

UJI EFEKTIFITAS ANTIMIKROBA EKSTRAK KULIT JERUK NIPIS (*Citrus aurantifolia*) TERHADAP BAKTERI *Salmonella Typhie*

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran**



Oleh:

**MUHAMAD AZKA SOELAEMAN
NIM: 145070107111050**

**PROGRAM STUDI SARJANA KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

HALAMAN PENGESAHAN

UJI EFEKTIFITAS ANTIMIKROBA EKSTRAK KULIT JERUK NIPIS (*Citrus aurantifolia*) TERHADAP BAKTERI *Salmonella Typhie*

Oleh :

Muhamad Azka Soelaeman
NIM. 145070107111050

Telah diuji pada

Hari : Kamis

Tanggal : 22 Maret 2018

Dan dinyatakan lulus oleh :

Penguji I

dr. Nurrahma Wahyu Fitriyani
NIP.198503042009122003

Pembimbing I/Penguji II,

Pembimbing II/Penguji III,

Prof. Dr. dr. Sumarno, DMM, SpMK (K)
NIP. 194807061980021001

dr. Sony Agung Santoso Sp.M
NIP. 196603111996011001

Ketua Jurusan Kedokteran

dr. Triwahju Astuti, M.Kes, Sp.P(K)
NIP. 196310221996012001

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Muhamad Azka Soelaeman

NIM : 145070107111050

Program Studi : Sarjana Kedokteran

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini adalah hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya sendiri. Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil plagiat, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 11 Februari 2018

Yang membuat pernyataan,

Muhamad Azka Soelaeman

NIM. 145070107111050

KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah SWT yang telah memberi rahmat dan petunjuk, serta hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir dengan judul

“UJI EFEKTIFITAS ANTIMIKROBA EKSTRAK KULIT JERUK NIPIS (*Citrus aurantifolia*) TERHADAP BAKTERI *Salmonella Typhie*”. Pada kesempatan ini

penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih yang besar kepada :

1. **Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes.**, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
2. **dr. Triwahju Astuti, M.Kes.,Sp.P(K)**, selaku Ketua Program Studi Sarjana Kedokteran Universitas Brawijaya.
3. **Prof. Dr. dr. Sumarno. DMM. SpMK(K)**, selaku Dosen Pembimbing pertama yang telah berbaik hati untuk banyak meluangkan waktu serta membimbing dan mengarahkan saya dengan sabar, penuh keikhlasan, serta senantiasa memberikan ilmu baru.
4. **dr. Sony Agung Santoso Sp.M.**, selaku Dosen Pembimbing kedua yang telah berbaik hati untuk banyak meluangkan waktu serta membimbing dan mengarahkan saya dengan sabar, penuh keikhlasan, serta senantiasa memberikan ilmu baru dan semangat dalam penulisan tugas akhir ini.
5. **dr. Nurrahma Wahyu Fitriyani.**, Selaku penguji pertama yang telah memberikan pandangan baru mengenai tugas akhir.
6. Kedua orang tua saya yang saya sayangi **Rudi Supriyadi** dan **Lia Marlia**, atas doa yang tidak pernah putus, limpahan kasih sayang dan motivasi yang telah diberikan sejak saya kecil hingga saat ini.

7. Kedua saudara saya yang saya banggakan, **Faza & Rachman** yang selalu menjadi motivasi saya untuk dapat meraih prestasi.

8. Teman-teman seperjuangan saya, kelas **PD-B 2014** yang senantiasa mengisi hari-hari perkuliahan di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya baik dalam suka maupun duka.

9. Sahabat-sahabat saya, yang selalu hadir untuk bertukar pikiran mengenai tugas akhir. **Danan, Uswa, Heidy, Maryam, Haris, Bhisma**

10. Pendukung setia saya yang senasib dan selalu mendengarkan keluh kesah saya, **Amel**.

11. Teman-teman dari **Lakesma FKUB** yang menjadi inspirasi saya.

12. **Bu Uchi, Pak Slamet, Pak Ali, Mas Andri, Mbak Mega** yang telah banyak membantu penelitian ini di Laboratorium Mikrobiologi.

13. Dan semua pihak yang telah membantu menyelesaikan tugas akhir ini yang tidak bisa disebutkan satu persatu.

Akhir kata penulis menyadari bahwa tulisan ini masih jauh dari kesempurnaan, sehingga kritik dan saran yang membangun untuk penulis sangat penulis harapkan.

Semoga tugas akhir ini dapat diterima dan akan bermanfaat bagi penulis khususnya dan bagi pembaca yang membutuhkannya.

Malang, 19 Maret 2018

Penulis

Soelamean, Muhamad Azka. 2018. **UJI EFEKTIFITAS ANTIMIKROBA EKSTRAK KULIT JERUK NIPIS (Citrus Aurantifolia) TERHADAP BAKTERI *Salmonella Typhi***. Tugas Akhir, Program Studi Sarjana Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing : (1) Prof. Dr. dr. Sumarno. DMM. SpMK (K) (2) dr. Sony Agung Santoso Sp.M

ABSTRAK

Angka kejadian demam tifoid di Indonesia masih tinggi. Demam tifoid termasuk urutan ketiga dalam daftar penyakit terbanyak pada pasien rawat inap di Rumah Sakit. Beberapa pemberian antibakteri telah membuat bakteri menjadi kebal dan tidak efektif lagi dalam membunuh bakteri. Hal tersebut dikarenakan bakteri terus berkembang dan melawan obat antibakteri sehingga dapat tetap bertahan hidup dalam tubuh manusia. Berdasarkan hal tersebut, perlu dikembangkan antibiotik baru terhadap *Salmonella Typhi*. Kulit jeruk nipis memiliki kandungan tannin, minyak atsiri, dan saponin yang memiliki efek sebagai antimikroba. Desain penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental laboratorium dengan rancangan true experimental-post test only control group design. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi antimikroba ekstrak etanol kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap *Salmonella Typhi* dengan menggunakan metode difusi sumuran. Konsentrasi ekstrak etanol kulit jeruk nipis yang digunakan adalah 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, dan 100% dengan empat kali pengulangan. Berdasarkan hasil penelitian, didapatkan zona inhibisi terbentuk pada seluruh konsentrasi uji tersebut. Hasil uji One-Way ANOVA menunjukkan ada perbedaan efek yang bermakna pada perubahan konsentrasi ekstrak etanol kulit jeruk nipis terhadap zona inhibisi pertumbuhan bakteri *Salmonella Typhi* ($p < 0.05$). Uji Regresi sederhana menunjukkan adanya terdapat hubungan yang bermakna antara pemberian ekstrak dengan diameter zona hambat (Korelasi, $R = 0,975$). Berdasarkan penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol kulit jeruk nipis memiliki potensi sebagai antimikroba terhadap bakteri *Salmonella typh*.

Kata Kunci : *Salmonella Typhi*, kulit jeruk nipis, potensi antimikroba.

Soelaeman, Muhamad Azka. 2018. . **TEST OF EFFECTIVENESS OF ANTI MICROBA FROM EXTRACT OF LIME PEEL (*Citrus aurantifolia*) ON *Salmonella Typhie* BACTERIA** Final

Assignment, Medical Program, Fakultas of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: (1) Prof. Dr. dr. Sumarno. DMM. SpMK (K) (2) dr.Sony Agung Santoso Sp.M

ABSTRACT

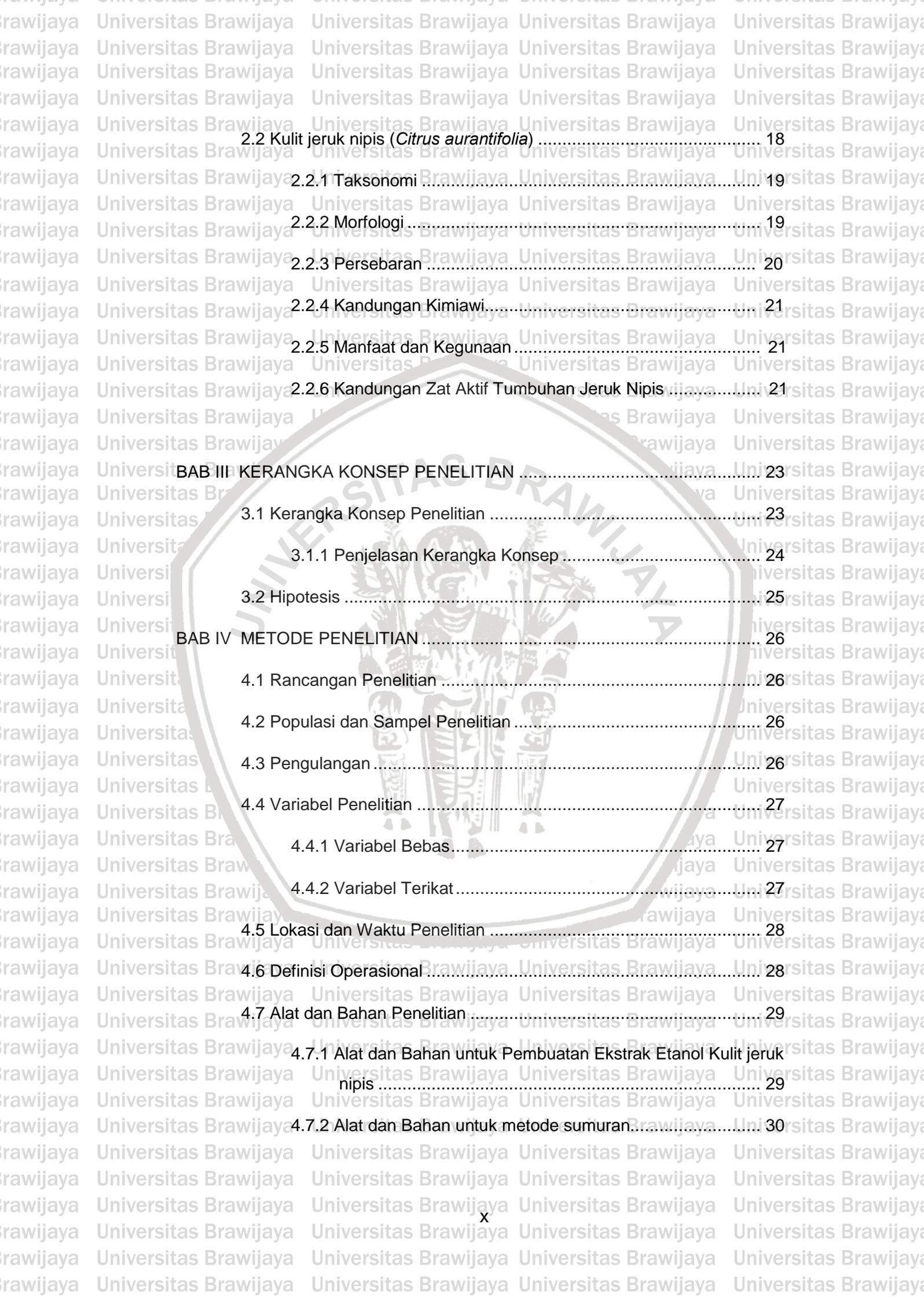
The incidence of typhoid fever in Indonesia is still high. Typhoid fever is the third highest in the list of diseases of hospitalized patients in hospitals. Some antibacterial administration has made bacteria immune and ineffective in killing bacteria. This is because bacteria continue to grow and fight antibacterial drugs that can survive in the human body. Based on this, new antibiotics should be developed against *Salmonella Typhi*. Lemon peel contains tannins, essential oils, and saponins that have an antimicrobial effect. The research design used was laboratory experimental study with true experimental-post test only control group design. The aim of this research is to know the antimicrobial potential of ethanol extract of lime peel (*Citrus aurantifolia*) against *Salmonella Typhi* by using the diffusion method of pitting. The concentration of ethano extract of lime peel used was 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, and 100% with four repetitions. Based on the results of the study, the zone of inhibition was formed at all concentrations of the test. The result of One-Way ANOVA test showed that there was a significant effect difference on the concentration of ethanol extract of lime peel on the zone of inhibition of *Salmonella Typhi* bacteria growth ($p < 0.05$). Simple Regresion test showed there was a significant correlation between giving extract and drag zone diameter (Correlation, $R = 0,975$). Based on this research, it can be concluded that extract of lemon peel ethanol has potential as antimicrobial against *Salmonella Typhi* bacteria.

