

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Uji Konfirmasi *Salmonella enteritidis*

Isolat *Salmonella enteritidis* SP-1-PKH yang akan digunakan terlebih dahulu dilakukan uji konfirmasi. Uji konfirmasi dilakukan untuk mengindikasikan bahwa isolat bakteri SP-1-PKH tidak terkontaminasi oleh bakteri lain. Uji yang dilakukan adalah pewarnaan Gram dan uji biokimia menggunakan sistem microbact 12A/12E(Lampiran 4). *Salmonella enteritidis* adalah bakteri gram negatif berbentuk batang. Hasil pewarnaan Gram dapat dilihat pada gambar 5.1. Bentuk dan warna bakteri yang homogen menunjukkan bahwa tidak ada kontaminasi oleh bakteri lain.



Gambar 5.1. Hasil Pewarnaan Gram pada Isolat bakteri SP-1-PKH

Hasil pewarnaan gram menunjukkan bahwa isolat SP-1-PKH merupakan bakteri gram negatif (berwarna merah) dan berbentuk batang. Bakteri gram negatif mempunyai lapisan peptidoglikan yang tipis dan memiliki membran luar yang tersusun atas lipopolisakarida (LPS) dan protein, sehingga pada proses



pewarnaan gram, kristal violet terbuang selama proses pewarnaan dan menyerap safranin, sehingga bakteri akan berwarna merah (Collin, *et al.*, 2004).

Uji biokimia dilakukan dengan menggunakan microbact 12A/12E. Suspensi *Salmonella enteritidis* dimasukkan kedalam masing-masing sumuran microbact, kemudian ditunggu 15 menit untuk mendapatkan hasil berupa nilai positif atau negatif. Hasil tersebut kemudian diolah sesuai database dalam komputer. Hasil pengujian dengan menggunakan microbact menunjukkan bahwa isolat SP-1-PKH adalah *Salmonella* sp. dengan ketelitian sebesar 88,85 % sesuai pada Lampiran 4. Untuk memastikan isolat SP-1-PKH adalah bakteri *Salmonella enteritidis* maka perlu dilakukan uji biokimia lanjutan seperti tes polyvalent antiserum dimana pengelompokan sub spesies *Salmonella* dibedakan dari jenis antigennya. *polyvalent antiserum* qO mengindikasikan bahwa isolat tersebut adalah *Salmonella* grup D, sedangkan *polyvalent antiserum* HqR mengindikasikan bahwa isolat tersebut adalah *Salmonella enteritidis*.

5.2 Eksplorasi Dosis

Eksplorasi dosis bertujuan untuk mengetahui konsentrasi ekstrak yang akan digunakan dalam penelitian. Bakteri diperlakukan dengan konsentrasi ekstrak 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, dan 3,125%. Hasil eksplorasi dosis dapat dilihat pada tabel 5.2.

