakat setelah melalui penelitian secara *in vivo*.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Daun Kelor (*Moringa oleifera* Lamk.)

Tanaman kelor (*Moringa oleifera* Lamk.) sering dikonsumsi masyarakat Indonesia sebagai sayur, terutama daun dan polong yang masih muda seperti pada Gambar 2.1 (Wilson, 1998).



Gambar 2.1 Daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.) (Roloff *et al.*, 2009)

Menurut Kasolo, *et al.* (2011) tanaman kelor berasal dari ordo Brassicales dan family Moringaceae dengan taksonomi sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Sinonim	: Moringa pterygosperma, gaersi
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Brassicales
Famili	: Moringaceae
Genus	: Moringa
Spesies	: <i>Moringa oleifera</i> Lamk.

2.1.1 Kandungan Kimia Daun Kelor (*Moringa oleifera* Lamk.)

Metabolit sekunder merupakan senyawa kimia yang umumnya mempunyai kemampuan bioaktifitas dan berfungsi sebagai pelindung tumbuhan dari gangguan hama penyakit. Menurut Kamal (2008) daun kelor mengandung beberapa senyawa kimia yang memiliki aktivitas antimikroba terperinci pada Tabel 2.1.

Tabel 2.1 Komposisi kimiawi yang terkandung dalam *Moringa oleifera* Lamk.

Bagian	Kandungan Fitokimia
Akar	4-(α -L-rhamnopyranosyloxy)-benzylglucosinolat eand benzylglucosinolate
Daun	Glycoside niazirin, niazirin and three mustard oil glycosides, 4-{4'-O-acetyl- α -L-rhamnosyloxy) bezyl} isothicyanate, niaziminin A and B
Biji	Crude protein, crude fat, carbohydrate, methionine, cysteine, 4-(alfa-L-rhamnopyranosyloxy)-benzylglucosinoate, benzylglucosinolate, moringyne, mono-palmitic and di-oleic triglyceride
Minyak biji	Vitamin A, β -carotene, precursor of vitamin A

Sumber : Kamal (2008)

Kasolo, *et al.* (2011) menjelaskan bahwa daun kelor mengandung beberapa senyawa metabolit sekunder yang memiliki efek antimikroba, maupun sebagai sumber senyawa metabolisme sekunder. Kandungan metabolit sekunder tersebut antara lain, tanin, flavonoid, saponin, steroids dan triterpenoids.

2.1.1.1 Saponin

Saponin berbentuk glikosida sehingga dapat dihidrolisis menjadi asam yang mengandung aglikon (sapogenin) yang terperinci pada Tabel 2.1 yaitu beberapa gula dan berkaitan dengan asam uroniat. Senyawa saponin dapat bekerja sebagai antimikroba (Robinson, 2005). Sebagian besar saponin bereaksi netral (larut dalam air), beberapa ada yang bereaksi asam (sukar larut dalam air), dan sebagian kecil ada yang bereaksi basa.

Saponin pada daun kelor tidak menimbulkan efek yang berbahaya bagi manusia yang telah mengkonsumsinya (Winarno 1992). Davidson (2004) menjelaskan saponin hadir dalam dua bentuk yaitu steroid (C27) dan triterpenoids (C30), saponin yang terdapat dalam daun kelor bersifat non hemolitik. Senyawa saponin akan merusak membran sitoplasma dan membunuh sel (Plantamor, 2008). Davidson (2004) menjelaskan bahwa saponin mempunyai kerja merusak membran plasma dari bakteri. Saponin bekerja aktif permukaan yang menyerang batas lapis sel bakteri dengan cara berikatan dengan lipoprotein, lemak dan menghambat DNA polimerase sehingga sintesa asam nukleat bakteri terganggu.

2.1.1.2 Minyak atsiri

Minyak atsiri terdistribusi terutama dalam bunga dan daun. Pada uji laboratorium minyak atsiri titik didihnya adalah 150°C - 160°C pada tekanan atmosfer. Daun kelor juga mengandung minyak atsiri. Melarutkan minyak atsiri yang terdapat dalam serbuk simplisia dengan pelarut organik yang mudah menguap (Guether, 1987). Minyak atsiri sebagai senyawa terpenoid, mekanisme

antibakteri diperkirakan melalui proses destruksi membran sel bakteri (Cowan, 1999).

2.1.1.3 Polifenol

Polifenol alami merupakan metabolit sekunder tanaman tertentu, termasuk dalam atau menyusun golongan tanin (Hagerman *et al.*, 2002). Harborne (1996) menyatakan bahwa polifenol memiliki spektrum luas dengan sifat kelarutan pada suatu pelarut yang berbeda-beda. Hal ini disebabkan oleh gugus hidroksil pada senyawa tersebut yang dimiliki berbeda jumlah dan posisinya. Senyawa fenol mudah membentuk kompleks protein melalui ikatan hidrogen. Flavonoid merupakan salah satu golongan fenol alam terbesar yang terdapat dalam semua tumbuhan hijau (Bylka, 2004). Tanin adalah senyawa polifenol yang memiliki berat molekul antara 500-3000 dalton yang diduga berperan sebagai antibakteri, karena dapat membentuk kompleks dengan protein dan interaksi hidrofobik (Hagerman *et al.*, 2002).

2.1.2 Kegunaan *Moringa oleifera* Lamk. dalam Bidang Kedokteran Hewan

Tanaman kelor ini bermanfaat sebagai stimulan bagi peredaran darah dan jantung. Memiliki manfaat antitumor, antipiretik, antiepilepsi, antiradang, *antiulcer*, antispasmodik, diuretik, antihipertensi, menurunkan kolesterol, antioksidan, antidiabetes, pelindung *lever*, detoksifikasi, mengurangi rasa lelah, antibakteri, dan antijamur (Pal *et al.*,1995; Ruckmani *et al.*,1998; Nickon *et al.*,2003). Hasil penelitian sebelumnya tentang manfaat daun kelor sebagai pakan

ayam pedaging menunjukkan bahwa daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.) dapat digunakan hingga 5% dalam pakan sebagai pengganti tepung ikan dan bungkil kedelai (Astuti *et al.*, 2005).