Keywords : *Salmonella Typhi*, Lime peel, antimicrobial potential.

DAFTAR ISI

Judul.....	i
Halaman Pengesahan.....	ii
Pernyataan Keaslian Tulisan.....	iii
Kata Pengantar.....	iv
Abstrak.....	vi
Abstract.....	vii
Daftar Isi.....	viii
Daftar Tabel.....	xi
Daftar Gambar.....	xii
Daftar Lampiran.....	xiii
Daftar Singkatan.....	xiv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.3.1 Tujuan Umum.....	3
1.3.2 Tujuan Khusus.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
1.4.1 Manfaat Keilmuan.....	3
1.4.2 Manfaat Akademik.....	3
1.4.3 Manfaat Praktis.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	4

2.1 <i>Salmonella Typhie</i>	4
2.1.1 Morfologi.....	4
2.1.2 Diagnosis Laboratorik.....	5
2.1.2.1 Reaksi Serologis.....	5
2.1.2.2 Reaksi Biokimia.....	6
2.1.2.3 Pembenihan.....	7
2.1.2.3.1 Spesimen.....	7
2.1.2.3.2 Metode Bakteriologi untuk isolasi <i>Salmonella</i>	8
2.1.4 Struktur antigen untuk <i>Salmonella Typhie</i>	9
2.1.5 Penentu Patogenitas <i>Salmonella Typhie</i>	10
2.1.5.1 Faktor Permukaan.....	11
2.1.5.2 Endotoksin.....	11
2.1.5.3 Enterotoksin.....	12
2.1.5.4 Sitotoksin.....	12
2.1.5.5 Daya Invasi.....	12
2.1.6 Patogenesis Infeksi <i>Salmonella Typhi</i>	13
2.1.7 Manifestasi Klinis <i>Salmonella</i>	14
2.1.7.1 Demam Enterik.....	14
2.1.7.2 Bakteriemia (Septisemia) dengan lesi fokal.....	15
2.1.7.3 Enterokolitis (Gastroenteritis).....	15
2.1.8 Diagnosis Penyakit Demam Tifoid.....	16
2.1.9 Pengobatan infeksi <i>Salmonella Typhi</i> (Demam Tifoid).....	17
2.1.10 <i>Salmonella</i> terhadap resistensi beberapa Antibiotik.....	17



2.2 Kulit jeruk nipis (<i>Citrus aurantifolia</i>)	18
2.2.1 Taksonomi	19
2.2.2 Morfologi	19
2.2.3 Persebaran	20
2.2.4 Kandungan Kimiawi	21
2.2.5 Manfaat dan Kegunaan	21
2.2.6 Kandungan Zat Aktif Tumbuhan Jeruk Nipis	21

BAB III KERANGKA KONSEP PENELITIAN 23

3.1 Kerangka Konsep Penelitian	23
3.1.1 Penjelasan Kerangka Konsep	24
3.2 Hipotesis	25

BAB IV METODE PENELITIAN 26

4.1 Rancangan Penelitian	26
4.2 Populasi dan Sampel Penelitian	26
4.3 Pengulangan	26
4.4 Variabel Penelitian	27
4.4.1 Variabel Bebas	27
4.4.2 Variabel Terikat	27
4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian	28
4.6 Definisi Operasional	28
4.7 Alat dan Bahan Penelitian	29
4.7.1 Alat dan Bahan untuk Pembuatan Ekstrak Etanol Kulit Jeruk nipis	29
4.7.2 Alat dan Bahan untuk metode sumuran	30

4.8 Prosedur Penelitian	30
4.8.1 Identifikasi Bakteri.....	30
4.8.1.1 Pewarnaan gram.....	30
4.8.1.2 Kultur BSA	26
4.8.1.3 Microbat 12	32
4.8.1.4 Pembuatan pembedihan cair bakteri CFU/ml	32
4.8.2 Pembuatan ekstrak metanol kulit jeruk nipis.....	33
4.8.3 Uji Sensitivitas Antimikroba	34
4.8.4 Pengamatan dan Pengukuran.....	34
4.8.5 Skema Prosedur Penelitian.....	36
4.9 Analisis Data.....	38
BAB V HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA	40
5.1 Hasil Penelitian	40
5.1.1 Hasil Identifikasi Bakteri	40
5.1.1.2 Hasil Ekstrak Etanol Kulit jeruk nipis	43
5.1.1.3 Hasil Penelitian Pendahuluan.....	43
Hasil Difusi Sumuran.....	44
Hasil Pengukuran Diameter zona Hambat	46
5.2 Analisis Data	48
BAB VI PEMBAHASAN	52
BAB VII PENUTUP	59
7.1 Kesimpulan	59
7.2 Saran	59
DAFTAR PUSTAKA.....	60
LAMPIRAN	62

DAFTAR TABEL

Tabel 5.1
Diameter Zona Inhibisi yang Terbentuk di sekitar Lubang Sumuran dalam
Pemberian Konsentrasi Ekstrak Etanol Kulit jeruk nipis47



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 <i>Salmonella Typhie</i> pada pewarnaan gram.....	9
Gambar 2.2 Jeruk Nipis.....	20
Gambar 3.1 Skema Kerangka Konsep Penelitian.....	23
Gambar 4.1 Cara Pengukuran Diaeter Zona Inhibisi.....	36
Gambar 4.2 Alur Kerja Penelitian Ekstrak Daun Kulit jeruk nipis Terhadap <i>Salmonella Typhie</i> dengan mengamati zona inhibisi yang terbentuk disekitar bakteri <i>Salmonella Typhie</i>	37
Gambar 5.1 Pengamatan Menggunakan Mikroskop Perbesaran Lensa Objektif 100x	40
Gambar 5.2 BSA.....	41
Gambar 5.3 Microbat	42
Gambar 5.4 Hasil Ekstrak Etanol Kulit jeruk nipis.....	43
Gambar 5.5 Hasil Pengamatan pada pengulangan konsentrasi 3.125%, 6.25%, 12.5%, 25%, 50%, 100%, dan Kontrol (-)	44
Gambar 5.6 Rerata Diameter Zona Inhibisi yang terbentuk disekitar Lubang Sumuran setelah Perlakuan Berbagai Konsentrasi Ekstrak Etanol Kulit jeruk nipis	45

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran . Penelitian Pendahuluan 66

Lampiran . Alat dan Bahan Penelitian 67

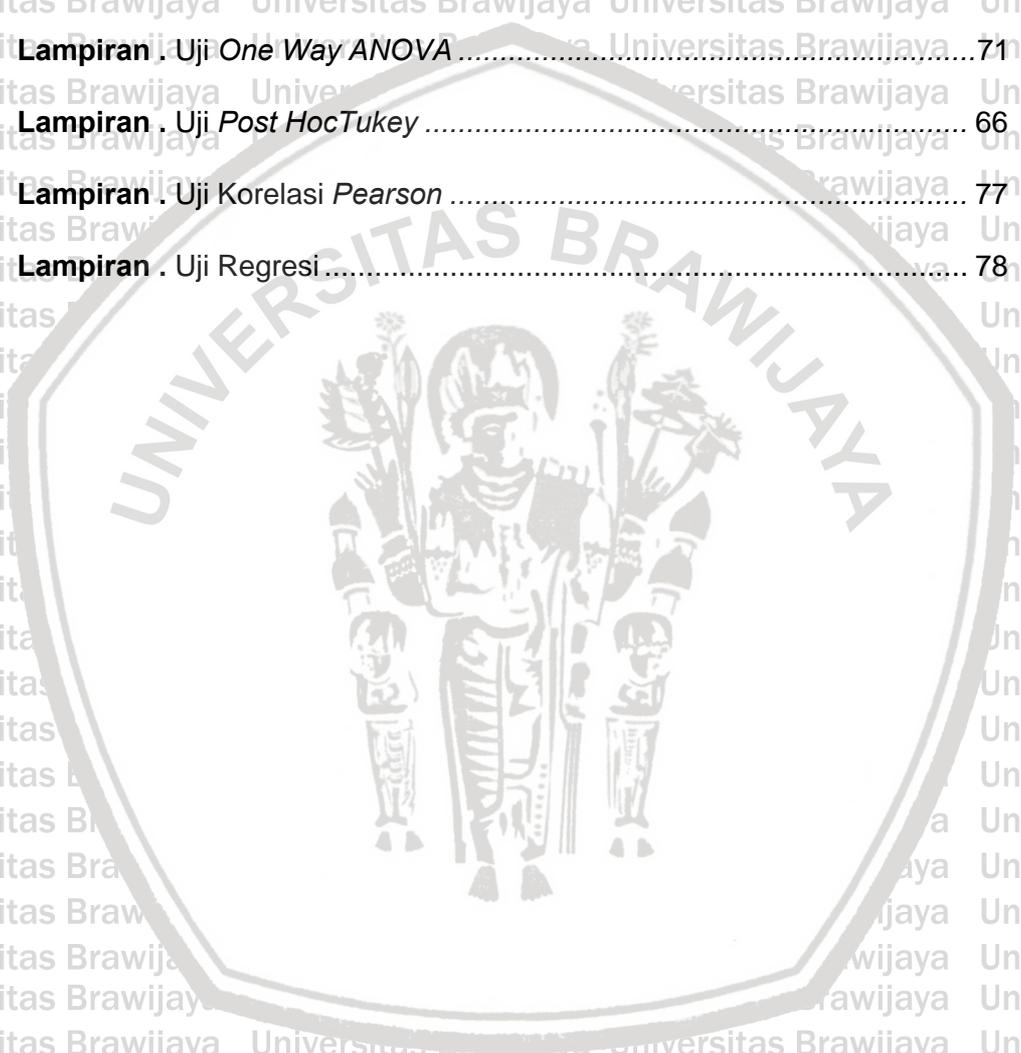
Lampiran . Uji Normalitas dan Uji Homogenitas 68

Lampiran . Uji One Way ANOVA 71

Lampiran . Uji *Post Hoc*Tukey 66

Lampiran . Uji Korelasi *Pearson* 77

Lampiran . Uji Regresi 78



DAFTAR SINGKATAN

CFU : *Coloni Forming Unit*

CFU/ml : *Coloni Forming Unit/mililiter*

SPSS : *Statistical Product of Service Solution*

K (-) : *Kontrol Negatif*



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Salmonella Typhi merupakan bakteri penyebab terjadinya demam tifoid atau thypus 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 di daerah 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). 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 antibakteri 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 chloramphenicol, 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).

