

**PENGARUH EKSTRAK SELEDRI (*Apium graveolens*) TERHADAP
PERTUMBUHAN BAKTERI *Shigella dysentriae* SECARA *IN VITRO***

TUGAS AKHIR

Untuk memenuhi sebagian persyaratan

Mencapai derajat Sarjana S-1 pada Program Studi Pendidikan Dokter



Oleh :

Bartolomeus Alvin Tjandra

165070107111021

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

PENGARUH EKSTRAK SELEDRI (*Apium graveolens*) TERHADAP
PERTUMBUHAN BAKTERI *Shigella dysenteriae* SECARA *IN VITRO*

Oleh :

Bartolomeus Alvin Tjandra

NIM. 165070107111021

Telah diuji pada

Hari : Kamis

Tanggal : 12 Desember 2019

Dan dinyatakan lulus oleh :

Penguji I

Prof. Dr. dr. Yuyun Yueniwati Prabowowati Wadjib, M. Kes., Sp. Rad (K)

NIP. 196810311996012001

Pembimbing I,

dr. Dewi Ernyawati, M.Si

NIP. 198510172009122007

Pembimbing II,

dr. Sinta Murlistyarini, Sp. KK

NIP/NIK. 198112102012122001

Mengetahui

Kepala Program Studi Kedokteran

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

NIP. 19630221996012001

ABSTRAK

Tjandra, Bartolomeus. 2019. **Pengaruh Ekstraks Seledri (*Apium graveolens*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Shigella dysenteriae* secara *In Vitro***. Tugas Akhir, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) dr. Dewi Erikawati, M.Si. (2) dr. Sinta Murlistyarini, Sp. KK.

Shigella dysenteriae salah satu organisme yang dapat menyebabkan penyakit disentri dimana manifestasi klinis yang muncul dapat menyebabkan gejala berupa diare berair yang disertai dehidrasi hingga nyeri perut dengan tinja mucoid yang disertai darah. Infeksi *Shigella dysenteriae* pada anak dapat menyebabkan manifestasi klinis yang lebih berat berupa nyeri kepala, meningismus, kejang, arthritis dan *hemolytic uremic syndrome*. Secara epidemiologis, infeksi *Shigella dysenteriae* masih sering dijumpai di negara berkembang dimana tingkat sanitasi lingkungan masih rendah dan praktek defekasi terbuka masih berlangsung. Dalam beberapa dekade terakhir, resistensi antibiotik terapi konvensional untuk terapi infeksi *Shigella dysenteriae* mulai bermunculan sehingga diperlukan pencarian senyawa yang efektif untuk pengobatan infeksi *Shigella dysenteriae*. Penelitian ini ditujukan untuk menggali efektivitas ekstrak etanol seledri terhadap pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* secara *in-vitro*. Sampel diperoleh dari isolat bakteri yang disediakan di Laboratorium Mikrobiologi FKUB. Konsentrasi ekstrak yang dipakai terdiri dari konsentrasi 0%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26% dan 27%. Metode yang digunakan untuk menguji efektivitas ekstrak seledri adalah metode dilusi tabung dengan kadar bunuh minimum pada konsentrasi 27% dan kadar hambat minimum pada konsentrasi 23%. Berdasarkan uji *one way ANOVA*, terdapat perbedaan signifikan jika ada perubahan konsentrasi ekstrak seledri terhadap pertumbuhan koloni *Shigella dysenteriae* (Korelasi, $r=-0,877$:

$p < 0,05$) dan terbukti bahwa ekstrak seledri memiliki efek antimikroba terhadap bakteri *Shigella dysenteriae*.

Kata kunci: *Shigella dysenteriae*, ekstrak etanol seledri (*Apium graveolens*), antibakteri.

ABSTRACT

Tjandra, Bartolomeus. 2019. **The Effect of Celery (*Apium graveolens*) Extract on *Shigella dysenteriae* Growth In Vitro**. Final Assignment, School of Medicine Brawijaya University. Supervisors: (1) dr. Dewi Erikawati, M.Si. (2) dr. Sinta Murlistyarini, Sp. KK.

Shigella dysenteriae is one of the organism that is capable of causing dysentery which symptoms usually varies between watery diarrhea and abdominal pain to mucoid stool that are often accompanied by blood. *Shigella dysenteriae* infection in pediatric patients often leads to heavier clinical manifestation that consists of headache, meningism, seizure, arthritis, and *hemolytic uremic syndrome*. Epidemiologically, *Shigella dysenteriae* infection can be often found on developing nations where sanitation standards are poor and the practice of open defecation is still prevalent. Antibiotic resistance of *Shigella dysenteriae* against conventional medication has been reported which requires other substances that are capable of treating *Shigella dysenteriae* infection. Through this research, the effectiveness of celery as an antimicrobial substance against *Shigella dysenteriae in vitro* will be explored. *Shigella dysenteriae* specimen was acquired from Brawijaya University School of Medicine Microbiology Laboratory. The concentration levels are 0%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, and 27%. The method used in this research to test the effect of the extract is tube dilution resulted in a 27% Minimum Bactericidal Concentration and 23% Minimum Inhibitory Concentration. Based on oneway ANOVA test, a significant correlation between extract concentration alterations and the number of *Shigella dysenteriae* colony that was growing on the plate can be found (Correlation, $r=-0,877$: $p<0,05$).

Keywords: *Shigella dysenteriae*, celery (*Apium graveolens*) ethanol extract,
antimicrobial

DAFTAR ISI

	Halaman
Judul.....	i
Halaman Pengesahan	ii
Kata Pengantar	iii
Abstrak	v
Abstract	vii
Daftar Isi.....	ix
Daftar Tabel	xiii
Daftar Gambar	xiv
Daftar Lampiran	xv
Daftar Singkatan	xvi
BAB 1 Pendahuluan.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
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 Praktis	5
BAB 2 Tinjauan Pustaka.....	6
2.1 Baketeri <i>Shigella dysentriae</i>	6
2.1.1 Taksonomi.....	6
2.1.2 Karakteristik Bakteri.....	6
2.1.2.1 Ciri Khas Organisme.....	6

2.1.2.2 Struktur Antigen.....	7
2.1.2.3 Faktor virulensi.....	8
2.1.2.4 Toksin.....	10
2.1.3 Identifikasi Bakteri.....	11
2.1.3.1 Pewarnaan Gram.....	11
2.1.3.2 Sifat Kultur.....	12
2.1.3.3 Uji urease.....	14
2.1.3.4 Uji oksidase.....	15
2.2 Shigellosis.....	16
2.2.1 Patogenesis.....	16
2.2.2 Manifestasi klinis.....	18
2.2.3 Resistensi Antimikroba.....	19
2.3 <i>Apium graveolens</i>	20
2.3.1 Taksonomi.....	20
2.3.2 Morfologi.....	20
2.3.3 Distribusi.....	21
2.3.4 Manfaat seledri.....	22
2.3.5 Kandungan kimia seledri.....	22
BAB 3 Kerangka Teori, Kerangka Konsep, dan Hipotesis Penelitian.....	26
3.1 Kerangka teori.....	26
3.2 Penjelasan kerangka teori.....	26
3.3 Kerangka kosep.....	27
3.4 Penjelasan kerangka konsep.....	28
3.5 Hipotesis penelitian.....	29
BAB 4 Metode Penelitian.....	30
4.1 Rancangan penelitian.....	30
4.2 Sampel.....	30

4.3 Lokasi dan waktu penelitian	31
4.4 Variabel penelitian	31
4.4.1 Variabel tergantung	31
4.4.2 Variabel bebas	31
4.5 Definisi Operasional.....	31
4.6 Instrumen penelitian	33
4.6.1 Alat	33
4.6.2 Bahan.....	33
4.6.2.1 Untuk identifikasi <i>Shigella dysenteriae</i>	33
4.6.2.2 Untuk pembuatan ekstrak <i>Apium graveolens</i>	34
4.6.2.3 Untuk uji kepekaan ekstrak <i>Apium graveolens</i>	34
4.7 Prosedur Penelitian	35
4.7.1 Indentifikasi ulang <i>Shigella dysenteriae</i>	35
4.7.1.1 Pewarnaan Gram	35
4.7.1.2 <i>Salmonella Shigella Agar</i>	36
4.7.1.3 Tes oksidase	36
4.7.1.4 Tes urease.....	37
4.7.1.5 TSI-IMViC	38
4.7.2 Pembuatan ekstrak etanol <i>Apium graveolens</i>	40
4.7.2.1 Proses pengeringan	40
4.7.2.1 Proses ekstraksi	40
4.7.2.3 Proses evaporasi.....	41
4.7.3 Persiapan suspense uji <i>Shigella dysenteriae</i>	41
4.7.4 Uji antimikroba ekstrak seledri terhadap <i>Shigella dysenteriae</i>	42
4.7.5 Kerangka operasional penelitian	44
4.7.6 Kerangka operasional penelitian.....	45

4.8 Analisis Data	45
BAB 5 Hasil Penelitian dan Analisis Data	48
5.1 Hasil Identifikasi Bakteri.....	51
5.2 Gambaran Ekstrak Seldri.....	47
5.3 Hasil Pengamatan Kekeruhan dan Analisis terhadap KHM	52
5.4 Hasil Penentuan KBM dan Analisis terhadap KBM	53
5.5 Analisis Data	56
5.5.1 Uji <i>One-Way ANOVA</i>	56
5.5.2 Uji <i>Post Hoc Tukey</i>	56
5.5.3 Uji Korelasi dan Regresi	57
BAB 6 Pembahasan	59
6.1 Penjelasan Singkat Penelitian	59
6.2 Identifikasi Bakteri dan Proses Ekstraksi	59
6.3 Penelitian Pendahuluan.....	60
6.4 Kadar Hambat Minimum.....	60
6.5 Kadar Bunuh Minum	61
6.6 Penelitian terkait	61
6.7 Mekanisme Antibakteri Ekstrak Seledri.....	62
6.8 Keterbatasan Penelitian.....	64
BAB 7 Penutup	65
7.1 Kesimpulan	65
7.2 Saran.....	65
Daftar Pustaka	67
Lampiran	68

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Shigellosis merupakan bentuk infeksi pada lapisan epitelium saluran pencernaan, terutama pada ileum terminal dan kolon, oleh bakteri *Shigella sp.* yang masuk melalui jalur *fecal-oral*. Manifestasi klinis yang muncul dari shigellosis dapat dibagi menjadi dua tipe yakni : (1) diare berair yang disertai episode muntah dan dehidrasi ringan hingga moderat , dan (2) tinja mucoid yang disertai darah dan nyeri abdominal dan tenesmus (Kotloff *et al.*, 2017). Ada empat spesies dari *Shigella sp.* yang mampu menyebabkan shigellosis yakni *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* dan *Shigella sonnei* dengan infeksi *S. dysenteriae* tipe 1 merupakan penyebab shigellosis dengan tingkat mortalitas yang tinggi (Christopher *et al.*, 2010).

Faktor virulensi yang dimiliki oleh *Shigella dysentriae* membuat bakteri ini mampu beradaptasi untuk bereproduksi di saluran pencernaan manusia. *Shigella dysentriae* memiliki kemampuan untuk memproduksi baik endotoksin maupun eksotoksin. Ketika lisis, lapisan lipopolisakarida pada dinding sel *Shigella dysentriae* berinteraksi langsung dengan sel epitel saluran pencernaan. Endotoksin ini diperkirakan menyebabkan iritasi dinding saluran pencernaan. Eksotoksin yang diproduksi oleh *Shigella dysentriae* bersifat menyebabkan proses diare dengan mekanisme yang serupa. *Shigella dysentriae* tipe 1 mampu memproduksi shiga toksin yang selain bersifat enterotoksik, juga bersifat neurotoksik (Hale dan Keusch,

1996; Strockbine, 2015). Selain itu, *Shigella dysenteriae* mampu menginvasi sel dengan produksi plasmid tertentu yang memungkinkan *Shigella dysenteriae* untuk masuk ke sel *host*, menghindari destruksi dan bereplikasi secara intraseluler (Banga *et al.*, 2011).

Secara epidemiologis, shigellosis memiliki memiliki tingkat infeksi tertinggi di negara berkembang dimana kualitas sanitasi lingkungan masih tergolong buruk. Penderita shigellosis 50% merupakan anak berumur 1-4 tahun yang berasal dari keluarga dengan tingkat ekonomi rendah. Walaupun tingkat kematian terkait shigellosis dalam tiga dekade terakhir telah turun secara signifikan, masih terdapat 164.000 kematian karena shigellosis per tahun dengan 99% kasus ditemukan pada negara berkembang (Kotloff *et al.*, 2017). Walaupun demikian, shigellosis juga dapat ditemukan di negara maju dimana kasus shigellosis juga dapat ditemukan secara sporadik dalam bentuk kasus tunggal, kontaminasi makanan dan minuman, dan di area dimana standar sanitasi buruk (Banga *et al.*, 2011; Kotloff *et al.*, 2017).

Dalam dua dekade terakhir, pemberian antibiotik untuk kasus shigellosis terus mengalami perubahan dikarenakan tingkat resistensi akan antibiotik yang terus meningkat. Resistensi terhadap antibiotik ampicillin, asam nalidixat, tetrasiklin and ciprofloxacin mengalami peningkatan yang signifikan. Pengobatan andalan untuk shigellosis sekarang adalah ceftriaxone, golongan ketiga cephalosporin. Perlu diwaspadai bahwa resistensi ceftriaxone mulai bermunculan pada tahun 2009 dikarenakan gen produsen CTX-M, enzim penghidrolisa ceftriaxone, yang ditemukan pada beberapa isolat *Shigella dysenteriae* (Bhattacharya *et al.*, 2012; Nüesch-Inderbinen, 2014).

Seledri (*Apium graveolens*) merupakan jenis tanaman yang seringkali digunakan dalam berbagai hidangan di berbagai negara. Tanaman ini juga tergolong mudah didapat dan terjangkau oleh masyarakat. Seledri mengandung berbagai senyawa antara lain asam klorogenat, saponin, tannin, flavonoid, dan limonen. Berbagai senyawa tersebut telah diuji sebelumnya dan memiliki potensi sebagai senyawa antimikroba. Mekanisme sifat antimikroba senyawa flavonoid secara garis besar dapat dibagi menjadi tiga mekanisme utama yakni inhibisi sintesis protein bakteri, inhibisi fungsi normal membran sitoplasma, dan inhibisi metabolisme energi bakteri serta efek sinergisme dengan antibiotik konvensional. Asam klorogenat dan limonene mampu menghambat pertumbuhan bakteri melalui peningkatan membrane luar bakteri. Tannin memiliki kemampuan menghambat enzim yang berperan dalam sintesis protein (Iswantini *et al.*, 2012; Al-Snafi, 2014).

Berdasarkan uraian tersebut, infeksi *Shigella dysenteriae* masih merupakan sebuah ancaman tersendiri, terutama di negara berkembang dimana standar sanitasi masih kurang optimal. Diperlukan eksplorasi segera untuk melahirkan solusi baru untuk penyakit *shigellosis* mengingat manifestasi klinis yang berat beserta munculnya strain bakteri yang resisten terhadap berbagai antibiotik. Diharapkan, melalui penelitian ini, bukti ilmiah bahwa ekstrak etanol seledri mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae*.

1.2. Rumusan Masalah

Apakah terdapat efek antibakteri pada ekstrak etanol seledri (*Apium graveolens*) dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* secara *in vitro*?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk membuktikan bahwa ekstrak etanol Seledri (*Apium graveolens*) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* secara *in vitro*.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Untuk menelusuri kadar hambat minimal (KHM) ekstrak etanol seledri (*Apium graveolens*) terhadap pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* secara *in vitro*.
2. Untuk menelusuri kadar hambat minimal (KHM) ekstrak etanol seledri (*Apium graveolens*) terhadap pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* secara *in vitro*.
3. Untuk menelusuri pengaruh perubahan konsentrasi ekstrak etanol seledri (*Apium graveolens*) terhadap pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* secara *in vitro*.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

1. Sebagai sumbangan informasi ilmu pengetahuan yang dapat digunakan sebagai dasar penelitian lebih lanjut

2. Memberikan informasi tentang penggunaan senyawa ekstrak etanol seledri (*Apium graveolens*) sebagai referensi atau acuan dalam penelitian selanjutnya baik terhadap penyakit yang sama atau penyakit infeksius lainnya.

