

**UJI EFEKTIVITAS EKSTRAK ETANOL DAUN SIRSAK SEBAGAI
ANTIMIKROBA TERHADAP *Salmonella Typhi***

TUGAS AKHIR

Untuk Memenuhi Syarat

Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran



Oleh:

RIZALDI MAHARDIKA RACHMAN

NIM : 145070107111049

PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER

FAKULTAS KEDOKTERAN

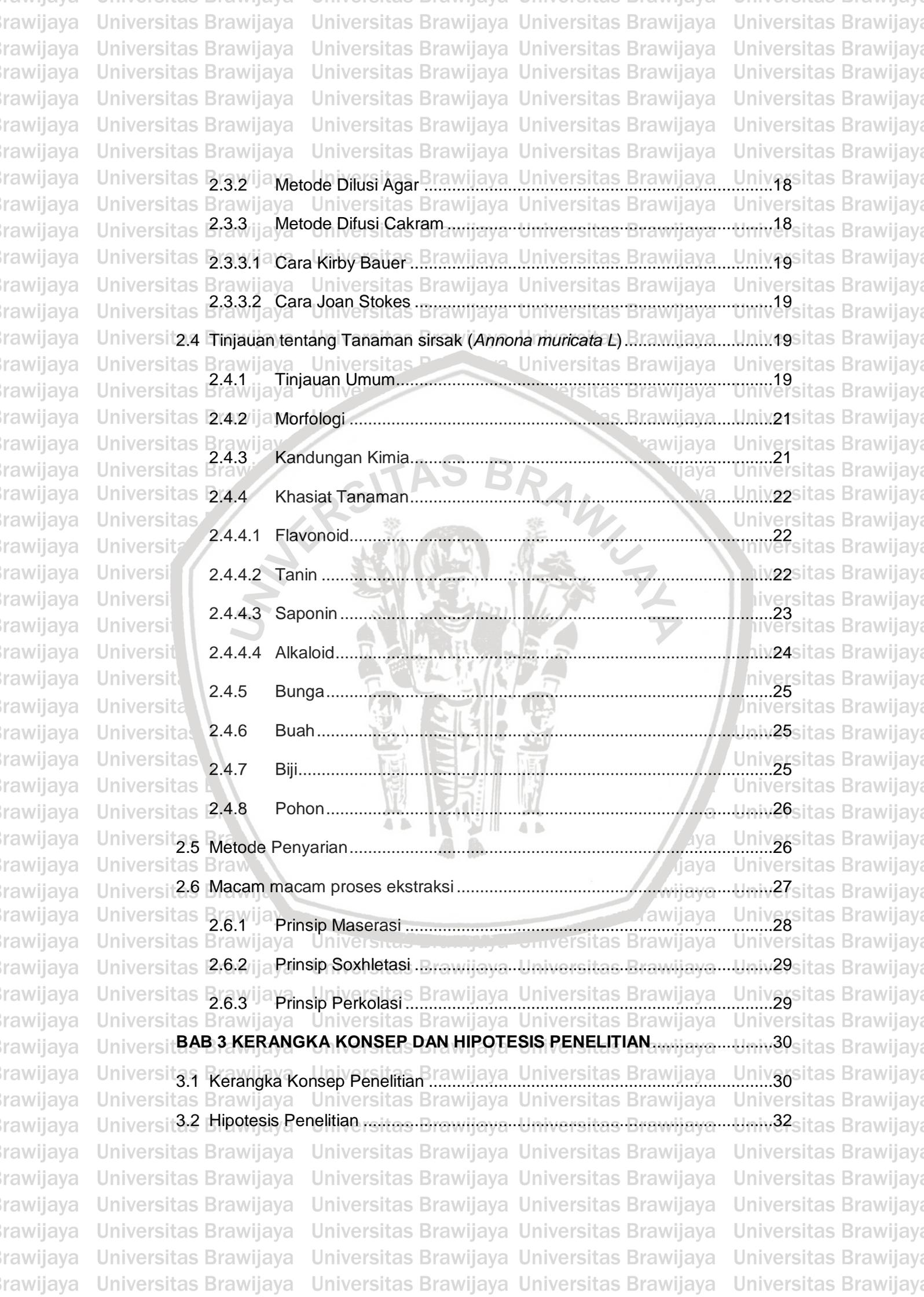
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

2018

DAFTAR ISI

Judul.....	i
Halaman Persetujuan	ii
Pernyataan Keaslian Tulisan	iii
Kata Pengantar	iv
Abstrak	vii
Abstract	viii
Daftar Isi	ix
Daftar Tabel.....	xiv
Daftar Gambar	xv
Daftar Singkatan	xvi
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.3.1 Tujuan Umum	4
1.3.2 Tujuan Khusus	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
1.4.1 Manfaat Akademis	4
1.4.2 Manfaat Klinis	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Tinjauan Umum <i>Salmonella</i> Typhi	5
2.1.1 Taksonomi <i>Salmonella</i> Typhi	5
2.1.2 Morfologi dan Struktur	6

2.1.2.1	Kapsul	6
2.1.2.2	Dinding Sel	6
2.1.2.3	Membran Sitoplasma	7
2.1.2.4	Sitoplasma	7
2.1.2.5	Mesosom	7
2.1.2.6	Inti Sel	8
2.1.2.7	Flagella	8
2.1.2.8	Pili (fimbriae)	8
2.1.3	Metabolisme Bakteri	9
2.1.4	Struktur Antigen	10
2.1.5	Daya Tahan	10
2.1.6	Patogenitas	11
2.1.7	Manifestasi infeksi <i>Salmonella</i> Typhi	12
2.2	Tinjauan Umum Zat Antibakteri	13
2.2.1	Mekanisme kerja antibakteri	13
2.2.1.1	Antibakter yang menghambat metabolisme sel bakteri	14
2.2.1.2	Antibakteri yang menghambat sintesis dinding sel bakteri	14
2.2.1.3	Antibakteri yang menghambat permeabilitas membran sel bakteri	14
2.2.1.4	Antibakteri yang menghambat sintesis protein sel bakteri	15
2.2.1.5	Antibakteri yang menghambat sintesis atau merusak asam nukleat sel bakteri	15
2.2.2	Pengobatan infeksi <i>Salmonella</i> Typhi (Demam Tifoid)	15
2.2.3	<i>Salmonella</i> terhadap resistensi dengan beberapa antibiotik	16
2.3	Uji Kepekaan terhadap Antibakteri	17
2.3.1	Metode Dilusi Tabung	17



2.3.2	Metode Dilusi Agar	18
2.3.3	Metode Difusi Cakram	18
2.3.3.1	Cara Kirby Bauer	19
2.3.3.2	Cara Joan Stokes	19
2.4	Tinjauan tentang Tanaman sirsak (<i>Annona muricata L</i>)	19
2.4.1	Tinjauan Umum	19
2.4.2	Morfologi	21
2.4.3	Kandungan Kimia	21
2.4.4	Khasiat Tanaman	22
2.4.4.1	Flavonoid	22
2.4.4.2	Tanin	22
2.4.4.3	Saponin	23
2.4.4.4	Alkaloid	24
2.4.5	Bunga	25
2.4.6	Buah	25
2.4.7	Biji	25
2.4.8	Pohon	26
2.5	Metode Penyarian	26
2.6	Macam macam proses ekstraksi	27
2.6.1	Prinsip Maserasi	28
2.6.2	Prinsip Soxhletasi	29
2.6.3	Prinsip Perkolasi	29
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN		30
3.1	Kerangka Konsep Penelitian	30
3.2	Hipotesis Penelitian	32

BAB 4 METODE PENELITIAN	33
4.1 Desain Penelitian.....	33
4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	33
4.3 Estimasi jumlah pengulangan.....	33
4.4 Variabel penelitian.....	34
4.4.1 Variabel bebas.....	34
4.4.2 Variabel tergantung.....	34
4.5 Definisi operasional.....	34
4.6 Alat dan Bahan Penelitian.....	35
4.6.1 Alat dan Bahan untuk Pewarnaan Gram Bakteri.....	35
4.6.2 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Daun Sirsak.....	35
4.7 Rencana Operasional Penelitian.....	36
4.7.1 Sterilisasi alat.....	36
4.7.2 Pembuatan Ekstrak daun sirsak.....	36
4.7.3 Identifikasi Bakteri <i>Salmonella</i> Typhi.....	37
4.7.3.1 Pewarnaan Gram.....	37
4.7.3.2 Penanaman pada BSA (Bismuth Sulfite Agar).....	38
4.7.3.3 Uji Biokimiawi Bakteri dengan Microbact 12 A.....	40
4.7.4 Pembuatan Perbenihan Cair Bakteri.....	41
4.7.5 Uji Ekstrak Etanol Daun Sirsak Terhadap Bakteri <i>S. Typhi</i>	42
4.7.6 Pengumpulan Data.....	43
4.7.7 Analisa Data.....	43
BAB 5 HASIL DAN ANALISIS PENELITIAN	45
5.1 Hasil Penelitian.....	45
5.1.1 Hasil Penelitian Pendahuluan.....	48

5.1.2	Hasil Penelitian Utama	49
5.2	Analisis Data	54
5.2.1	Uji Kruskal Wallis	54
5.2.2	Uji Mann-Whitney	55
5.2.3	Uji Spearman	57
BAB 6 PEMBAHASAN		59
6.1	Hasil Identifikasi	59
6.2	Ekstrak Daun Sirsak	60
6.3	Analisis Data	63
6.3.1	Uji Kruskal Wallis	63
6.3.2	Uji Mann-Whitney	64
6.3.3	Uji Spearman	64
6.4	Keterbatasan Penelitian	65
BAB 7 PENUTUP		67
7.1	Kesimpulan	67
7.2	Saran	67
DAFTAR PUSTAKA		69
LAMPIRAN		72



HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

UJIEFEKTIVITAS EKSTRAK ETANOL DAUN SIRSAK SEBAGAI
ANTIMIKROBA TERHADAP *Salmonella* TYPHI

Oleh:

Rizaldi Mahardika Rachman

NIM 145070107111049

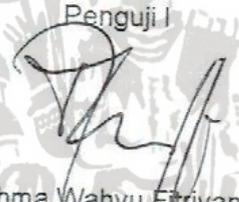
Telah diuji pada:

Hari : Senin

Tanggal : 30 April 2018

Dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji I


dr. Nurrahma Wahyu Fitriyani, M.Med.Ed.
NIP. 198503042009122003

Pembimbing-I / Penguji II,


Prof. Dr. dr. Sanarto Santoso,
DTM&H, Sp.MK (K)
NIP. 194812201980021002

Pembimbing-II / Penguji III,


dr. Khuznita Dasa Novita, Sp.
T.H.T.K.L.
NIP. 2016098211102001

Mengetahui,

Ketua Program Studi Kedokteran,


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

ABSTRAK

Rachman, Rizaldi Mahardika. 2018. **Uji Efektivitas Ekstrak Etanol Daun Sirsak Sebagai Antimikroba terhadap *Salmonella Typhi***. Tugas Akhir, Program Studi Sarjana Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing : (1) Prof.Dr.dr. Sanarto Santoso DTM&H., Sp.Mk(K) (2) dr. Khuznita Dasa Novita, Sp.T.H.T.K.L.

Salmonella Typhi memiliki bentuk infeksi yang serius dibanding genus yang lainnya dan dapat menyebabkan penyakit demam tifoid, bahkan jika tidak cepat ditangani akan menyebabkan komplikasi berupa delirium, penurunan kesadaran, pendarahan usus dan perforasi usus hingga kematian. Pemberian antibiotik sudah mulai dilaporkan menyebabkan resistensi seperti kloramfenikol, ampicillin, dan sulfametoxazol-trimetropim, atau dikenal sebagai MDR (*Multi-Drug Resistance*) sehingga perlu mencari agen-agen pengobatan yang baru dengan aktivitas sebagai antimikroba. Daun sirsak mempunyai komponen alkaloid, tanin, saponin, dan flavonoid yang dapat berfungsi sebagai antimikroba. Penelitian ini adalah *true experimental*, dengan menggunakan *post test only control* melalui uji antimikroba dengan metode dilusi agar. Dengan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol dapat menghasilkan ekstrak daun sirsak. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan bahwa ekstrak daun sirsak (*Annona muricata L.*) memiliki efek sebagai antimikroba terhadap pertumbuhan *Salmonella Typhi* secara *in vitro*. Konsentrasi yang digunakan pada penelitian ini adalah 0%; 2%; 3%; 4%; 6%; dan 7% dengan empat kali pengulangan. Berdasarkan hasil penelitian, pada konsentrasi 7% tidak ada pertumbuhan koloni bakteri. Analisis statistik menggunakan uji *Kruskal Wallis* menunjukkan perubahan signifikan pada perubahan konsentrasi terhadap pertumbuhan bakteri *Salmonella Typhi* ($p < 0,05$). Uji *Spearman* menunjukkan ada hubungan yang sangat kuat dengan arah negatif (koefisien = -0,972) yang dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun sirsak yang diberikan, maka pertumbuhan bakteri *Salmonella Typhi* semakin menurun. Berdasarkan penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun sirsak memiliki efek antimikroba terhadap *Salmonella Typhi*.

Kata kunci: Demam Tifoid, *Salmonella Typhi*, Daun Sirsak, Maserasi, efek antimikroba

ABSTRACT

Rachman, Rizaldi Mahardika. 2018. **Effectiveness Test of Ethanol Extract of Soursop Leaf as Antimicrobial to Salmonella Typhi**. Final Project, Medical Bachelor Degree Program, Faculty of Medicine University of Brawijaya. Supervisors: (1) Prof.Dr.dr. Sanarto Santoso DTM&H, Sp.Mk(K) (2) dr. Khuznita Dasa Novita, Sp.T.H.T.K.L.

Salmonella Typhi has the most serious form of infection than any other genus and can cause typhoid fever, even if not handled quickly will lead to complications of delirium, decreased consciousness, intestinal bleeding and intestinal perforation until death. Antibiotic administration has started to be reported to cause resistance such as chloramphenicol, ampicillin, and sulfamethoxazol-trimetropime, otherwise known as MDR (*Multi-Drug Resistance*), so it is necessary to seek new treatment agents with activity as antimicrobials. Soursop leaves have alkaloid components, tannins, saponins, and flavonoids that can function as antimicrobials. By using maseration method and ethanol solvent can produce soursop leaf extract. This study was *true experimental*, using *post test only control* through antimicrobial assays with agar dilution method. This research aims to prove that soursop leaf extract (*Annona muricata L.*) has an antimicrobial effect on *Salmonella Typhi* growth *in vitro*. The concentration used in this study was 0%; 2%; 3%; 4%; 6%; and 7% with four repetitions. Based on the results of the study, at a concentration of 7% there was no growth of bacterial colonies. Statistical analysis using *Kruskal Wallis* test showed significant changes in concentration change on *Salmonella Typhi* bacteria growth ($p < 0,05$). *Spearman* test showed that there is a very strong relationship with the negative direction (coefficient = -0.972) which can be concluded that the higher concentration of soursop leaf extract is given, the growth of *Salmonella Typhi* bacteria decreases. Based on this research can be concluded that soursop leaf extract has antimicrobial effect against *Salmonella Typhi*.

Keywords: Typhoid Fever, *Salmonella Typhi*, Soursop Leaf, Maseration, antifungal effects

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Salmonella Typhi adalah bakteri gram negatif penyebab demam tifoid dan memiliki bentuk infeksi yang serius karena sering menyebabkan komplikasi berupa pendarahan dan perforasi usus hingga kematian (Karsinah, 2012).

Angka kejadian demam tifoid diketahui lebih tinggi pada negara sedang berkembang di daerah tropis seperti di Indonesia (Gasem MH, Smits HL, Nugroho N, Goris MA, Dolmans WMV., 2008). Demam tifoid adalah penyakit serius yang banyak terjadi pada negara sedang berkembang. Demam tifoid juga merupakan penyakit endemis di Indonesia. Penyakit ini termasuk penyakit menular yang tercantum dalam Undang Undang Nomor 6 tahun 1962 tentang wabah. Kelompok penyakit menular ini merupakan penyakit yang mudah menular dan dapat menyerang banyak orang sehingga menimbulkan wabah (Soedarmo, 2010). Angka kejadian demam tifoid di Indonesia masih tinggi yaitu 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, pendarahan usus, perforasi usus dan berujung pada kematian (Brusch *et al.*, 2012). Meskipun gejala demam tifoid mulai hilang, orang yang terinfeksi masih berpotensi membawa bakteri *Salmonella Typhi*. Dengan demikian, penyakit bisa kambuh kembali, atau bisa menularkan ke orang lain (Judarwanto, 2012).