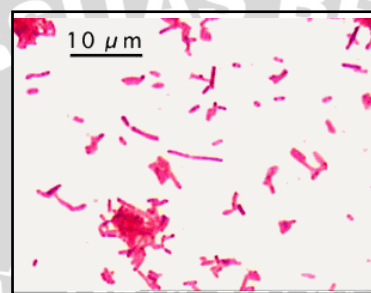
2.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) adalah bakteri batang pendek Gram negatif dengan ukuran 1,1 - 1,5 μm x 2- 6 μm , tersusun tunggal atau berpasangan seperti pada Gambar 2.2. *E.coli* merupakan bakteri Gram negatif yang tahan hidup dalam media yang kekurangan zat gizi (Valun 2008). Susunan dinding sel bakteri Gram negatif memiliki struktur dinding sel yang lebih kompleks daripada sel bakteri Gram positif. Bakteri Gram negatif mengandung sejumlah besar lipoprotein, lipopolisakarida, dan lemak (Schlegel 1993 dalam Valun 2008). Adanya lapisan-lapisan tersebut mempengaruhi aktivitas kerja dari zat antibakteri. Pada media *McConkey* koloni berwarna merah jambu karena ada peragian laktosa (Cruickshank, 1995).

E.coli klasifikasinya menurut Brooks (2007) sebagai berikut:

Superdomain	: Phylogenetica
Filum	: Proterobacteria
Kelas	: Gamma Proteobacteria
Ordo	: Enterobacteriales
Famili	: Enterobacteriaceae
Genus	: <i>Escherichia</i>
Spesies	: <i>Escherichia coli</i>

Nilai pH optimum untuk pertumbuhannya adalah 7,0-7,5. *E. coli* relatif sangat sensitif terhadap panas (Fardiaz, 1989). *E. coli* dapat bertahan hingga suhu 60 °C selama 15 menit atau pada 55 °C selama 60 menit. Waktu generasi bakteri *E.coli* sekitar 17 menit, artinya dalam 17 menit satu *E.coli* menjadi dua atau lebih *E.coli* (Valun, 2008).



Gambar 2.2 Pengecatan Gram pada *Escherichia coli* (Valun, 2008)

Perbenihan dan reaksi biokimia pada media diferensial EMBA (*Eosin Methylene Blue Agar*) pada koloni *E.coli* memberikan gambaran yang khas seperti kilatan logam (*metallic sheen*) pada agar EMB seperti Gambar 2.3 (Brooks, 2007). Media EMBA adalah media yang digunakan sebagai media isolasi dan identifikasi (Marietta, 2008).



Gambar 2.3. Kultur *E.coli* pada media EMBA (Marietta, 2008)

Saat ini uji biokimia terhadap bakteri Gram negatif dapat dilakukan dengan menggunakan *Microbact*. Sistem *Microbact* 12E/12A digunakan untuk identifikasi bakteri yang bersifat oksidase negatif, nitrat positif, dan meragikan glukosa. Berguna untuk skreening *Enterobacteriaceae* yang patogen baik dari usus maupun dari urin atau isolat umum lainnya (Bahdarsyam, 2003). Reaksi biokimia pada sistem *Microbact* 12E/12A adalah oksidase, nitrat, lisin, ornithin, H₂S, glukosa, manitol, xylose, *O*-nitrophenyl-*B*-*d*-galactopyranoside (ONPG), indole, urease, *Voges prokauer* (VP), sitrat, *Tryptophen Deaminase* (TDA) (Mugg, 2000).

2.2.1 Infeksi *Escherichia coli*

Bagian usus yang banyak mengandung bakteri *E.coli* adalah jejunum, ileum dan sekum. Sekitar 10-15% dari seluruh *E.coli* yang ditemukan didalam usus ayam yang sehat tergolong serotipe patogen (Todar, 2005). Terdapat pada usus biasanya tidak sama dengan *E.coli* yang menginfeksi kantung hawa/ *air sacculitis* dan selaput jantung/ *pericarditis* (Murtidjo, 1999). Adanya infeksi *E.coli* merupakan faktor pendukung timbulnya penyakit kompleks pada saluran pernafasan, pencernaan atau reproduksi yang sulit ditanggulangi. Penyakit yang ditimbulkan oleh *E.coli* dapat digolongkan menjadi dua kelompok yaitu oportunistik dan enteropatogenik/ enterotoksigenik (Isenberg, 2004).

Kolibasillosis adalah penyakit pada unggas yang disebabkan *E.coli* yang patogen, sebagai agen primer ataupun sekunder (Mylonakis, 2006). Timbulnya

Kolibasilosis, sebagai penyakit ikutan pada *Chronic Respiratory Disease* (CRD), *Infectious Coryza* (Snot), *Swollen Head Syndrome* (SHS), *Infectious Laryngo Trachetis* (ILT) dan Koksidirosis (Akoso, 1993; Gross, 1980). Saat ini telah banyak terjadi peningkatan sebesar 2-3 kali lipat resistensi *E.coli*. Terbukti pengamatan yang dilakukan oleh Poernomo (1996) memperlihatkan bahwa dalam periode 1991-1992 penyebaran serotipe *E.coli* patogen 0,02K1 dan 078K sebagai penyebab kolibasilosis pada ayam di Jabotabek, Sukabumi, Jawa Tengah, Jawa Timur, Bali, Sumatera Utara, Kalimantan Barat, Sulawesi Selatan dan Lampung menunjukkan serotipe 02K180 adalah dominan (51,5%), kemudian serotype 078K80 (10,6%) dan 0251K (9%), serta selebihnya serotype lain sebanyak 28,9%.

2.3 Antimikroba

Antimikroba adalah agen yang mampu membunuh atau menekan pertumbuhan dari mikroorganisme. Penggunaan antimikroba dipengaruhi oleh toksisitas selektif, yaitu perbedaan antara struktur sel mikroba dengan sel hospes. Antimikroba yang memiliki kemampuan mematikan bakteri disebut bakterisidal sedangkan antimikroba yang bersifat menghambat pertumbuhan bakteri disebut bakteriostatika (Cowan, 1999).

Penghambatan aktivitas antimikroba oleh komponen bioaktif tanaman dapat disebabkan oleh beberapa faktor, antara lain : (1) gangguan pada penyusun dinding sel; (2) peningkatan permeabilitas membran sel yang menyebabkan kehilangan komponen penyusun sel; (3) menginaktivasi enzim

metabolik, dan (4) destruksi atau kerusakan fungsi material genetik (Davidson, 2004).

Plezar (2005) mengatakan bahwa berdasarkan cara memperoleh antimikroba maka diketahui ada beberapa jenis antimikroba, yaitu antimikroba sintetik, alamiah, dan semisintetik. Antimikroba sintetik merupakan antimikroba yang dibuat secara kimiawi di laboratorium. Contoh antimikroba sintetik adalah *sulfonamis* (Dzen dkk., 2003). Antimikroba alamiah adalah senyawa antimikroba yang berasal dari tanaman sebagian besar diketahui merupakan metabolit sekunder tanaman, terutama dari golongan fenolik dan terpen dalam minyak atsiri. Sebagian besar metabolit sekunder dibiosintesis dari banyak metabolit primer seperti asam-asam amino, asetil koA, asam mevalonat, dan metabolit antara.

