

BAB 6

PEMBAHASAN

Isolat yang digunakan dalam penelitian ini berjumlah 4 spesimen dari pasien berbeda yang berasal dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Isolat pertama, kedua, ketiga, dan keempat memiliki nomor registrasi masing-masing yaitu 2103, 20536, 20732, dan 20734. Sebelum menggunakan bakteri uji, dilakukan identifikasi bakteri terlebih dahulu dengan pengecatan Gram, uji katalase, uji koagulase, dan uji fermentasi manitol. Hal ini penting dilakukan untuk memastikan ketepatan jenis bakteri yang diuji yaitu *Staphylococcus aureus*. Dari hasil identifikasi bakteri didapatkan bahwa bakteri *Staphylococcus aureus* secara mikroskopis merupakan bakteri coccus berwarna ungu yang menunjukkan bahwa bakteri tersebut adalah bakteri Gram positif. Uji katalase positif menunjukkan bahwa bakteri yang diuji adalah *Staphylococcus*, bukan *Streptococcus*. Sedangkan uji koagulase positif menunjukkan patogenitas bakteri. Selain itu, bakteri yang diuji menunjukkan fermentasi manitol positif pada *Mannitol Salt Agar* (MSA).

Bahan baku ekstrak berupa buah kawis (*Limonia acidissima*) dilakukan proses pengekstrakan di laboratorium kimia Politeknik Negeri Malang. Hasil ekstrak dari 300 gram serbuk kering buah kawis (*Limonia acidissima*) berupa larutan berwarna coklat sebanyak 20 ml. Metode ekstraksi berupa maserasi menggunakan etanol 96% karena pada studi literatur menunjukkan bahwa

pelarut polar seperti etanol 96% dapat melarutkan zat aktif yang terkandung dalam buah kawis (*Limonia acidissima*) yaitu alkaloid, saponin, flavonoid, dan tanin (Dewi, 2013). Pelarut metanol tidak digunakan sebagai pelarut dalam proses pengekstrakan dikarenakan harganya yang lebih mahal, lebih sulit didapatkan, dan sifat sitotoksiknya dapat menyebabkan hasil yang tidak akurat (Tiwari *et al.*, 2013). Penggunaan etanol 96% sebagai pelarut diperkirakan tidak mempengaruhi hasil ekstrak yang diuji efektivitasnya sebagai antibakteri dikarenakan dalam proses akhir pembuatan ekstrak sudah dilakukan penguapan etanol 96% menggunakan *rotary evaporator* dan pengovenan pada suhu 80% di mana titik didih etanol adalah 78%.

Hasil ekstrak buah kawis (*Limonia acidissima*) berwarna coklat, sehingga sulit untuk menentukan Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM) apabila menggunakan metode dilusi tabung. Oleh karena itu, peneliti menggunakan metode dilusi agar untuk menentukan KHM. Metode dilusi agar dilakukan dengan cara mengamati secara visual pertumbuhan koloni bakteri *Staphylococcus aureus* yang tumbuh pada keenam *petridish*. KHM ditentukan dari *petridish* yang tidak ditumbuhi oleh koloni bakteri *Staphylococcus aureus* (Forbes, 2007).

Berdasarkan studi literatur yang dilakukan sebelum memulai penelitian, diketahui bahwa ekstrak buah kawis (*Limonia acidissima*) mengandung beberapa senyawa antara lain alkaloid, saponin, flavonoid, dan tanin. Keempat senyawa tersebut diketahui memiliki efek antibakteri dengan mekanisme kerja berbeda terhadap struktur bakteri. Dinding sel bakteri dapat dipengaruhi oleh senyawa alkaloid. Sedangkan nukleus dan enzim dipengaruhi oleh adanya senyawa tanin. Namun, secara umum struktur bakteri yang lebih rentan rusak adalah

membran sel karena senyawa saponin, flavonoid, maupun tanin dapat bereaksi terhadap struktur tersebut (Tiwari *et al.*, 2011).