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

Laporan pertama terkait resistensi *Salmonella Typhi* terhadap kloramfenikol pada tahun 1974, dan 20 tahun kemudian dilaporkan telah terjadi resistensi juga terhadap obat yang lain yaitu ampicillin dan sulfametoxazol-trimetropim, atau dikenal sebagai MDR (*Multi-Drug Resistance*) *Salmonella Typhi* (Crump, 2004). Banyak dilaporkan resistensi terhadap dua lini kedua terapi *Salmonella Typhi* yaitu sefalosporin generasi ke-3 dan golongan quinolone (Alam, 2011).

Tumbuhan merupakan faktor yang senantiasa dipersoalkan oleh manusia karena sangat berkaitan dengan kehidupan. Untuk itu diperlukan pengamatan yang serius atas berbagai macam tumbuhan, baik dilihat dari kegunaan yang dimiliki, sifat-sifatnya, kandungan kimia, maupun kemampuan tumbuhan. Tumbuh-tumbuhan tersebut memiliki fungsi atau kegunaan yang sangat bermanfaat bagi manusia sehingga mendorong para ahli untuk meneliti kandungan serta cara ekstraksi dan isolasi senyawa aktifnya. Salah satu tumbuhan yang biasa digunakan sebagai obat tradisional adalah tanaman sirsak (*Annona muricata L.*). Manfaat tanaman sirsak terbukti mempunyai khasiat astrigen (daun dan buah mentah), antibakteri, dan antikejang (Hariana, 2006). Batang dan daun sirsak (*Annona muricata L.*) mengandung tansin, fitosterol, kalsium oksalat serta alkaloid murisine (Hariana, 2006). Selain itu juga buah sirsak mengandung senyawa acetoginin, antara lain asimisin, bulatacin dan

squamosin. Pada konsentrasi tinggi, senyawa acetogenin memiliki keistimewaan sebagai anti feedent. Dalam hal ini, serangga hama tidak bergairah untuk melahap bagian tanaman yang disukainya. Sedangkan pada konsentrasi rendah, bersifat racun perut yang bisa mengakibatkan serangga hama menemui ajalnya (Septerina, 2002).

Daun sirsak (*Annona muricata L.*) mengandung senyawa acetogenin, minyak esensial, reticuline, loreximine, coclaurine, annomurine, higenamine. Kandungan zat-zat lainnya pada daun sirsak (*Annona muricata L.*) antara lain annocatacin, annocatalin, annohexocin, annonacin, annomuricin, anomurine, anonol, caclourine, gentisic acid, gigantetronin, linoleic acid, dan muricapentocin.

Adapun pada batang dan daun sirsak kaya akan tannin, fitosterol, kalsium oksalat, serta alkaloid muricine (Hariana, A., 2005).

Aktivitas antibakteri yang terdapat pada daun sirsak menjadi dasar dilakukannya penelitian untuk mencari aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata L.*) terhadap *Salmonella Typhi* secara *in vitro*. Etanol umumnya baik untuk melarutkan senyawa aktif yang diduga berkhasiat sebagai antimikroba seperti alkaloid, flavanoid, tanin, dan saponin (Purwatresna, E., 2012).

1.2 Rumusan Masalah

Apakah pemberian daun sirsak mempunyai efek antibakteri terhadap pertumbuhan koloni bakteri *Salmonella Typhi* secara *in vitro*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk membuktikan efek antibakteri daun sirsak terhadap *Salmonella Typhi* secara *in vitro*.

1.3.1.1 Tujuan khusus

1. Menganalisa hubungan konsentrasi ekstrak etanol daun sirsak dengan pertumbuhan *Salmonella Typhi* secara *in vitro*.
2. Mengetahui Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM) ekstrak daun sirsak terhadap pertumbuhan bakteri *Salmonella Typhi* secara *in vitro*.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademis

Efek antibakteri daun sirsak terhadap *Salmonella Typhi* dapat digunakan untuk menambah wawasan keilmuan sebagai dasar penelitian lebih lanjut.

1.4.2 Manfaat Klinis

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

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Umum *Salmonella* Typhi

Salmonella Typhi termasuk *Enterobacteriaceae* (kuman enterik batang gram negatif) yang bersifat anaerob fakultatif atau aerob, tak berspora dan intraseluler fakultatif. Panjang *Salmonella* bervariasi, sebagian besar isolat motil dengan flagel peritrika (*peritrichous flagella*). *Salmonella* mudah tumbuh pada medium sederhana, tetapi hampir tidak pernah memfermentasikan laktosa atau sukrosa (Jawetz *et al.*, 2012). Genus *Salmonella* terdiri atas kelompok mikroorganisme yang secara biokimiawi dan serologis beragam. Disamping manusia, *Salmonella* dapat menginfeksi banyak macam binatang dan mampu menginvasi jaringan luar usus, menyebabkan demam enterik dengan bentuk yang terberat adalah demam tifoid (Dzen *et al.*, 2010).

2.1.1 Taksonomi *Salmonella* Typhi

Taksonomi *Salmonella* Typhi adalah sebagai berikut (Todar, 2012)

Kingdom : Bacteria

Phylum : Proteobacteria

Class : Gamma Proteobacteria

Order : Enterobacteriales

Familia : Enterobacteriaceae

Genus : *Salmonella*

Spesies : *Salmonella enterica* subspecies *enteric* serotipe Typhi
atau *Salmonella* Typhi

2.1.2 Morfologi dan Struktur

Struktur sel *Salmonella* terdiri dari:

2.1.2.1 Kapsul

Kapsul merupakan suatu lapisan tipis, berada diluar dinding sel dan secara kimiawi tersusun atas polisakarida, polipeptida, atau kedua-duanya.

Kapsul dapat melindungi bakteri dari proses fagositosis. Kapsul juga menentukan derajat keganasan atau virulensi bakteri, artinya bakteri yang mempunyai kapsul lebih virulen dibandingkan yang tidak memiliki kapsul. Selain itu kapsul juga bersifat antigenik atau biasa disebut Ag kapsul (Vi) (Dzen *et al.*, 2010).

2.1.2.2 Dinding Sel

Dinding sel adalah stuktur bakteri yang berfungsi untuk mempertahankan bentuk bakteri. Secara kimiawi, dinding sel bakteri terdiri atas *peptidoglikan* yang tersusun dari *N-asetil glukosamin* dan *N-asetil asam muramat*. Pada *Salmonella Typhi* kandungan *peptidoglikan* pada dinding selnya lebih sedikit, oleh karenanya bakteri gram negatif lebih peka terhadap pengaruh mekanik. Selain *peptidoglikan*, dinding sel gram negatif juga mengandung lipopolisakarida, fosfolipid, lipoprotein yang berperan dalam proses masuknya bahan-bahan dari luar sel kedalam sel serta menentukan sifat pewarnaan cara gram (Jawetz *et al.*, 2010).

Dinding sel tidak bersifat permeabel terhadap garam dan senyawa tertentu dengan berat molekul rendah. Secara normal konsentrasi garam dan gula yang menentukan tekanan osmotik di dalam sel lebih tinggi daripada di luar sel. Apabila tekanan osmotik di luar sel naik, air dalam sel akan mengalir keluar, protoplasma mengalami pengkerutan, dan membran akan terlepas dari dinding

sel sehingga cairan yang berada di dalam sel akan keluar (*plasmolisis*) Dinding sel *Salmonella* dapat dirusak oleh antimikroba yang bekerja pada dinding sel misalnya Sefalosporin (Dzen *et al.*, 2010).

2.1.2.3 Membran Sitoplasma

Membran sitoplasma adalah lapisan tipis yang terletak disebelah dalam dinding sel, tersusun oleh 60 % protein dan 40 % lipid yang umumnya berupa fosfolipid. Pada *Salmonella* Typhi Membran sitoplasma merupakan barier yang fungsinya mengatur keluar masuknya bahan-bahan dari dalam sel atau dari luar sel dan hanya bahan-bahan tertentu saja dapat melewatinya. Sifat tersebut dinamakan semipermeabilitas membran sitoplasma (Jawetz *et al.*, 2012).

Gangguan pada membran sel akan menghambat fungsi normalnya sehingga menyebabkan ketidakmampuan sel untuk tumbuh dan menyebabkan kematian sel bakteri (Jawetz *et al.*, 2012).

2.1.2.4 Sitoplasma

Sitoplasma bakteri merupakan suspensi zat-zat organik dan anorganik di dalam larutan yang kental. Sitoplasma mengandung ribosom, mesosom, benda-benda inklusi dan vakuola. Ribosom berfungsi untuk sintesis protein (Jawetz *et al.*, 2012).

2.1.2.5 Mesosom

Invaginasi (lekukan) membran plasma yang relative besar, biasanya bentuknya tak menentu, disebut mesosom. Invaginasi ini menyediakan perluasan permukaan membran yang berguna sebagai tempat kegiatan enzim yang terlibat dalam pernapasan dan pengangkutan (Volk and Wheller, 1993).

2.1.2.6 Inti Sel

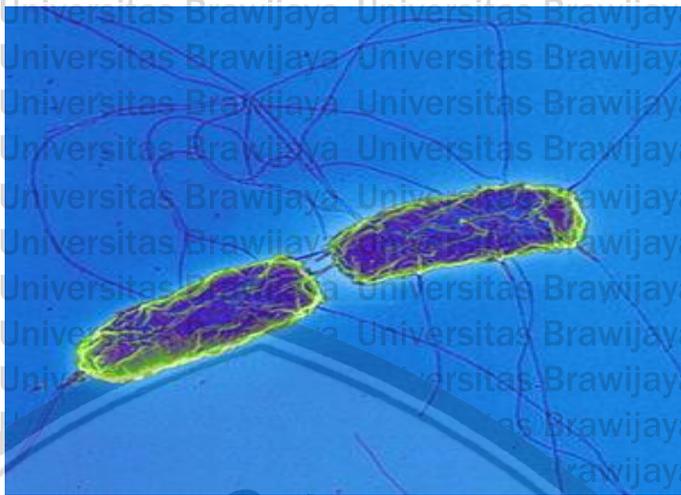
Sel bakteri tidak mempunyai pembungkus inti yang sebenarnya. Didalam inti, terdapat kromosom sebagai pusat informasi genetik yang mengatur semua kegiatan dari bakteri tersebut, termasuk metabolisme maupun yang menentukan sifat resistensi terhadap suatu anti mikroba (Jawetz *et al.*, 2012).

2.1.2.7 Flagella

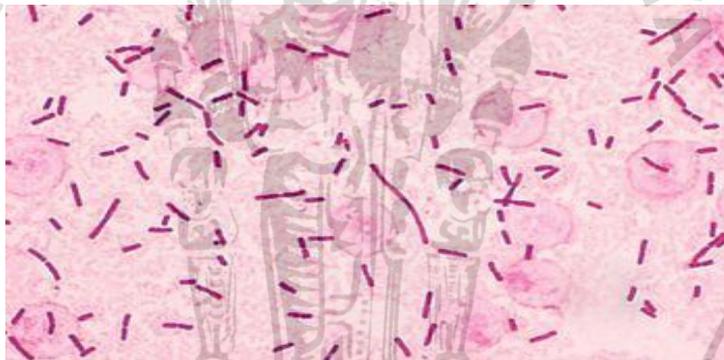
Flagella merupakan filamen tipis menyerupai rambut yang panjang berpangkal pada membrane sitoplasma dan menembus dinding sel. Strukturnya kompleks tersusun atas bermacam-macam protein termasuk flagelin yang membuat flagela berbentuk seperti tabung cambuk dan protein kompleks yang memanjangkan dinding sel dan membran sel untuk membentuk motor yang menyebabkan flagela berotasi. Flagela berbentuk seperti cambuk, flagela digunakan bakteri sebagai alat gerak. *Salmonella* mempunyai tipe *peritrichous flagella* yaitu flagellanya terdapat diseluruh permukaan bakteri (Jawetz *et al.*, 2012).

2.1.2.8 Pili (Fimbriae)

Pili atau fimbriae adalah struktur tambahan yang melekat pada permukaan dinding sel tetapi lebih pendek dari flagella serta lebih halus. Pili tersusun dari protein yang disebut pilin dan biasanya dimiliki oleh bakteri gram negatif. Pili yang berfungsi sebagai alat untuk menempelkan dirinya pada sel hospes disebut *colonizing factor*. Selain itu, ada pili yang berperan di dalam proses pemindahan materi genetic dari salah satu bakteri ke bakteri yang lain, disebut *sex pili* (Dzen *et al.*, 2010).



Gambar 2.1 Sel batang dan flagella dari *Salmonella Typhi* (Volker Brinkmann, 2011)



Gambar 2.1.2 Gambaran Mikroskopik Bakteri *Salmonella Typhi*

2.1.3 Metabolisme Bakteri

Seperti halnya makhluk hidup yang lebih tinggi tingkatnya, untuk mempertahankan kelangsungan hidupnya, bakteri mengadakan penggantian atau pembaharuan bagian-bagian sel yang menyusunnya, mengadakan pertumbuhan dan perkembangbiakan (Volk and Wheller, 1993).

Energi yang diperlukan untuk tumbuh, berkembang biak dan penggantian sel yang menyusunnya diperoleh dari bahan-bahan yang ada di sekelilingnya.

Semua kegiatan yang terjadi setelah masuknya bahan makanan ke dalam sel disebut metabolisme (Jawetz *et al.*, 2012).

Sistem enzim yang ikut berperan dan mempengaruhi jalannya reaksi biokimiawi tersebut sangat kompleks dan tiap enzim hanya mempengaruhi satu macam reaksi spesifik, misalnya enzim yang berperan pada metabolisme protein tidak dapat mempengaruhi atau berperan pada metabolisme karbohidrat ataupun lemak (Dzen *et al.*, 2010).

2.1.4 Struktur Antigen

Antigen O (antigen somatik) dan H (antigen flagela) 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 *antigenic major* yaitu fase-1 yang merupakan fase spesifik atau fase 2 yang merupakan fase non spesifik. Antigen H fase 1 dimiliki oleh hanya beberapa organisme, dan bereaksi hanya dengan antisera homolog, sedangkan antigen H fase2 dimiliki oleh banyak organisme dan bereaksi dengan antisera heterolog. Antigen K (antigen kapsuler) peranannya sangat kecil didalam klasifikasi, tetapi mempunyai kepentingan pathogenesis (Dzen *et al.*, 2010).

2.1.5 Daya Tahan

Kuman mati pada suhu 56° C dan pada kondisi kering. Dalam air bisa tahan selama 4 minggu. Hidup subur pada medium yang mengandung garam empedu, tahan terhadap zat warna hijau brilian dan senyawa natrium tetrathionat, dan natrium deoksikoholat. Senyawa-senyawa ini menghambat pertumbuhan

koliform sehingga senyawa-senyawa tersebut dapat digunakan di dalam media untuk isolasi kuman *Salmonella* dan feses (Jawetz *et al.*, 2012).

2.1.6 Patogenitas

Salmonella adalah organisme yang kompleks yang memproduksi berbagai faktor virulensi, termasuk antigen permukaan (*surface antigen*), faktor-faktor yang berperan pada invasi, endotoksin, sitotoksin, dan enterotoksin. Peranan masing-masing faktor dalam patogenesis infeksi *Salmonella* bervariasi, tergantung serotipe yang menyebabkan infeksi dan sistem hospesnya, karena *Salmonella* dapat menimbulkan sindroma yang berbeda pada hospes yang lain. Namun demikian, banyak serotipe yang memiliki hospes spesifik. Misalnya, *Salmonella* Typhimurium menyebabkan sindroma yang mirip dengan demam tifoid pada hospes alamiah mencit, tetapi pada manusia hanya menimbulkan gastroenteritis yang sembuh spontan. *Salmonella* Typhi terbatas menimbulkan penyakit pada manusia, sedangkan pada hewan tidak menimbulkan penyakit bila diberikan melalui *oral* (Jawetz *et al.*, 2012).