1.4.2 Manfaat Praktis

1. Memanfaatkan ekstrak Seledri (*Apium graveolans*) sebagai alternatif tata laksana infeksi yang disebabkan oleh bakteri *Shigella dysenteriae* yang berpotensi dapat diaplikasikan kepada masyarakat.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Bakteri *Shigella dysenteriae*

2.1.1 Taksonomi

Kingdom	:	Bacteria
Filum	:	Proteobacteria
Kelas	:	Gammaproteobacteria
Ordo	:	Enterobacteriales
Famili	:	Enterobacteriaceae
Genus	:	Shigella
Spesies	:	<i>S. dysenteriae</i> (Castellani and Chalmers, 1919)

2.1.2 Karakteristik bakteri

2.1.2.1 Ciri khas organisme

Shigella dysenteriae merupakan bakteri Gram negatif, fakultatif anaerob, nonmotil, tidak membentuk spora, tidak berkapsul dan berbentuk batang. Secara mikroskopis, *Shigella dysenteriae* memiliki 3 μm dan lebar 0.5 μm . Dalam genus *Shigella* sendiri, didapatkan 47 serotipe berbeda dengan 15 serotipe berbeda untuk *Shigella dysenteriae*, termasuk *S. dysenteriae* tipe 1 yang menghasilkan kasus dengan tingkat keparahan yang paling berat. *Shigella dysenteriae* memiliki faktor virulensi yang memungkinkan bakteri untuk menghindari sistem imunitas tubuh dan menjelaskan gejala yang muncul akibat invasi bakteri (Donnenberg, 2015).

2.1.2.2 Struktur antigen

Secara umum, *Enterobacteriaceae* memiliki tiga komponen antigen utama yakni antigen K (terdiri dari 100 tipe), antigen H dan antigen O. Antigen K merupakan antigen yang terletak pada kapsul bakteri yang dapat berupa polisakarida, seperti pada *E. coli*, atau berupa protein dan bersifat tidak stabil pada suhu tinggi.

Antigen K juga dapat memengaruhi faktor virulensi dari bakteri terkait, terutama dalam kemampuan bakteri dalam menempel pada sel *host*. Karena letaknya yang terletak lebih eksternal dibandingkan dengan antigen H dan antigen O, antigen K seringkali mengganggu uji antisera kedua antigen lainnya (Carroll *et al.*, 2016).

Antigen H merupakan antigen yang terdapat pada flagella pada *Enterobacteriaceae* yang bersifat motil dan rusak saat diberi paparan suhu tinggi atau alcohol. Antigen H diaglutinasi dengan antibody anti H yang terutama merupakan IgG. Antigen H memiliki komponen utama yakni senyawa asam amino dengan variasi yang beragam. Dikarenakan letaknya yang berada lebih eksternal dibanding antigen O, antigen H seringkali mengganggu uji aglutinasi menggunakan antibody anti O (Carroll *et al.*, 2016).

Antigen O merupakan antigen pada dinding lipopolisakarida sel yang tersusun oleh unit polisakarida berulang. Antigen O bersifat stabil pada paparan suhu tinggi dan alcohol, dan dideteksi melalui tes aglutinasi. Antibodi yang bereaksi dengan antigen O secara besar merupakan IgM. Berbagai organisme *Enterobacteriaceae* memiliki beberapa tipe antigen O berbeda yang dapat ditemukan pada spesies lainnya (Carroll *et al.*, 2016).

Shigella dysnetriae merupakan *Enterobacteriaceae* yang tidak mengekspresikan antigen K dan antigen H dikarenakan spesies ini tidak memiliki struktur flagella (non motil) dan kapsul. Pembagian serotipe *Shigella sp.* dibedakan berdasarkan struktur antigen O yang dimiliki dengan *Shigella dysentriae* memiliki 13 serotipe yang berbeda (Carroll *et al*; 2016). *Shigella dysentriae* merupakan *Enterobacteriaceae* yang bersifat non motil sehingga tidak mengekspresikan antigen H. Spesies ini juga tidak menghasilkan antigen K. Hal ini menyebabkan modalitas utama dalam identifikasi serologis terhadap spesies ini adalah melalui slide agglutination dengan *polyvalent, somatic (O) antigen grouping sera*, diikuti dengan uji menggunakan monovalent *antisera* untuk identifikasi serotype tertentu (Banga., 2011).

2.1.2.3 Faktor virulensi

Shigella dysentriae telah beradaptasi untuk bereproduksi di dalam sel kolon manusia. Faktor virulensi ini diperankan oleh materi genetik dan struktur antigen yang dimiliki oleh spesies ini. Faktor virulensi yang dimiliki oleh bakteri ini dikode oleh materi genetik : diluar kromosom yakni plasmid yang dimiliki oleh berbagai *Shigella* spesies lain beserta *Enteroinvasive Escherichia coli* (EIEC). Kompleks yang terdiri dari dua *Invasion Plasmid*, IpaB dan IpaC, memiliki peran utama dalam kolonisasi sel epitelium kolon manusia. IpaB diekspresikan ketika ada stimulasi suhu, konsentrasi empedu dan osmolalitas yang menyerupai lumen saluran pencernaan sedangkan IpaC diekspresikan ketika bakteri berhubungan langsung dengan sel saluran pencernaan manusia (Banga *et al.*, 2011). Sebelum dapat masuk, IpaA dibutuhkan untuk memungkinkan masuknya bakteri ke dalam sel epitel. Hal ini dicapai melalui depolimerisasi filamen aktin, mengganggu stabilitas sitoskeleton sel epitelium kolon. IpaA akan berhubungan dengan vinculin, protein yang mengatur tegangan dan integritas membrane sel terutama

di *adherence junction basal cell*. Interaksi IpaA dengan vinculin akan menginduksi perubahan struktur vinculin, memungkinkan interaksi *binding site* vinculin dengan IpaA lainnya (Mounier *et al.*, 2009).

Kompleks IpaB dan IpaC menginduksi endositosis oleh sel mukosa, sel epitel dan makrofag melalui mekanisme pembentukan pori-pori pada membran sel yang kemudian menyebabkan destabilisasi vakuol atau melalui protein efektor tertentu yang mengganggu integritas membran (Mattock *and* Blocker, 2017). IpaB memiliki kemampuan untuk berikatan dengan Mad2L2, menyebabkan siklus sel epitelium terhambat pada fase G2/M. Penghambatan mitosis sel epitelium secara langsung menghambat *turnover* sehingga sel epitelium yang terinfeksi tetap menempel pada jaringan sehat di sekitarnya, memungkinkan bakteri untuk menginfeksi sel-sel sehat tersebut. IpaB dan IpaC kemudian memediasi lisis vakuol endositosis sel yang terinfeksi, termasuk makrofag yang menyebabkan sitokin pro-inflamasi IL-1 dan apoptosis makrofag (Mattock *and* Blocker, 2017).

Shigella dysenteriae juga memiliki plasmid pengkode factor virulensi yang memungkinkan bakteri untuk bereplikasi di dalam sitoplasma sel yang terinfeksi. Kompleks plasmid ini terdiri dari *Intracellular Spread (Ics)* A dan B. IcsA merangsang polimerisasi aktin sehingga *Shigella dysenteriae* mampu mendorong dan pindah dari sel terinfeksi ke sel sehat, tanpa keluar dari sel terinfeksi. IcsB mengkode protein terlebih dahulu harus melisisikan membrane plasma antar sel sebelum *Shigella dysenteriae* dapat berpindah ke sel sebelahnya (Banga *et al.*, 2011) Selain fungsi untuk melisisikan membrane plasma antar sel, IcsB juga memiliki kemampuan untuk menginhibisi autofagi dengan cara menutup segmen Atg5 binding site pada IcsA sehingga mencegah formasi autofagosom (Baxt *and* Goldberg, 2014).

2.1.2.4 Toksin

Shigella dysenteriae memiliki dua toksin yang berperan langsung dalam perjalanan penyakit. Dua jenis toksin tersebut adalah endotoksin dan eksotoksin. Endotoksin yang dimiliki *S. dysenteriae* merupakan lipopolisakarida yang terdapat di dinding sel dan memiliki sifat yang sama pada bakteri Gram negatif lainnya. Lipopolisakarida ini memiliki fungsi utama bagi spesies bakteri untuk fungsi adhesi dalam insiasi proses invasi sel *host*. Struktur lipopolisakarida ini juga merupakan komponen utama yang dikenali oleh sistem imun melalui *Toll-Like Receptor 4*, memicu respon inflamasi lokal di saluran pencernaan (Mattock and Blocker, 2017). *Shigella sp.* memiliki kemampuan untuk modifikasi struktur lipopolisakarida yang dimiliki melalui penambahan atau pengurangan gugus asetil dan O-glukosil sehingga antibody yang dihasilkan saat infeksi pertama tidak dapat bekerja saat re-infeksi *Shigella sp.* (Murphy, 2012).

Enterotoksin yang diproduksi oleh *Shigella sp.* terdiri dari 2 toksin utama yakni *Shigella enterotoxin 1* (ShET1) dan *Shigella enterotoxin 2* (ShET2). Dua toksin ini menyebabkan pengeluaran cairan berlebih di saluran pencernaan *host* yang terinfeksi. ShET1 dikode di gen *set1A* dan *set1B* pada kromosom SH1-1 PAI, yang pasti ditemukan di *S. flexneri 2a*, namun tidak pasti ditemukan di serotipe dan spesies lainnya. ShET1 merupakan kompleks *holotoxin* yang berukuran 55kDa. Toksin ini merangsang efluks air dan ion dari sel secara berlebihan. ShET2 merupakan protein berukuran 63 kDa yang dikode oleh gen *ospD* pada plasmid. Plasmid ini dapat ditemukan di semua serotipe dan spesies *Shigella*. Toksin ini memiliki mekanisme kerja yang sama dengan ShET1 yakni rangsangan efluks air dan ion dengan mekanisme tambahan berupa rangsangan ekskresi IL-8 oleh sel saluran pencernaan. Keluarnya cairan yang berlebihan merupakan gejala awal

sebelum disentri karena infeksi *Shigella dysenteriae* (Farfán *et al.*, 2011; Faherty *et al.*, 2012).

Shigella dysenteriae serotipe 1 juga memproduksi toksin tambahan yaitu *Shiga toxin*. *Shiga toxin* merupakan toksin yang terdiri dari 2 unit utama yakni unit A (32,2 kDa) yang merupakan komponen aktif toksin dan 5 unit B (7,7 kDa) yang berfungsi sebagai unit pelekat toksin. *Shiga toxin* memiliki kemampuan untuk menghambat sintesis protein sel terinfeksi melalui inaktivasi subunit 60S ribosom. Selain itu, *shiga toxin* juga memiliki kemampuan untuk induksi apoptosis sel yang ditandai dengan perubahan seluler berupa *blebbing*, pengkerutan sel, pepadatan materi genetik dan fragmentasi DNA. Selain itu, *shiga toxin* juga mampu merangsang ekspresi dan pelepasan sitokin proinflamasi seperti TNF- α (*tumor necrosis factor α*), GM-CSF (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*), IL-1 (interleukin-1), IL-6 dan IL-8. Produksi ini memiliki efek dalam pemanggilan sel leukosit PMN ke lokasi dan merusak pembuluh darah di daerah tersebut. Sitokin ini juga memiliki potensi dalam hipersensitisasi reseptor Gb3 di sel lainnya yang awalnya tidak berespon terhadap toksin sehingga menjadi responsif terhadap toksin (Schweppe *et al.*, 2009).

2.1.3 Identifikasi bakteri

2.1.3.1 Pewarnaan Gram/*Gram Staining*

Pewarnaan Gram merupakan metode untuk membedakan dua kelompok besar bakteri yakni kelompok bakteri Gram positif dan kelompok bakteri Gram negatif. Metode pewarnaan ini membedakan bakteri dengan membedakan struktur kimia membran sel bakteri, terutama struktur peptidoglikan dinding sel. Ketika sampel diberi pewarna kristal violet, bakteri Gram positif menyimpan zat warna tersebut sehingga warna menjadi warna kristal violet sedangkan Gram negatif

tidak menyimpan zat warna tersebut. Bakteri Gram negatif akan mengambil zat warna dari pewarna safranin sehingga menunjukkan gambaran koloni berwarna merah muda. Dengan pewarnaan Gram, *Shigella dysenteriae* akan menunjukkan bakteri batang berwarna merah muda yang berukuran kecil dan pendek (Banga *et al.*, 2011, Donnenberg; 2015).



Gambar 2.1 Pewarnaan Gram *Shigella dysenteriae* (Erasmus, 2011)

(bentuk batang, Gram negatif, konfigurasi *monobacillus*, Perbesaran 1000x)

2.1.3.2 Sifat Kultur

Walaupun *Shigella dysenteriae* merupakan bakteri fakultatif anaerob, koloni bakteri ini akan tumbuh secara optimum dalam kondisi aerob. Kondisi yang dibutuhkan bakteri untuk tumbuh adalah suhu dalam rentang 10-40°C dengan suhu optimal yakni 37°C dan pH optimum berada pada pH 7.0 dengan variasi tergantung galur spesies. Koloni bakteri yang muncul berbentuk cembung, bulat, dengan permukaan halus dan ukuran 2mm dalam waktu 24 jam setelah inokulasi bakteri di media pertumbuhan (Christopher *et al.*, 2010).

Pada medium *Nutrient Agar Plate*, koloni yang tumbuh akan berwarna putih keabu-abuan. Pada *MacConkey Agar*, koloni yang tumbuh tidak menunjukkan

pigmen warna. Pada *Blood Agar Plate* (BAP), koloni yang muncul akan berwarna putih keabu-abuan dengan ukuran yang lebih besar dibanding koloni pada medium pertumbuhan lainnya. *S. dysenteriae* juga akan menunjukkan gambaran γ -hemolisis. Pada medium *Xylose Lysine Deoxycholate Agar* (XLD), gambaran koloni yang muncul adalah koloni yang lebih besar dengan warna merah muda tanpa inti hitam. Karena ketidakmampuan bakteri untuk memfermentasikan laktosa, koloni yang muncul pada *Eosin Methylene Blue* (EMB) Agar dan *Deoxycholate Agar* tidak menunjukkan pigmen warna. Pada *Salmonella Shigella Agar*, produksi Hidrogen Sulfida oleh koloni bakteri tidak dapat ditemukan sehingga koloni yang tumbuh tidak menunjukkan pigmen warna (Batra, 2018).

Setelah inkubasi selama 24 jam di media isolasi pada suhu 37°C, koloni yang bakteri kemudian dipindahkan ke media *Triple Sugar Iron* (TSI)-IMViC. Dari hasil tes TSI, *Shigella dysenteriae* akan menunjukkan bagian *slant* yang berwarna merah (basa) dan *butt* yang berwarna kuning (asam) dan tidak ada gelembung gas yang muncul. Hasil *Methyl Red*, *Voges-Proskauer*, dan *Citrate* akan menghasilkan hasil negatif pada semua hasil uji, kecuali uji *Methyl Red* dimana medium uji akan berubah dari warna kuning menjadi warna merah (Banga *et al.*, 2011).