Tabel 5.1. Hasil eksplorasi dosis

Konsentrasi Ekstrak

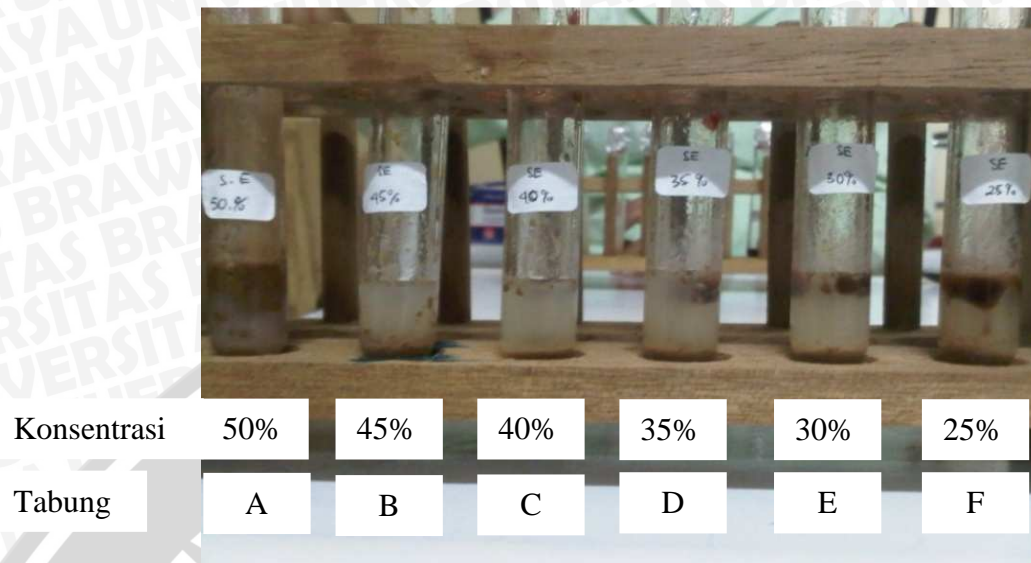
	100%	50%	25%	12,5%	6,25%	3,125
Jumlah koloni	0	0	1227	TNTC	TNTC	TNTC
	0	0	1239	TNTC	TNTC	TNTC
Rata-rata	0	0	1233	TNTC	TNTC	TNTC

Keterangan: TNTC = To Numerous to Count (Tidak Dapat Untuk Dihitung)

Dari hasil eksplorasi dosis dapat diketahui konsentrasi ekstrak yang terjadi pertumbuhan bakteri berada pada kisaran 25% sampai 50%. Konsentrasi 25% menunjukkan pertumbuhan koloni sebesar 1223 tetapi pada konsentrasi 12,5% sudah terlalu banyak untuk dihitung, maka akan diambil konsentrasi ekstrak terendah pada 25% dengan harapan akan tumbuh koloni bakteri yang dapat dihitung. Konsentrasi 50% merupakan batas ekstrak tertinggi, pada konsentrasi ini tidak ada koloni bakteri yang tumbuh, sehingga diharapkan nilai KBM dapat diketahui. Penelitian ini dilakukan enam perlakuan konsentrasi ekstrak dengan konsentrasi terendah 25% dan tertinggi 50%, maka penelitian dilakukan pada konsentrasi 25%, 30%, 35%, 40%, 45% dan 50%.

5.3 Hasil Uji Antimikroba Ekstrak *Pericarp Jambu Mete*

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi antimikroba ekstrak kulit biji mete dengan pelarut n-Heksana terhadap bakteri *Salmonella enteritidis* SP-1-PKH. Potensi antimikroba dapat diukur dari variabel kadar hambat minimal (KHM) dan kadar bunuh minimal (KBM). Pengukuran KHM dilakukan dengan melihat tingkat perubahan kekeruhan yang diakibatkan oleh pertumbuhan bakteri melalui metode *tube dilution* (dilusi tabung). Hasil uji dilusi tabung dapat dilihat pada gambar 5.2.



Gambar 5.2. Hasil Uji Dilusi Tabung

Kadar hambat minimal pada hasil uji dilusi tabung dalam penelitian ini belum dapat diamati karena warna dari ekstrak yang keruh menyamarkan hasil pengamatan. Seharusnya penentuan KHM untuk ekstrak yang keruh menggunakan metode lain seperti uji difusi cakram, atau uji dilusi agar, akan tetapi dalam penelitian ini tidak dilakukan uji tersebut karena keterbatasan alat dan bahan. Selanjutnya dilakukan penanaman pada media padat untuk mengetahui Kadar bunuh minimal.

Pengukuran nilai KBM, yaitu dengan penghitungan jumlah koloni yang tumbuh setelah dilakukan dengan penanaman hasil dilusi tabung ke media *Nutrien Agar Plate* (NAP) yang diinkubasi 37⁰C selama 24 jam. Penghitungan jumlah koloni dalam plate menggunakan *colony counter*.