Salmonella Typhi bersifat infeksius untuk manusia. Organisme ini hampir selalu masuk rute *oral*, biasanya bersama makanan atau minuman yang terkontaminasi. Dosis infeksi *Salmonella* rata-rata untuk menimbulkan infeksi klinis atau subklinis pada manusia adalah $10^5 - 10^8$ sel. Beberapa faktor hospes yang menimbulkan resistansi terhadap infeksi *Salmonella* adalah keasaman lambung, flora mikrobial usus, dan kekebalan usus. *Salmonella* yang tertelan mencapai usus halus, masuk kedalam aliran limfatik dan kemudian masuk ke aliran darah. Organisme ini dibawa oleh darah ke berbagai organ termasuk usus.

Salmonella bermultiplikasi di jaringan limfoid usus dan di ekskresikan di dalam

feses. Lesi utama adalah hiperplasia dan nekrosis jaringan limfoid (misal, *Peyer's patch*), hepatitis, nekrosis fokal di hati, serta inflamasi pada kandung empedu, periosteum, para, dan organ lainnya (Jawetz *et al.*, 2012).

2.1.7 Manifestasi Infeksi *Salmonella Typhi*

Jumlah organisme dalam makanan dan minuman yang termakan penting untuk menentukan *infection rate* dari bakteri ini. Masa tunas demam tifoid berlangsung antara 10-14 hari. Gejala klinis yang timbul sangat bervariasi dari ringan sampai yang berat, dari asimtomatik hingga gambaran penyakit yang khas disertai komplikasi hingga kematian.

Pada minggu pertama organisme mengadakan penetrasi ke dalam dinding usus dan menginfeksi sistem limfatik regional. Sebagian organisme masuk ke dalam aliran darah dan menginfeksi sistem retikuloendotelial yang lain. Pada kedua tempat ini, bakteri akan dimakan oleh sel-sel monosit tetapi tidak terbunuh, bahkan masih bisa mengadakan multiplikasi di dalam sel monosit tersebut. Pada periode ini gejala klinisnya adalah demam, nyeri kepala, pusing, nyeri otot, anoreksia, mual, muntah, obstipasi atau diare, perasaan tidak enak di perut, dan epistaksis. Pada pemeriksaan fisik hanya didapatkan suhu badan meningkat. Sifat demam adalah meningkat perlahan-lahan dan terutama pada sore hari hingga malam hari (Dzen *et al.*, 2010).

Pada minggu kedua, bakteri masuk lagi ke dalam aliran darah, menyebabkan bakterimia yang kedua. Terjadi infeksi pada saluran empedu dan organ-organ lain. Gejala-gejala menjadi lebih jelas berupa demam tinggi 40°C, brakikardia relatif (peningkatan suhu 1°C tidak diikuti peningkatan denyut nadi 8 kali permenit), lidah yang berselaput (kotor di tengah, tepi dan ujung merah serta

tremor), hepatomegali, splenomegali, metoroismus, gangguan mental berupa somnolen, stupor, koma, delirium, atau psikosis (Widodo, 2006).

2.2 Tinjauan Umum Zat Antibakteri

Secara umum, antibakteri sebaiknya mempunyai sifat-sifat sebagai berikut :

- Menghambat atau membunuh patogen tanpa merusak hospes.
- Bersifat bakterisidal dan bukan bakteriostatik.
- Tidak menyebabkan resistensi pada kuman.
- Berspektrum luas.
- Tidak bersifat alergenik atau tidak menimbulkan efek samping bila digunakan dalam jangka waktu lama.
- Tetap aktif dalam plasma, cairan tubuh, atau eksudat.
- Larut di dalam air dan stabil.

Kadar bakterisidal di dalam tubuh cepat tercapai dan bertahan untuk waktu yang lama (Dzen *et al.*, 2010).

2.2.1 Mekanisme Kerja Antibakteri

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antibakteri dibagi lima kelompok: (a) yang menghambat metabolisme sel bakteri; (b) yang menghambat sintesis dinding sel bakteri; (c) yang menghambat permeabilitas membran sel bakteri; (d) yang menghambat sintesis protein bakteri; (e) yang menghambat sintesis atau merusak asam nukleat sel bakteri (Setiabudy, 2007)

2.2.1.1 Antibakteri yang Menghambat Metabolisme Sel Bakteri

Bakteri membutuhkan asam folat untuk kelangsungan hidupnya. Berbeda dengan mamalia yang mendapatkan asam folat dari luar, kuman patogen harus mensintesis sendiri asam folat dari asam para amino benzoat (PABA) untuk kebutuhan hidupnya. Apabila antibiotik bersaing dengan PABA untuk diikutsertakan dalam pembentukan asam folat, maka terbentuk analog asam folat yang nonfungsional. Akibatnya, kehidupan bakteri akan terganggu (Setiabudy, 2007).

2.2.1.2 Antibakteri yang Menghambat Sintesis Dinding Sel Bakteri

Bakteri mempunyai lapisan luar yang rigid, yakni dinding sel yang berfungsi untuk mempertahankan bentuk mikroorganisme dan pelindung sel bakteri, yang mempunyai tekanan osmotik internal yang tinggi. Trauma pada dinding sel (misalnya oleh *lisozim*) atau penghambatan pembentukannya, menimbulkan lisis pada sel (Jawetz *et al.*, 2012).

2.2.1.3 Antibakteri yang Menghambat Permeabilitas Membran Sel Bakteri

Sitoplasma semua sel hidup dibatasi oleh membran sitoplasma, yang berperan sebagai barier permeabilitas selektif, membawa fungsi transpor aktif dan kemudian mengontrol komposisi internal sel. Jika fungsi integritas membran sitoplasma dirusak, makro molekul dan ion keluar dari sel, kemudian sel rusak atau terjadi kematian. Membran sitoplasma bakteri dan fungi mempunyai struktur berbeda dibanding sel binatang dan dapat dengan mudah dikacaukan oleh agen tertentu (Jawetz *et al.*, 2012).

2.2.1.4 Antibakteri yang Menghambat Sintesis Protein Sel Bakteri

Untuk kehidupannya, sel bakteri perlu mensintesis berbagai protein.

Sintesis protein berlangsung di ribosom, dengan bantuan mRNA dan tRNA. Pada bakteri, ribosom terdiri atas dua sub unit, yang berdasarkan konstanta sedimentasi dinyatakan sebagai ribosom 30S dan 50S. Untuk berfungsi pada sintesis protein, kedua komponen ini akan bersatu pada pangkal rantai mRNA menjadi ribosom 70S (Setiabudy, 2007). Cara kerja antibiotik dalam menghambat sintesis protein adalah melalui ikatan dengan ribosom 30S atau 50S (Jawetz *et al.*, 2012).

2.2.1.5 Antibakteri yang Menghambat Sintesis atau Merusak Asam Nukleat Sel Bakteri

Antibiotik ini bekerja dengan cara menghambat sintesis mRNA pada proses transkripsi atau menghambat replikasi DNA pada proses pembelahan sel (Dzen *et al.*, 2010).

2.2.2 Pengobatan Infeksi *Salmonella Typhi* (Demam Tifoid)

Terapi antibiotik untuk infeksi *Salmonella* lini pertama adalah dengan menggunakan ampicillin, trimetopim-sulfaetoxazol, atau cephalosporin generasi-3 (Hawkey *et al.*, 2009) selain itu, chloramphenicol juga merupakan obat pilihan untuk demam tifoid. Chloramphenicol diberikan secara per oral atau secara IV 25 mg/kg sampai 14-21 hari (fauci *et al.*, 2008). Pada saat ini mulai muncul strain yang resisten terhadap kloramfenikol, ampicillin, dan trimetopim-sulfametoxazol atau dikenal sebagai MDR-Typhi (Moehartono *et al.*, 2012). Pengobatan antibiotik untuk MDR-Typhi menggunakan golongan fluoroquinolon, extended

spectrum cephalosporin dan azithromycin (Mastroeni *et al.*, 2006) Beberapa penderita karier kronik dapat diobati hanya dengan menggunakan antibiotik ampicillin yang dikombinasikan dengan probenecid atau dengan menggunakan ciprofloxacin (Domino, 2007)

2.2.3 *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 *Salmonella Typhi* yang resisten terhadap semua terapi lini pertama yaitu chloramphenicol, ampicillin, dan co-trimoxazole. Dan sebagian besar kasus ditemukan diantara wisatawan yang kembali dari daerah yang telah menjadi endemik terhadap MDR strain *Salmonella Typhi* (Zaki, 2011).

Mekanisme resistensi yang berkembang pada *Salmonella 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 mentransferkan gen resistensi multiple dari satu bakteri ke bakteri lainnya.

Plasmid dari kelompok ketidakcocokan (inc)HI1 merupakan vektor penting resistensi antibiotik pada *Salmonella Typhi*. Mekanisme yang kedua yaitu diperantarai oleh kromosom DNA (Chromosomal DNA-mediated mechanism).

Pada proses tersebut terjadi mutasi pada region DNA yang mengkode DNA-gyrase sehingga mengakibatkan gangguan pada proses masuknya antibakteri ke

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

2.3 Uji Kepekaan Terhadap Antibakteri (*invitro*)

Uji kepekaan bakteri terhadap obat-obatan secara *invitro* bertujuan untuk mengetahui obat antimikroba yang masih dapat digunakan untuk mengatasi infeksi oleh mikroba tersebut. Uji kepekaan terhadap obat antimikroba pada dasarnya dapat dilakukan melalui dua cara yaitu metode dilusi dan metode difusi cakram.

2.3.1 Metode Dilusi Tabung

Cara ini digunakan untuk menentukan KHM (Kadar Hambat Minimal) dan KBM (Kadar Bunuh Minimal) dari obat antibakteri. Prinsip dari metode dilusi yaitu: menggunakan satu seri tabung reaksi yang diisi media cair dan sejumlah tertentu sel bakteri yang diuji. Kemudian masing-masing tabung diisi dengan antibakteri yang telah diencerkan secara serial. Selanjutnya, seri tabung diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam dan diamati terjadinya kekeruhan pada tabung. Konsentrasi terendah antibakteri pada tabung yang ditunjukkan dengan hasil biakan yang mulai tampak jernih (tidak ada pertumbuhan bakteri) adalah KHM dari antibakteri. Selanjutnya biakan dari semua tabung yang jernih diinokulasikan pada media agar padat, diinkubasikan dan keesokan harinya diamati ada tidaknya koloni bakteri yang tumbuh. Konsentrasi terendah antibakteri pada biakan padat yang ditunjukkan dengan

tidak adanya pertumbuhan koloni mikroba adalah KBM dari mikroba terhadap bakteri uji. (Dzen *et al.*, 2010)

2.3.2 Metode Dilusi Agar

Tes ini dikerjakan dengan menggunakan metode dilusi agar (*agar dilution test*). Larutan antibakteri yang sudah diencerkan secara serial dicampurkan ke dalam medium agar yang masih cair (tetapi tidak terlalu panas) kemudian agar dibiarkan memadat dan selanjutnya diinokulasi dengan bakteri. Dibutuhkan enam cawan dan satu cawan untuk control positif tanpa antibakteri. Dengan metode ini, satu atau lebih bakteri terisolasi yang tercampur per cawan. Pada metode dilusi agar diperlukan larutan antibakteri dengan kadar menurun yang dibuat menggunakan teknik pengenceran serial. Selanjutnya, diinkubasikan pada suhu 37° C selama 18-24 jam. Setelah di inkubasi, cawan diamati serta dihitung pertumbuhan bakteri (Dzen *et al.*, 2010)

2.3.3 Metode Difusi Cakram

Metode difusi cakram dilakukan dengan menjenuhkan obat ke dalam kertas saring (kertas cakram). Kertas cakram yang mengandung obat tertentu diletakkan pada media perbenihan agar padat yang telah dicampur dengan bakteri yang diuji, kemudian diinkubasikan 37° C selama 18-24 jam. Selanjutnya diamati adanya zona hambat disekitar kertas cakram yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri. Apabila ada zona hambat yang cukup luas (sesuai dengan skala yang dipakai), maka menunjukkan bahwa antibakteri bekerja efektif, tetapi apabila tidak ada zona hambat menunjukkan bahwa bakteri resisten terhadap antibakteri tersebut (Dzen *et al.*, 2010)

Untuk mengevaluasi hasil uji kepekaan bahan antibakteri, apakah isolat bakteri sensitif atau resisten terhadap obat dapat dilakukan dua cara seperti berikut ini :

2.3.3.1 Cara Kirby Bauer

Membandingkan diameter area jernih (Zona hambatan) disekitar cakram dengan tabel standar yang dibuat oleh CLSI (*Clinical And Labaoratorium Standart Institute*). Dengan tabel CLSI dapat diketahui kriteria sensitif, sensitif-intermediet, atau resisten.

2.3.3.2 Cara Joan Stokes

Membandingkan radius zona hambatan yang terjadi antara bakteri kontrol yang sudah diketahui kepekaannya terhadap obat tersebut dengan *isolate* bakteri yang diuji. Pada cara Joan Stokes, prosedur uji kepekaan untuk bakteri kontrol dan bakteri uji dilakukan bersama-sama dalam satu piring agar (Dzen *et al.*, 2010)

2.4 Tinjauan tentang Tanaman sirsak (*Annona muricata L.*)

2.4.1 Tinjauan Umum

Sistematika Tanaman sirsak (*Annona muricata L.*)

Klasifikasi dari tumbuhan sirsak adalah:

Kingdom : Plantae

Divisi : Spermatophyta

Sub divisi : Angiospermae

Kelas : Dicotyledonae

Ordo : Polycarpiceae
Familia : Annonaceae
Genus : Annona
Spesies : *Annona muricata* L. (Sunarjono, 2005).



Gambar 2.4 Daun Sirsak



Gambar 2.4.1 Tanaman Sirsak

2.4.2 Morfologi

Morfologi dari daun sirsak adalah berbentuk bulat dan panjang, dengan bentuk daun menyirip dengan ujung daun meruncing, permukaan daun mengkilap, serta berwarna hijau muda sampai hijau tua. Terdapat banyak putik di dalam satu bunga sehingga diberi nama bunga berpistil majemuk. Sebagian bunga terdapat dalam lingkaran, dan sebagian lagi membentuk spiral atau terpecah, tersusun secara hemisiklis. Mahkota bunga yang berjumlah 6 sepalum yang terdiri dari dua lingkaran, bentuknya hampir segitiga, tebal, dan kaku, berwarna kuning keputih-putihan, dan setelah tua mekar dan lepas dari dasar bunganya. Bunga umumnya keluar dari ketiak daun, cabang, ranting, atau pohon berbentuk sempurna (hermaprodit) (Sunarjono, 2005).

2.4.3 Kandungan Kimia

Daun sirsak mengandung alkaloid, tanin, dan beberapa kandungan kimia lainnya termasuk *Annonaceous acetogenins*. *Acetogenins* merupakan senyawa yang memiliki potensi sitotoksik. Senyawa sitotoksik adalah senyawa yang dapat bersifat toksik untuk menghambat dan menghentikan pertumbuhan sel kanker (Mardiana, 2011). *Acetogenins* merupakan inhibitor kuat dari kompleks I mitokondria atau NADH dehidrogenase. Zat ini akan mengakibatkan penurunan produksi ATP yang akan menyebabkan kematian sel kanker, lalu kemudian memicu terjadinya aktivasi jalur apoptosis serta 13 mengaktifkan p53 yang dapat menghentikan siklus sel untuk mencegah terjadinya proliferasi tak terkendali (Retnani, 2011).

2.4.4 Khasiat Tanaman

Daun sirsak dimanfaatkan sebagai pengobatan alternatif untuk pengobatan kanker, yakni dengan mengonsumsi air rebusan daun sirsak.

Selain untuk pengobatan kanker, tanaman sirsak juga dimanfaatkan untuk pengobatan demam, diare, anti kejang, anti jamur, anti parasit, anti mikroba, sakit pinggang, asam urat, gatal-gatal, bisul, flu, dan lain lain (Mardiana, 2011).