A

B

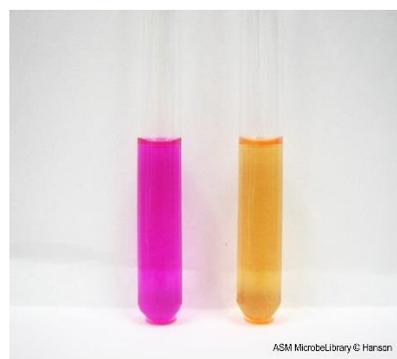
C

Gambar 2.2 Kultur *Shigella dysenteriae* (Erasmus, 2011)

(Koloni *Shigella dysenteriae* pada medium MCA (A), BAP(B) , dan XLD (C))

2.1.3.3 Uji urease

Penggunaan uji urease dilakukan untuk membedakan *Shigella dysenteriae* dengan *Enterobacteriaceae* lainnya yang mampu menghidrolisa urea menjadi ammonia dan karbon dioksida seperti *Proteus sp.* Proses hidrolisa urea ini membutuhkan enzim urease yang mengubah urea ((NH₂)₂CO) dan air (H₂O) menjadi karbon dioksida (CO₂) dan amonia (NH₃). Metode uji urease dapat dicapai dengan dua jenis medium yakni menggunakan medium *Christensen's Urea Agar* atau *Stuart's Urea Broth*. Sampel bakteri yang akan diujikan diinokulasikan ke medium di permukaan medium selama 18-24°C. Untuk medium *Christensen's Urea Agar*, medium kemudian diinkubasi di suhu 35°C 6 jam hingga 6 hari, sedangkan untuk *Stuart's Urea Broth*, setelah proses inokulasi, tabung berisi medium diagitasi dengan cara digoyangkan perlahan dan kemudian diobservasi selama 8 jam hingga 48 jam. Jika sampel bakteri merupakan bakteri urease positif, medium akan berubah dari warna oranye menjadi ungu. Jika sampel bakteri adalah urease negatif, warna medium adalah tetap (Brink, 2010). *Shigella dysenteriae* akan menghasilkan medium yang tetap berwarna oranye karena tidak ada produksi enzim urease (NHS, 2015).



Gambar 2.3 Uji Urease (Brink, 2010)

(Uji Urease pada Christensen's Urea Agar (kiri) dan Stuart's Urea Broth (kanan))

2.1.3.4 Uji oksidase

Uji oksidase digunakan untuk membedakan apakah organisme memiliki enzim sitokrom oksidase/indofenol oksidase yang mampu mengoksidasi tetramethyl- *p*-phenylenediamine dihydrochloride (TMPD) yang digunakan sebagai reagen. Pada bakteri yang memiliki enzim sitokrom oksidase, empat elektron dari sitokrom c akan pindah ke sitokrom oksidase. Pada proses respirasi, enzim sitokrom oksidasi akan mendonorkan elektron pinjaman tersebut ke molekul oksigen bersama 4 proton, bergabung dengan 2 molekul hydrogen membentuk air, mengembalikan konfigurasi elektron sitokrom oksidasi seperti semula. Ketika TMPD ditetaskan ke sampel, sitokrom c akan mengambil elektron dari TMPD untuk kembali ke konfigurasi elektron awal, menyebabkan TMPD kekurangan elektron, merubah warna dari tidak berwarna menjadi biru. Metode uji oksidase yang digunakan adalah dengan menggunakan metode kertas saring. Menggunakan ose loop, bakteri diambil dan diletakkan ke kertas saring. Satu atau dua tetes larutan Kovac's oxidase reagent kemudian ditetaskan ke kertas saring dan diamati. Perubahan warna akan tampak dalam durasi 5 sampai 10 detik untuk organisme oksidase positif 60 detik sampai 90 detik untuk organisme dengan oksidase yang tertunda dan negatif jika dalam waktu 2 menit tidak tampak perubahan warna (Shields, 2010). Kertas saring dengan *Shigella dysenteriae* tidak akan menunjukkan perubahan warna karena *Shigella dysenteriae* tidak memiliki enzim sitokrom oksidase (NHS, 2015).



Gambar 2.4 Uji oksidase dengan kertas saring (Shields, 2010)

(Uji oksidase positif di sisi kiri dan negatif di sisi kanan)

2.2 Shigellosis

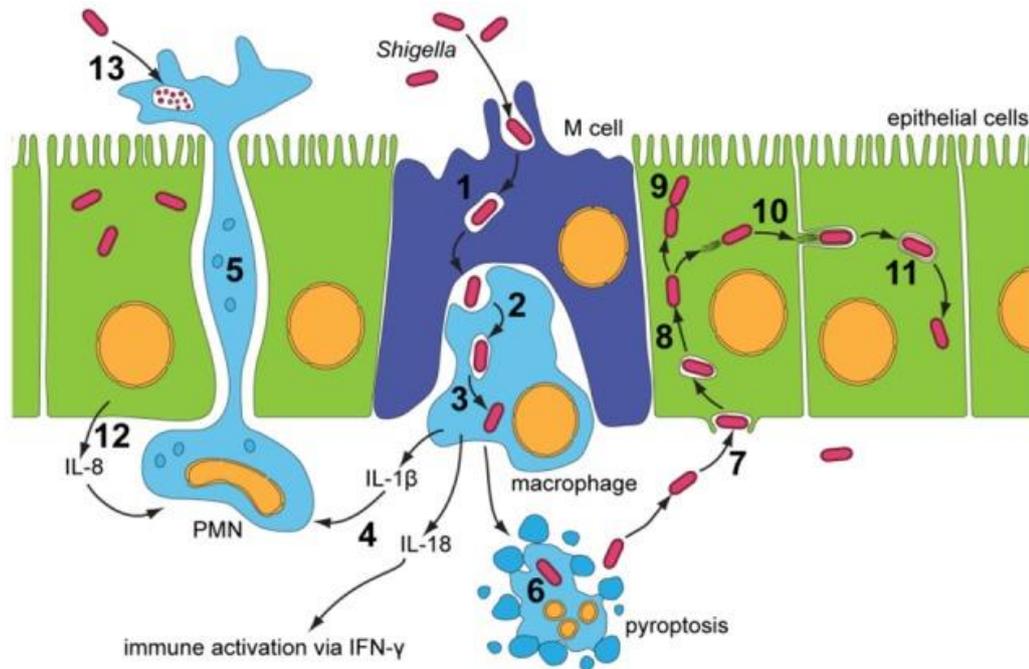
2.2.1 Patogenesis

Infeksi *Shigella dysenteriae* dimulai dengan kemampuan bakteri untuk mengubah bentuk dan formasi dari sel mukosa, memungkinkan bakteri masuk ke sitoplasma sel mukosa. Selain itu, adanya infeksi bakteri juga menginduksi produksi sitokin pro-inflamasi IL-1 dan sitokin kemotaksis IL-8 oleh sel epitel sekitar sel yang terinfeksi. Adanya sitokin tersebut menyebabkan lekosit PMN untuk berkumpul di situs infeksi. Sel-sel leukosit PMN tersebut harus menembus epitel kolon dari bagian basolateral ke apical untuk sampai di situs infeksi primer, merusak *tight junction* antar sel epitel dan memudahkan perpindahan dari sel terinfeksi ke sel tetangga yang sehat (Peng *et al.*, 2009).

Setelah bakteri masuk ke sel mukosa, makrofag akan mengendositoses bakteri mengaktifkan caspase-1 dan mengaktifasi produksi IL-1 β dan IL-1. Dengan faktor virulensi yang dimiliki *Shigella dysenteriae*, bakteri ini mampu keluar

dari vakuol fagositosis makrofag dan menginduksi apoptosis makrofag. Bakteri kemudian keluar dari makrofag dan menginvasi sel epitel lainnya melalui membran basolateral melalui stimulasi GTPase yang memicu polimerisasi aktin, diikuti depolimerisasi, membentuk filopodial dan lamellopodial membran epitel, memungkinkan bakteri untuk masuk. Masuknya bakteri ke sitoplasma epitel memungkinkan bakteri untuk bereplikasi, menghindari autofagi dan merusak badan golgi. Bakteri kemudian mengontrol aktivitas aktin membran sel sehingga dapat berpindah baik secara intraselular ataupun interselular. Protrusi bakteri di *intercellular junction* diendositososis oleh sel tetangga dan bakteri kemudian melisiskan membran vakuol endositososis. PMN kemudian mengeleminasi bakteri yang menginvasi (Roerich-Doenitz, 2013).

Infeksi pada dinding usus besar dan ileum terminal menyebabkan nekrosis membran mukosa, ulserasi, pendarahan dan pembentukan pseudomembran di area ulserasi. Pseudomembran ini terdiri dari fibrin, sel leukosit, fragmen sel, membran mukosa yang nekrosis dan bakteri. Setelah proses infeksi dan inflamasi berkurang, jaringan granulasi mengisi daerah ulserasi dan membentuk jaringan parut (Mattock dan Blocker, 2017).



Gambar 2.5 Siklus infeksi *Shigella dysenteriae* (Mattock dan Blocker, 2017)

2.2.2 Manifestasi klinis

Infeksi *Shigella dysenteriae* secara umum dapat menyebabkan dua gambaran klinis yakni diare berair disertai muntah dengan dehidrasi ringan sebagai gejala prodromal infeksi *Shigella dysenteriae* dimana bakteri memasuki periode inkubasi selama 1 hingga 3 hari. Setelah periode inkubasi, gejala yang muncul adalah tinja mukoid disertai sedikit darah dengan keluhan nyeri perut berupa kram abdomen dan tenesmus. Pada fase lanjutan ini, 200 hingga 300 ml serum protein hilang lewat feses, menyebabkan kemungkinan malnutrisi, kelainan pertumbuhan dan memperburuk tingkat mortalitas terkait dengan infeksi lain yang berlangsung (Banga *et al.*, 2011). Dari pemeriksaan fisik, hasil yang dapat ditemukan bersifat non spesifik beragam seperti toksemia sistemik, demam hingga 42°C, nyeri tekan abdomen di kuadran inferior dan suara abdomen yang berlebihan. Pemeriksaan rektum atau protoskopi bersifat nyeri bagi pasien dan menunjukkan gambaran berupa lapisan mukosa rektal yang hiperemi dan rapuh,

peningkatan produksi cairan mukosa dan *ecchymosis* diikuti ulserasi lapisan mukosa setelah beberapa hari dalam durasi infeksi. Prolaps rectum dengan defekasi yang tidak terkontrol juga dapat ditemukan (Donnenberg, 2015). Kemampuan produksi *Shiga toxin* oleh *Shigella dysenteriae* tipe 1 dapat menyebabkan beberapa komplikasi tertentu, terutama pada anak – anak, berupa nyeri kepala, meningismus, kejang, arthritis dan *hemolytic uremic syndrome* (HUS) yang tidak disertai dengan penemuan bakteri di darah. *Hemolytic uremic syndrome* ditandai dengan tiga tanda utama yakni hemolitik anemi dengan mikroangiopathi, trombositopenia dan gagal ginjal akut (Banga *et al.*, 2011).

2.2.3 Resistensi Antimikroba

Resistensi antimikroba pertama kali diamati pada tahun 1990 dimana ampicillin diperhatikan tidak mampu mengatasi kasus shigellosis di anak – anak. Dalam periode beberapa tahun kemudian, semua sampel *Shigellae* yang diisolasi dari pasien terinfeksi menunjukkan sifat resistensi terhadap ampicillin. Dalam dekade selanjutnya, Shigellosis tercatat memiliki resistensi terhadap tetracycline dan asam nalidixat. Resistensi kedua antibiotik diatas tersebut bisa dijelaskan melalui ekspresi *Extended Beta Lactamase Enzyme* (ESBL) yang diekspresikan melalui gen *bla_{TEM}* dan *bla_{SHV}*. Hal ini memaksa penggunaan quinolone seperti norfloxacin, ciprofloxacin dan ofloxacin yang direkomendasikan oleh WHO dimulai pada tahun 2005. Studi yang dilaksanakan dari tahun 2004 hingga 2014 menunjukkan bahwa spesies *Shigellae* lainnya mulai menunjukkan resistensi terhadap quinolone melalui ekspresi gen *gyrA* dan *parC*. Antibiotik cephalosporin generasi ketiga seperti ceftriaxone kemudian mulai digunakan untuk kasus Shigellosis yang menunjukkan resistensi terhadap terapi antibiotik konvensional. Perlu dicatat bahwa semenjak tahun 2009, isolat *Shigellae* menunjukkan ekspresi gen *bla_{CTX-M}*, memungkinkan produksi enzim CTX-M yang menghidrolisa

ceftriaxone. Pendekatan mendatang yang mulai dipertimbangkan bukan hanya untuk kasus infeksi *Shigella*, namun juga *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Acinetobacter baumannii* yang menunjukkan sifat *Multi Drug Resistance*, adalah kombinasi azithromycin dengan colistin (Bhattacharya *et al.*, 2012; Nüesch-Inderbinen, 2014; Lin *et al.*, 2015).

2.3 *Apium graveolens*

2.3.1 Taksonomi

Kingdom	:	Plantae
Divisi	:	Tracheophyta
Kelas	:	Magnoliopsida
Ordo	:	Apiales
Famili	:	Apiaceae
Genus	:	<i>Apium</i>
Spesies	:	<i>Apium graveolens</i> (Lansdown, 2013)

2.3.2 Morfologi

Seledri berasal dari keluarga tumbuhan Apiaceae yang memiliki karakteristik utama berupa batang yang berongga, bercabang, kaku namun memiliki kadar air yang tinggi. Beberapa jenis tanaman lain yang masuk dalam keluarga ini adalah adas, peterseli, wortel dan jinten. Daun tumbuhan seledri adalah daun dengan tulang daun menyirip dengan panjang 3 – 6 cm dan lebar 2 – 4 cm. Bunga yang dihasilkan seledri berbentuk radial simetris dengan lima kelopak identikal diameter 2 – 3 mm berwarna putih atau hijau muda, dan memiliki inti yang

datar. Bunga seledri tumbuh dalam rumpun yang terdiri dari 8 hingga 15 bunga. Tanaman seledri dapat ditemukan tumbuh dengan tinggi 30 hingga 90 cm. Buah yang dihasilkan oleh tanaman seledri, atau lebih dikenal sebagai biji seledri, bersifat *schizocarp* yang akan pecah menjadi dua *mericarp* ketika matang. *Mericarp* ini berwarna coklat kehijauan, berbentuk elips dengan panjang 1-2 mm (Al-Asmari, 2017).



Gambar 2.6 Tanaman Seledri (*Apium graveolens*) (New World Encyclopedia, 2014)

2.3.3 Distribusi

Seledri dapat merupakan tanaman yang berasal dari daerah Mediterania dan Timur Tengah dimana seledri tumbuh di musim dingin dan awal musim semi. Penggunaan seledri dalam kehidupan masyarakat peradaban kuno dapat dilacak asalnya dari berbagai artifak dan literatur yang ditemukan. Karangan bunga yang ditemukan di makam Tutankhamun, firaun Mesir kuno dari 1332 sampai 1323 SM. Biji seledri juga ditemukan di tempat penyembahan Dewi Hera pada zaman Yunani

Kuno. Bukti literatur yang menunjukkan asal mula seledri dapat banyak ditemukan di literature Yunani seperti Iliad dan Odyssey yang ditulis pada 900 SM. Bangsa Yunani sendiri menggunakan seledri, terutama untuk upacara yang berkaitan dengan kematian dikarenakan oleh rasa dan bau seledri yang kuat serta warna daunnya yang gelap (Zohary *and* Hopf, 2000).

2.3.4 Manfaat seledri

Seledri umumnya dikonsumsi sebagai secara langsung, terutama pangkal akar dan batangnya dikarenakan kandungan serat yang tinggi. Selain itu, kandungan selulosa, jenis karbohidrat yang tidak bisa dicerna dan diabsorpsi saluran pencernaan manusia, menyebabkan seledri sering digunakan sebagai sumber serat yang rendah kalori. Biji seledri juga dikenal memiliki rasa dan bau yang khas dikarenakan kandungan minyak esensial yang dikandung sehingga seringkali digunakan sebagai rempah – rempah hidangan. Biji seledri juga dapat ditemukan di parfum dan produk kecantikan lainnya. Sebelum abad ke-16, seledri juga dikenal sebagai obat herbal yang dipercaya dapat menyembuhkan berbagai penyakit. Biji seledri digunakan sebagai agen diuretik dan ekstrak biji seledri digunakan untuk menyembuhkan *gout arthritis*. Pangkal akar seledri digunakan untuk mengeluarkan batu ginjal, sebagai stimulan saluran pencernaan dan metabolisme hati, mengatasi agitasi ringan, penurunan nafsu makan, faringitis dan antihelmintik (Al-Asmari *et al.*, 2017).