Tabel 5.2 Hasil Penghitungan Jumlah Koloni pada Berbagai Perlakuan

Perlakuan	Jumlah Koloni (CFU/ <i>Plate</i>) pada Ulangan ke-				Rata-rata	Standar deviasi
	1	2	3	4		
25%	1410	1272	1237	1392	1327,75	86,09442491
30%	649	599	707	666	655,25	44,70924587
35%	229	324	343	387	320,75	66,61518846
40%	12	13	13	24	15,5	5,686240703
45%	2	1	3	1	1,75	0,816496581
50%	0	0	0	0	0	0
Kontrol (+)	1981	1886	1907	1945	1929,75	41,99503939
Kontrol (-)	0	0	0	0	0	0
OI	1801	1755	1725	1788	1767,25	34,17967232

Kadar bunuh minimal merupakan konsentrasi terendah yang memungkinkan pertumbuhan koloni bakteri yang bisa diketahui kurang dari atau sama dengan 0,1% dari *original inoculum* (Baron *et al*, 1994). *Original inoculum* dalam penelitian ini adalah 1767 maka 0,1% dari OI adalah 1,767 dan dijadikan tolak ukur untuk penentuan nilai KBM. Berdasarkan tabel hasil hubungan antara jumlah koloni terhadap berbagai perlakuan konsentrasi ekstrak menunjukkan bahwa konsentrasi 45% dengan jumlah rata-rata koloni 1,75 termasuk dalam Kadar Bunuh Minimal dalam penelitian ini.

Kadar Bunuh Minimal dalam penelitian ini relatif tinggi, yaitu pada angka 45%, hasil ini dapat dipengaruhi oleh dua hal yaitu sifat pelarut n-heksana dan sifat bakteri *Salmonella enteritidis*. Ekstrak *pericarp* jambu mete dengan pelarut n-heksana dapat meningkatkan prosentase kardol dalam larutan ekstrak, selain itu titik didih n-heksana yang relatif tinggi membuat asam anakardat yang bersifat termolabil bereaksi menjadi kardol, sehingga kandungan kardol meningkat. Selain itu, dalam uji toksisitas, penelitian yang dilakukan oleh Tedong *et. al.* (2007) menunjukkan ekstrak heksana dari daun jambu mete memiliki nilai toksisitas

terhadap tikus dengan *lethal dose* (LD50) 16 g/kg, dari berbagai data diatas pelarut n-heksana merupakan pelarut yang ideal dalam penelitian ini.

Penelitian yang dilakukan Vijayakumar dan Kalaichelvan (2011), menyebutkan ekstrak daun jambu mete memiliki aktivitas antimikroba terhadap dua bakteri Gram positif dan empat bakteri Gram negatif yaitu, *M.luteus*, *S.aureus*, *K.pneumonia*, *E.Coli*, *P.aeruginosa*, dan *S.typi*. Salmonella enteritidis merupakan bakteri Gram negatif yang memiliki lapisan dinding sel *lipid-bilayer* yang mirip dengan membran sel. Sasaran utama kandungan antimikroba dalam ekstrak *pericarp* jambu mete adalah dinding sel.. Membran sel ini dapat melindungi bakteri Gram negatif dari substansi anti peptidoglikan seperti penisilin yang tidak dipunyai oleh bakteri Gram positif. Ikatan antar asam amino dalam peptidoglikan bakteri Gram negatif lebih renggang dibandingkan dengan bakteri Gram positif (McKane dan Kandel, 1986), sehingga memudahkan senyawa asam anakardat, kardol, dan kardanol untuk masuk kedalam ikatan. Selain itu, dinding selnya tidak selektif permeabel, sehingga senyawa-senyawa tersebut dapat dengan mudah melakukan penetrasi menembus dinding sel yang akan menimbulkan terganggunya integritas dinding sel bakteri dan menyebabkan kematian bakteri.