2.4.4.1 Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada tanaman hijau, kecuali alga. Flavonoid termasuk juga senyawa fenolik alam yang potensial sebagai obat. Senyawa ini dapat ditemukan pada batang, daun, bunga, dan buah. Flavonoid dalam tubuh manusia berfungsi sebagai antioksidan sehingga sangat baik untuk mencegah kanker. Manfaat flavonoid antara lain adalah untuk melindungi struktur sel, meningkatkan efektivitas vitamin C, anti-inflamasi, mencegah keropos tulang, dan sebagai antibiotik.

2.4.4.2 Tanin

Tanin adalah senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada beberapa tanaman. Tanin mampu mengikat protein, sehingga protein pada tanaman dapat resisten terhadap degradasi oleh enzim protease di dalam silo ataupun rumen.

Tanin selain mengikat protein juga bersifat melindungi protein dari degradasi enzim mikroba maupun enzim protease pada tanaman, sehingga tanin sangat bermanfaat dalam menjaga kualitas silase. Tanin merupakan senyawa kimia yang tergolong dalam senyawa polifenol (Deaville et al., 2010). Tanin mempunyai kemampuan mengendapkan protein, karena tanin mengandung sejumlah

kelompok ikatan fungsional yang kuat dengan molekul protein yang selanjutnya akan menghasilkan ikatan silang yang besar dan kompleks yaitu protein tanin.

Tanin mempunyai berat molekul 0,5-3 KD. Tanin alami larut dalam air dan memberikan warna pada air, warna larutan tanin bervariasi dari warna terang sampai warna merah gelap atau coklat, karena setiap tanin memiliki warna yang khas tergantung sumbernya (Ahadi, 2003).

2.4.4.3 Saponin

Saponin adalah suatu glikosida alamiah yang terikat dengan steroid atau triterpena. Saponin mempunyai aktifitas farmakologi yang cukup luas diantaranya meliputi: immunomodulator, anti tumor, anti inflamasi, antivirus, anti jamur, dapat membunuh kerang-kerangan, hipoglikemik, dan efek hypokholesterol. Saponin juga mempunyai sifat bermacam-macam, misalnya: terasa manis, ada yang pahit, dapat berbentuk buih, dapat menstabilkan emulsi, dapat menyebabkan hemolisis. Dalam pemakaiannya saponin bisa dipakai untuk banyak keperluan, misalnya dipakai untuk membuat minuman beralkohol, dalam industri pakaian, kosmetik, membuat obat-obatan, dan dipakai sebagai obat tradisional¹. Biarpun saponin bisa diisolasi dari binatang tingkat rendah, sebenarnya saponin ditemukan terutama dalam tumbuh-tumbuhan. Namanya diambil dari Genus suatu tumbuhan yaitu Saponaria, akar dari famili Caryophyllaceae dapat dibuat sabun. Saponin juga bisa didapatkan dalam beberapa famili tumbuhan yang lain². Tulisan ini hanya akan membahas saponin yang dimanfaatkan sebagai obat alternatif dalam herbal.

2.4.4.4 Alkaloid

Salah satunya adalah senyawa alkaloid yang berkhasiat sebagai anti diare, anti diabetes, anti mikroba dan anti malaria, akan tetapi beberapa senyawa golongan alkaloid bersifat racun sehingga diperlukan adanya identifikasi senyawa golongan alkaloid yang dapat diketahui manfaatnya. Alkaloid adalah senyawa metabolit sekunder terbanyak yang memiliki atom nitrogen, yang ditemukan dalam jaringan tumbuhan dan hewan. Sebagian besar senyawa alkaloid bersumber dari tumbuh-tumbuhan, terutama angiosperm. Lebih dari 20% spesies angiosperm mengandung alkaloid (Wink, 2008). Alkaloid dapat ditemukan pada berbagai bagian tanaman, seperti bunga, biji, daun, ranting, akar dan kulit batang. Alkaloid umumnya ditemukan dalam kadar yang kecil dan harus dipisahkan dari campuran senyawa yang rumit yang berasal dari jaringan tumbuhan. Pada kehidupan sehari-hari alkaloid selama bertahun-tahun telah menarik perhatian terutama karena pengaruh fisiologisnya terhadap bidang farmasi. Hal ini disebabkan karena alkaloid bersifat basa, sehingga dapat mengganti basa mineral dalam mempertahankan kesetimbangan ion dalam tumbuhan. Sebagian besar senyawa alkaloid bersumber pada tumbuh-tumbuhan. Alkaloid dapat ditemui pada berbagai bagian tanaman seperti akar, batang, daun, dan biji. Alkaloid pada tanaman berfungsi sebagai racun yang dapat melindunginya dari serangga dan herbivora, faktor pengatur pertumbuhan, dan senyawa simpanan yang mampu menyuplai nitrogen dan unsur-unsur lain yang diperlukan tanaman (Wink, 2008).

2.4.5 Bunga

Bunga pada tanaman sirsak berbentuk tunggal (flos simplex) yaitu satu bunga terdapat banyak putik sehingga dinamakan bunga berpistil majemuk.

Bagian bunga tersusun secara hemicyclis, yaitu sebagian terdapat dalam lingkaran yang lain spiral atau terpecah. Mahkota bunga berjumlah 6 sepalum yang terdiri atas 2 lingkaran, bentuknya hampir segi tiga, tebal dan kaku, berwarna kuning keputih-putihan, dan setelah tua mekar, kemudian lepas dari dasar bunganya. Putik dan benang sari lebar dengan banyak karpel (bakal buah). Bunga keluar dari ketiak daun, cabang, ranting, atau pohon. bunga umumnya sempurna, tetapi terkadang hanya bunga jantan dan bunga betina saja dalam satu pohon. Bunga melakukan 5 penyerbukan silang, karena umumnya tepung sari matang lebih dahulu sebelum putiknya (Radi, 1998).

2.4.6 Buah

Buah Buah sirsak memiliki bentuk sejati berganda (agregat fruit) yaitu buah yang berasal dari satu bunga dengan banyak bakal buah tetapi membentuk satu buah. buah memiliki duri sisik halus. Apabila sudah tua daging buah berwarna putih, lembek, dan berserat dengan banyak biji berwarna coklat kehitaman (Radi, 1998).

2.4.7 Biji

Biji buah sirsak berwarna coklat agak kehitaman dan keras, berujung tumpul, permukaan halus mengkilat dengan ukuran panjang kira-kira 16,8 mm dan lebar 9,6 mm. Jumlah biji dalam satu buah bervariasi, berkisar antara 20-70

butir biji normal, sedangkan yang tidak normal berwarna putih kecoklatan dan tidak berisi (Radi, 1998).

2.4.8 Pohon

Pohon sirsak memiliki model Troll, ketinggian mencapai 8-10 meter, dan diameter batang 10-30 cm (Radi, 1998). Tanaman sirsak (*Annona muricata* Linn.) termasuk tanaman tahunan dengan sistematik sebagai berikut:

Divisi : Spermatophyta

Sub Divisio : Angiospermae

Ordo : Dicotylidoneae

Classis : Ranunculales

Familia : Annonaceae

Genus : *Annona*

Species : *Annona muricata* Linn. (Depkes RI, 2001)

2.5 Metode Penyarian

Ekstraksi atau penyarian merupakan peristiwa perpindahan massa zat aktif larut dalam cairan penyari. Pada umumnya penyarian akan bertambah baik jika permukaan serbuk simplisia yang bersentuhan dengan penyari semakin luas (Anonim, 1989). Ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua pelarut diuapkan dan

serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian sehingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (Anonim, 2000).

Metode dasar penyarian ada beberapa yaitu maserasi, perkolasi dan soxhletasi. Pemilihan dalam metode penyarian tersebut sebaiknya disesuaikan dengan kepentingan untuk memperoleh sari yang baik (Anonim, 1989).

Pemilihan metode ekstraksi juga tergantung pada sumber bahan alami dan senyawa yang akan diujikan. Oleh karena itu terdapat beberapa pilihan metode penyarian, antara lain: maserasi, boiling, sokletasi, supercritical fluid extraction, sublimasi, dan destilasi uap (Sarker et al., 2006).

Maserasi merupakan metode penyarian yang sangat sederhana dan paling banyak digunakan untuk menyari bahan obat yang berupa serbuk simplisia yang halus. Sedangkan remaserasi merupakan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama, dan seterusnya (Anonim, 2000).

2.6 Macam macam Proses Ekstraksi

Ekstraksi merupakan suatu proses pemisahan zat dan bahan padat maupun cair dengan bantuan pelarut. Pelarut yang digunakan harus dapat mengekstrak substansi yang diinginkan tanpa melarutkan material lainnya ekstraksi menggunakan pelarut didasarkan pada kelarutan komponen terhadap komponen lain dalam campuran. Salah satu teknik ekstraksi adalah menggunakan air untuk mengambil pigmen alami dari tumbuhan. Terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi laju ekstraksi suatu bahan atau zat, yaitu :

(1) Tipe persiapan sampel; (2) Waktu ekstraksi; (3) Kuantitas pelarut; (4) Suhu pelarut; dan (5) Tipe pelarut (Luthana, 2012).

Pemilihan larutan penyari harus mempertimbangkan banyak faktor. Larutan penyari yang baik harus memenuhi kriteria yaitu murah dan mudah diperoleh, stabil secara fisika dan kimia, bereaksi netral, tidak mudah menguap dan tidak mudah terbakar, tidak mempengaruhi zat berkhasiat. Larutan pengekstraksi yang digunakan disesuaikan dengan kepolaran senyawa yang diinginkan. Larutan pengekstraksi yang digunakan yaitu etanol 70% (Lifton, 2012)

Etanol adalah sejenis cairan yang mudah menguap, mudah terbakar, tak berwarna, dan merupakan alkohol yang paling sering digunakan dalam kehidupan sehari-hari. Etanol banyak digunakan sebagai pelarut berbagai bahan kimia (Lifton, 2012)

2.6.1 Prinsip Maserasi

Maserasi merupakan cara penyarian sederhana yang dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam cairan penyari selama beberapa hari pada temperatur kamar dan terlindung dari cahaya. Metode maserasi yang digunakan untuk menyari simplisia yang mengandung komponen kimia yang mudah larut dalam cairan penyari. Cairan penyari dibagi menjadi, Seluruh serbuk simplisia di maserasi dengan cairan penyari pertama, sesudah diendapkan, tuangkan dan diperas, ampas dimaserasi lagi dengan cairan penyari yang kedua. Keuntungan dari metode ini adalah peralatannya sederhana. Kerugian dari metode ini adalah waktu yang diperlukan untuk mengekstraksi sampel cukup lama, cairan penyari yang digunakan lebih banyak, tidak banyak digunakan untuk bahan-bahan yang mempunyai tekstur keras seperti benzoin, tiraks, dan lilin (Luthana, 2013)

2.6.2 Prinsip Soxhletasi

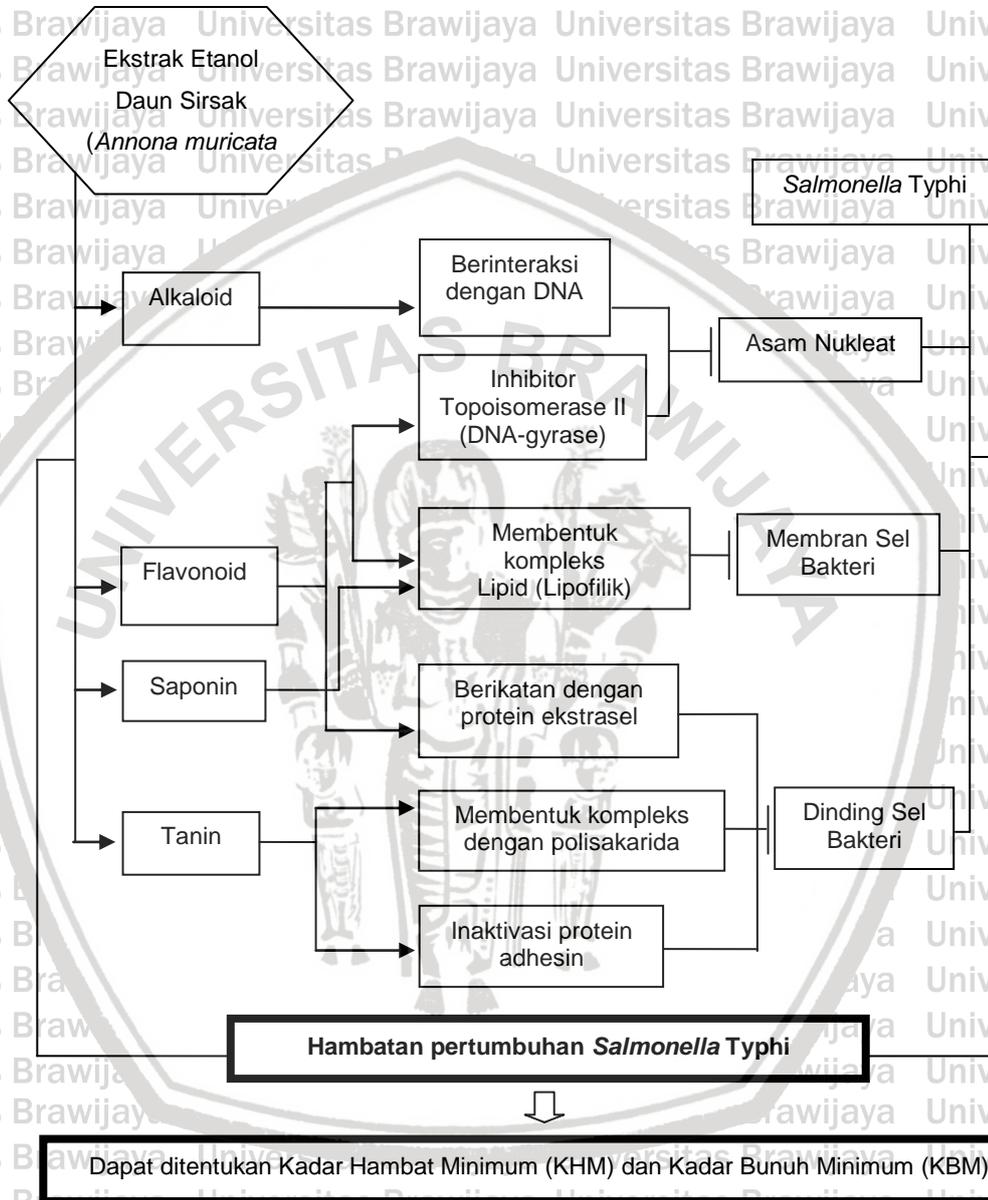
Soxhletasi merupakan penyarian simplisia secara berkesinambungan, cairan penyari dipanaskan sehingga menguap, uap cairan penyari terkondensasi menjadi molekul-molekul air oleh pendingin balik dan turun menyari simplisia dalam klongsong dan selanjutnya masuk kembali ke dalam labu alas buak setelah melewati pipa sifon (Luthana, 2013).

2.6.3 Prinsip Perkolasi

Perkolasi adalah cara penyarian dengan mengalirkan penyari melalui serbuk simplisia yang telah dibasahi. Keuntungan metode ini adalah tidak memerlukan langkah tambahan yaitu sampel padat telah terpisah dari ekstrak. Kerugiannya adalah kontak antara sampel padat tidak merata atau terbatas dibandingkan dengan metode refluks dan pelarut menjadi dingin selama proses perkolasi sehingga tidak melarutkan komponen secara efisien (Luthana, 2013).