2.3.5 Kandungan kimia seledri

Komposisi kandungan kimia seledri bervariasi berdasarkan bagian tumbuhan yang digunakan (batang, daun atau biji), persebaran geografis, tingkat maturasi seledri saat dipanen dan metode ekstraksi. Komposisi utama biji seledri adalah limonene, kumarin, bergapten, phthalides, β -salinene, salinene, apiol,

santalol, sedanolide, asam isedanik, β -pinene, camphene, cymene, terpinene, sabinene terpinolene, linoleat, petroselinat, pamitoleat dan oleat. Komposisi batang seledri terdiri dari celerin, bergapten, apiumoside, apiumetin, apigravrin, osthénol, isopimpinellin, isoimperatorin, celereoside, 5,8-hydroxy methoxypsoralen graveobioside A dan B, apiin, apigenin, isoquercitrin, saponin, tannins dan phytic acid. Komposisi daun seledri mirip dengan komposisi batang seledri dengan tambahan kolin askorbat, asam klorogenat enzim inositol trifosfat (Malhotra, 2012; Al-Snafi, 2014).

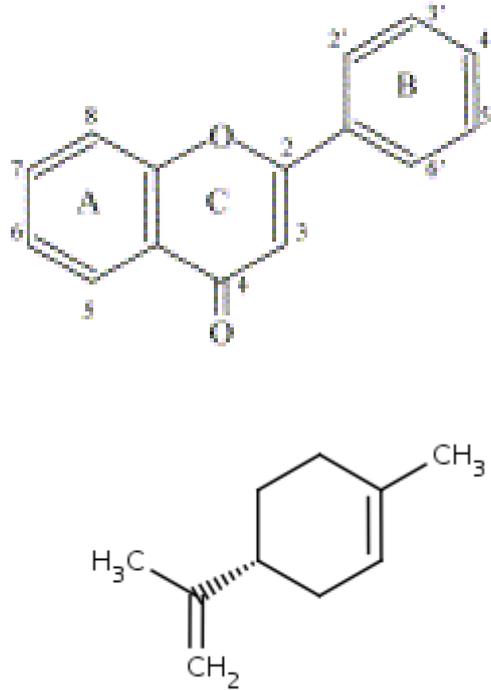
Seledri memiliki kandungan flavonoid berupa senyawa apiin yang dapat ditemukan di batang dan daun seledri. Flavonoid banyak ditemukan di bagian tumbuhan yang memiliki kemampuan untuk berfotosintesis. Fungsi flavonoid bagi tumbuhan adalah untuk menarik perhatian organisme penyerbuk, melindungi tumbuhan dari organisma patogen seperti fungi dan mengurangi radiasi UV-B. Selain itu, flavonoid juga berfungsi untuk fotosensitisasi, transfer energi, regulator hormon pertumbuhan, kontrol proses respirasi dan fotosintesis, morfogenesis dan penentuan jenis kelamin organ reproduksi tumbuhan. Struktur kimia utama flavonoid adalah 2-phenyl-benzo[α]pyrane yang memiliki 2 cincin benzene (A dan B) dihubungkan dengan cincin pirene heterosiklik (C) (Quideau *et al.*, 2011).

Berbagai penelitian telah membuktikan sifat antibakterial yang dimiliki oleh senyawa flavonoid terhadap berbagai bakteri Gram positif dan Gram Negatif seperti *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia* dan *Salmonella typhimurium* (Kumar and Pandey, 2013). Mekanisme antimikroba senyawa flavonoid dapat dijelaskan dengan tiga metode utama yakni inhibisi metabolisme energi, inhibisi membran sitoplasma dan inhibisi sintesis asam nukleat. Gugus cincin B yang dimiliki oleh senyawa flavonoid memiliki peran dalam penambahan gugus hidrogen sehingga menghambat

sintesis DNA dan RNA dalam gangguan penumpukan senyawa basa asam nukleat sehingga menghambat sintesis DNA dan RNA. Fungsi inhibisi membran sel yang dimiliki flavonoid dikarenakan kemampuan flavonoid dalam mengganggu integritas membran sel melalui destruksi langsung lipid bilayer dan induksi lisis bakteri melalui perubahan tekanan osmotik. Kerusakan membran ini menyebabkan keluarnya materi intraseluler sehingga bakteri akan mati. Flavonoid juga memiliki kemampuan menghambat enzim yang bekerja dalam proses transpor electron bakteri, *NADH-cytochrome c reductase* (Tajkarimi *et al.*, 2010).

Limonen merupakan senyawa hidrokarbon yang juga dapat ditemukan dalam berbagai bagian dari seledri. Selain fungsinya sebagai zat aditif perasa dalam berbagai produk konsumsi, limonen juga telah diteliti memiliki fungsi antifungal dan antibakteri. Mekanisme antibakterial limonen dapat dijelaskan melalui kemampuan limonene untuk menghambat proses pembentukan lapisan lipopolisakarida yang mengelilingi membran luar bakteri, menyebabkan peningkatan permeabilitas membran terhadap senyawa lipofilik (Espina, 2013). Asam klorogenat merupakan bagian dari kelompok senyawa polifenol yang berasal dari esterifikasi asam cafeic dan asam quinic. Asam klorogenat juga telah diteliti memiliki sifat antimikroba dengan fungsi yang mirip dengan senyawa flavonoid yakni dengan berikatan dengan membrane plasma luar bakteri, meningkatkan permeabilitas membrane yang menyebabkan hilangnya fungsi membrane dan keluarnya materi intraseluler, termasuk nukleotida yang memicu kematian sel bakteri (Lou *et al*, 2011). Tanin merupakan salah satu senyawa polifenol yang dapat ditemukan di berbagai bagian tumbuhan dan seringkali digunakan dalam proses pewarnaan tekstil dan kulit. Tanin memiliki sifat bakteristatik dengan mekanisme inhibisi enzim reverse transcriptase dan DNA topoisomerase. Ketika kedua enzim tersebut dihambat, pembentukan sel bakteri

juga akan terhambat sehingga mengurangi jumlah koloni bakteri yang muncul (Nuria *et al.*, 2009).

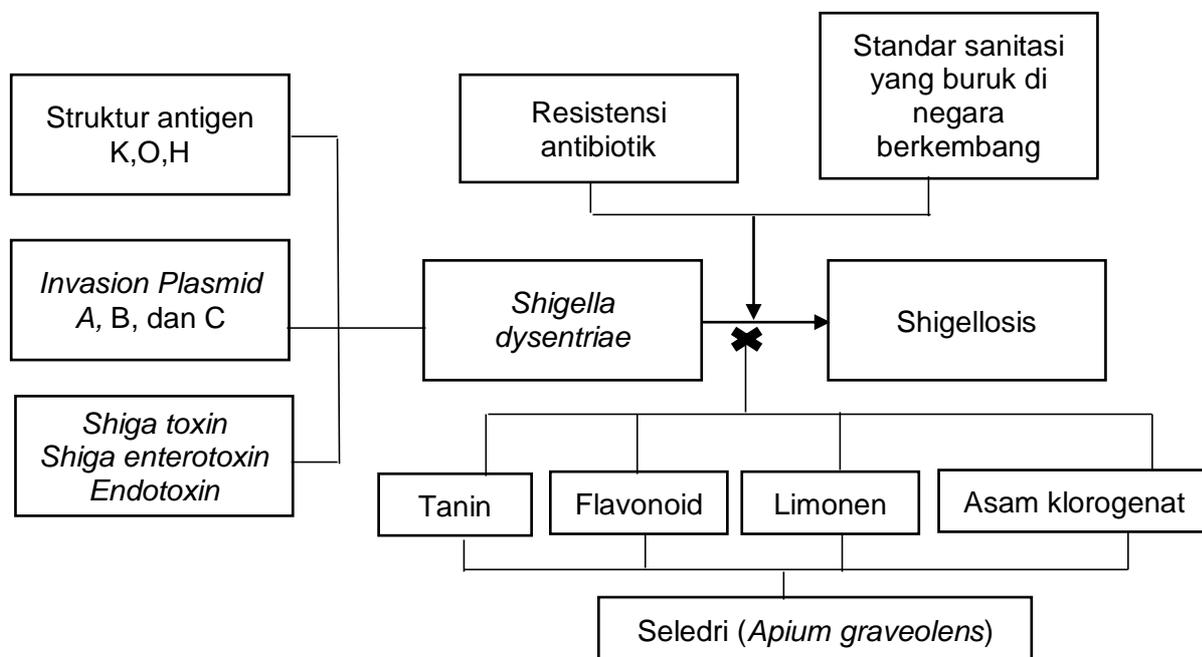


Gambar 2.7 Struktur Kimia Flavonoid (kiri) dan Limonene (kanan)
(Quiedeau *et al.*, 2011; Espina, 2013)

BAB 3

KERANGKA KONSEP, KERANGKA TEORI, DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Teori

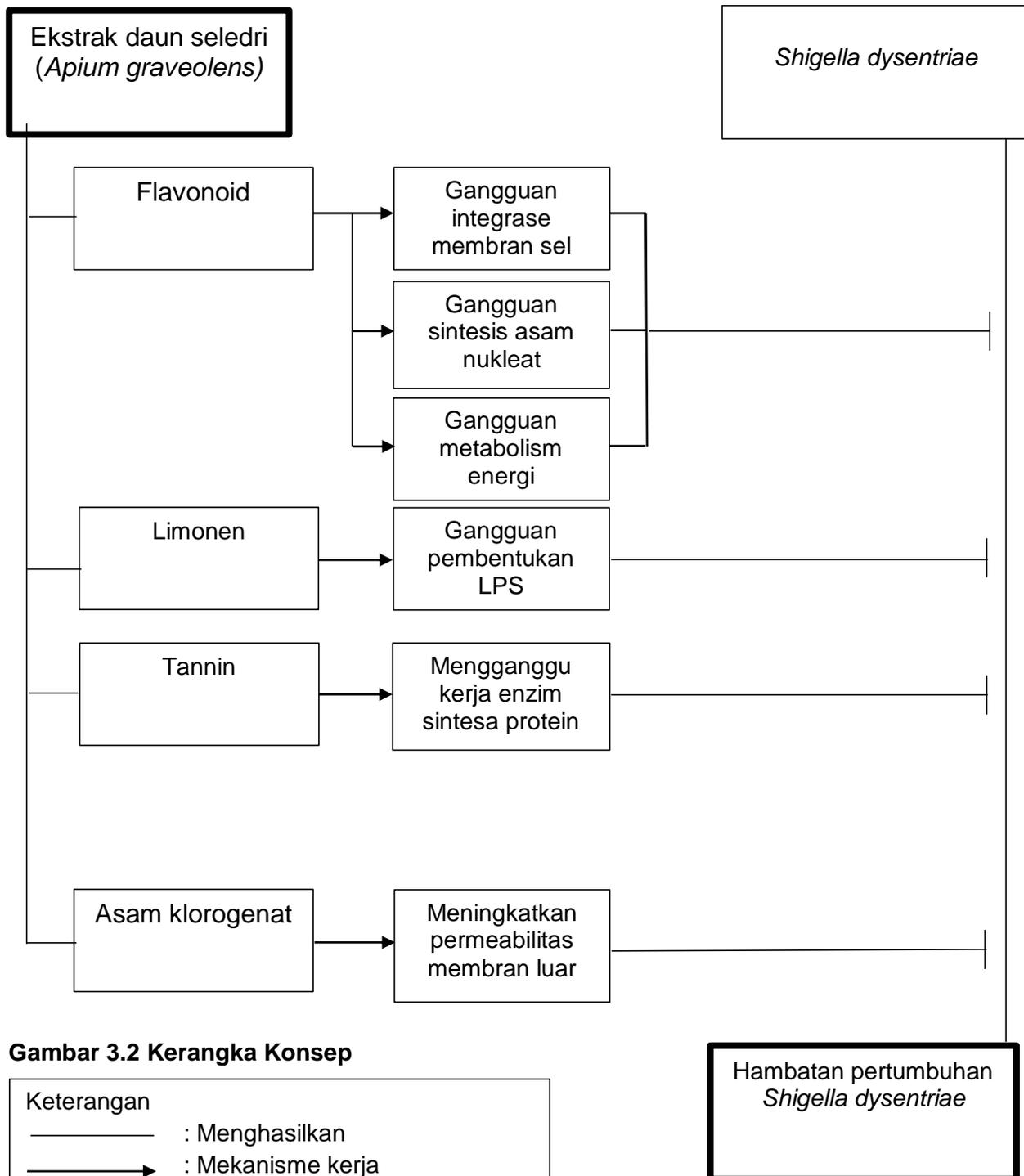


Gambar 3.1 Kerangka Teori

3.2 Penjelasan Kerangka Teori

Bakteri *Shigella dysenteriae* merupakan bakteri patogenik saluran cerna yang menginfeksi ileum terminal dan usus besar, menyebabkan penyakit shigellosis. Bakteri ini memiliki beberapa faktor virulensi yang membantu proses infeksi. Struktur antigen dan *invasion plasmid* yang dimiliki bakteri membantu invasi sel saluran pencernaan. Toksin yang dimiliki bakteri mampu memicu respon inflamasi lokal dan bersifat enterotoksik. Penyakit shigellosis masih dapat ditemukan di negara berkembang dengan standar sanitasi yang buruk. Selain itu, resistensi antibiotik oleh bakteri ini juga mulai dilaporkan. Seledri (*Apium graveolens*) memiliki kandungan senyawa tannin, flavonoid, limonene dan asam klorogenat yang bersifat sebagai antimikroba.

3.3 Kerangka Konsep



3.4 Penjelasan Kerangka Konsep

Penelitian ini menggunakan ekstrak seledri (*Apium graveolens*) yang diduga dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae*. Seledri memiliki kandungan flavonoid apiin yang memiliki sifat antimikroba. Senyawa flavonoid memiliki potensi sebagai senyawa antimikroba melalui mekanisme inhibisi sintesis asam nukleat, inhibisi metabolisme energi dan mengganggu integritas membran sel yang menginduksi kematian sel. Flavonoid mengganggu sintesis asam nukleat melalui inhibisi DNA gyrase, enzim yang dibutuhkan saat sintesis DNA untuk mengurangi regangan ketika replikasi DNA. Ketika enzim ini diinhibisi, DNA bakteri akan mengalami kerusakan, menginduksi respon SOS bakteri yang secara langsung menyebabkan penghentian siklus dan replikasi sel. Mekanisme inhibisi metabolisme energi dapat dijelaskan melalui kemampuan flavonoid untuk inhibisi enzim *NADH-cytochrome c reductase*. Inhibisi kerja enzim ini akan menyebabkan gangguan produksi energi di membran mitokondria, terutama dalam proses transport elektron sehingga mengganggu proses sintesis makromolekul yang dibutuhkan bakteri. Mekanisme yang menyebabkan kerusakan integritas membran sel dapat dijelaskan melalui dua kemungkinan yakni kemampuan flavonoid untuk langsung merusak membrane sel dan melalui perubahan tekanan osmotik. Flavonoid mampu menembus membran lipid bilayer dan menyebabkan fusi membran sel, menyebabkan keluarnya materi intrasel dan agregasi protein. Flavonoid juga menginduksi keluarnya cairan dari dalam sel bakteri, menyebabkan lisis sel. Dari penjabaran di atas, dapat disimpulkan bahwa ekstrak *Apium graveolens* memiliki potensi untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae*. Kemampuan limonene dalam menghambat pembentukan lapisan polisakarida dapat dijelaskan oleh interaksi limonene dengan protein LptD, protein yang dibutuhkan dalam penyusunan lipopolisakarida. Limonen akan langsung merusak LptD, meningkatkan permeabilitas membran

sitoplasma bakteri terhadap senyawa lipofilik. Peningkatan permeabilitas membran ini memungkinkan limonen untuk mampu masuk ke dalam sel bakteri dan menyebabkan denaturasi materi intraseluler sehingga menginduksi kematian sel bakteri. Asam klorogenat berikatan dengan membran plasma luar bakteri, meningkatkan permeabilitas membrane yang menyebabkan hilangnya fungsi membran dan keluarnya materi intraseluler, termasuk nukleotida yang memicu kematian sel bakteri. Tanin memiliki kemampuan inhibisi enzim reverse transcriptase dan DNA topoisomerase sehingga bersifat bakteristatik.