Standarisasi jumlah koloni bakteri yang akan diuji dalam penelitian ini (1×10^6 CFU/ml) dilakukan menggunakan spektrofotometri menggunakan panjang gelombang 625 nm. Hal ini dilakukan dengan alasan bahwa apabila standarisasi dilakukan dengan pengamatan secara visual saja, maka nilai subyektifitasnya menjadi tinggi. Akibatnya, hasil standarisasi bakteri kurang obyektif. Setelah dilakukan standarisasi, jumlah bakteri yang ditetaskan pada *petridish* kontrol maupun *petridish* uji adalah sebanyak 10 μ l (Puspitasari, 2011).

Pada penelitian ini dipilih *Mueller Hinton Agar* (MHA) karena media ini telah direkomendasikan oleh FDA dan WHO untuk digunakan sebagai tes antibakteri terutama bakteri aerob dan bakteri anaerobik fakultatif. MHA yang digunakan sebagai media penelitian ini dalam setiap liter airnya mengandung ekstrak sapi (2 g), asam hidrolisat kasein (17,5 g), pati (1,5 g), dan agar (17 g) (Acumedia, 2011). Setelah proses pemadatan campuran MHA dengan ekstrak dituangkan dalam *petridish* selesai, terbentuk serabut-serabut halus dalam *petridish* yang membuat media tampak tidak homogen. Pembentukan serabut-serabut tersebut sebanding dengan jumlah konsentrasi ekstrak yang digunakan. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak yang digunakan, maka semakin banyak dan tebal serabut-serabut yang terbentuk dalam *petridish*.

Dari studi literatur yang dilakukan sebelum penelitian, didapatkan bahwa komponen lemak yang terkandung dalam ekstrak buah kawis menggunakan metanol dapat dipisahkan menggunakan zat partisi seperti n-heksana. Namun karena dalam proses ekstraksi yang dilakukan dalam penelitian ini tidak dilakukan partisi tersebut pada suhu 95°C selama 60 menit, maka diperkirakan

ekstrak yang dihasilkan masih mengandung lemak. Jadi, diduga ketidakhomogenan tersebut disebabkan karena adanya ikatan antara komponen lemak yang berasal dari ekstrak dengan komponen penyusun MHA. Namun, hal tersebut tidak diketahui secara pasti dikarenakan tidak dilakukan tes penyaring sebelum melakukan penelitian efek antibakteri ekstrak buah kawis (*Limonia acidissima*) ini dikarenakan keterbatasan alat, biaya, dan waktu. Partisi bertujuan untuk memisahkan senyawa yang berbeda kepolarannya. Oleh karena itu, sebaiknya dilakukan partisi menggunakan n-heksana sebelum menguji efek antibakteri ekstrak buah kawis (*Limonia acidissima*) untuk penelitian selanjutnya sehingga komponen lemak terpisah dari ekstrak dan diharapkan dapat menghomogenkan campuran agar dan ekstrak yang dibuat (Dewi, 2013).

Penelitian efek antibakteri ekstrak buah kawis (*Limonia acidissima*) dengan metode dilusi tabung ataupun dilusi agar masih belum pernah dilakukan di Indonesia. Namun demikian, sudah pernah dilakukan penelitian efek antibakteri ekstrak metanol buah kawis (*Limonia acidissima*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* di luar negeri menggunakan metode difusi cakram dengan hasil zona inhibisi sebesar 43 mm (Thomas and Ponnammal, 2005). Selain itu, penelitian yang sama juga dilakukan pada tahun 2012 dengan hasil zona inhibisi 10 mm pada konsentrasi ekstrak 1,25 mg/ml dan KHM sebesar 0,312 mg/ml (Swami *et al.*, 2012). Dari hasil penelitian tersebut dapat diketahui bahwa ekstrak metanol buah kawis (*Limonia acidissima*) memiliki efek antibakteri. Bagian lain tanaman kawis yang telah terbukti sebagai antibakteri adalah kulit kayunya (Rahman and Gray, 2002) dan minyak esensial dari daunnya (Qureshi *et al.*, 2010).