BAB III
KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan :

— : Menghambat / merusak komponen *Salmonella Typhi*

▭ : Hasil hipotesis penelitian

◊ : Variabel yang diteliti

Ekstrak etanol Daun Sirsak mengandung beberapa senyawa yang memiliki aktivitas antibakteri yaitu saponin, flavanoid, alkaloid dan tanin. Saponin, flavanoid, dan tanin bekerja di membran sitoplasma, sedangkan alkaloid dan tanin bekerja di dinding sel. Mekanisme saponin adalah terjadinya ikatan antara saponin dengan sterol (protein bakteri) pada permukaan membran sel bakteri. Flavonoid berfungsi sebagai anti bakteri dengan cara membentuk senyawa kompleks terhadap protein ekstraseluler yang mengganggu integritas membran sel bakteri. Senyawa flavonoid diduga mekanisme kerjanya adalah mendenaturasi protein sel bakteri dan merusak membran sel bakteri tanpa dapat diperbaiki lagi. Tanin diduga dapat mengerutkan dinding sel dan membran sitoplasma sehingga mengganggu permeabilitas sel itu sendiri. Dimana sebagian besar struktur dinding sel dan membran sitoplasma bakteri mengandung protein dan lemak. Ketidakstabilan pada dinding sel dan membran sitoplasma bakteri menyebabkan fungsi permeabilitas selektif, fungsi pengangkutan aktif, pengendalian susunan protein dari sel bakteri menjadi terganggu, yang akan berakibat pada lolosnya makromolekul, dan ion dari sel. Sehingga sel bakteri menjadi kehilangan bentuknya, dan terjadilah lisis. Sedangkan alkaloid mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh. Gangguan pada struktur dinding sel dan membran sitoplasma menyebabkan ketidakmampuan sel untuk tumbuh dan menyebabkan kematian sel bakteri *Salmonella* Typhi.

Konsentrasi minimal ekstrak daun sirsak yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella* Typhi ditentukan dari KHM, konsentrasi minimal ekstrak yang dapat membunuh bakteri tersebut dapat ditentukan dari KBM.

3.2 Hipotesis

Berdasarkan kerangka konsep diatas, maka hipotesis dalam penelitian ini adalah: “ Ekstrak Etanol daun sirsak (*Annona muricata L.*) menurunkan pertumbuhan bakteri *Salmonella Typhi*”.



BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian *true eksperimental*, dengan menggunakan *post test only control*. Uji antibakteri dilakukan secara *in vitro* dengan menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol. Metode yang dipakai adalah dilusi tabung (*tube dilution test*) meliputi dua tahap, yaitu tahap pengujian bahan pada media *broth* dan tahap penanaman pada medium NAP (*Nutrient Agar Plate*) dengan metode penggoresan (*streaking*) yang bertujuan untuk menentukan KHM (kadar Hambat Minimal) dengan di amati kekeruhan pada medium cair pada tabung dan KBM (Kadar Bunuh Minimal) diamati pertumbuhan koloni pada medium padat pada plate, sehingga mengetahui efek antibakteri ekstrak daun sirsak dengan berbagai konsentrasi terhadap bakteri *Salmonella Typhi*.

4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.3 Estimasi Jumlah Pengulangan

Penelitian menggunakan 8 kelompok perlakuan konsentrasi ekstrak daun sirsak dan 1 kelompok kontrol sehingga ada 9 kelompok. Berdasarkan rumus berikut p adalah jumlah perlakuan dan n adalah jumlah pengulangan, maka:

$P(n-1) \geq 15$ (Lukito, 2001).

$6(n-1) \geq 15$

$6n-7 \geq 15$

$7n \geq 22$

$n \geq 3,14 = 4$

Keterangan :

p = jumlah perlakuan , n=jumlah sampel (isolat bakteri), 15= nilai konstanta

Dari hasil perhitungan di atas, maka diperlukan 4 isolat *Salmonella Typhi*. Jumlah setiap sampel 10^6 CFU/ ml bakteri *Salmonella Typhi*.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah kosentrasi ekstrak daun sirsak.

4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah jumlah koloni bakteri *Salmonella Typhi*.

4.5 Definisi Operasional

1. Daun sirsak (*Annona muricata L.*) yang digunakan dalam penelitian ini dibeli dari Balai Materia Medika dikota Batu, Malang, Jawa Timur dalam bentuk serbuk.

2. Ekstrak daun sirsak adalah ekstrak cair dari daun sirsak yang diekstrak menggunakan pelarut 96% melalui proses maserasi dan evaporasi untuk menghilangkan pelarut etanol.

3. Kosentrasi ekstrak daun sirsak yang digunakan dalam penelitian ini
konsetrasi I sampai VIII yaitu :

0.6%, 0.5%, 0.4%, 0.3%, 0.2%, 0.1%, 0%.

4. Isolat bakteri *Salmonella* Typhi diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi
Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang berasal dari darah
penderita tifoid .

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Alat dan Bahan untuk Pewarnaan Gram Bakteri

Alat yang digunakan untuk pewarnaan gram bakteri antara lain ose lurus,
ose lengkung, kertas penghisap, minyak emersi, gelas obyek, mikroskop, tabung
reaksi, dan lampu spiritus. Bahan yang digunakan adalah isolat bakteri *Salmonella*
Typhi (Pewarnaan gram : kristal violet, lugol, alkohol 96 %, safranin), Medium
perbenihan BSA Agar.

4.6.2 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Daun Sirsak

Alat yang digunakan dalam pembuatan ekstrak daun sirsak antara lain:
Blender untuk menghaluskan daun sirsak kering, saringan serbuk 90mass,
tabung ekstraktor, timbangan untuk mengukur berat serbuk daun sirsak, kertas
saring whatman no. 40 untuk pemyaringan daun sirsak yang direndam dengan
etanol 96%, Labu destilasi, pendingin spiral, *vacum*, *water pump*, evaporator, bak
untuk menampung akuades, selang plastik, vacuum oven untuk evaporasi serta
menghilangkan sisa pelarut. Bahan yang digunakan dalam pembuatan ekstrak
daun sirsak antara lain daun sirsak , etanol 96%, dan aquades.

4.7 Rancangan Operasional Penelitian

4.7.1 Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat dilakukan dengan:

- a. Mencuci semua alat dengan sabun hingga bersih dan membiarkannya hingga kering.
- b. Alat-alat yang bisa disterilasi dalam autoklaf dibungkus dengan kertas roti dan dimasukkan dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 atm, selama 15 menit. Sedangkan alat-alat yang tidak bisa disterilasi dengan autoklaf disterilkan dengan alkohol 70%.

4.7.2 Pembuatan Ekstrak Daun Sirsak

- a. Daun sirsak diambil yang segar dan berwarna hijau sebanyak 1 kg, dicuci dengan air mengalir, ditiriskan sampai air hilang, kemudian dijemur dalam ruangan penjemuran terdapat sinar matahari menjadi sumber panas selama kira-kira 3 hari untuk memperoleh daun sirsak yang kering.
- b. Menggiling daun sirsak kering dengan ukuran ayakan 90 mesh.
(Prosedur pembuatan serbuk daub sirsak berdasarkan metode di Balai Materi Batu, Malang, Jawa Timur).
- c. Serbuk daun sirsak ditimbang seberat 200 gram. Kemudian direndam dengan etanol 96% dalam wadah beker glass dengan perbandingan 1:3 (1kg bahan 3 liter pelarut etanol 96%).
- d. Merendam bahan dan mendinginkan pada suhu kamar selama minimal 2x24 jam dengan sesekali diaduk. Setelah 2x24 jam, rendaman dalam baker glass tersebut disaring.

e. Menyaring bahan larutan dengan menggunakan kertas saring whatman no.40, ditampung dalam elemenyer glass.

f. Larutan di evaporasi untuk menghilangkan sisa pelarut etanol 96% dengan menggunakan vacuum oven 40-50 C.

g. Melakukan pengovenan kembali untuk menghilangkan sisa pelarut yang tersisa dengan vacuum oven dengan suhu 40-50 C sehingga benar-benar tidak mengandung pelarut etanol.

(Prosedur pembuatan ekstrak etanol daun sirsak berdasarkan metode maserasi di Teknik Kimia Polinema Malang, Jawa Timur).

4.7.3 Identifikasi Bakteri *Salmonella Typhi*

4.7.3.1 Pewarnaan Gram

Prosedur pengecatan gram :

a. Bersihkan gelas obyek dengan kapas dan lewatkan di atas api kemudian biarkan dingin

b. Satu ose aquades steril ditetaskan pada gelas obyek, kemudian diambil sedikit bakteri untuk disuspensikan dengan aquades yang telah diletakkan di atas gelas obyek. Kemudian dibiarkan kering di udara.

c. Suspensi bakteri yang telah kering difiksasi dengan cara melewatkannya di atas api beberapa kali dan sediaan siap diwarnai

d. Sediaan ditetesi dengan kristal violet dan ditunggu selama 1 menit. Kemudian kristal violet dibuang dan dibilas dengan air perlahan-lahan.

e. Sediaan ditetesi dengan lugol dan ditunggu selama 1 menit, lalu lugol tersebut dibuang dan dibilas dengan air.

f. Sediaan ditetesi dengan alkohol 96% dan ditunggu 5-10 detik, kemudian alkohol dibuang dan dibilas dengan air.

g. Sediaan ditetesi dengan safranin dan ditunggu selama 1/2 menit, kemudian safranin dibuang dan dibilas dengan air.

h. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap dan siap untuk dilihat di bawah mikroskop.

i. Setelah kering, mengamati dibawah mikroskop dengan lensa obyektif perbesaran 1000x.

j. Mengamati bakteri *Salmonella Typhi* di bawah mikroskop berupa bakteri basil (batang) Gram negatif.

4.7.3.2 Penanaman Pada BSA (Bismuth Sulfite Agar)

Penanaman bakteri pada Bismuth Sulfite Agar (BSA) merupakan media selektif terhadap pertumbuhan *Salmonella Typhi*. Penanaman bakteri pada media tersebut didapatkan gambaran *black jet colony* (terbentuknya koloni hitam) yang merupakan gambaran khas dari *Salmonella Typhi* (Vaishnavi, 2013).

Prosedur indentifikasi bakteri pada medium BSA :

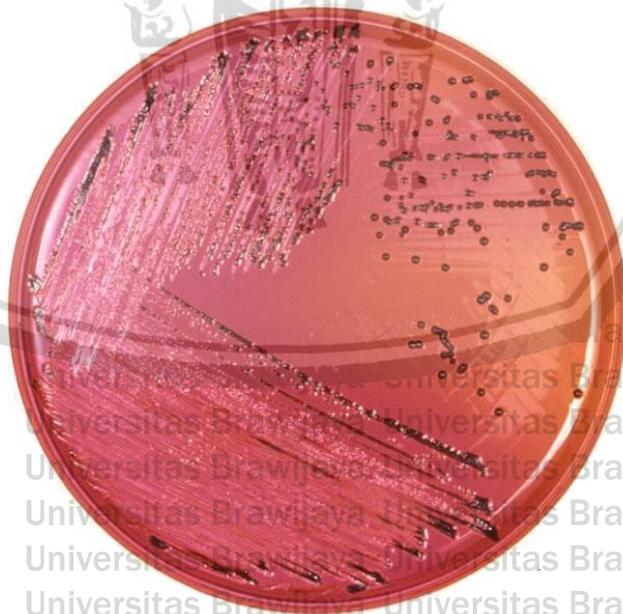
1. Menginokulasikan bakteri *Salmonella Typhi* dengan metode streaking pada medium Bismuth Sulfite Agar (BSA).

2. Menginkubasikan sediaan pada inkubator dengan suhu 37°C selama 18-24 jam dan mengamati hasilnya.

3. Koloni bakteri *Salmonella Typhi* pada medium BSA menghasilkan gambaran *black jet colony* (koloni berwarna hitam).



Gambar 4.1 Koloni *black jet* pada medium BSA



Gambar 4.2 Kultur *Salmonella Typhi* pada *macconkey* agar

4.7.3.3 Uji Biokimiawi Bakteri dengan Microbact 12 A

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

1. Menentukan hasil tes oksidase bakteri yang akan diuji untuk menentukan set microbact yang akan digunakan.
2. Menginkubasi koloni bakteri selama 18- 24 jam.
3. Mengambil koloni menggunakan ose kemudian dilarutkan kedalam 3- 6 ml gram fisiologis pada tabung reaksi steril hingga homogen.
4. Membuka penutup lubang microplate. Memasukkan 4 tetes suspensi bakteri ke dalam masing-masing lubang plate.
5. Memasukkan 2 tetes mineral oil (MB1093A) ke dalam lubang plat hitam.
6. Menutup kembali semua lubang plate, kemudian diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
7. Mengeluarkan microplate dari inkubator, kemudian menambahkan reagen yang diperlukan.
8. Hasil uji Microbact dapat diinterpretasikan menggunakan program tertentu yang telah disertakan dalam paket microbact.

4.7.4 Pembuatan Perbenihan Cair Bakteri

Setelah dipastikan bakteri tersebut merupakan *Salmonella Typhi*, maka selanjutnya bakteri tersebut dipindahkan dalam tabung yang berisi nutrient broth dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C

Kemudian perbenihan cair bakteri dinilai absorbansinya dengan spektrofotometer pada gelombang cahaya 540 nm. Dari nilai absorbansi dapat diperkirakan jumlah kuman pada perbenihan cair dengan kalibrasi yang sudah diketahui yaitu absorbansi optical density = OD 0,1 ekuivalen dengan jumlah bakteri sebesar 10⁸ CFU/ml (Murray, 2001). Misalnya didapatkan absorbansi 0,5; maka untuk mendapatkan suspensi dengan jumlah kuman 10⁸ CFU/ml sebanyak 10 ml dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$N1 \times V1 = N2 \times V2$$

$$0,5 \times V1 = 0,1 \times 1$$

$$V1 = 1/0,5$$

$$V1 = 2$$

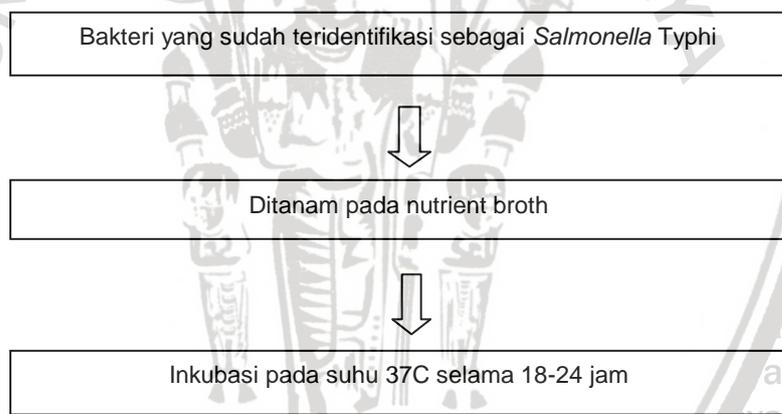
N1 sama dengan nilai absorbansi yang didapat sedangkan N2 adalah absorbansi 0,1 yang ekuivalen dengan jumlah kuman 10⁸ CFU/mL. V adalah volume suspensi bakteri. Jadi, menurut perhitungan di atas, untuk mendapatkan suspensi dengan kepadatan 10⁸ CFU/mL sebanyak 10 ml dibutuhkan 2 ml suspensi awal untuk dicampur dengan 8 ml nutrient broth sebagai pengencer.

Setelah didapatkan perbenihan cair dengan jumlah bakteri 10^8 CFU/ml, dilakukan pengenceran dengan menggunakan nutrient broth sampai didapatkan perbenihan cair dengan jumlah bakteri 10^6 CFU/ml.