3.5 Hipotesis Penelitian

Ekstrak etanol seledri (*Apium graveolens*) mempunyai efek antibakteri terhadap *Shigella dysenteriae* secara in vitro yang dilihat dari adanya KHM dan KBM.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan desain *post-test only control group experimental* untuk mengetahui pengaruh antimikroba ekstrak etanol daun seledri (*Apium graveolens*) terhadap pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae*. Prosedur penelitian menggunakan metode dilusi tabung. Metode dilusi tabung ekstrak etanol seledri ini akan melewati 2 tahap, yaitu tahap pengujian bahan di media cair untuk menentukan Kadar Hambat Minimum (KHM), kemudian dilanjutkan dengan tahap penggoresan pada media NA (*Nutrient Agar*) yang mengandung koloni *Shigella dysenteriae* untuk menentukan Kadar Bunuh Minimum (KBM) dari ekstrak etanol seledri terhadap *Shigella dysenteriae*.

4.2 Sampel

Sampel pada penelitian ini adalah bakteri *Shigella dysenteriae* yang berasal dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Jumlah pengulangan penelitian menggunakan rumus Lukito sebagai berikut (Lukito, 1998):

$$p(n-1) \geq 16$$

$$6(n-1) \geq 16$$

$$6n-6 \geq 16$$

$$6n \geq 22 \rightarrow n \geq 3,667 \approx 4$$

Keterangan:

p = jumlah perlakuan (6 konsentrasi ekstrak *Shigella dysenteriae*)

n = jumlah pengulangan (4 kali pengulangan)

4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Maret hingga Juni 2019.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Tergantung

Efektivitas ekstrak etanol *Apium graveolens* sebagai antimikroba terhadap bakteri *Shigella dysenteriae* yang dinilai kejernihan tabung dan jumlah koloni yang tumbuh pada *plate NAP*.

4.4.2 Variabel Bebas

Variabel bebas adalah dosis ekstrak etanol *Apium graveolens* dengan konsentrasi yang akan diperoleh dari penelitian pendahuluan.

4.5 Definisi Operasional

- Daun seledri (*Apium graveolens*) yang dipakai untuk penelitian ini diperoleh dari daerah pertanian Batu dan diekstrak di Laboratorium Teknik Kimia Polinema Malang.
- Ekstrak etanol *Apium graveolens* adalah daun seledri (*Apium graveolens*) yang telah dikeringkan dan diekstraksi dengan metode maserasi dan evaporasi (pemisahan zat-zat aktif dengan pelarutnya) menggunakan etanol 96%.
- Isolat bakteri *Shigella dysenteriae* adalah isolat yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Isolat akan diidentifikasi ulang sebelum digunakan dalam penelitian.

- Uji efektivitas adalah uji yang melalui hasil KHM (Kadar Hambat Minimum) dan KBM (Kadar Bunuh Minimum) bertujuan untuk menentukan efektif tidaknya ekstrak etanol seledri (*Apium graveolens*) sebagai antimikroba terhadap *Shigella dysenteriae*.
- KHM (Kadar Hambat Minimum) adalah konsentrasi minimal dimana larutan ekstrak etanol seledri mampu menghambat pertumbuhan *Shigella dysenteriae*.
- KBM (Kadar Bunuh Minimum) adalah konsentrasi minimal dimana larutan ekstrak seledri mampu membunuh bakteri. Jumlah ini ditandai dengan tidak ditemukan pertumbuhan koloni bakteri pada medium NA yang telah dilakukan *streaking* dengan satu ose larutan ekstrak seledri (*Apium graveolens*) atau dengan jumlah koloni bakteri < 0,1% *original inoculum*.
- *Original inoculum* adalah inokulasi bakteri dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml pada media agar padat yang digunakan untuk mencari kategori KBM.
- Kontrol bakteri adalah tabung berisi bakteri dengan konsentrasi ekstrak etanol sebesar 0% yang dapat digunakan untuk memastikan apakah ada kontaminasi bakteri lain.
- Kontrol bahan adalah bahan berupa larutan ekstrak etanol seledri untuk memastikan apakah bahan yang digunakan steril.
- Pengamatan kualitatif digunakan untuk menentukan skor pertumbuhan *Shigella dysenteriae* berdasarkan ketebalan bayangan hitam yang tampak di balik tabung.
- Pengamatan kuantitatif digunakan untuk mengukur pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* secara kuantitatif dengan menghitung koloni bakteri dengan *colony counter*.

4.6 Instrumen Penelitian

4.6.1 Alat

- *Object glass*
- *Ose*
- *Bunsen burner*
- *Disc/Plate* kosong steril
- Korek api
- *Vortex*
- Inkubator
- Mikroskop
- Nampan
- Timbangan
- Ekstraktor Soxhlet
- Waterbath
- *Rotatory evaporator*
- Cawan petri
- Mikropipet
- Spektrofotomer

4.6.2 Bahan

4.6.2.1 Untuk Identifikasi Bakteri *Shigella dysenteriae*

- *Salmonella Shigella Agar*
- *Triple Sugar Iron Agar*
- *Tryptone water*
- MRVP broth
- Citrate agar
- Kristal violet

- Lugol
- Alkohol 96%
- Safranin
- Aquadest
- Minyak imersi
- *Oxidase strip*
- Kertas penghisap
- Kapas
- *Stuart's Urease Broth*
- Ose
- Mikroskop

4.6.2.2 Untuk Pembuatan Ekstrak Etanol *Apium graveolens*

- Daun *Apium graveolens*
- 450 ml etanol
- Air pendingin

4.6.2.3 Untuk Uji Kepekaan Ekstrak Etanol *Apium graveolens*

- Isolat *Shigella dysenteriae*
- Ekstrak etanol *Apium graveolens*
- NaCl
- *Aquadest* steril
- Nutrient Agar
- Nutrient Broth
- Ose
- Rak Tabung
- Tabung Reaksi
- Inkubator
- *Vortex*

- Spektrofotometer
- Mikorpipet
- Bunsen

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Identifikasi Ulang Bakteri *Shigella dysenteriae*

4.7.1.1 Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram bertujuan untuk mengidentifikasi bakteri *Shigella dysenteriae* yang termasuk dalam famili *Enterobacteriaceae* yang bersifat Gram negatif (Murray *et al.*, 2015).

Prosedur pewarnaan Gram:

1. Bersihkan gelas obyek dengan kertas tisu dan kemudian dilewatkan di atas api untuk menghilangkan lemak. Lalu biarkan sampai dingin.
2. Panaskan ose dengan menggunakan bunsen hingga ose berpijar merah.
3. Ambil satu tetes akuades steril dengan menggunakan ose, teteskan pada gelas obyek.
4. Panaskan kembali ose dengan menggunakan bunsen hingga ose berpijar merah.
5. Ambil satu koloni bakteri dari medium padat, dan buat sediaan bakteri di atas gelas obyek dengan cara mensuspensikan dengan akuades steril yang telah ditetaskan sebelumnya dengan ketebalan yang cukup dan dibiarkan kering di udara, kemudian difiksasi di atas api bunsen.
6. Sediaan dituangi dengan kristal violet. Setelah 1 menit, sisa kristal violet dibuang dan sediaan dibilas dengan air.

7. Sediaan dituangi dengan lugol. Setelah 1 menit, sisa lugol dibuang dan sediaan dibilas dengan air.
8. Sediaan dituangi dengan alkohol 96%. Setelah 5-10 detik atau sampai warna cat luntur, sisa alkohol dibuang, dan sediaan dibilas dengan air.
9. Sediaan dituangi dengan safranin. Setelah 30 detik, sisa safranin dibuang dan sediaan dibilas dengan air.
10. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap, selanjutnya dilihat di bawah mikroskop dengan obyektif perbesaran 100x.
11. Hasil positif: bakteri *Shigella dysenteriae* berbentuk batang dan tercat merah (Gram negatif) berukuran kecil dan pendek.

4.7.1.2 *Salmonella Shigella Agar*

Salmonella Shigella Agar merupakan medium kultur selektif yang biasanya digunakan untuk isolasi dan identifikasi *Enterobacter*, termasuk *Shigella dysenteriae* (NHS, 2015).

Prosedur inokulasi:

1. Dilakukan inokulasi bakteri *Shigella dysenteriae* dengan metode *streaking* pada *Salmonella Shigella Agar*.
2. Medium diinkubasi pada incubator dengan suhu 35°C selama 18-24 jam dan diamati hasilnya.
3. Koloni *Shigella dysenteriae* akan muncul sebagai koloni bulat, tidak berwarna dengan diameter satu hingga dua milimeter.

4.7.1.3 Tes Oksidase

Tes oksidase merupakan sebuah prosedur uji pada mikroorganisme yang berfungsi untuk mendeteksi adanya enzim *cytochrome c oxidase*. Mikroorganisme

yang memiliki enzim tersebut dapat mengoksidasi glukosa dan karbohidrat lainnya (Murray *et al.*, 2015)

Prosedur *oxidase strip test*:

1. Siapkan kertas filter yang telah mengandung oksidase *tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride* 1% (oxidase strip).
2. Ambil koloni kuman uji dengan ose dan usapkan pada kertas filter.
3. Perhatikan perubahan warna yang terjadi dalam 10 detik.
4. Hasil dikatakan positif jika terjadi perubahan warna menjadi keunguan pada daerah yang diusap dengan bakteri uji dalam waktu 10 detik.
5. Hasil dikatakan negatif jika tidak terjadi perubahan warna menjadi keunguan.
6. Bakteri *Shigella dysenteriae* akan memberi hasil negatif (NHS, 2015).

4.7.1.4 Tes Urease

Penggunaan uji urease dilakukan untuk membedakan *Shigella dysenteriae* dengan *Enterobacteriaceae* lainnya yang mampu menghidrolisa urea menjadi ammonia dan karbon dioksida seperti *Proteus sp.* Proses hidrolisa urea ini membutuhkan enzim urease yang mengubah urea (CH_4N_2 air (H_2O) menjadi karbon dioksida (CO_2) dan amonia (NH_3). Medium yang akan digunakan untuk uji urease ini adalah *Stuart's Urea Broth* (Brink, 2010).

Prosedur uji urease :

1. Dengan ose atau tusuk gigi, ambil sedikit koloni *Shigella dysenteriae* dan masukkan ke tabung reaksi yang berisi *Stuart's Urea Broth*.
2. Campuran kemudian diagitasi dengan cara menggoyangkan perlahan tabung reaksi.

3. Tabung reaksi dimasukkan ke inkubasi dengan suhu 35°C dan diamati perubahan yang muncul sampai 48 jam
4. Jika dalam 48 jam, ada perubahan warna di medium dari kuning menjadi ungu, berarti hasil tes positif.
5. Jika dalam 48 jam tidak muncul perubahan warna menjadi ungu, berarti hasil tes negatif
6. *Shigella dysenteriae* akan memberi hasil negatif (NHS, 2015).

4.7.1.5 TSI-IMViC

Triple Sugar Iron test dilakukan untuk membedakan sifat kemampuan fermentasi karbohidrat dari empat spesies *Shigella* sp. yang berbeda. Media ini berisi tiga jenis gula yang berbeda yakni 0.1% glukosa, 1% sukrosa, dan 1% sukrosa. Kemampuan bakteri untuk memfermentasikan laktosa dan sukrosa akan menghasilkan suasana asam di medium, menyebabkan perubahan warna pada dasar tabung dan *slant* medium, sedangkan jika bakteri mampu memfermentasikan glukosa, hanya bagian dasar medium yang berubah warna. IMViC merupakan rangkaian tes yang terdiri dari tes *Indole*, *Motility*, *Methyl-Red* (MR), *Voges-Proskaur* (VP), *Citrate*. Tes *Indol*. *Shigella dysenteriae* tidak mampu menghasilkan indol sehingga hasil tes indol negatif dengan tidak ditemukannya perubahan warna pada medium dengan motilitas negatif. Pada tes *Methyl Red* dan *Voges-Proskaur*, *Shigella dysenteriae* akan memecah glukosa melalui *acidic pathway* yang menyebabkan perubahan warna menjadi merah pada medium MR dan bukan VP. *Shigella dysenteriae* tidak akan menghasilkan perubahan warna pada medium uji *citrate* menjadi biru karena ketidakmampuan bakteri untuk mengubah asam sitrat menjadi Na₂CO₃ yang bersifat basa. (Carroll *et al*, 2016).

Prosedur uji TSI-IMViC :

1. Jarum lurus dipanaskan sampai berpijar merah kemudian didinginkan agar tidak membunuh koloni.
2. Dengan jarum yang sudah dipanaskan, ambil koloni yang tumbuh di media SSA.
3. Koloni di ujung jarum ditusukkan ke medium TSI sampai dasar tabung
4. Bagian *slant* kemudian diberi *streak* bakteri dengan jarum yang sama
5. Mencampur koloni bakteri dengan medium triptofan.
6. Mencampur koloni bakteri dengan MRVP *broth*.
7. Ose dipanaskan hingga berpijar merah kemudian didinginkan agar tidak membunuh koloni
8. Dengan ose yang sudah dipanaskan, ambil koloni yang tumbuh di media SSA.
9. Koloni kemudian di *streaking* di bagian miring *citrate agar*.
10. Tabung – tabung reaksi dimasukkan ke inkubator dengan suhu 35°C dengan durasi 18 hingga 24 jam
11. Menambahkan reagen kovac ke medium triptofan
12. Menambahkan reagen *methyl red* ke MR *broth* dan diamkan selama 1 jam.
13. Menambahkan reagen Barrit A dan B ke VP *broth* dan diamkan selama 1 jam.
14. Perubahan warna dari merah ke kuning yang menunjukkan adanya proses fermentasi pada medium TSI
15. Melihat adanya produksi H₂S berupa warna hitam dan gas.

16. Bakteri *Shigella dysenteriae* akan menunjukkan gambaran berupa perubahan warna hanya di dasar tabung dan tidak ada produksi gas dan H₂S. Bakteri *Shigella dysenteriae* akan mengasilkan perubahan warna hanya oada medium *Methyl Red* dari kuning menjadi merah. Uji *Indole*, *Voges-Proskaur*, dan *Citrate* tidak akan menghasilkan perubahan (Murray *et al.*, 2015).

4.7.2 Pembuatan Ekstrak Etanol *Apium graveolens*

4.7.2.1 Proses Pengeringan

1. Daun seledri dibersihkan dengan cara dibasuh dengan air mengalir.
2. Proses selanjutnya adalah mengiris kecil-kecil daun seledri untuk mempercepat proses pengeringan.
3. Daun seledri di keringkan dengan cara diangin-anginkan selama lebih kurang 2 hari hingga benar-benar kering (Redfern *et al*, 2014).

4.7.2.2 Proses Ekstraksi (Metode Maserasi)

1. Setelah mengalami proses pengeringan, daun seledri tadi kemudian dihaluskan dengan menggunakan mortar hingga berbentuk bubuk.
2. Timbang sebanyak 100 gram (sampel kering).
3. Masukkan 100 gram sampel kering ke dalam gelas Erlenmeyer ukuran 1 liter.
4. Kemudian rendam dengan etanol 96% hingga volume 900 ml.
5. Kocok sampai benar-benar tercampur (\pm 30 menit).
6. Didiamkan satu malam sampai mengendap.
7. Setelah itu maka daun seledri kemudian diuapkan secara bertahap di dalam evaporator; hasil akhir dari proses evaporasi ini adalah terbentuknya daun seledri yang siap dipergunakan dalam penelitian ini (Redfern *et al*, 2014).