Beberapa senyawa yang bersifat antimikroba alami berasal dari tanaman diantaranya adalah fitoaleksin, asam organik, minyak esensial (atsiri), fenolik dan beberapa kelompok pigmen tanaman atau senyawa sejenis. Antimikroba yang berasal dari tumbuhan, salah satunya kelor, yang termasuk antimikroba alamiah (Syahrurachman, 1994). Dzen, dkk. (2003) menjelaskan antimikroba semisintetik diperoleh dengan melakukan modifikasi rumus kimia dari senyawa alamiah.

2.4 Uji Antimikroba secara *In Vitro* dengan Metode Dilusi

Metode dilusi digunakan untuk mengetahui Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM) dari efek antimikroba. Dilakukan dengan membuat larutan antimikroba dengan konsentrasi yang menurun melalui teknik pengenceran serial kemudian ditambahkan perbenihan cair bakteri uji.

Konsentrasi bakteri uji yang digunakan adalah 10^6 CFU/ml (*Colony Forming Unit/ml*). Prinsip dari metode ini dilaksanakan dengan memakai satu seri tabung reaksi yang terisi media cair dan sejumlah sel mikroba tertentu yang akan diuji dicampurkan dengan antimikroba yang telah diencerkan secara serial.

Masing-masing tabung diinkubasikan pada suhu $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ dalam waktu 24 jam dan diamati terjadinya kekeruhan pada tabung. Konsentrasi terendah antimikroba pada tabung yang ditunjukkan dengan hasil biakan yang mulai tampak jernih, yang artinya tidak ada pertumbuhan mikroba, disebut Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) dari antimikroba. Kemudian biakan dari semua tabung yang jernih diinokulasikan pada media agar padat, diinkubasikan dan keesokan harinya diamati ada tidaknya koloni mikroba yang tumbuh (Brooks, 2007).

Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) atau *Minimal Inhibition Concentration* (MIC) adalah konsentrasi terendah dari antimikroba yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri ditandai dengan tidak adanya kekeruhan pada tabung setelah diinkubasi 24 jam. Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM) atau *Minimal Bactericidal Concentration* (MBC) adalah konsentrasi terendah dari antimikroba yang dapat membunuh bakteri dengan pertumbuhan koloninya kurang dari 0,1 % dari jumlah koloni inokulum awal (*original inoculum/ OI*) pada medium NAP yang telah dilakukan penggoresan sebanyak satu ose dan diinkubasi 24 jam. *Original inoculum* (OI) adalah inokulum bakteri dengan konsentrasi 10^9 CFU/ ml sebelum diinkubasi yang diinokulasikan pada media agar padat (Dzen dkk., 2003).

Inokulum bakteri untuk uji dilusi tabung dapat menggunakan standar turbiditas McFarland. McFarland adalah standar turbiditas yang digunakan untuk memperkirakan jumlah bakteri dalam sediaan cair. Standar yang paling banyak dipakai untuk uji mikrobiologi klinis adalah 0,5 McFarland yang merepresentasikan $1 \times 10^8 - 2 \times 10^8$ CFU/ml (Isenberg, 2004). Densitas sel yang diukur pada panjang gelombang 625 nm dengan OD = 0,08 - 0,1 ekuivalen dengan standar turbiditas 0,5 McFarland (Chaouce, 2012).

2.5 Ekstraksi

Ekstraksi adalah proses penarikan komponen zat aktif dengan menggunakan pelarut tertentu (Guether, 1987). Pemisahan pelarut berdasarkan kaidah '*like dissolved like*' artinya suatu senyawa non polar akan larut dalam pelarut non polar. Ekstraksi dapat dilakukan dengan bermacam-macam metode, tergantung dari tujuan ekstraksi, jenis pelarut yang digunakan dan senyawa yang diinginkan (Harborne, 1996). Secara umum teknik ekstraksi menggunakan pelarut organik dapat dibedakan menjadi tiga yaitu maserasi, *digestion*, dan perkolasi.

Maserasi merupakan cara ekstraksi yang sederhana. Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk sampel dalam pelarut. Sampel tidak boleh menyimpang bau dan warna, tidak boleh mengandung lendir atau menunjukkan adanya kerusakan (Anonimus, 2000). Keuntungan ekstraksi ini adalah cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah diusahakan (Ahmad, 2006). Waktu maserasi pada umumnya 5 hari, setelah waktu tersebut

keseimbangan antara bahan yang diekstraksi pada bagian dalam sel dengan luar sel telah tercapai.

Keadaan diam selama maserasi menyebabkan turunnya perpindahan bahan aktif (Voight, 1995). Proses ini sangat menguntungkan dalam menyari senyawa bahan alam karena dengan perendaman sampel tumbuhan akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar sel, sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik (Harborne, 1996).

2.6 Normal Heksana (n-Heksana)

Heksana adalah sebuah senyawa hidrokarbon alkana dengan rumus kimia C_6H_{14} (isomer utama n-Heksana memiliki rumus $CH_3(CH_2)_4CH_3$). Menurut Syamsuni (2005) sifat fisika dan kimia terperinci pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2 Sifat Fisika dan Kimia n-Heksana

Karakteristik	Syarat
Bobot molekul	86,2 gram/ mol
Warna	Tak berwarna
Wujud	Cair
Titik lebur	-95 °C
Titik didih	69 °C (pada 1 atm)
Densitas	0,6603 gr/ ml pada 20 C