4.7.5 Uji Ekstrak Etanol Daun Sirsak Terhadap Bakteri *Salmonella* Typhi

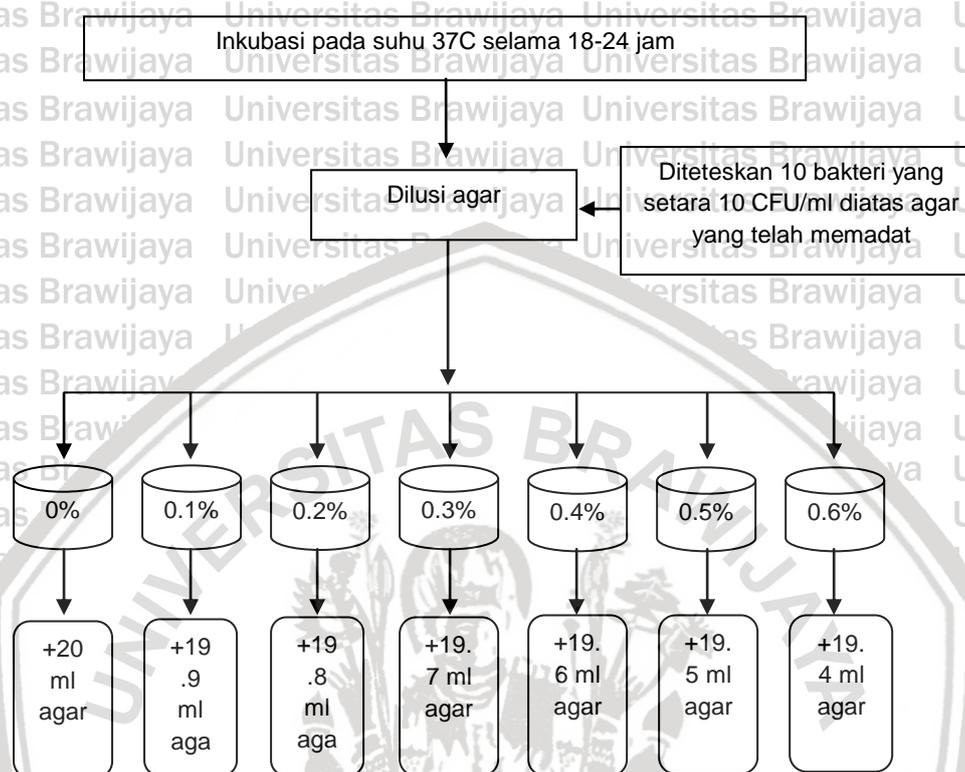
Metode yang digunakan untuk tes ini adalah metode dilusi agar. Pada penelitian ini diperlukan kadar beberapa macam konsentrasi ekstrak daun sirsak untuk dicampurkan atau diinokulasi dengan perbenihan cair bakteri *Salmonella* Typhi. Proses selanjutnya adalah inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C .

Hari ke-1 :



Gambar 4.2 Preparasi Bakteri Uji Hari Pertama

Hari ke-2:



Gambar 4.3 Perlakuan Pada Hari ke Dua

4.7.6 Pengumpulan Data

Data yang digunakan adalah data kualitatif dari hasil pertumbuhan koloni *Salmonella* Typhi pada agar plate yang telah diinkubasikan pada suhu 37 C selama 18-24 jam berupa data konsentrasi ekstrak etanol daun sirsak dan pertumbuhan koloni bakteri.

4.7.7 Analisa Data

Analisis data yang digunakan adalah uji statistik non parametrik dikarenakan data hasil penelitian berupa data ordinal. Uji statistik Kruskal Wallis untuk mengetahui perbedaan pengaruh dari berbagai konsentrasi etanol ekstrak

daun sirsak terhadap *Salmonella* Typhi sehingga dapat disimpulkan apakah ekstrak etanol daun sirsak mempunyai pengaruh antibakteri yang signifikan terhadap *Salmonella* Typhi, Uji Mann Whitney yang digunakan untuk mengetahui perbedaan pengaruh pemberian ekstrak etanol daun sirsak sebagai antibakteri terhadap *Salmonella* Typhi pada setiap konsentrasi yang diberikan, dan uji Korelasi Spearman untuk mengetahui besarnya keerataan hubungan pemberian perlakuan terutama yang disebabkan oleh pemberian ekstrak etanol daun sirsak dengan pertumbuhan koloni bakteri *Salmonella* Typhi.

Dalam penelitian Analisis statistik dilakukan pada taraf kepercayaan 95% ($\alpha=0.05$).



BAB V

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian

Pembuatan ekstrak etanol daun sirsak dilakukan di Laboratorium

Farmakologi Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang, Jawa Timur.

Ekstraksi etanol daun sirsak menggunakan metode maserasi dengan pelarut

etanol menghasilkan hasil ekstrak berwarna hijau tua sebagaimana terlampir

pada Gambar 5.1. Ekstrak etanol daun sirsak berbentuk liquid dan tidak dapat

tercampur homogen jika hanya dilarutkan dengan aquades sehingga dibutuhkan

emulgator agar dapat larut dalam aquades. Sebanyak 200 gram serbuk daun

sirsak dapat menghasilkan ekstrak cair sebanyak 25 ml.



Gambar 5.1 Hasil Ekstrak Etanol Daun Sirsak

Penelitian ini menggunakan isolat bakteri *Salmonella Typhi* yang telah disediakan oleh laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas

Brawijaya. Sebelum melakukan uji efektivitas antibakteri, terlebih dahulu

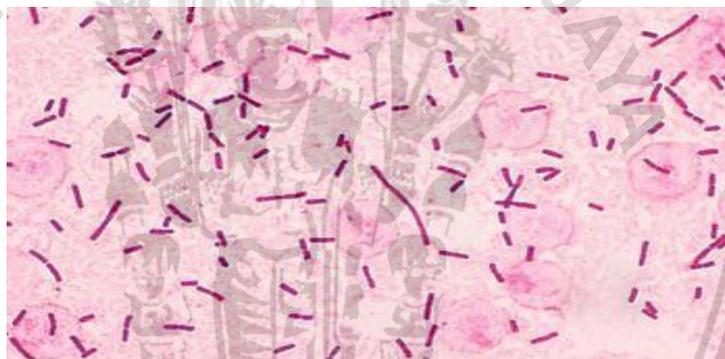
dilakukan identifikasi bakteri *Salmonella Typhi* yang tersedia di Laboratorium

Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. *Salmonella* Typhi yang digunakan adalah hasil isolat yang berjenis dari pasien yang terinfeksi *Salmonella*

Typhi dari Malang. Identifikasi bakteri dilakukan melalui 4 tahap, yaitu:

- Pewarnaan Gram
- Kultur pada Medium Bismuth Sulfite Agar (BSA)
- Tes Microbact 12

Tahap pertama adalah Pewarnaan Gram. Dari Perwarnaan Gram, diperoleh hasil batang Gram negatif yang ditandai dengan warna merah pada bakteri (Gambar 5.1.2).



Gambar 5.1.2 Gambaran Mikroskopik Bakteri *Salmonella* Typhi (perbesaran 1000x, berbentuk batang, Gram negatif)

Tahap kedua adalah penanaman pada medium *Bismuth Sulfite Agar* (BSA), pada medium BSA, *Salmonella* Typhi akan memberikan karakteristik koloni khas, yaitu adanya koloni berwarna hitam (*Black Jet Colony*) oleh karena *S.*Typhi menghasilkan H_2S (Gambar 5.1.3).



Gambar 5.1.3 Bakteri *Salmonella Typhi* pada Medium *Bismuth Sulphite Agar* (Koloni berwarna hitam atau *Black Jet Colony*), hasil *streaking* ditunjukkan dengan panah.

Tahap ketiga adalah test Microbact 12A. Pada tes ini, *Salmonella Typhi* memberikan hasil positif pada lysin, ornitin, glukosa, H₂S, manitol, xylose, urease, dan citrat. Test microbact 12A memberikan hasil negatif pada ONPG, indole, voges-proskauer serta TDA (Gambar 5.1.4).

OXOID MICROBACT™ IDENTIFICATION KEYS		MICROBACT™ GNB 12A/B/E, 24E																										
		GNB 12A / 12E										GNB 24E			GNB 12B													
Oxidase	Motility	Nitrate	Lysine	Ornithine	H ₂ S	Glucose	Manitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	V-P	Citrate	TDA	Gelatin	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Sialicin	Arginine		
			+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1		
Sum / Suma / Summe / Somme / Soma / Σ			7			7			2																			
Identification / Identificación / Identifikation / Identificazione / Identificação / Identifizierung / Identification / Ταυτοποίηση		<i>Salmonella typhi</i> 98.601																										

Gambar 5.1.4 Hasil Tes Microbact 12A *Salmonella Typhi*

Dari Gambar 5.4 merupakan Test Microbact 12A didapatkan bahwa tingkat kemurnian bakteri *Salmonella Typhi* sebesar 98,60%. Faktor yang menyebabkan tidak 100% adalah suhu, tekanan osmosis, kadar oksigen, dan kadar air.

5.1.1 Hasil Penelitian Pendahuluan

Pada penelitian ini dilakukan sebanyak dua kali penelitian pendahuluan.

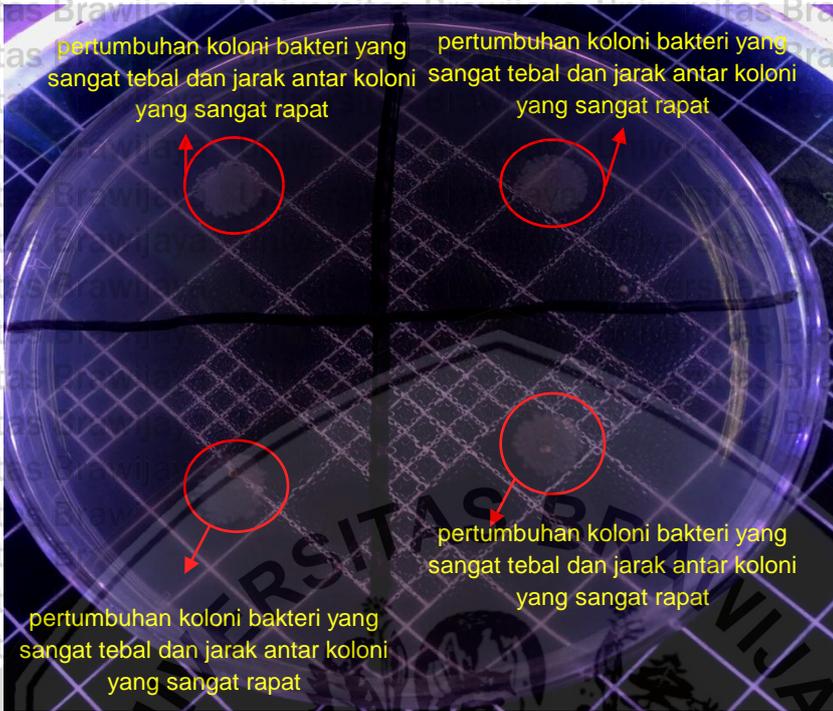
Penelitian pendahuluan yang pertama adalah uji antimikroba ekstrak etanol daun sirsak menggunakan metode sumuran (*well diffusion*) dengan konsentrasi 100%; 50%; 25%; 12,5%; 6%; 3%; dan 0%. Hasil dari uji efek antimikroba dengan metode sumuran adalah tidak terlihat adanya efek yang ditimbulkan dari ekstrak etanol daun sirsak terhadap pertumbuhan *Salmonella Typhi* yang ditunjukkan dengan tidak adanya zona hambat atau inhibisi (Lampiran 2). Hal ini terjadi kemungkinan oleh karena besarnya ukuran partikel senyawa yang terdapat dalam ekstrak etanol daun sirsak sehingga menyulitkan senyawa untuk berdifusi ke sekitar area sumuran dan menyebabkan tidak tampaknya zona inhibisi.

Penggantian metode adalah alternatif untuk mengatasi hal tersebut, metode uji efek antimikroba dengan sumuran (*well diffusion*) diganti dengan metode dilusi agar. Penelitian pendahuluan yang ke-2 uji efek antimikroba menggunakan ekstrak yang pertama dengan konsentrasi 0%, 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25%. Hasil dari penelitian pendahuluan menunjukkan pada konsentrasi 0% terdapat pertumbuhan koloni yang sangat tebal dengan jarak yang sangat padat dan pada konsentrasi 5% masih terdapat pertumbuhan koloni bakteri yang tipis dan jarak antara koloni yang renggang.

Sedangkan pada konsentrasi 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25% sudah tidak didapati pertumbuhan bakteri *Salmonella Typhi*. Sehingga dibuatlah konsentrasi 0%, 2%, 3%, 4%, 6%, dan 7% sebagai penelitian utama.

5.1.2 Hasil Penelitian Utama

Pada penelitian ini menggunakan ekstrak etanol daun sirsak dengan konsentrasi 0%, 2%, 3%, 4%, 6%, dan 7%. Pengamatan hasil pada penelitian ini dilakukan dengan melihat secara langsung pertumbuhan koloni bakteri setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C pada masing-masing *plate* dengan konsentrasi yang sudah ditentukan dan berisi campuran media *Nutrient Agar* dengan ekstrak etanol daun sirsak. Berikut ini merupakan hasil pertumbuhan koloni bakteri pada beberapa konsentrasi ekstrak etanol daun sirsak dengan media *Nutrient Agar* setelah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Konsentrasi 0%, 2%, 3%, 4%, 6%, dan 7% diperoleh dari penelitian pendahuluan. Pada penelitian pendahuluan konsentrasi 10% sudah tidak didapatkan pertumbuhan koloni (Lampiran 2). Sehingga dengan membuat konsentrasi 0%, 2%, 3%, 4%, 6%, dan 7% diharapkan ada nilai KHM (Kadar Hambat Minimum) pertumbuhan koloni bakteri *Salmonella Typhi*.



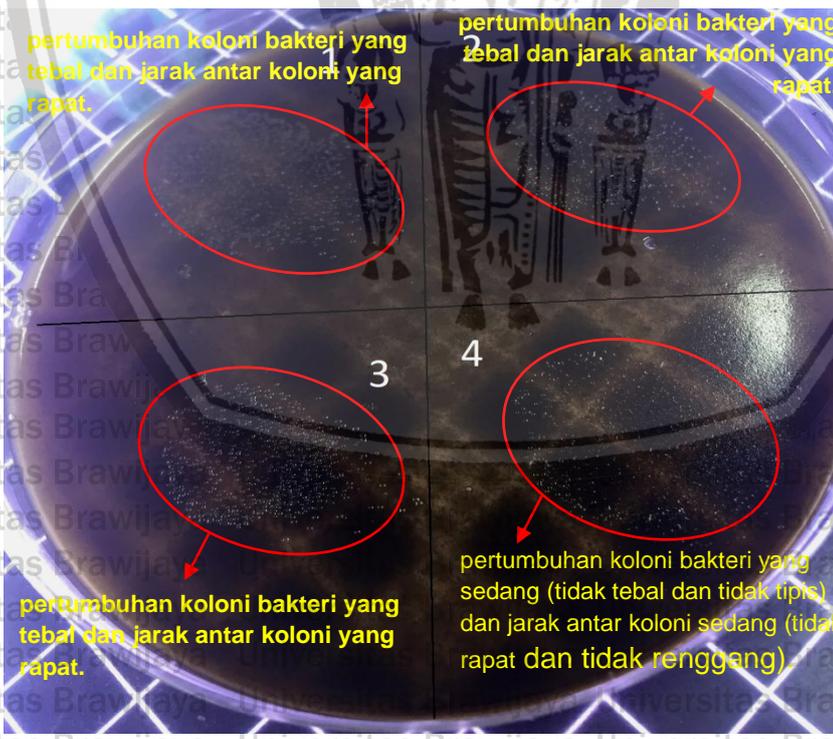
pertumbuhan koloni bakteri yang sangat tebal dan jarak antar koloni yang sangat rapat

pertumbuhan koloni bakteri yang sangat tebal dan jarak antar koloni yang sangat rapat

pertumbuhan koloni bakteri yang sangat tebal dan jarak antar koloni yang sangat rapat

pertumbuhan koloni bakteri yang sangat tebal dan jarak antar koloni yang sangat rapat

Konsentrasi 0%



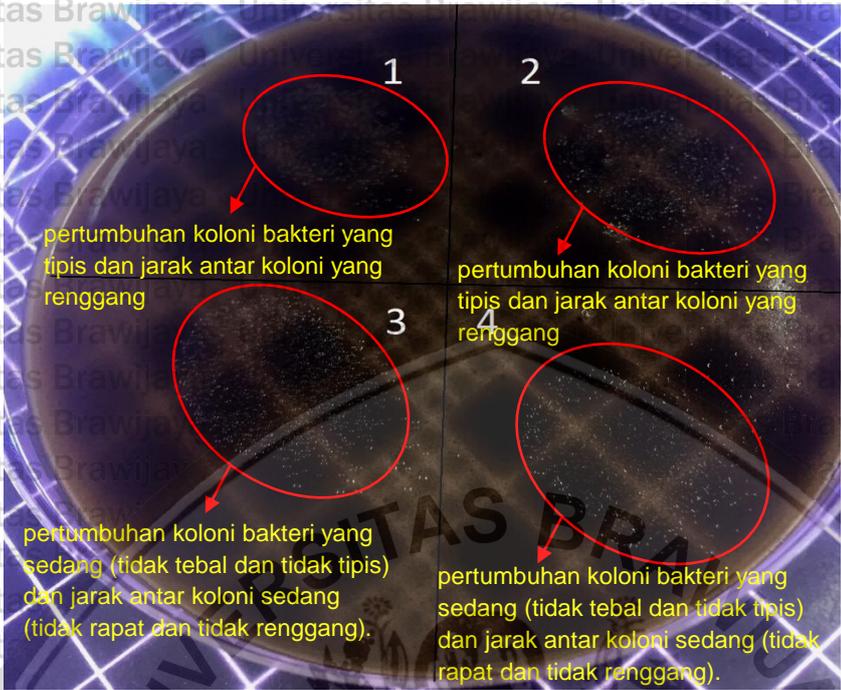
1 pertumbuhan koloni bakteri yang tebal dan jarak antar koloni yang rapat.