Adanya efek samping terhadap pemakaian antibakteri dan perkembangan terhadap resistensi terhadap antibakteri tersebut, menjadi dasar ingin dilakukan penelitian terhadap salah satu bahan alami sebagai antibakteri terhadap *S. Typhi*. Indonesia dengan kelimpahan sumber daya alamnya memiliki keunggulan untuk memanfaatkan berbagai tumbuhan obat sebagai antimikroba. Salah satu tanaman yang berpotensi untuk pengobatan infeksi bakteri adalah kulit buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*). Bahan aktif dalam ekstrak kulit buah jeruk nipis seperti alkaloid, tannin, flavanoid, dan saponin memiliki efek antimikroba yang berperan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella Typhi*. Konsentrasi flavonoid tertinggi terdapat pada jaringan luar yang berwarna seperti kulit buah (Machin *et al.*, 1991). Flavonoid sebagai antimikroba bekerja dengan

menghambat enzim DNA girase dan metabolisme energi sehingga bakteri kehilangan fungsi vitalnya dan mati (Cushine and Lamb, 2005).

Berdasarkan uraian diatas, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek pemberian ekstrak kulit buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) sebagai antimikroba terhadap bakteri *Salmonella Typhi*. Diharapkan dengan adanya penelitian ini, masyarakat umum dapat meningkatkan penggunaan tanaman kulit buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*).

1.1 Rumusan Masalah

Apakah ekstrak kulit buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) memiliki efek antimikroba terhadap bakteri *Salmonella Typhi* secara *in vitro*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui efek antimikroba ekstrak kulit buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap bakteri *Salmonella Typhi* secara *in vitro*.

1.3.2 Tujuan khusus

Mengetahui pengaruh perbedaan konsentrasi ekstrak dari kulit buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap pertumbuhan bakteri *Salmonella Typhi*.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Keilmuan

Dapat memperkokoh landasan teori ilmu kedokteran terutama di bidang mikrobiologi, khususnya mengenai pengaruh kulit buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dalam menghambat pertumbuhan.

1.4.2 Manfaat Akademik

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

1.4.3 Manfaat Praktis

1. Memperoleh pengobatan alternatif dari bahan alami pada pengobatan infeksi *Salmonella Typhi*.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Salmonella Typhi

2.1.1 Morfologi Salmonella Typhi

S. 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 petrichous 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:

- 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 tetratonat. 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 *Salmonella 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. *Salmonella* Typhi, Pewarnaan Gram negatif, berbentuk batang (Todar, 2008)

2.1.4 Struktur Antigen *Salmonella* Typhi

S. Typhi memiliki antigen somatik O, flagella A, capsullar 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 intraceluller 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 fagisitoses juga dipengaruhi oleh adanya antigen Vi. Fisiologi dari antigen Vi belum ditentukan, namun telah ditunjukkan bahwa galur Typhi dengan antigen Vi tidak di fagisitoses 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 peranannya 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 propria. 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, berkembang biak, dan bersama cairan empedu di ekskresikan ke dalam lumen usus, 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 sitemik, 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 didinding usus. Proses patologis jaringan limfoid ini dapat berkembang hingga menembus lapisan mukosa dan otot dan dapat mengakibatkan perforasi (Widodo, 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 disebabkan 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 trimetropim-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 ampicilin 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 Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*)

Jeruk nipis yang dibudidayakan di Indonesia tidak jelas varietasnya. Namun, di Instalasi Penelitian dan Pengkajian Teknologi Pertanian Tlengkung, Malang, telah dikoleksi kultivar jeruk nipis komersial disebut jeruk nipis wajak. Bibit yang dikembangkan adalah bibit jeruk bebas penyakit. Produktivitas jeruk nipis sangat bergantung dari umur, kondisi tanaman, keadaan iklim, kesuburan tanah, dan pemeliharaan tanaman. Di Indonesia, jeruk nipis bisa berbunga dan berbuah secara serentak dan bisa berlangsung sepanjang tahun (Sarwono, 2001).

2.2.2 Taksonomi

Berdasarkan taksonomi tumbuhan, Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) digolongkan sebagai berikut:

Kingdom : *Plantae*

Divisi : *Spermatophyta*

Sub divisi : *Magnoliophyta*

Kelas : *Magnoliopsida*

Ordo : Sapindales

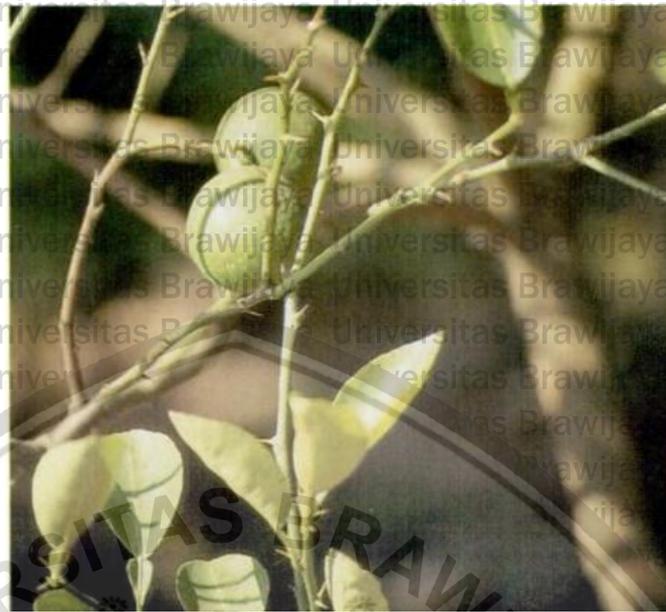
Famili : Rutaceae

Genus : Citrus L.

Spesies : Citrus aurantifolia

2.2.3 Morfologi

Pohon kecil bercabang lebat, tetapi tidak beraturan, tinggi 1,5-3,5 m, batang bulat, berduri pendek, kaku, dan tajam. Daun tunggal, tangkai daun bersayap sempit. Helaian daun berbentuk jorong sampai bundar telur lonjong, pangkal bulat, ujung tumpul, tepi beriringgit, permukaan atas berwarna hijau tua mengilap, permukaan daun bagian bawah berwarna hijau muda, panjang 2,5-9 cm, lebar 2-5 cm. Bunga majemuk, tersusun dalam malai yang keluar dari ketiak daun, bunga berbentuk bintang, diameter 1,5-2,5 cm, berwarna putih, baunya harum. Buahnya buah buni, berbentuk bulat sampai bulat telur, diameter 2,5-5 cm, berkulit tipis tanpa benjolan, berwarna hijau yang akan menjadi kuning matang, rasanya asam. Bijinya banyak, kecil-kecil, licin, bulat telur sungsang (Dalimartha, S., 2000).



Gambar 2.1 Tanaman Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*): A. Daun; B.

Buah

(Dalimartha, S., 2000)

2.2.4 Persebaran

Biasanya, jeruk nipis ditanam di pekarangan atau di kebun, dapat tumbuh pada tanah yang kurang subur, asalkan mudah meneruskan air dan mendapat sinar

matahari penuh. Konon, jeruk nipis berasal dari kepulauan Hindia Timur. Di

Indonesia tanaman ini dapat ditemukan pada ketinggian 1-1.000 m dpl

(Dalimartha, 2000).

2.2.5 Kandungan Kimiawi

Jeruk nipis mengandung minyak terbang limonene dan linalool. Selain itu, juga mengandung flavonoid, seperti poncirin, hesperidine, rhoifolin, dan naringin.

Buah masak mengandung synephrine dan N-methyltyramine. Disamping itu, juga

mengandung asam sitrat, kalsium, fosfor, besi dan vitamin (A, B₁, dan C) (Dalimartha, 2000).

Sedangkan ekstrak dari kulit jeruk nipis sendiri memiliki bahan aktif seperti alkaloid, flavonoid, dan triterpenoid (Pathan, Rafi, 2012).

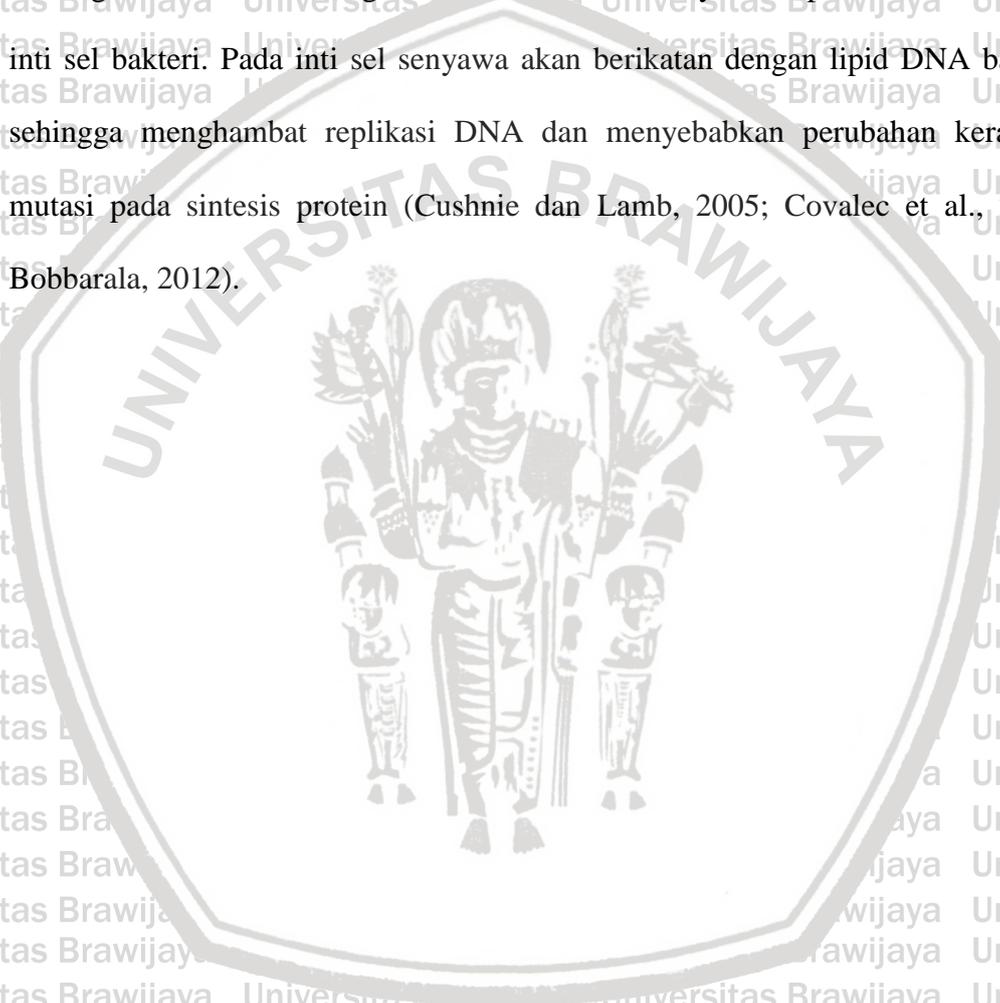
2.2.6 Manfaat dan Kegunaan

Sebagai obat tradisional, tanaman jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) memiliki banyak manfaat dan kegunaan. Jeruk nipis dapat digunakan untuk menghilangkan sumbatan vital energi, obat batuk, peluruh dahak (mukolitik), peluruh kencing (diuretik), peluruh keringat, dan membantu proses pencernaan. Untuk pemakaian luar, air jeruk nipis diaduk dengan bahan lain untuk dikompreskan atau dibalurkan ke bagian tubuh yang sakit, seperti demam pada anak-anak, sakit perut, diare, sakit gigi, nyeri haid, kepala pusing, rematik, kurap, ketombe, jerawat, *clavus*, terkilir, mengecilkan perut, mengecilkan pori-pori di wajah, dan membersihkan lemak di kulit wajah. Air jeruk nipis juga dapat digunakan sebagai obat kumur pada penderita sakit tenggorokan atau abses tenggorokan (Dalimartha, 2000).

2.2.7 Kandungan Zat Aktif Tumbuhan Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*)

Jeruk nipis, tumbuhan yang sering kita temui di lingkungan kita, mempunyai efek yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Ekstrak kulit jeruk nipis memiliki bahan aktif seperti flavonoid, polifenol, saponin, dan alkaloid (Nogota, *et al.*, 2006).

Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri adalah membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler bakteri, sehingga dapat merusak membran sitoplasma bakteri dan diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler. Senyawa flavonoid bersifat lipofilik sehingga mampu mengikat fosfolipid – fosfolipid pada dinding sel bakteri. Dinding sel bakteri lisis dan senyawa dapat masuk ke dalam inti sel bakteri. Pada inti sel senyawa akan berikatan dengan lipid DNA bakteri sehingga menghambat replikasi DNA dan menyebabkan perubahan kerangka mutasi pada sintesis protein (Cushnie dan Lamb, 2005; Covalec et al., 2005; Bobbarala, 2012).

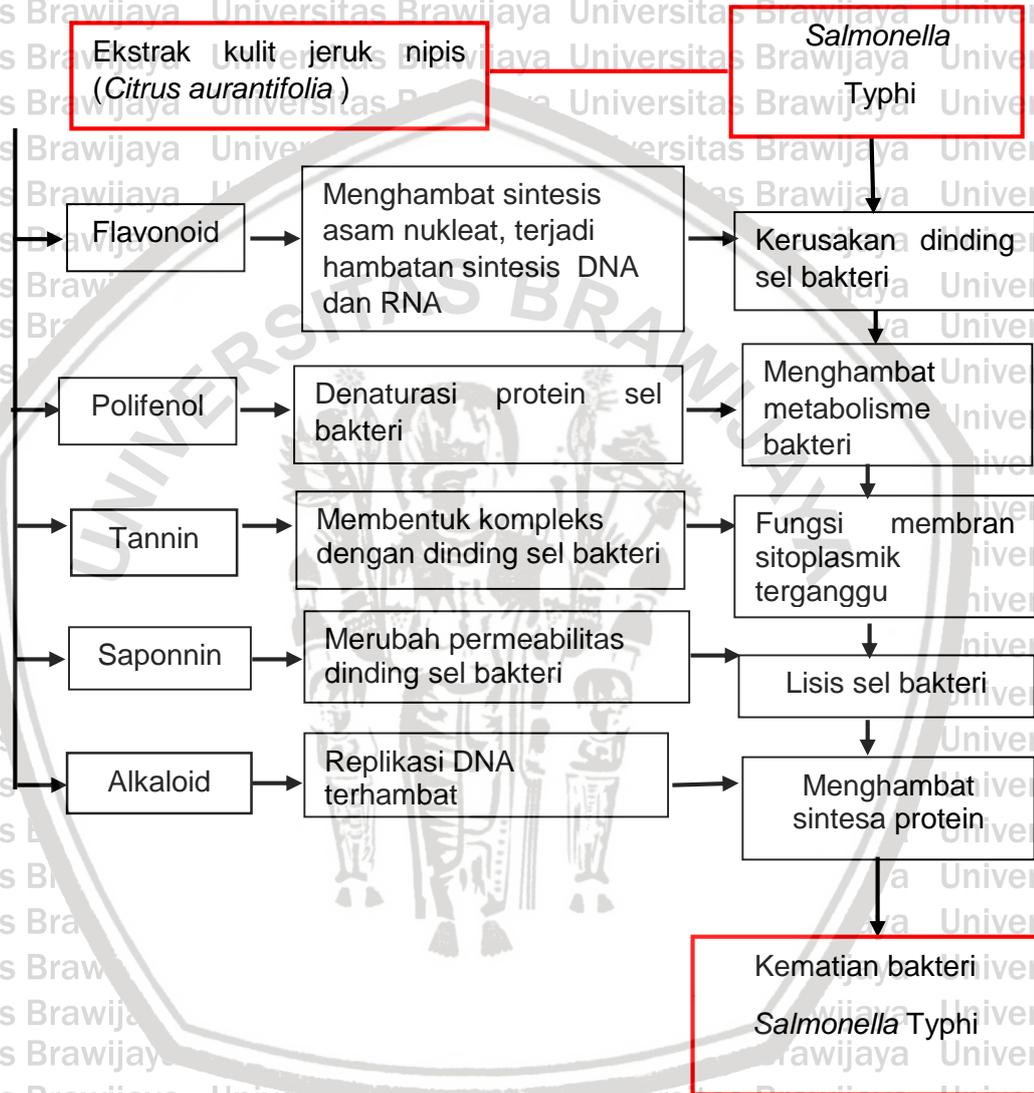


BAB 3

KERANGKA KONSEP PENELITIAN

3.1

Kerangka Konsep Penelitian



Keterangan :

: variabel yang akan di teliti

: variable yang tidak di teliti

Gambar 3.1 Skema Kerangka Konsep Penelitian

3.1.1 Penjelasan Kerangka Konsep

Kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) mengandung banyak zat-zat antioksidan seperti tanin, saponin, alkaloid, dan flavonoid dimana zat-zat tersebut memiliki efek menstimulasi sistem imun, menurunkan agregasi platelet, modulasi metabolisme hormon, antikanker, dan salah satunya antibakteri (Saxena *et al.*, 2013).

Flavonoid bekerja dengan menghambat enzim DNA girase, fungsi membran sitoplasmik, dan metabolisme energi (Cushnie and Lamb, 2005).

Saponin sebagai antibakteri memiliki efek merubah permeabilitas membran sel dengan memblokade kanal ion. Studi lain menjelaskan, saponin meningkatkan permeabilitas membran sel dengan menyisipkan senyawa aglycone diantara lapisan lipid bilayer bakteri sehingga membentuk lubang.

Tanin adalah penghambat pertumbuhan bakteri yang baik karena memiliki senyawa asam tannic. Tanin, sebagai antibakteri, bekerja dengan merubah susunan ikatan hidrogen dan membentuk kompleks dengan nitrogen dari asam amino pada sel bakteri sehingga kehilangan aktivitas vitalnya. Selain itu, tanin juga bekerja dengan melarutkan lapisan lipid dinding bakteri sehingga menyebabkan kebocoran sel (Al-Ani *et al.*, 2008). Senyawa alkaloid memiliki efek antibakteri karena kemampuannya untuk menghambat sintesis asam nukleat dengan menghambat enzim topoisomerase tipe I dan II. Selain itu alkaloid juga memiliki kemampuan untuk menghambat pembentukan biofilm, menghambat sistem sekresi bakteri, mengganggu regulasi gen, dan mengganggu fimbriae dan adhesin (Cushnie *et al.*, 2014).

Saponin juga merubah fungsi glikoprotein membran plasma dan membentuk kompleks saponin-kolesterol sehingga mengganggu organisasi membran fosfolipid. Senyawa alkaloid memiliki efek antimikroba karena kemampuannya untuk menghambat sintesis asam nukleat dengan menghambat enzim dihydrofolate reductase, topoisomerase tipe I dan II.

Alkaloid memiliki kemampuan untuk menghambat pembentukan biofilm, menghambat sistem sekresi bakteri, mengganggu regulasi gen, dan mengganggu fimbriae dan adhesin (Cushnie, et al., 2014). Saponin sebagai antibakteri memiliki efek merubah permeabilitas membran sel dengan memblokir kanal ion. Studi lain menjelaskan, saponin meningkatkan permeabilitas membran sel dengan menyisipkan senyawa aglycone diantara lapisan lipid bilayer bakteri sehingga membentuk lubang. Saponin juga merubah fungsi glikoprotein membran plasma dan membentuk kompleks saponin-kolesterol sehingga mengganggu organisasi membran fosfolipid dan membuatnya hancur (Hassan, 2008).

Pengaruh antimikroba Ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap bakteri *Salmonella* Typhi dapat dilihat dengan menentukan zona inhibisi yang terbentuk di sekitar lubang sumuran. Zona inhibisi merupakan zona bening di sekitar lubang sumuran yang menunjukkan terjadinya penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri.

3.2 Hipotesis

Ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) memiliki efek antimikroba terhadap bakteri *Salmonella* Typhi secara in vitro.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental laboratorium dengan rancangan *true experimental-post test only control group design*, dengan fokus penelitian pada keadaan bakteri *Salmonella Typhi* setelah perlakuan berupa pemberian ekstrak metanol kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) secara *in vitro* melalui metode difusi sumuran untuk menentukan zona inhibisi yang terbentuk di sekitar lubang sumuran.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan ekstrak metanol kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dan sampel bakteri uji yang digunakan dalam penelitian adalah *Salmonella Typhi* yang didapat dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.3 Pengulangan

Jumlah pengulangan yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan rumus (Solimun, 2001) :

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

Keterangan

p = jumlah perlakuan yang dilakukan
n = jumlah pengulangan tiap perlakuan

Dalam penelitian ini digunakan 7 macam perlakuan yaitu kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* swingle) konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, kontrol negatif berupa bakteri *Salmonella* Typhi yang diberi akuades dan antibiotik penicilin sebagai kontrol positif, maka :

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

$$7(n-1) \geq 15$$

$$7n - 7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 3.14 \text{ (dibulatkan menjadi 4)}$$

Jumlah perlakuan ulang (n) yang digunakan dalam penelitian ini adalah 3.14 yang kemudian dibulatkan menjadi 4 kali pengulangan

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak metanol kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, kontrol negatif berupa bakteri *Salmonella* Typhi yang diberi akuades dan antibiotik penicilin sebagai kontrol positif.

4.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah diameter zona inhibisi yang terbentuk di sekitar lubang sumuran

4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada tahun 2017. Bahan dan tempat ekstraksi ekstrak metanol kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) diperoleh di UPT Materia Medika Kota Batu.

4.6 Definisi Operasional

4.6.1 kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan di UPT Materia Medika Kota Batu.

4.6.2 Ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) menggunakan pelarut metanol yang diproses dengan ekstraksi menggunakan metode maserasi.

4.6.3 Bakteri *Salmonella* Typhi yang digunakan dalam penelitian berasal dari stock culture Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

4.6.4 Kelompok kontrol negatif bakteri adalah dengan perlakuan akuades.

4.6.5 Kelompok perlakuan adalah kelompok dengan perlakuan ekstrak metanol kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%.

4.6.6 Kelompok kontrol positif adalah kelompok dengan perlakuan antimikroba Penisilin yang merupakan antimikroba yang terbukti efektif terhadap bakteri *Salmonella* Typhi.

4.6.7 Zona inhibisi adalah zona bening yang terbentuk di sekitar lubang sumuran dan menunjukkan bahan antimikroba dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Semakin lebar zona inhibisi maka semakin rentan bakteri tersebut terhadap ekstrak metanol kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*). Diameter zona inhibisi di ukur dalam satuan milimeter (mm).

4.7. Alat dan Bahan Penelitian

4.7.1 Alat dan Bahan untuk Pembuatan ekstrak metanol kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*)

1. Alat

- a. Oven
- b. Timbangan
- c. Gelas erlenmeyer
- d. Kertas saring
- e. *Rotatory evaporator*
- f. Labu penampung metanol
- g. Labu evaporator
- h. Selang *water pump*
- i. *Water pump*
- j. *Water bath*
- k. *Vacuum pump*

2. Bahan

a. ekstrak metanol kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*)

b. Aquades

4.7.2 Alat dan Bahan untuk Metode Sumuran

1. Alat

a. Cawan petri

b. Pelubang sumuran

c. Pipet mikro

d. Incubator

e. Bunsen burner

f. Korek api

g. Penggaris

h. Jangka sorong

2. Bahan

a. ekstrak metanol kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*)

b. Suspensi bakteri *Salmonella* Typhi 10^8 CFU/ml

c. Aquades

d. Selective Blood agar medium

4.8 Prosedur penelitian

4.8.1 Identifikasi Bakteri

4.8.1.1 Pewarnaan Gram (Brooks et al., 2013)

Pewarnaan Gram bertujuan untuk mengetahui *Salmonella Typhi* termasuk bakteri Gram positif atau Gram negative. Prosedur pewarnaan Gram, sebagai berikut.