Variabel bebas berupa konsentrasi ekstrak buah kawis (*Limonia acidissima*) yang digunakan diperoleh dari uji eksplorasi. Pada uji eksplorasi awal, digunakan konsentrasi 1% dan 5% \forall_v di mana pada kedua konsentrasi tersebut tidak didapatkan pertumbuhan koloni bakteri *Staphylococcus aureus*. Selanjutnya, pengambilan konsentrasi yang diuji adalah 0,2%; 0,4%; 0,6%; 0,8%; dan 1% \forall_v dengan hasil pada kelima konsentrasi tersebut masih dapat ditumbuhi oleh koloni bakteri uji. Sehingga dilakukan pengujian selanjutnya pada konsentrasi 1%; 1,5%; 2%; 2,5%; dan 3% \forall_v dengan hasil tidak didapatkan pertumbuhan koloni bakteri uji pada konsentrasi ekstrak $\geq 1,5\% \forall_v$. Dari pengujian tersebut, dilakukan pengujian terakhir dengan konsentrasi sebesar 1%; 1,2%; 1,4%; 1,6%; dan 1,8% \forall_v dengan hasil keempat isolat bakteri uji tidak tumbuh pada konsentrasi $\geq 1,6\% \forall_v$. Apabila tidak didapatkan pertumbuhan koloni bakteri *Staphylococcus aureus* pada *petridish*, maka konsentrasi ekstrak buah kawis (*Limonia acidissima*) yang terdapat di dalamnya disebut dengan KHM (Therese *et al.*, 2006). Oleh karena itu, KHM pada penelitian ini adalah 1,6% \forall_v .

Data hasil penelitian dianalisis menggunakan uji *Kruskall-Wallis* dengan hasil H_0 (perlakuan tidak berpengaruh secara signifikan pada hasil) ditolak dan H_1 (perlakuan berpengaruh secara signifikan pada hasil) diterima. Setelah itu, dari hasil uji *Mann-Whitney* didapatkan bahwa terdapat perbedaan signifikan antara pertumbuhan koloni bakteri *Staphylococcus aureus* yang dihasilkan media MHA pada kelompok kontrol kuman (0% konsentrasi ekstrak) terhadap kelompok perlakuan ataupun kelompok perlakuan yang satu dengan kelompok perlakuan lainnya. Selanjutnya, hasil uji korelasi *Spearman* menunjukkan bahwa antara kedua variabel terdapat korelasi bernilai negatif yang artinya bahwa semakin

tinggi konsentrasi ekstrak buah kawis (*Limonia acidissima*) yang digunakan, maka semakin rendah pertumbuhan koloni bakteri *Staphylococcus aureus*.

Hasil dari penelitian ini yaitu ekstrak buah kawis (*Limonia acidissima*) memiliki efek poten sebagai antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*. Namun, penelitian ini masih terbatas pada lingkup *in vitro*, sehingga aplikasi klinis selanjutnya masih memerlukan penelitian lebih lanjut mengenai efeknya melalui studi *in vivo*. Penelitian *in vivo* sendiri bertujuan untuk memperkirakan dosis terapeutik yang efektif, dosis letal, dan dosis toksik, sehingga akan memperkecil risiko penelitian pada manusia secara langsung. Pengujian efek ekstrak ini terhadap manusia sendiri bertujuan untuk memastikan efektivitas ekstrak, tingkat keamanan, dan efek samping yang mungkin timbul dari pemakaian dengan dosis tertentu.

Pada penelitian ini didapatkan beberapa keterbatasan berupa pengukuran pertumbuhan koloni *Staphylococcus aureus* menggunakan sistem skoring yang menunjukkan adanya subyektivitas peneliti, tidak dilakukan studi mengenai jenis dan besarnya kandungan pasti senyawa-senyawa dalam ekstrak buah kawis (*Limonia acidissima*) yang digunakan dalam penelitian menyebabkan dari hasil penelitian tidak dapat disimpulkan mengenai jenis senyawa yang memiliki efek antibakteri paling poten. Selain itu, ekstrak buah kawis yang digunakan dalam uji antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ini telah mengalami penyimpanan dalam kulkas dengan suhu 2°C selama kurang lebih 1 bulan, sehingga aktivitasnya diperkirakan sedikit berkurang apabila dibandingkan dengan ekstrak yang masih baru.