2 pertumbuhan koloni bakteri yang tebal dan jarak antar koloni yang rapat.

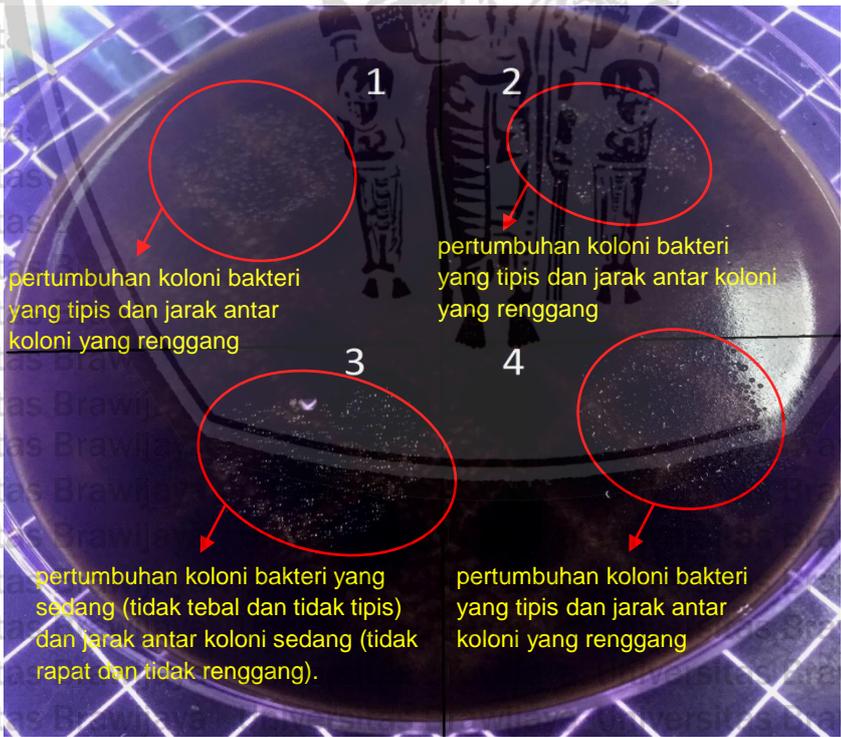
3 pertumbuhan koloni bakteri yang tebal dan jarak antar koloni yang rapat.

4 pertumbuhan koloni bakteri yang sedang (tidak tebal dan tidak tipis) dan jarak antar koloni sedang (tidak rapat dan tidak renggang).

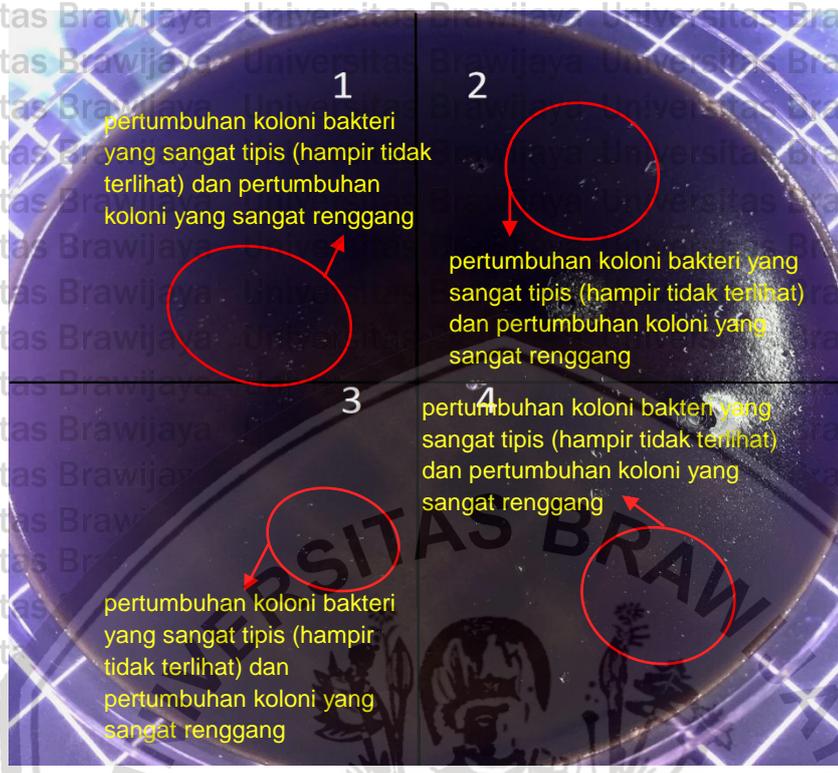
Konsentrasi 2%



Konsentrasi 3%



Konsentrasi 4%



Konsentrasi 6 %



Konsentrasi 7%

Gambar 5.5 Hasil Uji Antimikroba dengan Metode Dilusi Agar

Berdasarkan gambar 5.5, pertumbuhan koloni semakin berkurang pada setiap kenaikan konsentrasi dari ekstrak etanol daun sirsak dan tidak terlihat pada konsentrasi 7%. Penilaian Kadar Hambat Minimum (KHM) dilakukan dengan melihat konsentrasi terendah dari antimikroba yang mampu menghambat pertumbuhan koloni bakteri. Penilaian ini dilakukan dengan melihat secara langsung dengan mata telanjang pada media *Nutrient Agar* yang telah ditanam bakteri uji dan diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Penilaian secara langsung diinterpretasikan melalui sistem *skoring*. Konsentrasi ekstrak yang memiliki skor nol (0) pada seluruh pengulangan merupakan KHM. Hasil pengulangan dapat diamati pada tabel 5.2 .

Tabel 5.2 Hasil Skoring dari Pertumbuhan Koloni *Salmonella Typhi* Setelah Pemberian Ekstrak dengan Beberapa Konsentrasi

No	Konsentrasi	Pengulangan				Rerata Skor
		I	II	III	IV	
1	0%	+5	+5	+5	+5	5
2	2%	+4	+4	+4	+3	3,7
3	3%	+2	+2	+3	+3	2,5
4	4%	+2	+2	+3	+2	2,25
5	6%	+1	+1	+1	+1	1
6	7%	0	0	0	0	0

Keterangan:

- +5 = terdapat pertumbuhan koloni bakteri yang sangat tebal dan jarak antar koloni yang sangat rapat.
- +4 = terdapat pertumbuhan koloni bakteri yang tebal dan jarak antar koloni yang rapat.
- +3 = terdapat pertumbuhan koloni bakteri yang sedang (tidak tebal dan tidak tipis) dan jarak antar koloni sedang (tidak rapat dan tidak renggang).
- +2 = terdapat pertumbuhan koloni bakteri yang tipis dan jarak antar koloni yang renggang.
- +1 = terdapat pertumbuhan koloni bakteri yang sangat tipis (hampir tidak terlihat) dan pertumbuhan koloni yang sangat renggang.
- 0 = tidak terdapat pertumbuhan koloni fungi.

Pertumbuhan koloni *Salmonella* Typhi pada konsentrasi 2% mulai berkurang atau menurun. Pada konsentrasi 7% dari ekstrak etanol daun sirsak merupakan nilai KHM, pada konsentrasi ini tidak terlihat pertumbuhan koloni dari bakteri *Salmonella* Typhi yang telah dilakukan empat kali pengulangan. Pada konsentrasi ekstrak 7% terdiri dari 0,7 ml ekstrak etanol daun sirsak yang dicampurkan dengan NA sebanyak 9,3 ml.

5.2 Analisis Data

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek ekstrak etanol daun sirsak terhadap pertumbuhan *Salmonella* Typhi secara invitro dengan metode dilusi agar. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah beberapa konsentrasi ekstrak etanol daun sirsak. Pertumbuhan koloni bakteri *Salmonella* Typhi pada penelitian ini digunakan sebagai variabel terikat. Hasil penilaian diinterpretasikan berdasarkan sistem skoring (+5, +4, +3, +2, +1, 0).

Hasil penelitian dinilai dengan cara pengamatan secara langsung dan uji statistik. Pada penelitian ini merupakan data ordinal sehingga menggunakan analisis data berupa uji nonparametrik. Data ordinal dari penelitian ini adalah variabel penelitian berupa tingkat pertumbuhan koloni bakteri. Uji nonparametrik yang dilakukan meliputi uji *Kruskal Wallis*, uji *post hoc Mann-Whitney*, dan uji *Spearman*.

5.2.1 Uji *Kruskal Wallis*

Uji *Kruskal Wallis* berupa nonparametrik. Uji ini dilakukan untuk mengetahui perbedaan beberapa konsentrasi ekstrak etanol daun sirsak terhadap pertumbuhan koloni fungi. Hipotesis yang dibuat berdasarkan data

yang ada adalah H_0 dan H_1 . Makna H_0 dalam uji statistik ini adalah tidak terdapat perbedaan efek antibakteri pada setiap pemberian ekstrak etanol daun sirsak dalam beberapa konsentrasi terhadap pertumbuhan koloni bakteri *Salmonella Typhi*. Makna H_1 dalam uji statistik ini adalah terdapat perbedaan efek antibakteri pada setiap pemberian ekstrak etanol daun sirsak dalam beberapa konsentrasi terhadap pertumbuhan koloni bakteri *Salmonella Typhi*. Hasil H_0 diterima jika nilai signifikansi lebih dari 0,05 ($p > 0,05$) dan ditolak jika nilai signifikansi kurang dari 0,05 ($p < 0,05$). Hasil uji *Kruskal Wallis* dapat diamati pada Tabel 5.3.

Tabel 5.3 Hasil Analisis Uji *Kruskal Wallis*

<i>Kruskal Wallis</i>	
Chi-Square	22,082
Probabilitas	0,001

Tabel 5.3, merupakan hasil analisis uji *Kruskal Wallis*. Nilai signifikansi yang didapat melalui uji ini adalah 0,001. Nilai signifikansi sebesar 0,001 ini mempunyai arti bahwa H_0 ditolak dan H_1 diterima. Hal ini dikarenakan nilai 0,001 adalah kurang dari 0,05. Kesimpulan yang dapat ditarik melalui hasil analisis uji *Kruskal Wallis* adalah terdapat perbedaan efek antibakteri pada setiap pemberian ekstrak etanol daun sirsak dalam beberapa konsentrasi terhadap pertumbuhan koloni *Salmonella Typhi*.

5.2.2 Uji *Mann-Whitney*

Uji analisis *post hoc* untuk uji *Kruskal Wallis* adalah uji *Mann-Whitney*. Uji *Mann-Whitney* merupakan uji komparasi berganda (*multiple comparison*). Uji ini dilakukan untuk mengetahui signifikan atau tidak, perbedaan yang didapatkan dari perbandingan setiap dua konsentrasi ekstrak. Metode ini dilakukan dengan cara

membandingkan hasil pertumbuhan koloni *Salmonella Typhi* pada pemberian dua konsentrasi ekstrak etanol daun sirsak yang berbeda.

Tabel 5.4 Ringkasan Hasil Uji *Mann-Whitney*

Perbandingan Antarperlakuan		Sig.
0%	2%	0,029
	3%	0,029
	4%	0,029
	6%	0,029
	7%	0,029
2%	3%	0,029
	4%	0,029
	6%	0,029
	7%	0,029
3%	4%	0,686
	6%	0,029
	7%	0,029
4%	6%	0,029
	7%	0,029
6%	7%	0,029

Tabel 5.4, merupakan ringkasan hasil uji *Mann-Whitney* dari tabel hasil uji *Mann-Whitney* yang terlampir. Perbedaan antar dua konsentrasi ekstrak yang berbeda dikatakan berbeda signifikan jika nilai signifikansi kurang dari 0,05 ($p < 0,05$) dan tidak berbeda signifikan jika nilai signifikansi lebih dari 0,05 ($p > 0,05$).

Interpretasi dari hasil uji *Mann-Whitney* yang dapat dilihat pada tabel ringkasi di atas adalah sebagai berikut:

1. Pertumbuhan koloni bakteri *Salmonella Typhi* pada konsentrasi 0% berbeda signifikan terhadap konsentrasi 2%, 3%, 4%, 6%, dan 7%.
2. Pertumbuhan koloni bakteri *Salmonella Typhi* pada konsentrasi 2% berbeda signifikan terhadap konsentrasi 3%, 4%, 6%, dan 7%.

3. Pertumbuhan koloni bakteri *Salmonella Typhi* pada konsentrasi 3% berbeda signifikan terhadap konsentrasi 6% dan 7%, dan tidak berbeda signifikan terhadap konsentrasi 4%.
4. Pertumbuhan koloni bakteri *Salmonella Typhi* pada konsentrasi 4% berbeda signifikan terhadap konsentrasi 6% dan 7%.
5. Pertumbuhan koloni bakteri *Salmonella Typhi* pada konsentrasi 6% berbeda signifikan terhadap konsentrasi 7%.

5.2.3 Uji Spearman

Uji *Spearman* merupakan uji korelasi yang dilakukan jika data berupa nonparametrik. Uji ini dilakukan untuk mengetahui hubungan antara pemberian ekstrak etanol daun sirsak dalam beberapa konsentrasi terhadap pertumbuhan koloni bakteri *Salmonella Typhi* (tabel 5.5). Uji ini juga dilakukan untuk mengetahui arah hubungan tersebut.

Koefisiensi Korelasi	Probabilitas
-0,972	0,000

Tabel 5.5 Hasil Uji Spearman

Uji variabel dikatakan mempunyai hubungan signifikan jika nilai signifikansi kurang dari 0,05 ($p < 0,05$). Nilai signifikansi dari hasil uji *Spearman* yaitu 0,000. Hal ini mempunyai arti bahwa terdapat hubungan yang signifikan antara pemberian ekstrak daun sirsak dalam beberapa konsentrasi terhadap pertumbuhan koloni *Salmonella Typhi*.

Nilai koefisien korelasi dari hasil uji Spearman yaitu -0,972. Tanda negatif pada koefisien tersebut mempunyai arti bahwa arah hubungannya adalah berkebalikan. Arah hubungan berkebalikan diartikan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol daun sirsak yang diberikan, maka pertumbuhan bakteri *Salmonella Typhi* semakin menurun.



BAB VI

PEMBAHASAN

6.1 Hasil Identifikasi

Tujuan dilakukannya penelitian eksperimental ini adalah untuk mengetahui adanya efek antimikroba ekstrak daun sirsak (*Annona muricata L*) terhadap bakteri *Salmonella Typhi* secara in vitro. Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode dilusi agar. Metode tersebut digunakan untuk dapat menentukan pada konsentrasi berapa ekstrak daun sirsak dapat menghambat pertumbuhan *Salmonella Typhi*. Metode ini digunakan untuk mengetahui KHM (Kadar Hambat Minimum), penentuan KHM dilakukan dengan membandingkan pertumbuhan koloni bakteri *Salmonella Typhi* yang diinokulasikan pada medium dilusi agar pada temperature 37 C selama 18-20 jam. Pada metode ini (Kadar Bunuh minimal) KBM tidak dapat ditentukan.

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 *Salmonella Typhi*.