1. Gelas obyek dibersihkan dengan kapas steril, kemudian dilewatkan di atas api lalu dibiarkan dingin.
2. Satu tetes akuades steril ditetaskan pada gelas obyek.
3. Dengan ose jarum yang steril, diambil sedikit bakteri *Salmonella Typhi* yang tumbuh pada medium padat kemudian disuspensikan dengan satu tetes akuades steril yang sudah ditetaskan terlebih dulu pada gelas obyek. Hapusan sebaiknya dibuat tipis.
4. Hapusan dibiarkan kering di udara. Setelah kering hapusan difiksasi dengan cara melewatkan sediaan sebanyak tiga sampai lima kali di atas api. Sediaan siap diwarnai.
5. Sediaan ditetesi dengan kristal violet dan ditunggu selama satu menit. Kemudian sisa kristal violet dibuang dan dibilas dengan air mengalir perlahan-lahan.
6. Sediaan dituangi dengan lugol dan ditunggu selama satu menit setelah itu sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air mengalir perlahan-lahan.
7. Sediaan dituangi dengan alkohol 96% dan ditunggu 5-10 detik, kemudian sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air mengalir perlahan-lahan.

8. Sediaan dituangi safranin dan ditunggu selama 30 detik, kemudian sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air.

9. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap, ditetesi minyak imersi lalu dilihat di bawah mikroskop dengan lensa objektif pembesaran 97-100x.

10. Bakteri *Salmonella Typhi* yang teramati di bawah mikroskop berupa bakteri berbentuk batang dan bewarna merah.

4.8.1.2 Kultur pada Medium BSA (*Bismuth Sulfite Agar*)

Penamaan bakteri pada *Bismuth Sulfite Agar* (BSA) merupakan media selektif terhadap pertumbuhan *S. Typhi*. Penamaan 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) Dilakukan inokulasi pada bakteri *S. Typhi* dengan metode streaking pada medium Bismuth Sulfite Agar (BSA).
- 2) Sediaan di inkubasi pada inkubator dengan suhu 37°C selama 18-24 jam dan diamati hasilnya.
- 3) Koloni bakteri *S. Typhi* pada medium BSA menghasilkan gambar *black jet colony* (koloni berwarna hitam).

4.8.1.3 Uji Identifikasi Bakteri dengan *Microbact 12*

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 (oxoid, 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 \pm 4 tetes suspensi bakteri ke dalam masing-masing lubang plate.
5. Memasukan \pm 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.

1. Hasil uji *Microbact* dapat diinterpretasikan menggunakan program tertentu yang telah disertakan dalam paket *Microbact*. Pada tes ini, S.Typhi akan memberikan hasil positif pada lysin, ornitin, glukosa, H₂S, manitol, xylose, dan citrat. Test *microbact* 12A memberikan hasil negatif pada ONPG, indole, urease, voges-proskauer serta TDA.

4.8.1.4 Pembuatan Pembenuhan Cair Bakteri Kepadatan 10⁸ CFU/ml

Pembuatan suspensi uji *Salmonella* Typhi (10^8 CFU/ml) adalah sebagai berikut:

1. Beberapa koloni bakteri *Salmonella* Typhi diambil dari lempeng *Selective Blood agar medium* kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril yang berisi *Nutrient Broth*.
2. Tabung reaksi lalu diinkubasikan dalam incubator pada suhu 37° selama 18-24 jam.
3. Dilakukan spektrofotometri dengan panjang gelombang 625 nm untuk mengetahui OD (*Optical Density*) dari suspensi.
4. Untuk mendapatkan konsentrasi bakteri sebesar 10^8 CFU/ml (sesuai standar McFarland 0.5) yang setara dengan OD=0.1 maka dilakukan perhitungan sebagai berikut :

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

Keterangan :

N_1 = Nilai absorbs suspensi (hasil spektrofotometri)

V_1 = Volume bakteri yang akan ditambah pengencer

N_2 = *Optical Density* (0,1 setara 10^8 CFU/ml)

V_2 = volume suspensi bakteri uji (10ml)

Dari hasil perhitungan maka diperoleh volume bakteri (ml) yang akan ditambah pengencer untuk mendapatkan konsentrasi 10^8 CFU/ml sebanyak 10 ml

4.8.2 Pembuatan ekstrak metanol kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*)

Pembuatan ekstrak metanol kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dalam beberapa tahap seperti berikut. Ekstrak kulit jeruk nipis *Citrus aurantifolia* diperoleh dengan metode maserasi. Kulit jeruk nipis dipanaskan dengan suhu 80C dan dibiarkan selama semalam agar kandungan airnya berkurang (Yuliani dan Astuhu, 2012). Setelah itu, kulit jeruk nipis dihaluskan dengan blender, sehingga bentuknya menjadi bubuk yang homogen (Azwanida, 2015). Seringkali maserasi dikombinasikan dengan digesti dan refluk selama 1-2 jam dengan suhu 40-60^o C untuk meningkatkan efisiensi penyaringan. Ekstraksi biasanya dilakukan 2-3 kali atau sampai material tidak mengandung senyawa terlarut lagi. Hal tersebut dicek dengan KLT dan lampu UV 254/366 nm (Saifudin, 2014).

4.8.3 Uji Sensitivitas Antimikroba

Dalam menguji sensitivitas antimikroba ekstrak metanol kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap *Salmonella* Typhi digunakan konsentrasi 6.25%, 12.5%, 25%, 50%, dan 100%. Di tambah akuades sebagai kontrol negatif dan antibiotik penisilin sebagai control positif. Uji aktivitas antibakteri ekstrak metanol kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) menggunakan metode difusi sumuran adalah sebagai berikut.

- a. Alat dan bahan disiapkan. Cawan petri sebanyak tujuh buah dengan rincian, satu untuk kontrol negatif (-), satu untuk kontrol positif (+) dan lima cawan petri lainnya diberikan tanda untuk mengetahui konsentrasi ekstrak-ekstrak metanol kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) yang akan dimasukkan.

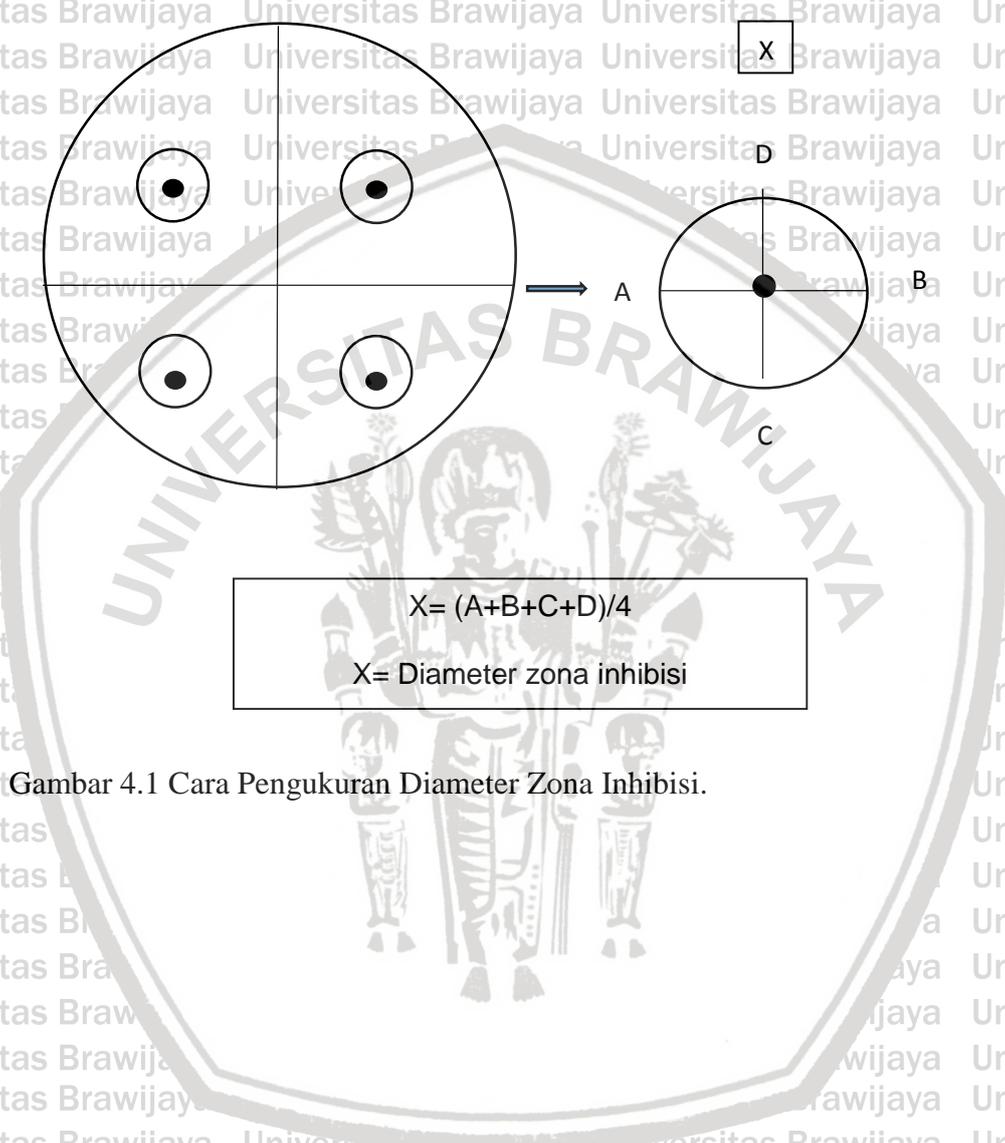
- b. Suspensi bakteri *Salmonella* Typhi 10^8 CFU/ml dicampurkan dengan agar selected blood agar sebanyak 15 ml dalam cawan petri.
- c. Cawan petri digoyang-goyangkan sehingga campuran tercampur dengan baik, lalu diamkan beberapa saat hingga mengeras.
- d. Campuran selected blood agar dan suspensi bakteri *Salmonella* Typhi 10^8 CFU/ml dibagi empat dengan menggunakan penggaris.
- e. Lubang sumuran dibuat pada keempat sisi campuran selected blood agar dan suspense bakteri *Salmonella* Typhi 10^8 CFU/ml yang telah di bagi sebelumnya, dengan menggunakan pelubang sumuran
- f. Cawan petri pertama berisi 40 μ l akuades sebagai kontrol negatif, cawan petri kedua sampai ke enam berisi 40 μ l larutan ekstrak-ekstrak metanol kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dengan konsentrasi 6.25%, 12,5%, 25%, 50%, dan 100%. Dan cawan petri ketujuh berisi 40 μ l penisilin sebagai kontrol positif.
- g. Cawan petri dimasukkan ke dalam incubator selama 18-24 jam dengan suhu 37°C.
- h. Mengukur diameter zona inhibisi yang terbentuk di sekitar lubang sumuran dengan menggunakan jangka sorong dalam satuan milimeter (mm)

4.8.4 Pengamatan dan Pengukuran

Zona inhibisi yang dihasilkan mempunyai bentuk lingkaran dan diukur menggunakan jangka sorong dengan ketelitian 0,05 satuan milimeter (mm).