Pada penelitian ini ditambahkan *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO) 10% pada ekstrak. DMSO adalah suatu bahan pelarut *aprotic* polar yang sering digunakan sebagai pelarut bahan farmasi, pelarut aditif makanan sintesis, dan juga sering digunakan pada campuran pelarut polar dan non polar agar dapat terlarut dengan baik. Penggunaan DMSO 10% merupakan hasil dari percobaan pendahuluan dimana berbagai konsentrasi DMSO ditambahkan pada ekstrak (Lampiran 2).

Percobaan ini juga digunakan untuk memastikan DMSO aman digunakan dan tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri. Konsentrasi DMSO 10% merupakan konsentrasi yang paling baik dan aman untuk digunakan dalam penelitian ini. Penelitian yang dilakukan oleh Ajizah (2004), menyatakan bahwa DMSO digunakan sebagai campuran ekstrak etanol kayu secang sebagai bahan antibakteri terhadap bakteri *Lactobacillus acidophillus* dengan konsentrasi DMSO 100mg/ml DMSO adalah kadar yang paling efektif sebagai antibakteri *Lactobacillus acidophillus*.

. Selanjutnya data hasil penghitungan rata-rata jumlah koloni dilakukan uji ANOVA untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan pengaruh yang bermakna antar konsentrasi yang berbeda. Hasil Uji ANOVA sesuai pada Lampiran 5 menunjukkan nilai signifikansi (P-value) sebesar 0,05 yang artinya tolak H_0 atau berarti minimal terdapat satu pasang perlakuan yang berbeda secara nyata. Hasil Uji ini menunjukkan bahwa perbedaan konsentrasi Ekstrak *pericarp* Jambu mete terbukti memiliki efek antimikroba terhadap *Salmonella enteritidis* SP-1-PKH secara *in vitro*.

Berdasarkan hasil uji lanjutan menggunakan *Tukey HSD* atau uji Beda Nyata Jujur (BNJ) dan subset yang terbentuk (Lampiran 5), terlihat bahwa kelompok perlakuan konsentrasi 50%, 45% dan 40%, tidak memiliki perbedaan pengaruh yang nyata. Perlakuan konsentrasi 40%, 35%, 30%, dan 25% masing-masing memiliki perbedaan pengaruh yang nyata terhadap pertumbuhan *Salmonella enteritidis* SP-1-PKH. Perbedaan pengaruh dari masing-masing konsentrasi ini dikarenakan kemampuan ekstrak yang berbeda-beda dalam

menghambat dan membunuh bakteri, sehingga masing-masing konsentrasi memiliki perbedaan yang nyata, terutama pada konsentrasi ekstrak 25% hingga 40%.

Uji korelasi (Lampiran 5) menunjukkan bahwa konsentrasi ekstrak dan jumlah koloni *Salmonella enteritidis* berkorelasi negatif (-0.897). Tanda negatif pada hasil uji korelasi menunjukkan hubungan yang terbalik antara konsentrasi ekstrak *pericarp* Jambu mete dengan jumlah koloni *Salmonella enteritidis* SP-1-PKH yang artinya semakin tinggi konsentrasi ekstrak *pericarp* Jambu mete maka semakin rendah jumlah pertumbuhan koloni *Salmonella enteritidis* SP-1-PKH. Nilai korelasi akan semakin kuat ketika mendekati nilai 1 atau (-1), pada penelitian ini didapat nilai (-0.897) dari uji korelasi yang artinya terdapat korelasi yang kuat antara konsentrasi ekstrak *pericarp* Jambu mete terhadap jumlah pertumbuhan koloni *Salmonella enteritidis* SP-1-PKH.