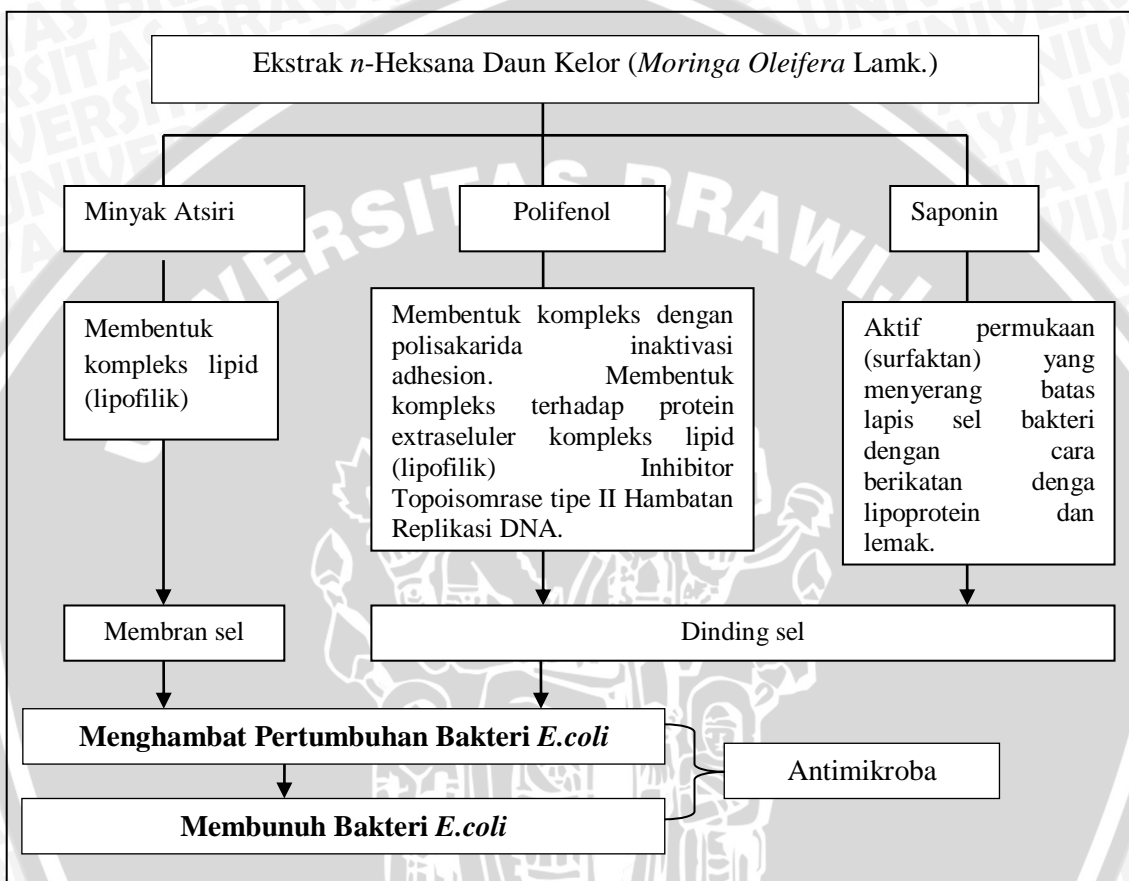
Sumber: Syamsuni (2005)

Syamsuni (2005) menjelaskan bahwa pelarut normal Heksana (n-Heksana) adalah salah satu pelarut yang bersifat nonpolar. Pemilihan pelarut harus disesuaikan dengan simplisia yang akan digunakan. Pelarut nonpolar digunakan untuk menyari senyawa yang tidak larut air, maka terisolasi kandungan senyawa kimia dari daun kelor. Pelarut akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat kimia sehingga zat kimia akan larut. Hal ini karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat kimia di dalam sel, maka larutan yang terpekat didesak keluar.



BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konseptual



Gambar 3.1. Kerangka Konsep Mekanisme Efek Atimikroba Ekstrak n-Heksana Daun Kelor (*Moringa oleifera* Lamk.) terhadap *E.coli* secara *in vitro*.

Gambar 3.1 menunjukkan komponen *E.coli* yang dipengaruhi oleh efek antimikroba dari ekstrak n-Heksana daun kelor adalah dinding sel, metabolisme sel, dan membran sel. Gangguan terhadap komponen tersebut akan menyebabkan pertumbuhan *E.coli* menjadi terhambat atau mati. Efek antimikroba terhadap *E.coli* diukur dengan pertumbuhan jumlah koloni yang disimpulkan dengan nilai



KHM dan KBM. Ekstrak n-Heksana daun kelor mengandung senyawa kimia minyak atsiri, polifenol, dan saponin yang memiliki kemampuan sebagai antimikroba. Saponin merupakan bahan aktif permukaan yang menyerang batas lapis sel bakteri melalui pembentukan ikatan senyawa. Gugus nonpolar saponin berikatan dengan lemak dinding sel bakteri, sehingga terjadi gangguan semipermeabilitas membran sitoplasma yang akan mengakibatkan terjadinya gangguan fungsi sel, diikuti dengan pecahnya sel dan kematian sel mikroba.

Minyak atsiri bekerja dengan mendenaturasi protein ekstraseluler sehingga mengganggu pembentukan dinding sel, merusak membran sel secara langsung, dan mempunyai aktifitas antibakteri. Senyawa ini mampu membentuk kompleks lipid. Kerusakan membran sel bakteri dapat menyebabkan terganggunya transport nutrisi yang melalui membran sel. Kerusakan ini mengakibatkan terganggunya metabolisme sel atau kematian sel bakteri.

Polifenol mempunyai peran berikatan dengan prolin (protein pembentuk dinding sel) yang merusak ketersediaan reseptor permukaan sel bakteri dan mengaggu permeabilitas sel bakteri. Senyawa flavonoid dan tanin yang termasuk dalam golongan polifenol mempunyai kerja menghambat enzim topoisomerase II pada bakteri serta berikatan dalam menghambat sintesis protein dengan merusak dinding. Semakin lipofilik suatu flavonid, kemampuannya dalam merusak dinding sel bakteri semakin kuat.

3.2 Hipotesis Penelitian

Hipotesis penelitian ini adalah terdapat pengaruh konsentrasi ekstrak n-Heksana daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.) yang memiliki efek antimikroba terhadap pertumbuhan jumlah koloni bakteri *E.coli* secara *in vitro*.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Program Kedokteran Hewan, Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran, Laboratorium Fisiologis Fakultas Kedokteran dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada Juli-September 2012.

4.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan antara lain ose bulat, kertas penghisap, minyak emersi, mikroskop cahaya (*Olympus*), *obyek glass*, *cover glass*, tabung reaksi steril (Pyrex), bunsen dan spirtus, oven, timbangan, kantong plastik tahan panas, labu erlenmeyer, corong gelas, kertas gelas, kertas saring, selang *water pump*, *water bath*, pisau, neraca analitik, kertas saring, gelas ukur (Pyrex), *beaker glass*, *vacuum rotary evaporator*, tabung pendingin, rak tabung, pompa sirkulas air dingin, pompa vakum, neraca analitik, cawan penguap, dan tabung penampung n-Heksana, cawan petri, ose bulat, timbangan (Metter toledo), mikropipet, *blue tip*, inkubator (MMM Medcenter), kertas label, penggaris, spektrofotometer, *Refrigerator*, dan pengaduk kaca.

Bahan yang digunakan antara lain isolat *E.coli* pewarna Gram (kristal violet, lugol, alkohol 96 %, safranin), *Nutrient broth* (NB) (Merck), *Nutrient Agar* (NA) (Merck), *Eosin Methylen Blue* (EMB), *Microbact 12E/12A* (Oxoid), minyak emersi, n-Heksana, daun kelor, ekstrak daun kelor, isolat *E. Coli EC-2-PKH*.