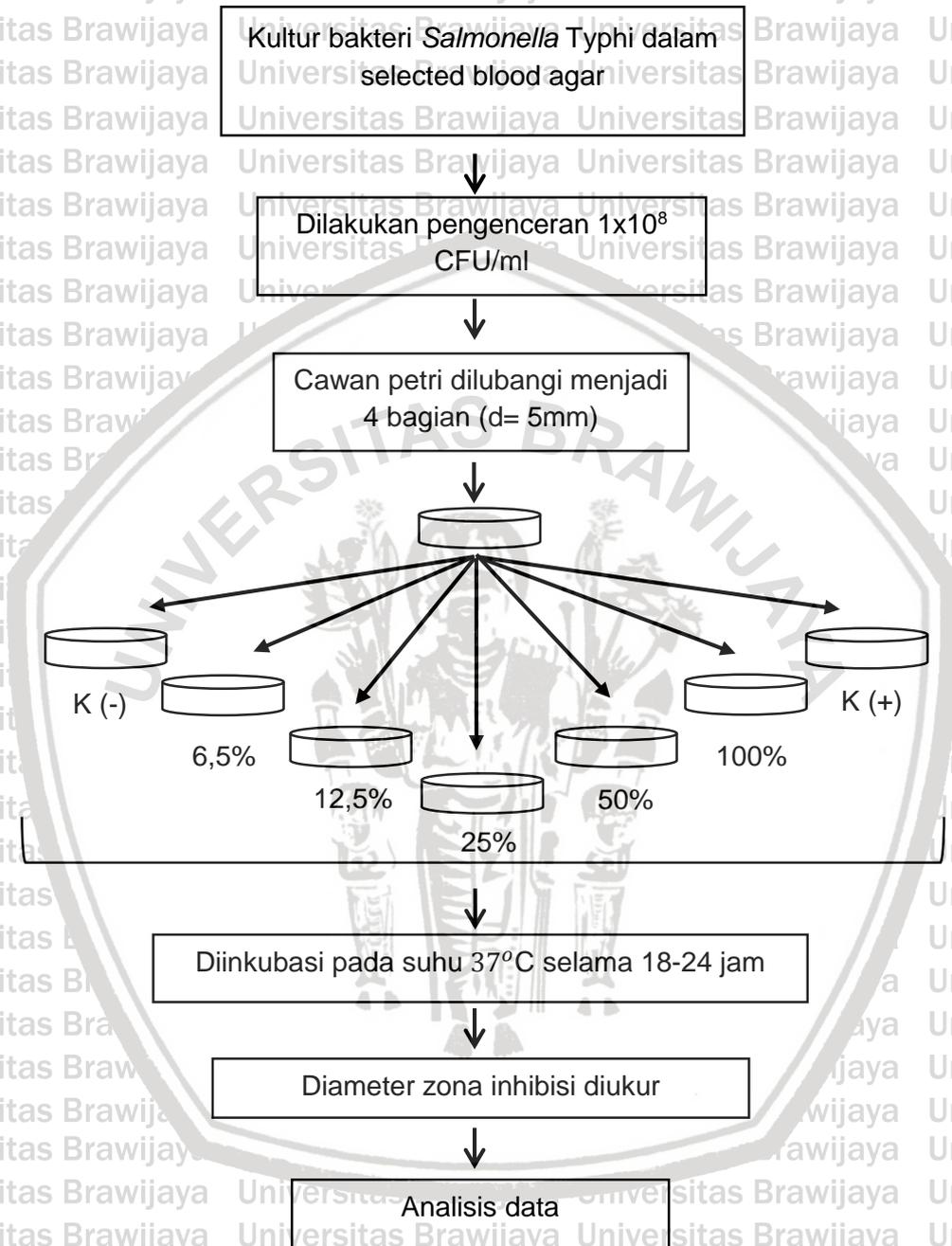
Pengukuran diameter zona inhibisi dilakukan sebanyak 4 kali (arah vertikal,

horizontal dan dua arah diagonal) dan dihitung rata-ratanya. Diameter diukur dari batas terluar dari zona inhibisi dari satu sisi ke sisi lainnya.



Gambar 4.1 Cara Pengukuran Diameter Zona Inhibisi.

4.8.5 Skema Prosedur Penelitian



Gambar 4.2 Skema alur uji antimikroba ekstrak ekstrak metanol kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap *Salmonella Typhi*.

4.9 Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) untuk windows versi 17 (Dahlan, 2008).

Adapun langkah-langkah pengujian sebagai berikut.

1. Uji normalitas data dengan menggunakan *Kolmogorov Smirnov test*

untuk menguji apakah data tersebar normal (parametrik) atau tidak tersebar normal (non parametrik).

2. Uji komparasi dilakukan dengan cara *One-Way ANOVA* > 2 kelompok

untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian ekstrak-ekstrak metanol

kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap pertumbuhan

Salmonella Typhi, dengan syarat:

- a. Sebaran data harus normal
- b. Varian data harus sama (homogen)

Kemudian dilanjutkan dengan uji post hoc menggunakan tukey.

Namun jika data tidak homogen atau tidak tersebar normal, maka

digunakan metode *Kruskal Wallis* untuk mengetahui perbedaan

ukuran zona inhibisi yang terbentuk di sekitar lubang sumuran pada

setiap perlakuan yang disebabkan oleh pemberian ekstrak ekstrak

metanol kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*), dan dilakukan uji post

hoc menggunakan uji *mann whitney test*.

3. Uji Korelasi dilakukan untuk mengetahui hubungan antara variable

dependen dan variable independen. Jika data parametrik maka

digunakan Uji Korelasi *Pearson*, sedangkan data non parametrik akan

diuji dengan Uji Korelasi *Spearman*. Uji korelasi dilakukan untuk mengetahui hubungan konsentrasi pemberian ekstrak ekstrak metanol kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) dan efeknya.



BAB 7 PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan, maka dapat diambil kesimpulan bahwa:

Ekstrak kulit buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terbukti mempunyai efek antimikroba terhadap bakteri *Salmonella Typhi* secara *in vitro*.

7.2 Saran

Saran yang dapat diberikan untuk penelitian selanjutnya adalah:

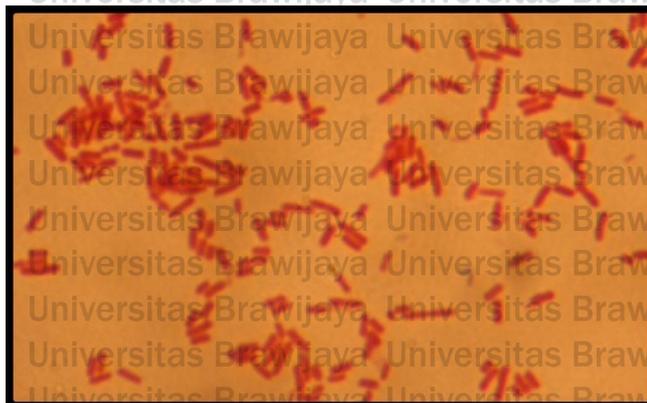
- a. Diharapkan dapat dilakukan penelitian lain mengenai efek antimikroba ekstrak kulit buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) pada bakteri lain, jamur, ataupun virus.
- b. Diperlukan uji mengenai efek toksik dan efek samping ekstrak kulit buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) agar nantinya dapat diaplikasikan secara klinis sebagai obat pada manusia.

BAB 5**HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA****5.1 Hasil Penelitian****5.1.1 Hasil Identifikasi *Salmonella* 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
- Kultur pada Medium Bismuth Sulfite Agar (BSA)
- Kultur pada Medium MacConkey
- Tes Microbact 12

Tahap pertama adalah Pewarnaan Gram. Dari Pewarnaan 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 test Microbact 12A. Pada tes ini, S.Typhi memberikan hasil positif pada lysin, ornitin, glukosa, H_2S , manitol, xylose, urease, dan citrat.

Test microbact 12A memberikan hasil negatif pada ONPG, indole, voges-proskauer serta TDA (Gambar 5.4).

5.1.1.2 Hasil Ekstrak Kulit Buah Jeruk Nipis



Gambar 5.4 Ekstrak Kulit Buah Jeruk Nipis

Ekstrak kulit buah jeruk nipis dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya sebanyak 100 gram menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Gambar 5.4 diatas menunjukkan bahwa ekstrak kulit buah jeruk nipis berwarna hitam dan keruh dengan konsistensi kental.

5.1.1.3 Hasil Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan dilakukan untuk mengetahui konsentrasi ekstrak kulit buah jeruk nipis yang akan digunakan pada penelitian difusi sumuran yaitu 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, dan 3,125%. Daya antimikroba ditandai adanya zona hambat pertumbuhan bakteri di sekeliling sumuran. Penelitian pendahuluan menghasilkan zona hambat di konsentrasi 100% dan 50%. Hasil ini dapat dapat diamati pada gambar 5.6. Selanjutnya untuk penelitian inti digunakan konsentrasi ekstrak kulit jeruk nipis 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, dan 50%.

5.1.1.4 Hasil Difusi Sumuran

Penentuan zona hambat menggunakan difusi sumuran pada penelitian

ini dilakukan dengan mengamati terbentuknya zona hambat pertumbuhan bakteri yang ada disekeliling sumuran. Zona hambat yang dihasilkan mempunyai bentuk

lingkaran dan diukur menggunakan jangka sorong dengan ketelitian 0,1 mm.

Konsentrasi ekstrak kulit buah jeruk nipis yang digunakan adalah 100%, 90%,

80%, 70%, 60%, 50%, dan 0%. Hasil difusi sumuran dapat diamati pada Gambar

5.7.



Gambar 5.5 Hasil Penelitian Pendahuluan Menggunakan Metode Difusi Sumuran

Keterangan: tanda panah menunjukkan lebar zona hambatan

Keterangan gambar 5.6 :

1. : Konsentrasi ekstrak kulit jeruk nipis 100% dengan rerata zona hambat 17.3 mm
2. : Konsentrasi ekstrak kulit jeruk nipis 50% dengan rerata zona hambat 14.5 mm
3. : Konsentrasi ekstrak kulit jeruk nipis 25% dengan rerata zona hambat 10 mm
4. : Konsentrasi ekstrak kulit jeruk nipis 12.5% dengan rerata zona hambat 4 mm
5. : Konsentrasi ekstrak kulit jeruk nipis 6.25% dengan rerata zona hambat 2 mm
6. : Konsentrasi ekstrak kulit jeruk nipis 3.125% dengan rerata zona hambat 0 mm
- K : Konsentrasi ekstrak kulit jeruk nipis 0% dengan rerata zona hambat 0 mm



Gambar 5.6 Hasil Difusi Sumuran Konsentrasi Ekstrak Kulit Jeruk Nipis 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50% dan 0% .

Keterangan Gambar

- 1. : Konsentrasi ekstrak jeruk nipis 100% dengan rerata zona hambat 16.72 mm
- 2. : Konsentrasi ekstrak jeruk nipis 90% dengan rerata zona hambat 16.39 mm
- 3. : Konsentrasi ekstrak jeruk nipis 80% dengan rerata zona hambat 15.10 mm
- 4. : Konsentrasi ekstrak jeruk nipis 70% dengan rerata zona hambat 14.85 mm
- 5. : Konsentrasi ekstrak jeruk nipis 60% dengan rerata zona hambat 14.55 mm
- 6. : Konsentrasi ekstrak jeruk nipis 50% dengan rerata zona hambat 13.81 mm

K : Konsentrasi ekstrak etanol akar gantung beringin 0% dengan rerata zona hambat 0 mm

A : Pengulangan Uji Difusi Sumuran I

B : Pengulangan Uji Difusi Sumuran II

C : Pengulangan Uji Difusi Sumuran III

D : Pengulangan Uji Difusi Sumuran IV

Gambar 5.6 menunjukkan adanya variasi ukuran diameter besar zona hambat pertumbuhan bakteri setelah diinkubasi selama 18-24 jam. Secara

umum, terlihat bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak kulit jeruk nipis maka semakin besar zona hambat yang terbentuk.