Analisa selanjutnya adalah analisis regresi linier yang hasilnya tertera pada Lampiran 4 dengan persamaan regresi yang didapat yaitu $y = 1277 - 254,4x$, Y adalah jumlah koloni *Salmonella enteritidis*, sedangkan X adalah konsentrasi ekstrak *pericarp* Jambu mete dengan pelarut n-Heksana. Hal ini dapat diartikan bahwa berarti tanpa pemberian ekstrak *pericarp* Jambu mete maka jumlah koloni yang tumbuh akan cenderung meningkat konstan sebesar $1,277 \times 10^3$ koloni dan pengaruh setiap kenaikan 5% pemberian ekstrak *pericarp* Jambu mete menyebabkan penurunan jumlah koloni *Salmonella enteritidis* sebesar $2,5 \times 10^3$ koloni. Nilai $R^2 = 0,810$ (81%) ini berarti bahwa perlakuan konsentrasi ekstrak

pericarp jambu mete mempengaruhi sebesar 81% terhadap penurunan jumlah koloni *Salmonella enteritidis* SP-1-PKH.

Hasil uji analisis yang telah dilakukan diatas menunjukkan bahwa ekstrak *pericarp* Jambu mete mempunyai pengaruh yang besar terhadap pertumbuhan koloni *Salmonella enteritidis* SP-1-PKH. Berbagai penelitian yang berhubungan kulit biji mete telah banyak dilakukan. Kandungan kulit biji mete yang terbesar adalah *chasew nut shell liquid* (CNSL) atau minyak laka yang didalamnya terkandung asam anakardat, kardol, dan kardanol (Simpen, 2008). Pemanfaatan CNSL dalam dunia medis yang sudah dilakukan yaitu, untuk menguji kemampuan dalam bidang mikrobiologi dan parasitologi. Penelitian yang dilakukan oleh Parasa *et.al.* (2011), ekstrak CNSL menggunakan aseton 70% memberikan efek penghambatan pertumbuhan *methilen resistance Stapylococcus aureus* (MRSA) yang setara dengan oxacillin 1mg/ml yang dilihat dari diameter hambat 25 mm untuk ekstrak CNSL dan 21 mm untuk oxacillin 1mg/ml. Penelitian yang dilakukan oleh Ademola dan Eloff (2010), ekstrak aseton pada jambu mete menunjukkan efek penghambatan setara dengan albendazole terhadap pertumbuhan *haemonchus contortus*.

Komposisi kimia dari CNSL adalah asam anakardat, kardol serta ditemukan adanya kardanol(3-alkilfenol), dan 2-metilkardol (2-metil-5-alkilresorsinol). Asam anakardat merupakan komponen terbesar dalam CNSL, dengan prosentase 70% dan sisanya kardol, kardanol dan dimetilkardol. Menurut penelitian yang lain, asam anakardat yang telah diisolasi dari buah semu jambu

mete juga menunjukkan aktifitas sitotoksis melawan sel kanker payudara BT-20 (Budiati *et al*, 2004).

Gugus OH pada CNSL dinilai memiliki peran aktif dalam fungsinya sebagai bahan antibakteri. Kardol memiliki dua gugus OH fenolik sedangkan asam anakardat memiliki satu gugus OH dan satu gugus COOH pada cincin aromatisnya, hal inilah yang memungkinkan kardol lebih bersifat sebagai zat antibakteri daripada asam anakardat. Berdasarkan beberapa sumber yang telah disebutkan diatas, besar kemungkinan zat aktif kardol dapat menjadi penyebab utama terjadinya penurunan pertumbuhan bakteri secara signifikan seiring dengan bertambahnya konsentrasi ekstrak *pericarp* Jambu mete. Meningkatnya konsentrasi ekstrak menjadikan konsentrasi kardol semakin tinggi sehingga gugus OH yang bersifat sebagai zat antibakteri akan bereaksi dengan bakteri *Salmonella enteritidis*, sehingga semakin banyak bakteri yang mengalami kematian (Kresnamurti dan Budiati, 2008).