4.3 Tahapan Penelitian

1. Proses Ekstraksi n-Heksana Daun Kelor
2. Preparasi *E.coli* EC-2-PKH
3. Pembuatan Suspensi dan Inokulum *E.coli* EC-2-PKH
4. Penentuan Konsentrasi Ekstrak n-Heksana Daun Kelor Uji Antimikroba
5. Pengujian Efek Antimikroba yaitu Analisis Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM) terlihat pada diagram alir Lampiran 1.
6. Analisis Data

4.4 Prosedur Penelitian

Rancangan penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang dilakukan secara *in vitro* menggunakan RAL (Rancangan Acak Lengkap) dengan 5 perlakuan konsentrasi dan 4 ulangan untuk mengetahui efek antimikroba ekstrak n-Heksana daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.) terhadap bakteri *Escherichia coli*. Pada penelitian ini dibuat dua kelompok, yaitu kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Kelompok perlakuan yaitu kelompok bakteri yang diberi ekstrak n-Heksana daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.). Sedangkan kelompok kontrol ada dua yaitu kontrol positif dan kontrol negatif.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat *E.coli* 10⁶ CFU/ml kode EC-2-PKH yang dimiliki oleh Laboratorium Mikrobiologi Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya. Menurut Kusningrum (2010) adapun

pengulangan yang dilakukan mengacu pada rumus, derajat bebas galat $RAL \geq 15$,

(t) adalah jumlah perlakuan, dan (n) adalah jumlah pengulangan yang diperlukan.

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

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Berdasarkan perhitungan di atas, maka jumlah pengulangan yang dilakukan dalam penelitian ini minimal adalah empat kali, artinya masing-masing konsentrasi diulang minimal sebanyak empat kali.

Definisi Operasional pada penelitian ini adalah :

1. Daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.) berupa serbuk simplisia yang diperoleh dari UPT Materia Medica Batu Jawa Timur.
2. Ekstraksi dilakukan di laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dengan metode ekstraksi dingin (maserasi) menggunakan pelarut n-Heksana terhadap daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.)
3. Bakteri yang digunakan adalah *E.coli* yang berasal dari saluran pencernaan ayam sakit di Laboratorium Mikrobiologi dan Immunologi Program Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya dengan kode EC-2-PKH.
4. Dalam penelitian ini yang diamati adalah efek antimikroba ekstrak n-Heksana daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.) terhadap pertumbuhan *E.coli* EC-2-PKH sehingga dapat menetapkan Konsentrasi Hambat Minimal

(KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM) terhadap pertumbuhan jumlah koloni bakteri *E.coli* EC-2-PKH secara *in vitro*.

5. Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) adalah konsentrasi antimikroba terendah yang mampu menghambat pertumbuhan jumlah koloni bakteri *E.coli* EC-2-PKH yang ditandai dengan kejernihan dalam tabung setelah diinkubasikan 24 jam. Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM) adalah konsentrasi antimikroba terendah yang mampu membunuh bakteri (yang dapat dilihat dari jumlah koloni yang tumbuh pada NAP) setelah inkubasi 24 jam. Menggunakan Pedoman jumlah koloni kurang dari 0,1% dari jumlah koloni pada inokulum awal (*Original Inoculum/ OI*) pada medium NAP yang telah dilakukan penggoresan sebanyak satu ose.
6. Kontrol negatif adalah ekstrak n-Heksana daun kelor yang tidak dicampur dengan suspensi *E.coli* EC-2-PKH yang juga dapat digunakan untuk mengetahui apakah bahan yang digunakan steril, nilai kontrol negatif adalah 0 (nol). Kontrol positif adalah biakan *E.coli* EC-2-PKH murni yang tidak diberi perlakuan ekstrak n-Heksana daun kelor. Pengencer Aquadest steril yang digunakan untuk mengencerkan ekstrak n-Heksana daun kelor.
7. *Original inoculum* (OI) adalah inokulum bakteri dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml yang diinokulasikan pada media agar padat sebelum diinkubasi, dan digunakan untuk mencari kategori KBM.
8. Dalam penelitian ini variabel yang akan diamati adalah variabel bebas merupakan konsentrasi yang berbeda dari ekstrak n-Heksana daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.) yaitu konsentrasi 15%, 20%, 25%, 30%, 35% dan

variabel tergantung adalah jumlah koloni dari pertumbuhan *Escherichia coli*.

4.4.1 Proses Ekstraksi n-Heksana Daun Kelor (Markham, 1998; Voight, 1995)

Tahap ekstraksi yang dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Serbuk simplisia daun kelor ditimbang sebanyak 100 g lalu dimaserasi menggunakan pelarut n-Heksana selama dua hari. Maserat disaring, kemudian dipekatkan dengan *vacum rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental. Cara kerja disajikan pada Lampiran 2.

4.4.2 Preparasi bakteri *E.coli* EC-2-PKH (Madigan, 2003; Eisenhower, 2005)

Pewarnaan Gram digunakan untuk identifikasi anggota dari domain bakteri kedalam dua kelompok berdasarkan perbedaan dinding selnya. Tahap pewarnaan Gram sederhana dilakukan diatas preparat kaca, yaitu kultur disebar membentuk lapisan tipis diatas preparat kaca, dikering udarakan, dilewatkan diatas api untuk fiksasi, diwarnai dengan pewarnaan Gram, dicuci dan dikeringkan. Selanjutnya morfologi sel bakteri uji dilihat dibawah mikroskop dengan perbesaran 1.000x. Sel bakteri dengan morfologi berwarna violet merupakan bakteri Gram positif, sedangkan sel bakteri dengan morfologi berwarna merah merupakan bakteri Gram negatif (Madigan *et al.*, 2003).

Identifikasi *E.coli* dilakukan dengan menggunakan media diferensial, yaitu medium yang dapat memisahkan antar koloni bakteri yang berbeda dan digunakan sebagai media isolasi dan identifikasi seperti agar EMBA (*Eosin Methylene Blue Agar*). Uji reaksi biokimia yang mengacu pada Mugg (2000) merupakan uji

keakuratan bakteri batang Gram negatif *E.coli* sebagai bakteri patogen dengan menggunakan sistem *Microbact* 12E/12A. Langkah melakukan preparasi *E.coli* EC-2-PKH disajikan pada Lampiran 2.

4.4.3 Pembuatan Suspensi dan Inokulum *E.coli* EC-2-PKH (Chaouce *et al*, 2012)

Inokulum bakteri *E.coli* EC-2-PKH ditumbuhkan selama 24 jam dalam 10 mL *Nutrien Broth*. Kepadatan sel inokulum masing-masing disesuaikan dengan spektrofotometer ($OD = 0,08-0,1 / \lambda = 625\text{nm}$) untuk mendapatkan konsentrasi akhir sekitar 10^8 CFU/ml (0,5 McFarland standar) (Chaouce *et al*, 2012). Pengukuran nilai *Optical Density* (OD) menggunakan alat spektrofotometri untuk mendapatkan bakteri dengan konsentrasi 10^8 CFU/ml yaitu medium cair *Nutrien Broth* (NB) yang telah ditanami bakteri uji dan diinkubasi selama 24 jam pada gelombang 625 nm untuk mengetahui nilai absorbansi dari suspensi. Suspensi bakteri uji dengan konsentrasi bakteri 10^8 CFU/ml yang setara dengan *Optical Density* (OD) dengan nilai 0,1. Perhitungan yang digunakan $N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$.