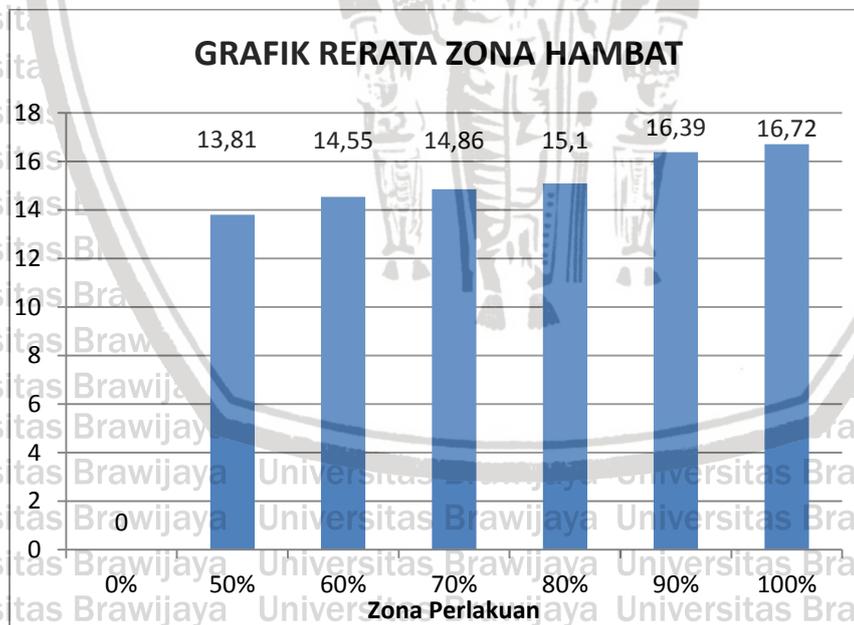
5.1.1.5 Hasil Pengukuran Diameter Zona Hambat Pertumbuhan Bakteri

Penelitian ini dilakukan dengan berbagai macam konsentrasi ekstrak kulit jeruk nipis konsentrasi yang digunakan adalah 100%,90%,80%,70%,60%,50%,dan 0%. Penentuan pemberian ekstrak kulit buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap pertumbuhan bakteri *Salmonella Typhi* dilakukan dengan metode difusi sumuran dengan menggunakan *brain heart infusion agar*, diberi lubang yang ditetesi dengan ekstrak kulit buah jeruk nipis dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C. Perbedaan daya antimikroba ditentukan dengan besar diameter zona hambat pertumbuhan bakteri yang terbentuk pada *brain heart infusion agar* yang telah dicampur dengan isolat bakteri *Salmonella Typhi*.

Zona hambat yang terbentuk pada masing-masing konsentrasi memiliki rata-rata diameter yang berbeda-beda. Semakin besar diameter zona hambat yang terbentuk, maka semakin besar daya antimikrobanya. Berdasarkan hasil uji difusi sumuran dapat diukur diameter zona hambat pertumbuhan bakteri dan dapat ditentukan besar zona hambat pada masing-masing konsentrasi ekstrak kulit buah jeruk nipis terhadap pertumbuhan bakteri *Salmonella Typhi*. Hasil perhitungan zona hambat ekstrak kulit buah jeruk nipis disajikan dalam Tabel 5.1.

Tabel 5.1 Rata-Rata Pertumbuhan Bakteri *Salmonella* Typhi

Konsentrasi (%)	Zona Hambatan Ekstrak Kulit Buah Jeruk Nipis				Rerata (mm)
	I (mm)	II (mm)	III (mm)	IV (mm)	
0%	0	0	0	0	0
50%	13.7	13.975	13.8	13.775	13.81
60%	14.4	14.375	14.725	14.7	14.55
70%	14.1	15.2	14.9	15.22	14.86
80%	14.85	14.65	15.3	15.6	15.10
90%	16.125	16.6	16.35	16.47	16.39
100%	16.25	16.1	16.975	17.55	16.72

Tabel 5.2 Grafik Rerata Diameter Zona Hambat Pertumbuhan Bakteri *Salmonella* Typhi pada Ekstrak Kulit Buah Jeruk nipis

Berdasarkan Tabel 5.2 dan Gambar 5.8 di atas dapat dilihat adanya

perbedaan rerata diameter zona hambatan yang menunjukkan adanya perbedaan

daya antimikroba masing-masing perlakuan. Kelompok kontrol akuades tidak menunjukkan adanya daya antimikroba. Kelompok perlakuan 100% menunjukkan zona hambatan yang terbesar dengan rerata 16,72 mm. Ekstrak kulit jeruk nipis dengan konsentrasi 50%, 60%, 70%, 80%, 90% dan 100% menghasilkan zona hambatan yang menunjukkan bahwa ekstrak kulit buah jeruk nipis dengan konsentrasi tersebut memiliki daya antimikroba untuk menghambat pertumbuhan *Salmonella Typhi*.

5.2 Analisis Data

Pada penelitian ini, pemberian ekstrak kulit buah jeruk nipis pada media BHIA adalah variabel bebas, sedangkan diameter zona hambat yang terbentuk disekitar lubang sumuran adalah variabel tergantung. Uji hipotesis komparatif dan uji hipotesis korelatif yang digunakan dalam menganalisis data pada penelitian ini. Uji hipotesis komparatif dipilih untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan zona hambat yang terbentuk disekitar lubang sumuran yang diberi beberapa konsentrasi ekstrak kulit jeruk nipis dibandingkan dengan yang tidak diberi ekstrak. Uji komparatif yang digunakan untuk mengetahui perbedaan rata-rata data lebih dari dua kelompok adalah *One-Way ANOVA*. Syarat uji *One-Way ANOVA* adalah sebaran data sampel harus normal dan varian data harus homogen atau sama.

Langkah pertama dalam menganalisis data adalah melakukan uji normalitas *Kolmogorov-Smirnov Test* dan uji homogenitas *Levene Test Homogeneity of Variance*. Tujuan dari uji normalitas adalah untuk melihat apakah data sampel penelitian terdistribusi normal atau tidak terdistribusi normal. Hasil uji normalitas didapatkan nilai signifikansi 0.084 ($p > 0.05$) yang berarti bahwa data tersebut normal. Lalu, uji homogenitas dilakukan untuk melihat apakah kelompok data sampel berasal dari populasi dengan varian sama atau tidak. Hasil uji

homogenitas didapatkan nilai signifikansi 4.085 ($p < 0,05$) yang berarti bahwa variasi tiap sampel tidak homogen atau tidak sama. Karena kedua syarat uji *One-Way ANOVA* tidak dapat terpenuhi, uji komparasi dilakukan dengan metode non parametrik *Kruskal Wallis*. Uji hipotesis korelatif yang digunakan untuk data ini adalah uji *Spearman*.

5.2.1 Uji Asumsi Data

5.2.1.1 Uji *Kruskal Wallis*

Uji non-parametrik *Kruskal Wallis* dilakukan untuk membandingkan beberapa kelompok variabel tidak terikat (konsentrasi ekstrak) dan mengetahui apakah ada perbedaan yang bermakna antar perlakuan konsentrasi ekstrak kulit buah jeruk nipis yang satu dengan yang lain (Mehotcheva, 2008). Hasil uji *Kruskal Wallis* dapat dilihat pada Tabel 5.2

Tabel 5.3 Uji *Kruskal Wallis*

<i>Kruskal Wallis</i>	
Chi-Square	20.050
Probabilitas	0.001

Hasil uji *Kruskal Wallis* didapatkan nilai signifikansi sebesar $< 0,05$ yang menunjukkan bahwa pada setiap pemberian konsentrasi ekstrak kulit buah jeruk nipis terdapat perbedaan efek yang bermakna terhadap diameter zona hambat yang terbentuk. Hal ini berarti efek penambahan konsentrasi ekstrak berpengaruh secara signifikan terhadap pertumbuhan bakteri *Salmonella Typhi*.

5.2.1.2 Uji *Mann Whitney*

Uji *Mann-Whitney* digunakan untuk mengetahui perbedaan median dua

kelompok bebas yang dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak kulit jeruk nipis. Pada uji ini kita dapat mengetahui apakah perbedaan antar konsentrasi ekstrak kulit jeruk nipis memberikan pengaruh yang bermakna atau tidak.

Tabel 5.4 Uji *Mann-Whitney*

	50%	60%	70%	80%	90%	100%
50%	-	0.021	0.021	0.021	0.021	0.021
60%	0.021*	-	0.083	0.083	0.021	0.021
70%	0.021*	0.248	-	0.564	0.021	0.021
80%	0.021*	0.083	0.564	-	0.021	0.021
90%	0.021*	0.025	0.025	0.021	-	0.773
100%	0.021*	0.025	0.025	0.021	0.773	-

Keterangan:

* = Berbeda signifikan ($P < 0,05$)

□ = Berbeda tidak signifikan ($P > 0,05$)

Hasil dari uji *Mann-Whitney* menunjukkan bahwa antara konsentrasi satu dengan yang lain tidak memiliki perbedaan yang bermakna kecuali konsentrasi 50% memiliki perbedaan yang bermakna.

5.2.1.3 Uji Korelasi *Spearman*

Selanjutnya, dilakukan uji korelasi *Spearman* untuk mengetahui keeratan hubungan antara konsentrasi pemberian ekstrak kulit buah jeruk nipis dengan diameter zona hambat yang terbentuk. Hasil uji korelasi *Spearman* (Tabel 5.4) menunjukkan nilai signifikansi antara kedua variabel tersebut adalah 0,000 ($p < 0,05$). Hal tersebut menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang bermakna antara pemberian ekstrak dengan diameter zona hambat. Besar koefisien korelasi adalah 0.925 yang berarti bahwa hubungan korelasi kuat. Tanda positif (searah)

koefisien menunjukkan hubungan berbanding lurus, yaitu semakin tinggi konsentrasi ekstrak yang diberikan maka semakin besar diameter zona hambat yang terbentuk dan sebaliknya.

Tabel 5.5 Korelasi Konsentrasi dan Diameter Zona Hambat

Parameter	Parameter	Korelasi	P-value
Konsentrasi	Diameter Zona Hambat	0.925	0.000



BAB 6
PEMBAHASAN

6.1 Hasil Identifikasi

Tujuan dilakukannya penelitian eksperimental ini adalah untuk mengetahui adanya efek antimikroba ekstrak kulit buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap bakteri *Salmonella typhi* secara *in vitro*. Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode difusi sumuran. Metode tersebut digunakan untuk dapat menentukan pada konsentrasi berapa ekstrak kulit buah jeruk nipis dapat menghambat pertumbuhan *Salmonella typhi*. Hal tersebut dilakukan dengan cara mengukur zona hambat yang terbentuk di sekitar lubang sumuran dengan menggunakan jangka sorong. Zona hambat yang terlihat bening tersebut menunjukkan adanya penghambatan pertumbuhan bakteri uji.

Salmonella typhi yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Sebelum bakteri ini digunakan untuk penelitian, dilakukan beberapa uji identifikasi terlebih dahulu untuk memastikan kemurnian bakteri *Salmonella typhi* yang akan digunakan dalam penelitian. Identifikasi tersebut meliputi pewarnaan Gram, kultur dengan medium BSA, dan indentifikasi dengan Microbat 12.