4.7.2.3 Proses Evaporasi

1. Ambil lapisan atas campuran etanol 96% dengan zat aktif daun seledri yang sudah terambil.
2. Masukkan dalam labu evaporasi 1 liter.
3. Pasang labu evaporasi pada evaporator.
4. Isi *waterbath* dengan air sampai penuh.
5. Pasang semua rangkaian alat, termasuk *rotary evaporator*, pemanas *water bath* (atur sampai 90°C), sambungkan dengan aliran listrik.
6. Biarkan larutan etanol 96% memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu.
7. Tunggu sampai aliran etanol 96% berhenti menetes pada labu penampung (\pm 1,5 sampai 2 jam untuk 1 labu).
8. Hasil yang diperoleh kira-kira $\frac{1}{2}$ dari berat awal daun seledri kering (Redfern *et al*, 2014).

4.7.3 Persiapan Suspensi Uji *Shigella dysenteriae*

1. Dipersiapkan bakteri *Shigella dysenteriae* dari medium *Salmonella Shigella Agar* yang telah diuji konfirmasi.
2. Ambil 5 koloni ($d \geq 1\text{mm}$) dengan ose kemudian dimasukkan ke dalam 5 ml NaCl 0,85% steril. Kemudian diukur *Optical Density* (OD) atau kepadatan optisnya dengan spektrofotometer pada $\lambda_{\text{maks}} = 530\text{ nm}$. Dari hasil yang diperoleh dibuat suspensi sel yang mengandung 1×10^6 hingga 5×10^6 CFU/ml dengan rumus $n_1 \times v_1 = n_2 \times v_2$ (Murray *et al.*, 1999).
3. Untuk mendapatkan suspensi sel yang mengandung $0,5 \times 10^6$ hingga $2,5 \times 10^6$ CFU/ml dilakukan dengan cara mengambil 1 ml (dari tabung yang mengandung 10^6 CFU/ml) untuk dicampur dengan 9 ml NaCl 0,85% steril. Maka akan didapatkan suspensi sel dengan konsentrasi 10^5 CFU/ml.

Proses dilanjutkan dua kali hingga mencapai konsentrasi suspensi bakteri yang digunakan untuk tes, yaitu $0,5 \times 10^6$ hingga $2,5 \times 10^6$ CFU/ml (Murray *et al.*, 1999).

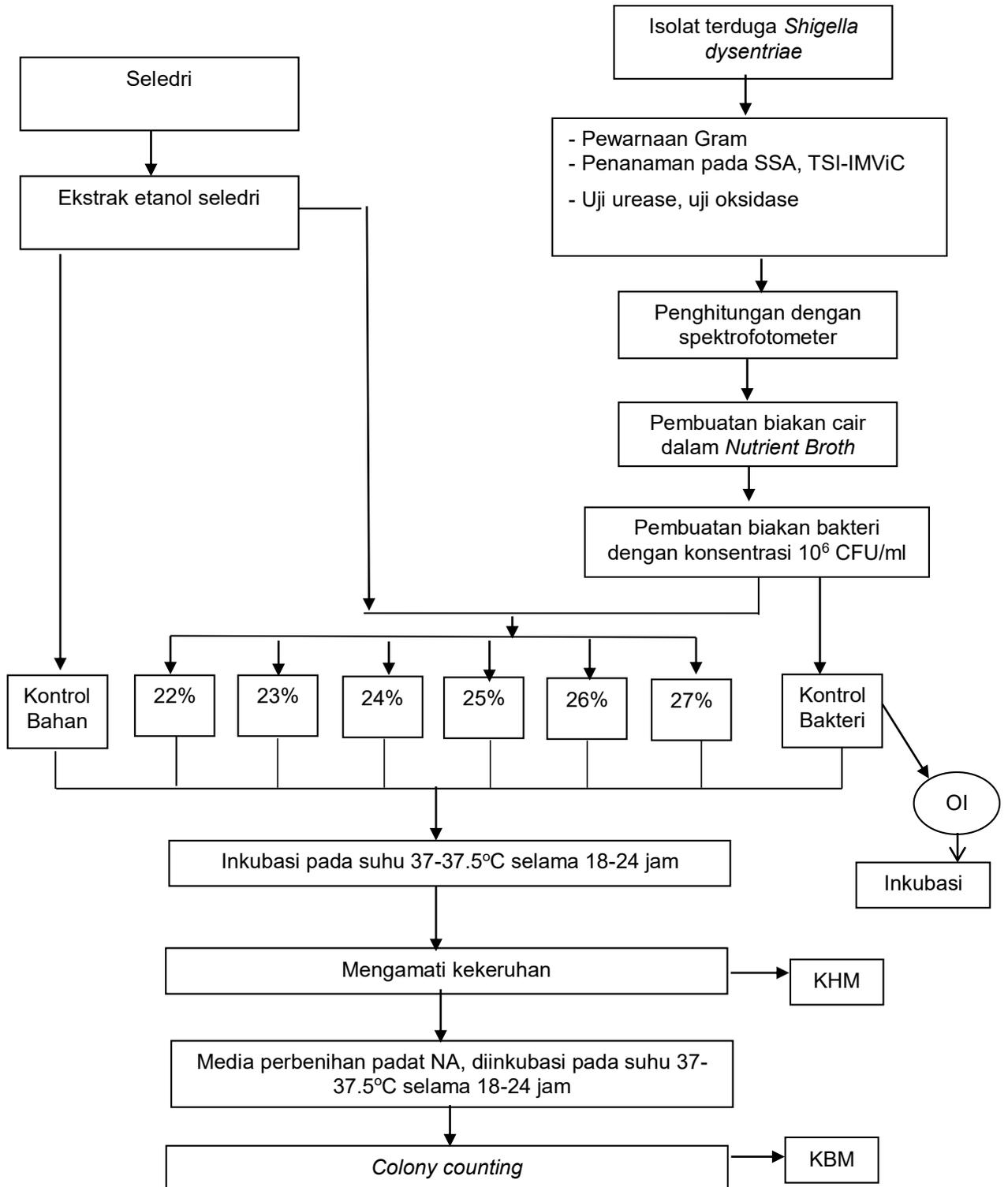
4.7.4 Uji Aktivitas Antimikroba Ekstrak Etanol Daun Seledri (*Apium graveolens*) Terhadap *Shigella dysenteriae*

Rangkaian uji aktivitas antimikroba ekstrak etanol daun seledri (*Apium graveolens*) adalah sebagai berikut (diadopsi dengan penyesuaian dosis dari Murray *et al.*, 2015):

1. Siapkan 7 tabung steril, beri tanda KK, A, B, C, D, E, dan KB (kontrol bahan). Kontrol bahan (KB) adalah ekstrak etanol seledri. Kontrol bakteri (KB) adalah biakan bakteri *Shigella dysenteriae* dengan konsentrasi 10^4 CFU/ml.
2. Masukkan 1,56 ml aquades steril ke dalam tabung bertanda A, lalu tambahkan 0,44 ml ekstrak seledri.
3. Masukkan 1,54 ml aquades steril ke dalam tabung bertanda B, lalu tambahkan 0,46 ml ekstrak seledri.
4. Masukkan 1,52 ml aquades steril ke dalam tabung bertanda C, lalu tambahkan 0,48 ml ekstrak seledri.
5. Masukkan 1,5 ml aquades steril ke dalam tabung bertanda D, lalu ditambahkan 0,50 ml ekstrak seledri.
6. Masukkan 1,48 ml aquades steril ke dalam tabung bertanda E, lalu ditambahkan 0,52 ml ekstrak seledri.
7. Masukkan 1,46 ml aquades steril ke dalam tabung bertanda F, lalu ditambahkan 0,54 ml ekstrak seledri.
8. Masukkan 1 ml aquades steril ke dalam tabung bertanda konsentrasi 0%.

9. Setiap tabung ditambahkan 1 ml biakan cair *Shigella dysenteriae*, kecuali tabung kontrol bahan.
10. Memasukkan 2 ml ekstrak seledri ke dalam tabung bertanda KB.
11. Dari tabung bertanda KF diambil 1 ose untuk diinokulasikan pada NAP (sebagai *original inoculum* (OI)).
12. Semua tabung dan plate *original inoculum* diinkubasi pada suhu 37°-37,5° C selama 18-24 jam.
13. Setelah 18-24 jam, derajat kekeruhan pada semua tabung diperhatikan dan dicatat. Derajat kekeruhan dapat dibaca dengan cara meletakkan sebuah kertas putih dibelakang tabung, dimana sebelumnya pada kertas tersebut digambar sebuah garis hitam, kemudian garis hitam tersebut diperhatikan dari depan tabung. Konsentrasi paling rendah yang tidak menunjukkan kekeruhan adalah KHM.
14. Jumlah koloni pada *original inoculum* dihitung dengan menggunakan *colony counter*.
15. Untuk mengetahui KBM, lakukan penggoresan dari seluruh tabung pada media NAP, kemudian diinkubasikan pada suhu 37°-37,5° C selama 18-24 jam.
16. Setelah 18-24 jam hitung jumlah koloni *Shigella dysenteriae* yang tumbuh dengan *colony counter*, konsentrasi terendah dengan jumlah koloni kurang dari 0,1% *original inoculum* adalah KBM.

4.7.5 Kerangka Operasional Penelitian



Gambar 4.1 Kerangka Operasional Penelitian

4.7.6 Penjelasan Kerangka Operasional Penelitian

Seledri yang didapatkan dibuat menjadi ekstrak etanol seledri dengan metode maserasi, ekstraksi dan evaporasi. Bakteri yang diduga merupakan bakteri *Shigella dysenteriae* diuji ulang dengan uji Gram, uji oksidase, uji urease dan inokulasi ke media SSA, TSI-IMViC. Biakkan bakteri kemudian dibiakkan ke *Nutrient Broth* dan dibuatkan biakkan bakteri dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml. Kemudian bakteri dicampurkan dengan ekstrak etanol menjadi 6 konsentrasi yang berbeda yakni konsentrasi 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, dan 27%. Dua tabung tambahan juga disiapkan sebagai tabung kontrol bahan dan kontrol bakteri untuk melihat apakah ada kontaminasi terhadap ekstrak atau biakkan bakteri. Dari kontrol bakteri, diambil sebagian menjadi *Original Inoculum* untuk menentukan KBM. Semua tabung diatas kemudian diinkubasi pada suhu 37°C hingga $37,5^{\circ}\text{C}$ selama 18 hingga 24 jam. Tabung kemudian diamati untuk menentukan kadar hambat minimum dengan melihat kekeruhan isi tabung dengan konsentrasi tabung pertama yang menunjukkan kejernihan cairan sebagai konsentrasi hambat minimum (KHM). Isi tabung kemudian diinokulasikan ke media padat *Nutrient Agar* dan diinkubasikan pada suhu 37°C hingga $37,5^{\circ}\text{C}$ selama 18 hingga 24 jam. Hasil inkubasi kemudian dihitung menggunakan *colony counter* untuk menentukan Kadar Bunuh Minimum

4.8 Analisis Data

Uji statistik dengan langkah – langkah pengujian sebagai berikut (Wijaya, 2011):

1. Uji normalitas data dengan menggunakan Kolmogorov Smirnov *test* jika terdapat lebih dari 50 data, untuk menguji apakah data tersebar normal (parametrik) atau tidak tersebar normal (nonparametrik). Jika terdapat kurang dari 50 data, menggunakan Shapiro-Wilk *test*.
2. Uji homogenitas data dengan menggunakan Levene *test* untuk menguji

apakah varian data homogen atau tidak homogen.

3. Berdasarkan hasil uji normalitas dan uji homogenitas, maka dapat dipilih jenis uji statistik yang akan digunakan:

	Data tersebar normal	Data tidak tersebar normal
Data homogen	uji parametrik	uji non-parametrik
Data tidak homogen	uji non-parametrik	uji non-parametrik

Jenis data untuk uji parametrik adalah data yang bersifat kuantitatif (interval atau rasio). Apabila jenis data bukan termasuk data kuantitatif melainkan data kualitatif (nominal atau ordinal), maka data tersebut tergolong pada data non-parametrik.

4. Uji komparasi digunakan untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian berbagai konsentrasi ekstrak *Apium graveolens* terhadap jumlah koloni bakteri *Shigella dysentriae*. Uji komparasi untuk data parametrik dilakukan dengan cara berikut:

a) T – test, dengan syarat:

- i. Uji ini dilakukan dengan jumlah data yang sedikit (kurang dari 30).
- ii. Uji ini dilakukan apabila hanya terdapat satu perlakuan dalam variabel independen.

b) ANOVA, dengan syarat:

- i. Uji ini lebih baik dilakukan pada jumlah data yang lebih dari 30.
- ii. Uji ini dilakukan apabila terdapat lebih dari satu perlakuan dalam variabel independen

Jika data merupakan data non-parametrik maka uji komparasi yang digunakan adalah uji Kruskal Wallis.

5. Uji *Post Hoc* digunakan untuk mengetahui pengaruh dari tiap-tiap variabel independen terhadap variabel dependen. Uji *Post Hoc* pada data parametrik

dilakukan dengan Tukey HSD. Jika data non parametrik maka digunakan uji *Mann Whitney*.

6. Uji korelasi digunakan untuk mengetahui kekuatan dan bentuk hubungan antara konsentrasi ekstrak *Apium graveolens* dengan pertumbuhan *Shigella dysentriae*. Uji korelasi pada data parametrik dilakukan dengan uji *Pearson*. Apabila data non-parametrik maka digunakan uji *Spearman*.
7. Uji Regresi dilakukan untuk besarnya probabilitas perubahan variabel dependen yang disebabkan oleh perubahan pada variabel independen setelah diketahui ada hubungan bermakna antara kedua variabel penelitian. Uji regresi dilakukan apabila data bersifat parametrik.

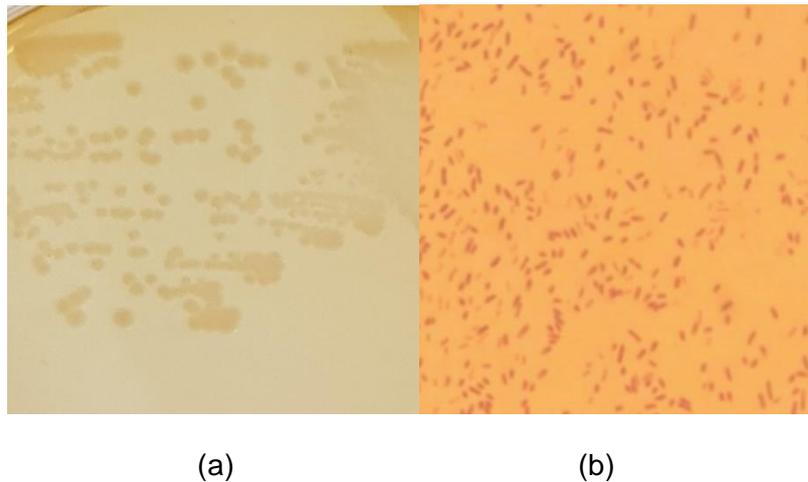
BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Identifikasi Bakteri

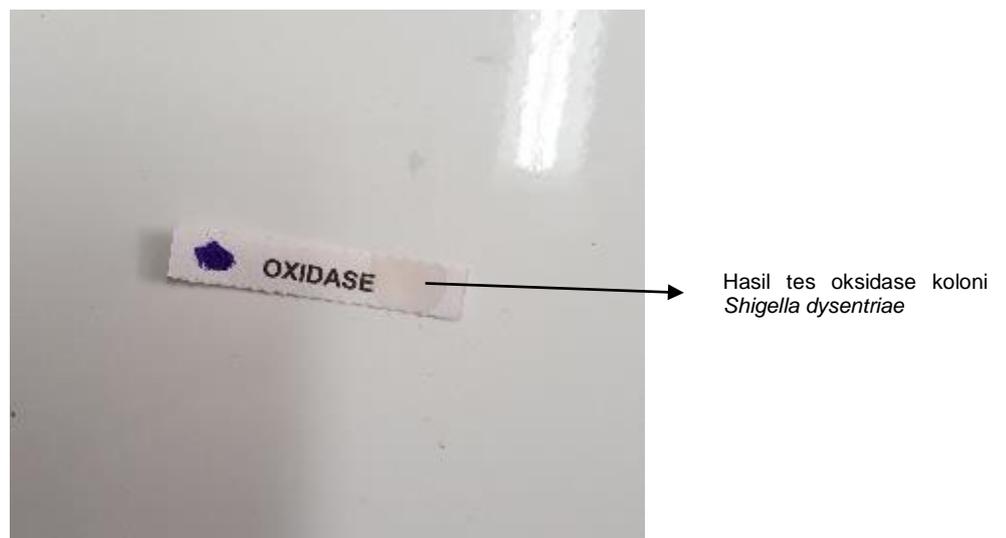
Penelitian ini menggunakan isolat bakteri *Shigella dysenteriae* yang disediakan oleh Laboratorium Mikrobiologi FKUB. Masing-masing isolat bakteri *Shigella dysenteriae* kemudian di-*streaking* ulang di *Nutrient Agar Plate (NAP)*. Koloni yang tumbuh kemudian diambil dan diidentifikasi dengan pewarnaan Gram. Pada medium *Salmonella Shigella Agar (SSA)*, semua isolat bakteri *Shigella dysenteriae* akan menghasilkan koloni yang berbentuk bulat dengan permukaan sedikit cembung tidak berwarna seperti yang dapat dilihat pada Gambar 5.1a. Tekstur permukaan koloni bakteri *Shigella dysenteriae* halus dan licin dengan bau yang menyerupai bau kaus kaki. Ukuran koloni bervariasi di antara satu hingga dua milimeter.