N_1 adalah nilai absorbansi suspensi (hasil spektrofotometri). V_1 adalah volume bakteri dengan pengenceran. N_2 adalah nilai OD ($0,1 = 10^8$ CFU/ml). V_2 adalah volume bakteri (10 mL). Sehingga diperoleh volume (mL) bakteri yang akan ditambah pengencer untuk mendapatka bakteri dengan konsentrasi 10^8 CFU/ml sebanyak 10 ml, selanjutnya dilakukan pengenceran sebanyak 100 kali dengan menggunakan *Nutrien Broth* sehingga suspensi bakteri sebanyak 10 mL dengan kosentrasi bakteri 10^6 CFU/ml. Alasan menggunakan kosentrasi bakteri

10^6 CFU/ml karena pertumbuhan makroskopik dapat dilihat dalam batas 10^6 sampai 10^7 CFU/ml (Isenberg, 2004).

4.4.4 Penentuan Konsentrasi Uji Efek Antimikroba

Dilakukan untuk menentukan Konsentrasi Hambat Minimal dan Konsentrasi Bunuh Minimal yang efektif terhadap *E.coli*. Menggunakan konsentrasi 100 %, 50%, 25 %, 12, 5%, 6, 25% dan 3,125% dengan metode dilusi tabung dan *streaking* NAP. Konsentrasi 50% hingga 100% memberikan efek antimikroba yang ditandai dengan tidak ada pertumbuhan koloni bakteri sehingga dilakukan uji pada konsentrasi dibawahnya yaitu antara konsentrasi 25% dan 12,5% guna mengetahui nilai KHM dan KBM dari bahan coba. Maka, ditetapkanlah konsentrasi dibawah dan diatas konsentrasi 25% yaitu 15%, 20%, 25% 30%, dan 35% guna menguji efek antimikroba daun kelor terhadap *E.coli*. Langkah kerja dapat dilihat pada Lampiran 2.

4.4.5 Pengujian Efek Antimikroba (Dzen, 2003)

Menggunakan metode dilusi tabung yang meliputi dua tahap, yaitu penentuan KHM (Konsentrasi Hambat Minimal) dan KBM (Konsentrasi Bunuh Minimal). Penggunaan 7 tabung pada penelitian ini yaitu 1 kontrol bakteri (k+), 1 kontrol negatif (k-), aquades steril, dan 5 tabung perlakuan konsentrasi yang berbeda yaitu 15%, 20%, 25% 30%, dan 35%. Dilakukan pengenceran terhadap ekstrak dengan aquadest sehingga diperoleh konsentrasi 15%, 20%, 25% 30%, dan 35% masing-masing sebanyak 1 mL, ditambah 1 mL suspensi *E.coli* EC-2-

PKH. Dilakukan penanaman suspensi bakteri pada media NAP sebagai *Original Inoculum* (OI).

Prosedur dilakukan pengulangan sebanyak empat kali. Semua perlakuan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, kemudian mengamatinya dan membandingkan dengan kontrol. Konsentrasi terendah dari larutan sampel yang dapat menghambat pertumbuhan *E.coli* EC-2-PKH (ditandai dengan kejernihan secara visual) ditentukan sebagai Kadar Hambat Minimum (KHM). Sedangkan, untuk mengetahui Kadar Bunuh Minimum (KBM), larutan tadi *streaking* pada media NAP (*Nutrient Agar Plate*) padat kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. KBM ditentukan pada konsentrasi terendah dimana pada media NAP (*Nutrient Agar Plate*) tidak terdapat pertumbuhan koloni *E.coli* EC-2-PKH. Langkah kerja disajikan pada Lampiran 2.

4.5 Analisis Data

Data yang diperoleh adalah data kuantitatif dari hasil penghitungan jumlah koloni *E.coli* pada medium NAP yang telah diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil penghitungan jumlah koloni yang tumbuh dikonversi ke dalam satuan CFU/ml, dimana satu ose yang sudah dikalibrasi adalah sama dengan 0.001 mL. Jadi, jumlah koloni yang didapat dikalikan 1000 (Finegold, 1986). Analisis statistika secara komputersasi dengan menggunakan software *Statistical Product of Service Solution 16 for Windows* (SPSS 16) dengan $\alpha = 0.05$. Data tersebut diuji normalitasnya dengan uji *Kolmogorov-Smirnov*. Jika didapatkan data yang normal, maka dilakukan uji beda menggunakan uji statistik parametrik ANOVA, Sedangkan, distribusi yang tidak normal, maka dilakukan uji non parametrik

Kruskal Wallis. Dan jika dari hasil uji statistik tersebut ada perbedaan yang bermakna maka dilanjutkan dengan uji statistik *Mann-Whitney*, kemudian dilakukan uji korelasi dan analisis regresi.



BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1. Preparasi *E.coli*

Bakteri *E.coli* EC-2-PKH yang digunakan untuk uji efek antimikroba adalah bakteri yang telah diuji biokimia menggunakan sistem *Microbact*. Sistem *Microbact* menunjukkan persentase kebenaran *E.coli* EC-2-PKH sebesar 96,39 % (Lampiran 6). Sistem identifikasi ini merupakan uji biokimia pada bakteri dengan menggunakan media secara konvensional, lebih hemat dan efisien, berfungsi mengurangi resiko kontaminasi dan meningkatkan akurasi pengujian (Mugg, 2000).

Hal ini diperkuat dengan hasil pewarnaan Gram yang menunjukkan bahwa isolat *E.coli* EC-2-PKH merupakan bakteri batang Gram negatif dengan koloni berwarna merah muda dan koloni *E.coli* berwarna khas *methalic sheen* pada media EMBA, disebabkan besarnya kuantitas asam yang dihasilkan dan pengendapan zat pewarna di atas permukaan pertumbuhan (Lampiran 3). Menurut Valun (2008) Gram negatif tidak mempertahankan zat warna metil ungu dan menyerap larutan safranin, sehingga berwarna merah muda. Selanjutnya pada penelitian ini, *E.coli* EC-2-PKH tersebut dilakukan uji efek antimikroba secara *in vitro* dengan metode dilusi.