Penamaan bakteri pada media tersebut didapatkan gambaran Black Jet Colony yang merupakan gambaran khas dari *Salmonella* Thypii. Hasil uji Microbact dapat diinterpretasikan menggunakan program tertentu yang telah disertakan dalam paket Microbact. Pada tes ini, *Salmonella*.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 Daun Sirsak

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun sirsak (*Annona muricata* L). Ekstrak daun sirsak dibuat dengan cara mengekstrak daun sirsak 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 daun sirsak (*Annona muricata* L). Ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L) 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 dilusi agar untuk membuktikan bahwa ekstrak daun sirsak

(*Annona muricata* L) dapat menghambat pertumbuhan koloni bakteri *Salmonella* Typhi. Daun sirsak kini didapatkan di Matreria Medika Batu, sedangkan proses pengekstraksannya dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Banyaknya bubuk daun sirsak yang digunakan adalah 200 gram. Ekstrak daun sirsak sendiri memiliki bahan aktif seperti alkaloid, saponin, tannin, polifenol dan flavonoid yang dapat digunakan sebagai antimikroba (Nogota, et al., 2006).

Bahan aktif dalam ekstrak daun sirsak 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 bakteriolisis (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). Flavonoid berfungsi sebagai anti bakteri dengan cara membentuk senyawa kompleks

terhadap protein ekstraseluler yang mengganggu integritas membran sel bakteri.

Senyawa flavonoid diduga mekanisme kerjanya adalah mendenaturasi protein sel bakteri dan merusak membran sel bakteri tanpa dapat diperbaiki lagi (Melderer, 2008).

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

Konsentrasi ekstrak daun sirsak yang digunakan dalam penelitian ini adalah 2%, 3%, 4%, 6%, 7%, dan 0% sebagai kontrol negatif. Konsentrasi tersebut ditentukan berdasarkan penelitian pendahuluan yang telah dilakukan. Langkah penelitian selanjutnya adalah menguji aktivitas antimikroba ekstrak daun sirsak terhadap *Salmonella Typhi* dengan menentukan nilai KHM pada penelitian ini menggunakan metode dilusi agar. Pada metode ini setiap konsentrasi antibakteri dicampurkan pada media agar padat (NAP), sedangkan bakteri ditetaskan pada permukaan agar pada sejumlah 0.01 ml atau 10 ul.

Dari hasil pengamatan didapatkan bakteri tidak tumbuh dikonsentrasi 7% pada keempat isolate. Berdasarkan penilaian secara deskriptif menurut penilaian kualitatif terhadap pertumbuhan koloni bakteri *Salmonella Typhi* yang dihasilkan pada medium agar, maka dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun sirsak mempunyai efek sebagai antibakteri terhadap bakteri *Salmonella Typhi* dibandingkan dengan kelompok kontrol (konsentrasi 0%). Data-data dari pertumbuhan koloni yang didapat dalam penelitian ini kemudian dilakukan uji

statistik dengan menggunakan Uji Kruskal Wallis, Uji Mann Whitney, dan Uji Korelasi Spearman.

6.3 Analisis Data

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek ekstrak etanol daun sirsak terhadap pertumbuhan *Salmonella* Typhi secara invitro dengan metode dilusi agar. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah beberapa konsentrasi ekstrak etanol daun sirsak. Pertumbuhan koloni bakteri *Salmonella* Typhi pada penelitian ini digunakan sebagai variabel terikat. Hasil penilaian diinterpretasikan berdasarkan sistem skoring (+5, +4, +3, +2, +1, 0).

Hasil penelitian dinilai dengan cara pengamatan secara langsung dan uji statistik. Pada penelitian ini merupakan data ordinal sehingga menggunakan analisis data berupa uji nonparametrik. Data ordinal dari penelitian ini adalah variabel penelitian berupa tingkat pertumbuhan koloni bakteri. Uji nonparametrik yang dilakukan meliputi uji *Kruskal Wallis*, uji *post hoc Mann-Whitney*, dan uji *Spearman*.

6.3.1 Uji *Kruskal Wallis*

Uji statistik *Kruskal Wallis* untuk mengetahui perbedaan pengaruh dari berbagai konsentrasi etanol ekstrak daun sirsak terhadap *Salmonella* Typhi sehingga dapat disimpulkan apakah ekstrak etanol daun sirsak mempunyai pengaruh antibakteri yang signifikan terhadap *Salmonella* Typhi. Nilai signifikansi yang didapat melalui uji ini adalah 0,001. Nilai signifikansi sebesar 0,001 ini mempunyai arti bahwa H_0 ditolak dan H_1 diterima. Hal ini dikarenakan nilai 0,001 adalah kurang dari 0,05. Kesimpulan yang dapat ditarik melalui hasil analisis uji *Kruskal Wallis* adalah terdapat perbedaan efek antibakteri pada setiap

pemberian ekstrak etanol daun sirsak dalam beberapa konsentrasi terhadap pertumbuhan koloni *Salmonella Typhi*.

6.3.2 Uji Mann-Whitney

Uji *Mann-Whitney* merupakan uji komparasi berganda (*multiple comparison*). Uji ini dilakukan untuk mengetahui signifikan atau tidak, perbedaan yang didapatkan dari perbandingan setiap dua konsentrasi ekstrak. Interpretasi dari hasil uji *Mann-Whitney* yang dapat dilihat pada tabel ringkasi (tabel 5.4) adalah sebagai berikut:

1. Pertumbuhan koloni bakteri *Salmonella Typhi* pada konsentrasi 0% berbeda signifikan terhadap konsentrasi 2%, 3%, 4%, 6%, dan 7%.
2. Pertumbuhan koloni bakteri *Salmonella Typhi* pada konsentrasi 2% berbeda signifikan terhadap konsentrasi 3%, 4%, 6%, dan 7%.
3. Pertumbuhan koloni bakteri *Salmonella Typhi* pada konsentrasi 3% berbeda signifikan terhadap konsentrasi 6% dan 7%, dan tidak berbeda signifikan terhadap konsentrasi 4%.
4. Pertumbuhan koloni bakteri *Salmonella Typhi* pada konsentrasi 4% berbeda signifikan terhadap konsentrasi 6% dan 7%.
5. Pertumbuhan koloni bakteri *Salmonella Typhi* pada konsentrasi 6% berbeda signifikan terhadap konsentrasi 7%.

6.3.3 Uji Spearman

Uji *Spearman* merupakan uji korelasi yang dilakukan jika data berupa nonparametrik. Uji ini dilakukan untuk mengetahui hubungan antara pemberian ekstrak etanol daun sirsak dalam beberapa konsentrasi terhadap pertumbuhan koloni bakteri *Salmonella Typhi*. Uji ini juga dilakukan untuk mengetahui arah

hubungan tersebut. Uji variabel dikatakan mempunyai hubungan signifikan jika nilai signifikansi kurang dari 0,05 ($p < 0,05$). Nilai signifikansi hasil uji *Spearman* yaitu 0,000. Hal ini mempunyai arti bahwa terdapat hubungan yang signifikan antara pemberian ekstrak daun sirsak dalam beberapa konsentrasi terhadap pertumbuhan koloni *Salmonella* Typhi. Nilai koefisien korelasi dari hasil uji *Spearman* yaitu -0,972. Tanda negatif pada koefisien tersebut mempunyai arti bahwa arah hubungannya adalah berkebalikan. Arah hubungan berkebalikan diartikan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol daun sirsak yang diberikan, maka pertumbuhan bakteri *Salmonella* Typhi semakin menurun.

Berdasarkan hasil penelitian dan analisis data, disimpulkan bahwa ekstrak daun sirsak memiliki efek antimikroba terhadap *Salmonella* Typhi secara in vitro. pertumbuhan koloni semakin berkurang pada setiap kenaikan konsentrasi dari ekstrak etanol daun sirsak dan tidak terlihat pada konsentrasi 7%. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun sirsak 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 daun sirsak, sesuai dengan hipotesa, dapat digunakan sebagai antimikroba.

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 daun sirsak. 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 daun sirsak 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 daun sirsak agar ekstrak daun sirsak bisa diaplikasikan secara klinis sebagai obat pada manusia.



BAB VII

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

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

- a) Terdapat hubungan antara peningkatan konsentrasi ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) dengan hambatan pertumbuhan koloni *Salmonella* Typhi secara *in vitro* dengan metode dilusi agar.
- b) Ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) terbukti mempunyai efek antimikroba terhadap bakteri *Salmonella* Typhi secara *in vitro*
- c) Kadar Hambat Minimum (KHM) ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap pertumbuhan *Salmonella* Typhi adalah 7%.
- d) Tidak didapatkan Kadar Bunuh Minimum (KBM) pada penelitian ini dikarenakan metode penelitian yang digunakan (dilusi agar) hanya dapat melihat Kadar Hambat Minimum (KHM).

7.2 Saran

Saran yang dapat diberikan untuk penelitian selanjutnya adalah:

- a) Perlu dilakukan uji penampisan fitokimia untuk mengetahui prosentasi kandungan komponen fitokimia dalam ekstrak daun sirsak dan komponen fitokimia yang paling berperan sebagai antimikroba.
- b) Diperlukan uji mengenai efek toksik dan efek samping ekstrak daun sirsak (*Annona muricata* L.) agar nantinya dapat diaplikasikan secara klinis sebagai obat pada manusia.

c) Diharapkan dapat dilakukan lain mengenai efek antimikroba ekstrak daun sirsak (*Annona muricata L.*) pada bakteri lain, jamur, ataupun virus.



DAFTAR PUSTAKA

- Ahadi, M. R. 2003. Kandungan Tanin Terkondensasi dan Laju Dekomposisi pada Serasah Daun *Rhizospora mucronata* pada Ekosistem Tambak Tumpangsari, Purwakarta. Skripsi. Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Anonim, 2000, Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat, 1, 3, Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.
- Bhan, M K., Bahl, R., Bhatnagar S. (2005). Typhoid and Paratyphoid Fever. *Lancet* 2005; 366, halaman: 749–62.
- Brooks, G.F., Butel, J.S., Morse, S.A., 2004. Jewetz, Melnick, & Adelberg Mikrobiologi Kedokteran, Edisi 23. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran ECG: 251-264
- Brusch JL, et al. Typhoid Fever. [updated April 4 2014] Available from <http://emedicine.medscape.com/article/231135-clinical>
- Connor, B. A., Schwartz, E. (2005). Typhoid and Paratyphoid Fever in Travelers. *Lancet Infect Dis* 2005; 5, halaman 623–628.
- Deaville, E. R., Givens, D. I. and Harvey, I. M. 2010. Chesnut and Mimosa tannin silages: Effect in sheep differ for apparent digestibility, nitrogen utilization and losses. *Anim. Feed Sci. Technol.* 157: 129-138.
- Dzen, Sjoekoer M., et al 2003, *Bakteriologi Medik*, Ed. 1, Malang, Bayumedia Publishing, p 187-197 & 223-234.
- Dzen, Sjoekoer M., et al 2003, *Bakteriologi Medik*, Ed. 1, Malang, Bayumedia Publishing, p 187-197 & 223-234.
- Gasem MH, Smits HL, Nugroho N, Goris MA, Dolmans WMV. Evaluation of a simple and rapid dipstick assay for the diagnosis of typhoid fever in Indonesia. *Journal of Medical Microbiology* 2002; 51: 173-7.
- Hariana arief, H, 2005, *Tumbuhan Obat dan Khasiatnya seri 3*, Penerbit Penebar Swadaya.
- Hatta, M. and Ratnawati. 2008. Enteric fever in endemic areas of Indonesia: an increasing problem of resistance. *Journal of Infection in Developing Countries* 2: 279- 282.
- Humphrey T. 2006. Public health aspects of *Salmonella enterica* in food production. Di dalam: Mastroeni P, Maskell D, editor. *Salmonella Infections Clinical, Immunological and Molecular Aspects*. New York: Cambridge Univ Pr.

Jawetz, E., Melnick, J.L. & Adelberg, E.A., 2005, *Mikrobiologi Kedokteran*, diterjemahkan oleh Mudihardi, E., Kuntaman, Wasito, E. B., Mertaniasih, N. M., Harsono, S., Alimsardjono, L., Edisi XXII, 327-335, 362-363, Penerbit Salemba Medika, Jakarta

Karsinah, Lucky, H.M., Suharto dan Mardiasuti, H.W., 1993, *Bakteri Gram Negatif*. In, Staf pengajar FK-UI: *Mikrobiologi Kedokteran*, Edisi 1, Jakarta: Binarupa Aksara. p.168-173.

Kemendes RI; Petunjuk Teknis: Profil Kesehatan Indonesia, Kementerian Kesehatan RI, Jakarta, 2012.

Luthana. 2009. *Prosedur Ekstraksi Senyawa Fenol dan Antibakteri dari Produk Tanaman Gambir Yang Disertai Metode Analisanya*. Diakses:25mei2009.

<http://yongkikastanyaluthana.wordpress.com/2009/01/26/prosedur-ekstraksi-senyawa-fenol-dan-antibakteri-dari-produk-tanamangambir-yang-disertai-metode-analisanya/htm>
<http://www.holocaust-history.org/PetroleumEtel/lifton/1November2007>

Mardiana, Lina.2011.*Ramuan dan Khasiat Kulit Manggis*. Jakarta : Penebar Swadaya.

Purwatresna E. *Aktivitas Antidiabetes Ekstrak Air dan Etanol Daun Sirsak Secara In Vitro Melalui Inhibisi Enzim α -Glukosidase*. Bogor. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. 2012.

Retnani, V. 2011. *Pengaruh Suplementasi Ekstrak Daun Annona muricata Terhadap Kejadian Displasia Epitel Kelenjar Payudara Tikus Sprague Dawley Yang Diinduksi 7, 12 Dimetilbenz (α) Antracene*. Skripsi. Semarang: Universitas Diponegoro

Sarker, Satyajit D., Zahid Latif, & Alexander I. Gray (Ed). (2006). *Natural Products Isolation*. Totowa : Humana Press.

Septerina. 2002. *Pengaruh Ekstrak Daun Sirsak sebagai Insektisida Rasional terhadap Pertumbuhan dan Hasil Tanaman Paprika Varietas Bell Boy*. Tesis S-2 Fakultas Pertanian. Universitas Muhammadiyah. Malang.

Setiabudy, R., 2007a , *Pengantar Antimikroba*, dalam Ganiswara, S.G., *Farmakologi dan Terapi* Edisi V, 585-598, Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta.

Soedarmo, 2010, *Validitas pemeriksaan uji Aglutinin O dan H Salmonella typhi dalam menegakkan diagnosis Dini Demam Tifoid*, Trisakti, Jakarta.

Sunarjono H. 2005. *Sirsak dan Srikaya: Budidaya untuk Menghasilkan Buah Prima*. Penebar Swadaya: Depok

Tanu, I., 2007, *Farmakologi dan Terapi*. Edisi V, UI Press, Jakarta.

Tiwari P, Kumar B, Kaur M, Kaur G, Kaur H. Phytochemical Screening and Extraction. *Journal of International Pharmaceutical Scientia*. 2011;1(1):98-106

Todar. K, PhD. 2008. *Salmonella and Salmonellosis* (<http://www.textbookofbacteriology.net/salmonella.html>)

Torres AV, Carson JJ, Mastroeni P, Ischiopoulus H, Fang FC. Antimicrobial action of the NADPH phagocyte oxidase and inducible nitric oxidase synthase in experimental salmonellosis. Effect on microbial killing by activated peritoneal macrophages in vitro. *J Exp Med*, 2000: 192(2) : 227-36

Volk, Wesley A. dan Wheeler, Margaret F., 1993, *Mikrobiologi Dasar*, Erlangga, Jakarta.

Volker Brinkmann, 2004, Evolution of typhoid bacteria <http://phys.org/news83593133.html>

Widodo, Djoko 2006, Dalam: Sudoyo, Aru W., dkk (eds), *Buku Ajar: Ilmu Penyakit Dalam*, Ed. 4, Jakarta, FK UI, p 1752-1756.

Zaki, S.A. and Karande, S. Multidrug-Resistant Typhoid Fever. *J. Infect Dev Ctries* 2011 5(5):324-337. Diakses dari <http://jidc.org/index.php/journal/article/viewFile/1405/543>