Pada pewarnaan Gram dan pengamatan di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x, didapatkan gambaran sel bakteri berbentuk batang pendek dan kecil seperti pada Gambar 5.1b.



Gambar 5.1 Morfologi Koloni dan Sel *Shigella dysenteriae* (a) Koloni *Shigella dysenteriae* pada Medium SSA; (b) Gambaran Mikroskopis Bakteri *Shigella dysenteriae* pada Pengecatan Gram Menunjukkan Sifat Gram Negatif berbentuk batang kecil.

Uji oksidase menggunakan *Oksidase Strip* menunjukkan gambaran tidak adanya perubahan warna pada kertas oksidase menjadi warna ungu setelah specimen ditetaskan reagen oksidase *tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride* 1 yang berarti bakteri tidak memiliki enzim *cytochrome c oxidase*. Hasil strip uji oksidase dapat dilihat pada Gambar 5.2.



Gambar 5.2 Hasil uji oksidase *Shigella dysenteriae*

Uji fermentasi gula menggunakan *Triple Sugar Iron Agar* menunjukkan gambaran berupa perubahan warna pada dasar tabung saja dan tidak

menghasilkan gas atau H_2S seperti yang dapat dilihat pada Gambar 5.3. Uji Indol dan motilitas tidak menghasilkan perubahan warna dan tidak ada persebaran koloni bakteri. Uji *Methyl Red* menghasilkan perubahan warna dari kuning menjadi merah sedangkan uji *Voges-Proskaur* tidak menghasilkan perubahan warna. Uji *Citrate* tidak menghasilkan perubahan warna medium dari hijau menjadi biru.

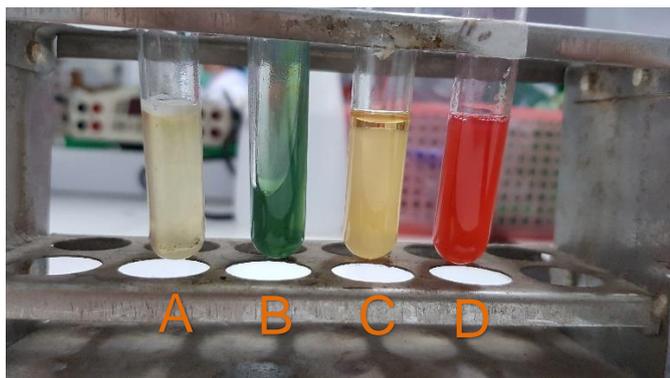


Interpretasi tabung

Sifat : Alkali/acid

H_2S : -

Gas : -



Interpretasi IMViC

(A) Indol, motilitas : negatif

(B) *Citrate* : negatif

(C) *Voges-Proskaur* : negatif

(D) *Methyl Red* : positif

Gambar 5.3 Hasil TSI IMViC *Shigella dysenteriae*

Uji urease menggunakan *Urease Agar* menunjukkan gambaran tidak adanya perubahan warna menjadi warna ungu pada agar setelah periode inkubasi yang membuktikan bahwa spesimen bakteri tidak mampu menghidrolisa urea. Hasil uji urease dapat dilihat pada Gambar 5.4.



Gambar 5.4 Hasil uji urease *Shigella dysenteriae*

(Hasil uji urease negatif karena tidak ada perubahan warna menjadi ungu pada medium)

5.2 Gambaran Ekstrak Seledri

Ekstrak seledri berwarna hijau tua dan keruh. Konsistensi ekstrak cair dan tidak larut di air.

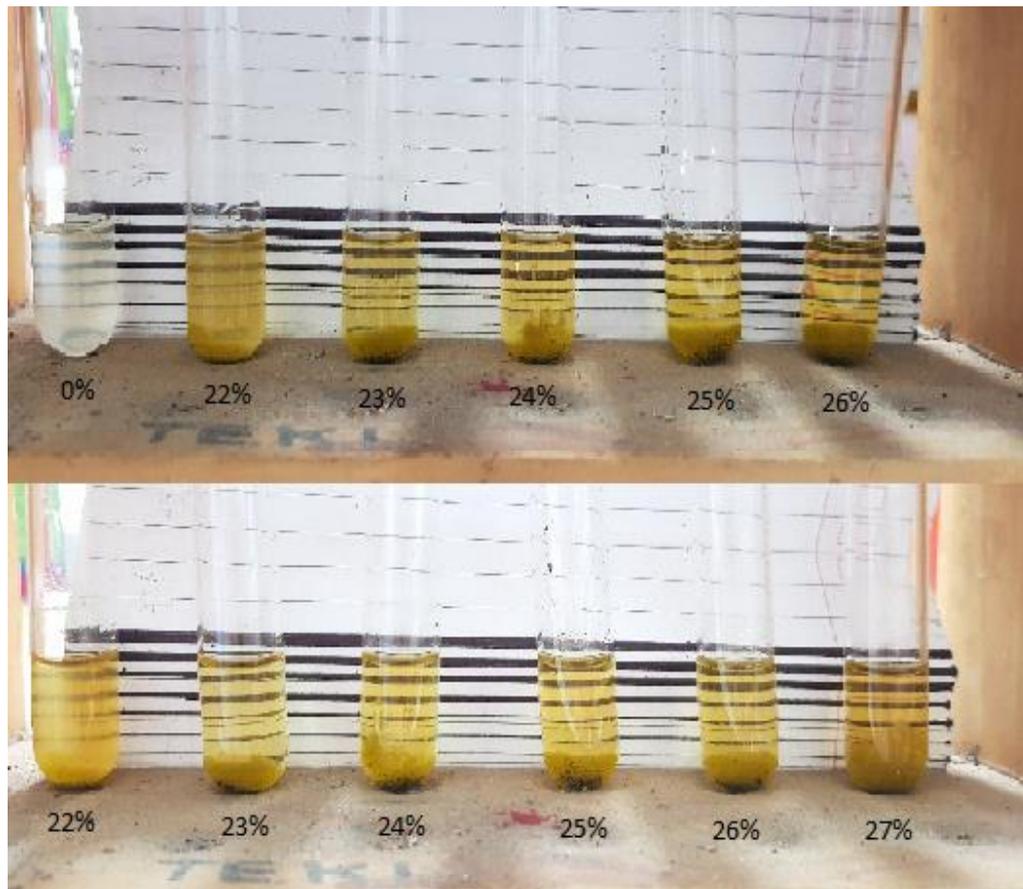


Gambar 5.5 Gambar Ekstrak Seledri

5.3 Hasil Pengamatan Kekeruhan dan Analisis terhadap KHM

Pada penelitian ini digunakan lima macam konsentrasi ekstrak etanol seledri yakni 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27% serta konsentrasi 0% (kontrol bakteri atau bakteri tanpa ekstrak). KHM (Kadar Hambat Minimal) adalah kadar terendah dari antibakteri yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri (ditandai dengan tidak adanya kekeruhan pada tabung), setelah diinkubasikan selama 18-24 jam (Dzen., 2003).

Berdasarkan hasil pengamatan visual, tabung dengan konsentrasi 22 % masih menunjukkan kekeruhan yang merupakan indikasi pertumbuhan bakteri. Pada tabung 23%, tidak ditemukan kekeruhan cairan tabung yang menunjukkan bahwa pada tabung tersebut tidak didapatkan pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae*. Berdasarkan hasil pengamatan tersebut, dapat ditentukan bahwa ekstrak seledri memiliki KHM pada konsentrasi 23% terhadap bakteri *Shigella dysenteriae* (Gambar 5.6).



Gambar 5.6 Hasil Pengamatan Kekeruhan Isolat *Shigella dysenteriae*

(Kekeruhan hanya ditemukan pada tabung 22% diikuti tabung 23% yang jernih)

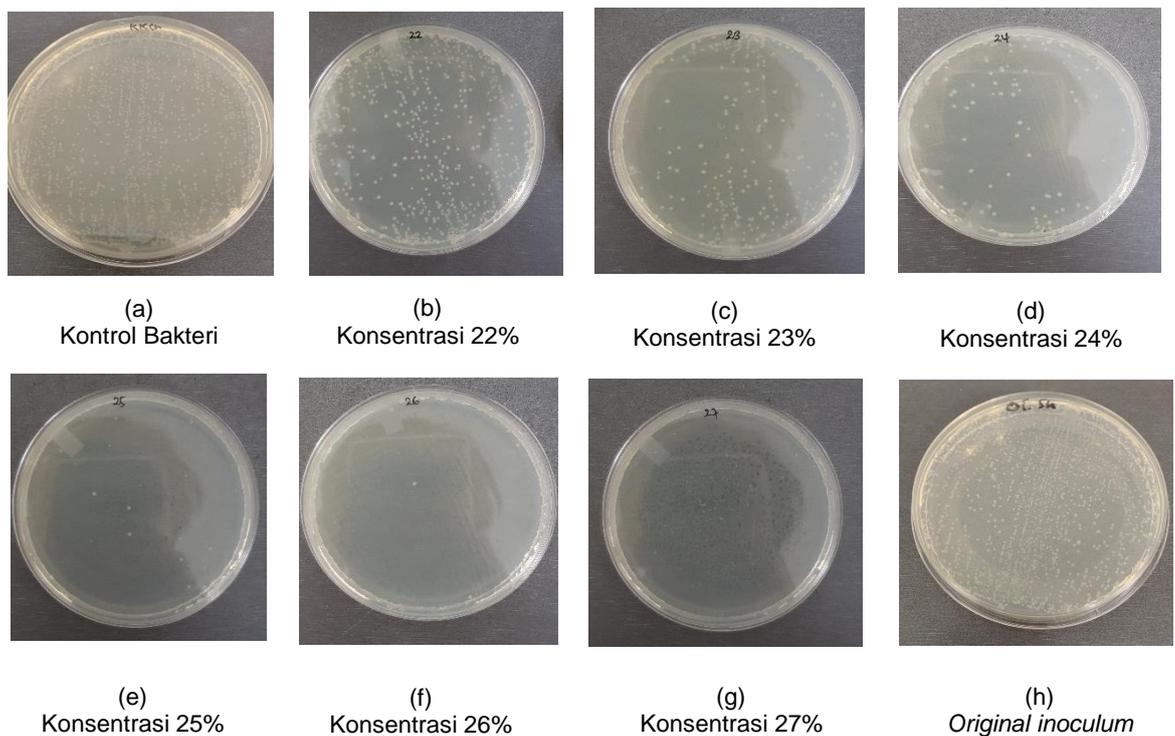
5.4 Hasil Penentuan KBM dan Analisis terhadap KBM

Setelah tabung diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C dan diamati tingkat kekeruhannya untuk melihat KHM, tiap konten tabung diinokulasikan pada *Nutrient Agar Plate (NAP)*. Kemudian, NAP diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam dan jumlah koloni yang tumbuh pada masing-masing konsentrasi NAP dihitung menggunakan *colony counter* untuk keempat hasil *streaking* bakteri *Shigella dysenteriae*.

Definisi KBM (Kadar Bunuh Minimal) adalah kadar terendah dari senyawa antibakteri yang dapat membunuh bakteri yang menyebabkan bakteri tidak dapat tumbuh pada NAP atau jika pertumbuhan koloni pada NAP kurang dari 0,1% dari

jumlah koloni pada *original inoculum* (OI) pada NAP yang telah dilakukan penggoresan sejumlah satu ose (1 μ l) (Dzen *et al.*, 2003). Hasil *streaking* pada NAP dapat dilihat pada Gambar 5.7.

Dari hasil penghitungan koloni bakteri *Shigella dysenteriae*, dapat ditentukan kadar bunuh minimal dari ekstrak etanol seledri, yakni jika pada NAP tidak ditemukan pertumbuhan koloni atau jumlah koloni yang tumbuh pada NAP kurang dari 0,1% dari jumlah perhitungan koloni *original inoculum* pada NAP. Hasil penghitungan koloni yang tumbuh di NAP menggunakan *colony counter* dapat dilihat pada Tabel 5.1



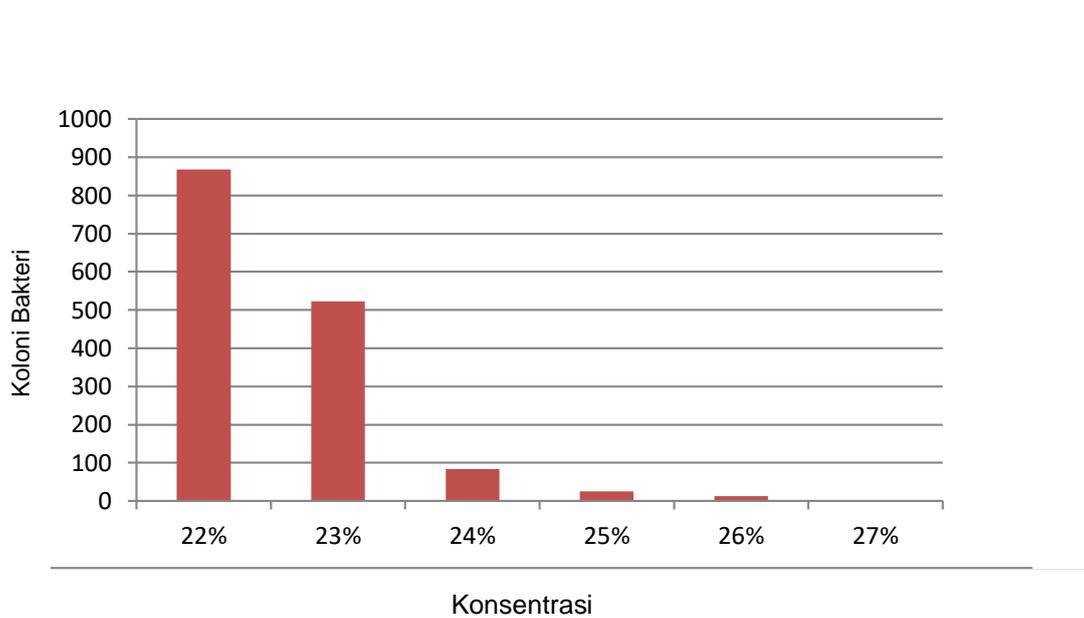
Gambar 5.7 Pertumbuhan Koloni *Shigella dysenteriae* pada *Nutrient Agar Plate*

Tabel 5.1 Hasil Penghitungan Koloni Pada NAP

KONSENTRASI EKSTRAK	JUMLAH KOLONI PER PLATE				RATA - RATA
	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III	Ulangan IV	
0%	∞	∞	∞	∞	∞
22%	868	871	870	872	870.25
23%	521	519	522	518	520
24%	84	89	81	83	84.25
25%	25	28	23	25	25.25
26%	11	13	14	12	12.5
27%	0	0	0	0	0
OI	1056	1066	1062	1053	1059.25

Keterangan: ∞ = Tidak terbatas (tidak bisa dihitung karena terlalu banyak)

Dari Gambar 5.5 dan data hasil perhitungan jumlah koloni pada Tabel 5.1, dibuat grafik rata-rata jumlah koloni yang menunjukkan hubungan antara perubahan konsentrasi ekstrak etanol seledri dengan jumlah koloni bakteri *Shigella dysenteriae* yang tumbuh pada medium NAP setelah periode inkubasi. Interpretasi grafik menunjukkan bahwa dengan peningkatan konsentrasi ekstrak etanol seledri menyebabkan adanya penurunan jumlah koloni yang dapat tumbuh pada medium NAP dan kadar bunuh minimal ekstrak pada konsentrasi 27% yang ditandai dengan tidak adanya koloni bakteri yang tumbuh pada agar. Gambaran tentang interaksi antara konsentrasi ekstrak dengan jumlah koloni yang tumbuh dapat dilihat pada Gambar 5.8.