5.2. Efek Antimikroba Ekstrak n-Heksana Daun Kelor

5.2.1 Penentuan Konsentrasi Ekstrak n-Heksana Daun Kelor

Dilakukan analisis awal penentuan konsentrasi 100 %, 50%, 25 %, 12, 5%, 6, 25% dan 3,125% menggunakan metode dilusi. Hasilnya pada konsentrasi 100

% hingga 50% memberikan efek antimikroba yang ditandai dengan tidak ada pertumbuhan bakteri sehingga dilakukan uji pada konsentrasi dibawahnya yaitu konsentrasi 25% dan 12,5 %.

Tabel 5.1 Penentuan Konsentrasi Ekstrak n-Heksana Dan Kelor

	Konsentrasi Ekstrak (CFU/ml)					
	100%	50%	25%	12,5%	6,25%	3,125
Jumlah koloni	0	0	$4,1 \times 10^4$	TNTC	TNTC	TNTC
	0	0	$4,5 \times 10^4$	TNTC	TNTC	TNTC
Rata-rata	0	0	$4,3 \times 10^4$	TNTC	TNTC	TNTC

Keterangan: TNTC = *To Numerous to Count*

Hasilnya pada Tabel 5.1 konsentrasi 25% menunjukkan rata-rata jumlah pertumbuhan yang dapat dihitung sebanyak $4,3 \times 10^4$ CFU/ml sedangkan pada konsentrasi 12,5% terjadi pembentukan koloni bakteri yang tidak dapat dihitung. Maka, diambil konsentrasi dibawah dan diatas konsentrasi 25% yaitu 15%, 20%, 25% 30%, dan 35% sebagai konsentrasi untuk menguji efek antimikroba daun kelor terhadap *E.coli*.

5.2.2 Analisis Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM)

Penentuan Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM) menggunakan metode dilusi untuk mengetahui efek antimikroba. Hasil dari metode dilusi tabung pada penentuan nilai KHM dengan pengamatan terhadap tingkat kejernihan yang dibandingkan dengan kontrol negatif pada semua konsentrasi menunjukkan nilai KHM yang belum dapat teramati karena semua tabung keruh (Lampiran 5). Hal ini dipengaruhi oleh warna ekstrak yang

kecoklatan sehingga sulit untuk menentukan tingkat kekeruhan antar tabung. Kesimpulan dari hasil dilusi tabung pada ekstrak untuk menentukan nilai KHM belum dapat ditentukan. Pengamatan dilanjutkan dengan cara menanam hasil uji dilusi pada NAP, setelah inkubasi 24 jam didapatkan hasil sebagai berikut:

Tabel. 5.2 Jumlah Koloni *E.coli* EC-2-PKH pada NAP dalam Menentukan KBM dari Efek Antimikroba Ekstrak n-Heksana Daun Kelor (*Moringa oleifera* Lamk.) secara *in vitro*

Konsentrasi	Rata-rata \pm SD (CFU/ml)*	Notasi
15%	$2,44 \times 10^6 \pm 9,77 \times 10^6$	a
20%	$5,41 \times 10^5 \pm 2,03 \times 10^5$	b
25%	$4,85 \times 10^4 \pm 8,88 \times 10^3$	c
30%	$5,55 \times 10^3 \pm 7,18 \times 10^3$	d
35%	-	

Keterangan : Notasi pada superskrip yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0,05$). (-) = tidak ada pertumbuhan *E.coli* EC-2-PKH. (*) = rerata jumlah koloni yang dihitung dengan empat kali ulangan.

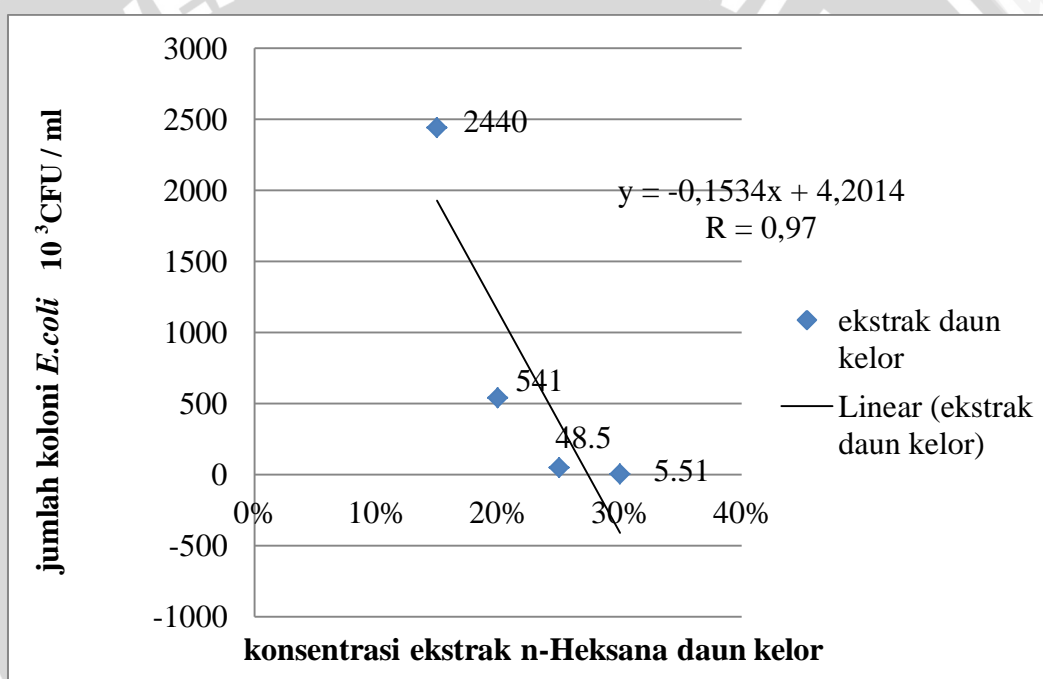
Analisis statistika untuk mengetahui perbedaan pada setiap konsentrasi ekstrak n-Heksana daun kelor dengan menggunakan uji *Kruskal wallis* yang dilanjutkan *Man Whitney*. Pada Lampiran 8 hasil uji *Kruskal wallis* dengan $\alpha = 0.05$, memperoleh nilai signifikansi sebesar 0.003 ($p < 0.05$), artinya terdapat perbedaan pengaruh konsentrasi yang signifikan terhadap pertumbuhan *E.coli* EC-2-PKH. Uji lanjutan *Man whitney*, menunjukkan hasil terdapat perbedaan efek antimikroba dengan nilai signifikan 0.021 ($p > 0.05$). Taraf perbedaan yang ditunjukkan oleh notasi huruf.

Konsentrasi bunuh minimal (KBM) merupakan konsentrasi terendah yang memungkinkan pertumbuhan hanya $< 0,1\%$ dari *Original Inoculum*. Hasil rerata OI pada penelitian ini adalah $2,94 \times 10^3$ (Lampiran 4).