Hasil identifikasi secara pengecatan Gram didapatkan gambaran bakteri berbentuk bulat berantai berwarna merah yang artinya bakteri ini merupakan bakteri Gram negatif. Penamaan bakteri pada media BSA didapatkan gambaran *Black Jet Colony* yang merupakan gambaran khas dari *S. Thyphi*. Penamaan bakteri pada

media tersebut didapatkan gambaran *Black Jet Colony* yang merupakan gambaran khas dari *S. Typhi*. Hasil uji *Microbact* dapat diinterpretasikan menggunakan program tertentu yang telah disertakan dalam paket *Microbact*. Pada tes ini, *S. Typhi* akan memberikan hasil positif pada lysin, ornitin, glukosa, H₂S, manitol, xylose, dan citrat. Test *microbact* 12A memberikan hasil negatif pada ONPG, indole, urease, voges-proskauer serta TDA.

6.2 Ekstrak Kulit Buah Jeruk Nipis

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah kulit buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*). Ekstrak kulit buah jeruk nipis dibuat dengan cara mengekstrak kulit buah jeruk nipis dengan metode maserasi menggunakan etanol 96% sebagai pelarutnya. Metode maserasi dipilih karena menghindari terjadinya kerusakan komponen pada ekstrak yang tidak tahan terhadap panas, prosesnya yang mudah, relatif murah. Etanol dipilih karena bersifat semipolar sehingga dapat melarutkan zat kimia yang bersifat polar maupun non polar (Haditomo, 2010). Pelarut etanol 96% digunakan untuk melarutkan saponin, tannin, alkaloid, flavanoid, polifenol dan tidak mempunyai efek sebagai antimikroba. Hasil ekstrak yang diperoleh yaitu cairan pekat 50 ml berwarna hijau tua, mengandung endapan kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*). Ekstrak etanol kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) yang didapatkan adalah 100% bersifat keruh terhadap endapan, kemudian untuk memisahkan cairan dan endapannya dilakukan proses sentrifugasi dengan kecepatan 1000 rpm selama 15 menit. Setelah dilakukan proses sentrifugasi, ekstrak yang didapatkan tetap keruh dan masih terdapat endapan sehingga tidak bisa dilakukan penelitian dengan metode dilusi tabung, karena itu peneliti menggunakan metode difusi sumuran untuk

membuktikan bahwa ekstrak kulit jeruk (*Citrus aurantifolia*) dapat menghambat pertumbuhan koloni bakteri *Salmonella typhi*. Kulit buah jeruk nipis ini didapatkan di Matreia Medika Batu, sedangkan proses pengekstraksinya dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Banyaknya bubuk kulit jeruk nipis yang digunakan adalah 100 gram. Ekstrak kulit jeruk nipis sendiri memiliki bahan aktif seperti alkaloid, saponin, tannin, polifenol dan flavonoid yang dapat digunakan sebagai antimikroba (Nogota, et al.,2006).

Bahan aktif dalam ekstrak kulit buah jeruk nipis seperti alkaloid, tannin, flavonoid, dan saponin memiliki efek antimikroba yang berperan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi*. Alkaloid dapat menurunkan sintesis asam nukleat bakteri dengan menghambat enzim topoisomerase I dan II selain itu alkaloid juga bisa memiliki kemampuan untuk mengganggu regulasi gen dan mengganggu fimbriae dan adhesin bakteri sehingga dapat membunuh bakteri (Cushine, et al., 2014). Tannin sebagai antimikroba bekerja dengan melarutkan lapisan lipid dinding bakteri sehingga menyebabkan kebocoran sel dan bakteri menjadi hancur selain itu, tannin juga merubah susunan hidrogen dan membentuk kompleks dengan nitrogen dari asam amino pada sel bakteri sehingga menyebabkan kebocoran sel dan mati (Al-Ani, et al., 2008). Aktivitas antimikroba saponin berhubungan dengan kemampuannya merubah fungsi glikoprotein membran plasma dan membentuk kompleks saponin-kolestrol sehingga mengganggu organisasi membran fosfolipid dan menyebabkan bakteri lisis (Hassan, 2008). Flavonoid bekerja dengan menghambat enzim DNA girase, fungsi membran sitoplasmik, dan metabolisme energi sehingga bakteri kehilangan fungsi vitalnya dan mati (Cushnie and Lamb,

2005). Penelitian sebelumnya telah menganalisis analisis kandungan flavonoid dalam jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) yang dilakukan dengan menggunakan metode HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), menunjukkan bahwa kandungan flavonoid yang terdapat dalam jeruk nipis adalah flavonone glikosida yaitu eriocitrin (49-62 mg L-1), hesperidin (84-196 mg L-1) (Mouly,1994).

Dari penjelasan tersebut dapat disimpulkan bahwa kandungan alkaloid, tannin, flavonoid, polifenol dan saponin yang ada pada ekstrak kulit buah jeruk nipis memiliki efek antimikroba, sehingga kulit jeruk nipis dapat digunakan sebagai obat yang bersifat antimikroba.

Konsentrasi ekstrak kulit buah jeruk nipis yang digunakan dalam penelitian ini adalah 100 %, 90%, 80%, 70%, 60%, 50% dan 0% sebagai kontrol negatif.

Konsentrasi tersebut ditentukan berdasarkan penelitian pendahuluan yang telah dilakukan.

Langkah penelitian selanjutnya adalah menguji aktivitas antimikroba ekstrak kulit buah jeruk nipis terhadap *Salmonella typhi*. Pengamatan kuantitatif dilakukan dengan menghambat diameter zona hambat yang terbentuk disekitar lubang sumuran yang diberi ekstrak. Pengukuran diameter zona hambat tersebut menggunakan jangka sorong dalam satuan millimeter (mm). Hasil dari uji tersebut menunjukkan bahwa zona hambat terbentuk disekitar lubang sumuran pada konsentrasi 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, dan 50% . Diameter terkecil terbentuk pada konsentrasi 50% sebesar 13,81 mm yang menunjukkan bahwa terjadi penghambatan pertumbuhan bakteri uji.

6.3 Analisis Data

Analisis data pada penelitian ini menggunakan uji *Kolmogrov-Smirnov* untuk mengetahui kenormalan pengaruh ekstrak kulit buah jeruk nipis terhadap pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi*. Dari hasil uji *Kolmogrov-Smirnov* menghasilkan probabilitas $> \alpha$ ($p > 0,05$) sehingga dinyatakan normal. Uji analisis selanjutnya yang digunakan adalah *Levene Test* untuk mengetahui apakah memiliki ragam yang homogen atau tidak, dari hasil *Levene Test* menunjukkan probabilitas $< \alpha$ ($p < 0,05$) dinyatakan tidak memiliki ragam yang homogen.

Setelah dilakukan uji normalitas dan uji homogen dilanjutkan uji *Kruskal Wallis*.

Uji *Kruskal Wallis* untuk mengetahui perbedaan pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi* dengan pemberian berbagai konsentrasi ekstrak kulit buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*). Hasil uji *Kruskal Wallis* didapatkan nilai yang berbeda signifikan sebesar 0,000 ($p < 0,05$) yang menunjukkan bahwa pada setiap pemberian konsentrasi ekstrak kulit buah jeruk nipis terhadap perbedaan efek yang bermakna terhadap diameter zona hambat yang terbentuk. Setelah uji *Kruskal Wallis* yang digunakan adalah uji *Mann whitney* untuk mengetahui apakah perbedaan antar konsentrasi ekstrak kulit buah jeruk nipis memberikan pengaruh yang bermakna atau tidak. Hasil menunjukkan bahwa antara konsentrasi satu dengan yang lain memiliki perbedaan yang tidak bermakna kecuali konsentrasi 50% memiliki pertumbuhan bakteri yang paling rendah dan berbeda signifikan. Setelah dilakukan uji *Mann Whitney* yang digunakan adalah uji Kolerasi *Spearman* untuk mengetahui keeratan hubungan antara konsentrasi pemberian ekstrak kulit buah jeruk nipis dengan diameter zona hambat yang terbentuk. Hasil menunjukkan bahwa terdapat

hubungan yang bermakna yang kuat antara pemberian ekstrak dengan diameter zona hambat. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak yang diberikan maka semakin besar diameter zona hambat yang terbentuk.

Berdasarkan hasil penelitian dan analisis data, disimpulkan bahwa ekstrak kulit buah jeruk nipis memiliki efek antimikroba terhadap *Salmonella typhi* secara *in vitro*. Zona hambat terbentuk di sekitar lubang sumuran pada konsentrasi ekstrak kulit buah jeruk nipis sebesar 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, dan 50%. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak kulit buah jeruk nipis yang digunakan, semakin besar diameter zona hambat yang terbentuk. Efek penambahan konsentrasi ekstrak tersebut berpengaruh secara signifikan terhadap pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi*. Dari penjelasan diatas, maka ekstrak kulit buah jeruk nipis, sesuai dengan hipotesa, dapat digunakan sebagai antimikroba.

Penelitian lainnya mengenai efek antimikroba dari ekstrak kulit buah jeruk nipis pernah dilakukan sebelumnya terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* secara *in vitro* menggunakan metode difusi cakram. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kulit buah jeruk nipis memiliki efek antimikroba pada *Staphylococcus aureus* dengan konsentrasi 30%, 40%, 50%, 60%, dan 70%. Rata-rata zona hambat yang terbentuk pada masing-masing konsentrasi tersebut secara berurutan adalah sebesar 9,25 mm, 13,50 mm, 15,37 mm, 20,00 mm, dan 20,25 mm (Vajriana, 2013).

Selain itu, ekstrak kulit buah jeruk nipis sebagai antimikroba juga pernah diuji dengan bakteri *Escherichia coli* menggunakan metode Kirby-Bauer. Hasil penelitian tersebut menunjukkan ekstrak kulit buah jeruk nipis dapat menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* pada konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100%.

Pada konsentrasi terendah, yaitu 20%, terbentuk zona hambat sebesar 6,95 mm (Sutrisno, 2017).

Ekstrak kulit buah jeruk nipis dengan konsentrasi 50% juga dapat menghambat pertumbuhan jamur *Candida albicans*. Dari hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa ekstrak kulit buah jeruk nipis juga memiliki efek antijamur (Putri, 2014).

Menurut Prakoso, dkk, tingkat sensitivitas ekstrak antimikroba dapat dikategorikan berdasar zona hambat yang terbentuk menjadi kuat, sedang, dan lemah. Suatu antimikroba herbal dikatakan berefek yang kuat bila diameter zona hambat yang terbentuk adalah 10-20 mm, berefek sedang bila diameter 5-10 mm, dan berefek lemah bila diameter <5 mm (Prakoso, dkk, 2016). Rata-rata zona hambat yang terbentuk pada penelitian ini adalah berkisar 13,8 mm sampai dengan 16,7 mm. Ekstrak kulit buah jeruk nipis dengan konsentrasi 100%, 90%, 80%, 70%, 60% memiliki efek antimikroba yang kuat, sedangkan konsentrasi 50% memiliki konsentrasi yang sedang.

6.4 Keterbatasan Penelitian

Penelitian ini masih memiliki beberapa keterbatasan, seperti tidak diketahui secara pasti kandungan dan seberapa banyak bahan aktif yang ada dalam ekstrak kulit buah jeruk nipis. Selain itu, juga tidak diketahui bahan aktif mana yang paling berperan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi*. Serta penelitian metode sumuran ini juga tidak bisa menentukan kadar hambat minimal (KHM) dan kadar bunuh minimal (KBM) dari ekstrak kulit buah jeruk nipis terhadap pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi*.

Pada penelitian ini masih perlu dilakukan uji lebih lanjut untuk meneliti efek toksik, efek samping, farmakodinamik, dan farmakokinetik dari ekstrak kulit buah jeruk nipis agar ekstrak kulit buah jeruk nipis bisa diaplikasikan secara klinis sebagai obat pada manusia.