Pada Tabel 5.2 ditunjukkan bahwa konsentrasi 15% hingga 30% adalah belum termasuk nilai KBM. Pada konsentrasi 35% tidak ada pertumbuhan bakteri *E.coli* (Lampiran 4). Hal ini termasuk nilai KBM karena $< 0,1\%$ dari *Original Inoculum*. Hasilnya menunjukkan bahwa ekstrak n-Heksana daun kelor memiliki nilai KBM pada konsentrasi 35% yang bersifat bakterisidal. Sesuai dengan Baron *et al*, (1996) bakterisidal ditunjukkan dengan perbedaan jumlah koloni bakteri dengan jumlah bakteri pada OI (*Original Inoculum*) dengan ketentuan hasil perhitungan $< 0,1\%$ OI. Hal tersebut membuktikan bahwa ekstrak n-Heksana daun kelor memiliki efek antimikroba sebagai bakteriosidal. Sesuai dengan Cowan (1999) antimikroba yang memiliki kemampuan mematikan bakteri disebut bakterisidal.

Uji regresi dan korelasi menunjukkan persamaan $y = -0,1534x + 4,2014$ setiap peningkatan 5% ekstrak daun kelor akan membunuh *E.coli* sebesar 0,1534 koloni. Hal ini diperkuat oleh koefisien korelasi R Spearman sebesar $-0,97$ menyatakan besar derajat keeratan antara konsentrasi ekstrak n-Heksana daun kelor dengan jumlah koloni *E.coli* EC-2-PKH sebesar 97 % (Lampiran 8). Tanda negatif pada persamaan linier yang menunjukkan semakin tinggi konsentrasi ekstrak n-Heksana daun kelor maka semakin rendah jumlah koloni yang tumbuh. Gambar 5.1 menunjukkan penurunan jumlah koloni *E.coli* seiring dengan kenaikan konsentrasi ekstrak n-Heksana daun kelor yang memiliki efek

antimikroba. Faktor adanya penurunan jumlah koloni *E.coli* EC-2-PKH karena adanya efek antimikroba dari senyawa-senyawa metabolit sekunder yang berasal dari daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.). Indah (2008) mengatakan bahwa senyawa metabolit sekunder salah satunya minyak atsiri. Minyak atsiri mengandung zat yang termasuk kelompok fenol. Fenol memiliki kemampuan untuk mendenaturasikan protein dan merusak membran sel.



Gambar 5.1 Persamaan linier efek antimikroba ekstrak n-Heksana daun kelor terhadap *E.coli* EC-2-PKH secara *in vitro*.

Efek antimikroba dari ekstrak n-Heksana daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.) memiliki sasaran utama hingga menyebabkan pertumbuhan bakteri dapat ditekan yaitu dinding sel. Dinding sel bakteri merupakan lapisan *lipid-bilayer* yang mirip dengan membran sel. Membran sel ini dapat melindungi bakteri Gram

negatif dari substansi antipeptidoglikan seperti penisilin. Ikatan antar asam amino dalam peptidoglikan bakteri Gram negatif lebih renggang dibandingkan dengan bakteri Gram positif (McKane dan Kandel, 1986), sehingga memudahkan senyawa minyak atsiri, polifenol, dan saponin untuk masuk kedalam ikatan. Selain itu, dinding selnya tidak selektif permeabel, sehingga senyawa-senyawa tersebut mudah dalam penetrasi menembus dinding sel yang akan menyebabkan terganggunya integritas dinding sel bakteri.

Minyak atsiri bekerja dengan mendenaturasi protein ekstraseluler sehingga mengganggu pembentukan dinding sel, merusak membran sel secara langsung, dan mempunyai aktifitas antibakteri, karena senyawa ini mampu membentuk kompleks lipid. Kerusakan membran sel bakteri dapat menyebabkan terganggunya transport nutrisi yang melalui membran sel. Sehingga sel bakteri mengalami kekurangan nutrisi yang diperlukan dalam proses pertumbuhan bakteri (Guether, 1987).

Saponin bekerja dengan merusak membran sitoplasma yang kemungkinan saponin mempunyai efek yang sinergis atau adiktif dengan golongan polifenol dalam merusak permeabilitas sel bakteri itu sendiri (Plantamor, 2008). Davidson (2004) mengatakan bahwa saponin bersifat amfipatik (mengandung bagian hidrofilik dan hidrofobik) yang dapat melarutkan protein membran. Hidrofobik saponin berikatan pada region hidrofobik protein membran sel dengan menggeser sebagian besar unsur lipid yang terikat sehingga sel bakteri menjadi lisis.

Polifenol mampu merusak dinding sel bakteri yang memiliki kandungan peptidoglikan. Hagerman, *et al.* (2002) mengatakan bahwa golongan polifenol

diantaranya tanin dan flavonoid. Tanin bekerja dengan mengikat salah satu protein adhesin bakteri yang dipakai sebagai reseptor permukaan bakteri, sehingga terjadi penurunan daya perlekatan bakteri serta penghambatan sintesis protein untuk pembentukan dinding sel (Agnol *et. al.*,2003). Protein yang merupakan komponen enzim apabila mengalami kerusakan akan mengganggu enzim. Apabila terjadi kerusakan pada enzim. ATP yang menurun mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan dan perkembangan sel bakteri dan selanjutnya menyebabkan kematian sel. Flavonoid diketahui telah disintesis oleh tanaman dalam responsnya terhadap infeksi mikroba sehingga tidak mengherankan jika flavonoid efektif secara *in vitro* terhadap sejumlah mikroorganisme. Todar (2005) menjelaskan bahwa flavonoid yang bersifat lipofilik akan mengikat fosfolipid-fosfolipid pada membran sel bakteri. Mekanisme antimikroba senyawa polifenol diduga terlibat dalam perusakan membran sel oleh senyawa lipofilik.

Penelitian ini dapat membuktikan bahwa ekstraksi daun kelor menggunakan metode ekstrak maserasi serta dengan pelarut n-Heksana memiliki efek antimikroba terhadap *E.coli* EC-2-PKH secara *in vitro* walaupun belum diketahui kandungan metabolit sekunder yang paling berperan aktif sebagai antimikroba. Mengetahui Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM) dari ekstrak n-Heksana daun kelor terhadap *E.coli* EC-2-PKH adalah 35% .

BAB 6 PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa, ekstrak n-Heksana daun kelor memberikan efek antimikroba pada Konsentrasi Bunuh Minimal 35% terhadap *E.coli* secara *in vitro*.

6.2 Saran

Penelitian lebih lanjut dapat dilakukan isolasi dan identifikasi senyawa kimia yang memberikan efek antimikroba pada ekstrak n-Heksana daun kelor (*Moringa oleifera* Lamk.).