Gambar 5.8 Grafik Hasil Jumlah Koloni terhadap Perubahan Konsentrasi Ekstrak Etanol Seledri

5.5 Analisis Data

Hasil penelitian ini dianalisis menggunakan aplikasi analisis statistik SPSS versi 23.0 oleh IBM untuk *operating system Windows*. Dalam perhitungan hasil penelitian ini, digunakan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$).

5.5.1 Uji *One-Way ANOVA*

One-Way ANOVA merupakan pengujian yang ditujukan untuk mengetahui perbedaan antara konsentrasi ekstrak etanol seledri terhadap rerata pertumbuhan koloni bakteri *Shigella dysenteriae* selama empat kali pengulangan. Dari hasil uji *One-Way ANOVA* (Lampiran 3.1), didapatkan angka signifikansi 0,000 ($p < 0,05$) yang menunjukkan bahwa efek perubahan konsentrasi ekstrak etanol seledri terhadap jumlah rerata pertumbuhan koloni *Shigella dysenteriae* berbeda secara signifikan dengan *confidence interval* 95%.

5.5.2 Uji *Post Hoc Tukey*

Uji *Post Hoc Tukey* merupakan uji perbandingan berganda dimana tiap kelompok konsentrasi uji dipasangkan dengan kelompok konsentrasi uji yang lain.

Uji ini ditujukan untuk menunjukkan bahwa pasangan konsentrasi dan jumlah koloni yang berbeda memberikan perbedaan yang signifikan atau tidak signifikan. Dari hasil uji *Post Hoc Tukey* (Lampiran 3.2) dapat diketahui bahwa ada perbedaan yang signifikan di setiap pasangan kelompok sampel yang ditujukan oleh angka signifikansi 0,000 pada setiap perbandingan ($p < 0,05$). Untuk mengetahui kelompok konsentrasi mana yang rata-ratanya tidak berbeda, dilakukan uji lanjut *Homogenous Subsets* yang dapat dilihat pada lampiran 3.3.

Berdasarkan hasil uji *Post Hoc Tukey*, terdapat perbedaan yang bermakna antara jumlah koloni bakteri *Shigella dysenteriae* yang tumbuh pada medium NAP antara variasi konsentrasi perlakuan ekstrak etanol seledri dengan $p < 0,05$.

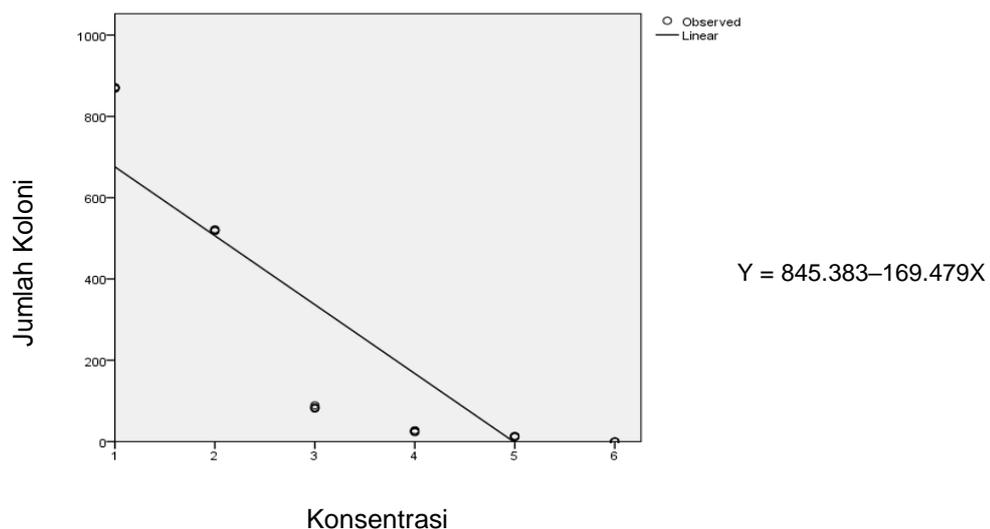
5.5.3 Uji Korelasi dan Regresi

Uji Korelasi (Lampiran 4.1) menunjukkan angka signifikansi 0.000 ($p < 0,05$) yang menunjukkan adanya hubungan bermakna antara pemberian ekstrak etanol seledri dengan jumlah pertumbuhan koloni bakteri *Shigella dysenteriae*. Besar koefisien korelasi Pearson yaitu $R = -0,877$ yang menunjukkan hubungan yang terbalik yaitu bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol seledri, semakin sedikit jumlah koloni bakteri yang tumbuh, dan sebaliknya. Nilai 0,877 menunjukkan bahwa terdapat hubungan bermakna antara perbedaan konsentrasi dengan jumlah pertumbuhan bakteri karena nilai koefisien (0,877) yang lebih besar dari 0,5.

Uji regresi digunakan untuk menentukan model yang paling sesuai untuk pasangan data serta dapat digunakan untuk membuat model dan menyelidiki hubungan antara dua variabel atau lebih. Dalam penelitian ini uji regresi digunakan untuk mengetahui sejauh mana hubungan antara peningkatan konsentrasi dengan kemampuan penghambatan pertumbuhan koloni.

Koefisien Determinasi R Kuadrat (R^2) sebesar 0,758 berarti bahwa kontribusi pemberian ekstrak etanol seledri dalam menurunkan jumlah koloni bakteri *Shigella dysenteriae* sebesar 75.8% sedangkan sisanya 24,2% disebabkan oleh faktor-faktor lain yang tidak diteliti. Faktor-faktor tersebut bisa merupakan akibat dari lama penyimpanan ekstrak, potensi solubilitas ekstrak, atau faktor lainnya yang tidak diteliti.

Hubungan antara perubahan konsentrasi ekstrak etanol seledri dengan pertumbuhan koloni bakteri *Shigella dysenteriae* dapat dinyatakan dengan rumus $Y = 845.317 - 169.407X$. Y adalah jumlah koloni bakteri *Shigella dysenteriae* sedangkan X adalah konsentrasi ekstrak etanol seledri. Hal ini berarti tanpa pemberian ekstrak etanol seledri maka jumlah koloni *Shigella dysenteriae* yang mampu tumbuh di medium NAP akan meningkat konstan yaitu 845.317. Dengan pengaruh ekstrak maka setiap peningkatan konsentrasi ekstrak etanol seledri sebesar 1% justru menyebabkan penurunan jumlah koloni bakteri hingga 169.407 koloni.



Gambar 5.9 Grafik Persamaan Linier Uji Regresi dari Jumlah Koloni *Shigella dysenteriae* terhadap Konsentrasi Ekstrak Etanol Seledri

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Penjelasan Singkat Penelitian

Penelitian ini berjenis penelitian eksperimental yang ditujukan untuk mengetahui adanya efek antimikroba ekstrak etanol seledri (*Apium graveolens*) terhadap pertumbuhan *Shigella dysenteriae* secara *in vitro* dengan menggunakan metode dilusi tabung (*tube dilution*). Dengan menggunakan metode dilusi tabung, Kadar Hambat Minimum (KHM) akan diketahui secara kualitatif dari tingkat kekeruhan isi tabung. Kadar Bunuh Minimum (KBM) juga dapat diketahui jika pertumbuhan koloni bakteri pada *Nutrient Agar Plate* (NAP) kurang dari 0,1% koloni pada *original inoculum* atau jika tidak ditemukannya pertumbuhan koloni bakteri pada medium NAP. Dari penelitian ini, juga dapat diketahui hubungan antara konsentrasi ekstrak etanol seledri terhadap pertumbuhan koloni bakteri *Shigella dysenteriae*.

6.2 Identifikasi Bakteri dan Proses Ekstraksi

Sampel bakteri yang digunakan pada penelitian ini berasal dari stok bakteri yang disimpan di laboratorium Mikrobiologi FKUB. Sebelum digunakan, beberapa tes diujikan terhadap sampel bakteri untuk mengidentifikasi ulang sampel bakteri *Shigella dysenteriae* yang terdiri dari pewarnaan Gram, kultur di media diferensiasi *Salmonella Shigella Agar*, uji TSI-IMViC, Tes Oksidase, dan Tes Urease. Semua hasil tes mengindikasikan bahwa sampel yang disediakan memang benar bakteri *Shigella dysenteriae*.

Ekstrak yang digunakan pada penelitian ini adalah ekstrak seledri (*Apium graveolens*) dengan proses ekstraksi metode maserasi dengan etanol 96%. Ekstraksi dilakukan di Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Negri Malang.

6.3 Penelitian Pendahuluan

Sebelum dimulai penelitian, terlebih dahulu diujikan eksplorasi dahulu untuk mencari konsentrasi perlakuan yang akan digunakan saat penelitian. Dari hasil uji eksplorasi pertama, didapatkan bahwa pada konsentrasi 25%, pada plate uii pendahuluan hanya ditemukan satu koloni *Shigella dysenteriae*. Pada uji perapatan dengan konsentrasi 14%, 16%, 18%, 20%, 22%, 24%. Pada konsentrasi 24%, koloni yang tumbuh sedikit. Dilakukan perapatan dosis kembali dengan jarak antar konsentrasi 1% sehingga ditemukan konsentrasi yang akan digunakan pada penelitian. Konsentrasi ekstrak yang digunakan pada penelitian ini akhirnya adalah 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, dan 27%.

6.4 KHM (Kadar Hambat Minimum)

Berdasarkan hasil pengamatan visual, tabung dengan konsentrasi 22 % masih menunjukkan kekeruhan yang merupakan indikasi pertumbuhan bakteri. Pada tabung 23%, tidak ditemukan kekeruhan cairan tabung untuk pertama kalinya yang menunjukkan bahwa pada tabung tersebut tidak didapatkan pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae*. Berdasarkan hasil pengamatan tersebut, dapat ditentukan bahwa ekstrak seledri memiliki KHM pada konsentrasi 23% terhadap bakteri *Shigella dysenteriae*.

6.5 KBM (Kadar Bunuh Minimum)

Setelah proses *streaking* dan inkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C dari masing-masing konsentrasi dilusi tabung ke medium NAP menunjukkan bahwa pada konsentrasi 27% tidak terdapat pertumbuhan koloni bakteri. Koloni yang tumbuh pada medium dengan konsentrasi lebih rendah, yakni konsentrasi 22%, 23%, 24%, 25%, dan 26% masing-masing dihitung jumlah koloninya dengan *colony counter*. Pada setiap perbedaan konsentrasi, dapat diamati adanya perbedaan jumlah koloni bakteri seperti yang dicatumkan pada Tabel 5.1. Melalui empat kali pengulangan, didapatkan jumlah pertumbuhan koloni yang berbeda-beda.

6.6 Penelitian terkait Seledri (*Apium graveolens*) dan *Shigella dysenteriae*

Seledri (*Apium graveolens*) adalah salah satu tanaman yang telah digunakan oleh berbagai kebudayaan yang ada di berbagai bagian dunia sejak ribuan tahun yang lalu. Selain digunakan sebagai bahan dan perasa makanan, seledri juga digunakan untuk kemampuan seledri sebagai bahan pengawet.

Penelitian pada tahun 2015 menunjukkan bahwa ekstrak seledri (*Apium graveolens*) efektif sebagai antimikroba terhadap organisme yang bersifat *foodborne* seperti *Salmonella sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, dan *Pseudomonas aeruginosa*. Komponen utama pada ekstrak diidentifikasi dengan *Gas Chromatography-mass Spectrometry* (GC-MS). Pada hasil identifikasi ini, ditemukan bahwa bahan aktif yang menyusun komposisi utama seledri adalah limonen dengan konstitusinya sebanyak 76,55% (Mousa *et al.*, 2015).

Pada penelitian ini dipilih ekstrak etanol dengan menggunakan metode maserasi. Maserasi merupakan proses perendaman sampel dengan pelarut organik yang digunakan pada temperatur ruangan. Proses ini sangat

menguntungkan dalam isolasi senyawa bahan herbal karena dengan perendaman sampel tumbuhan dalam larutan etanol, akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam dan luar sel sehingga metabolit sel yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik. Selain itu, ekstraksi senyawa dengan metode ini akan sempurna karena dapat diatur lama perendaman yang dilakukan (Hosettmann, 1991).

Berdasarkan penelitian lain, daun jambu (*Psidium guajava*) diketahui memiliki efek antimikroba. Kandungan daun jambu berupa flavonoid, tannin, β -sitosterol, triptenoid, uvaol, asam ursolat dan asam oleanolat. Untuk mengesktraksi senyawa yang terkandung dalam daun jambu, peneliti menggunakan metode maserasi dan imersi menggunakan larutan methanol 75%. Ekstrak daun jambu menunjukkan aktivitas antimikroba terkuat terhadap *Staphylococcus sp.* dan diikuti *Shigella flexneri*. Aktivitas antimikroba ekstrak daun jambu terhadap *Shigella dysenteriae* pada penelitian ini dapat diamati pada konsentrasi 30% (Birdi *et al.*, 2010).

Bila dibandingkan dengan aktivitas antimikroba ekstrak etanol seledri terhadap *Shigella dysenteriae*, maka ekstrak etanol seledri lebih efektif sebagai antibakteri dibandingkan dengan ekstrak daun jambu.

6.7 Mekanisme Antibakteri Ekstrak Seledri

Mekanisme aksi dari obat antibakteri bervariasi, dapat melalui gangguan intergrasi membran sel, gangguan sintesis asam nukleat, gangguan metabolisme energi bakteri, gangguan pembentukan lapisan lipopolisakarida, kebocoran materi intraseluler dan hambatan duplikasi sel bakteri. Beberapa literatur menunjukkan bahwa kandungan flavonoid memiliki beberapa efek antibakteri dengan mekanisme fusi dan penetrasi membrane sel dan merubah tekanan osmotik yang

mengakibatkan gangguan integrase membran sel. Selain itu, flavonoid inhibisi DNA gyrase yang menyebabkan gangguan sintesis asam nukleat. Flavonoid juga mampu menghambat enzim sitokrom reductase yang mengganggu metabolisme energi. Seledri (*Apium graveolens*) juga memiliki senyawa limonene dan asam klorogenat yang memiliki kemampuan meningkatkan permeabilitas sel. Limonen memiliki kemampuan untuk merusak LptD yang mengganggu penyusunan lipopolisakarida sehingga meningkatkan permeabilitas membran sel. Asam klorogenat mampu berikatan langsung dengan sel sehingga menyebabkan kebocoran materi intraseluler sehingga sel bakteri mati. Senyawa tannin dalam seledri memiliki kemampuan inhibisi enzim *reverse transcriptase* dan DNA topoisomerase sehingga bersifat bakteriostatik.

Berdasarkan hasil penelitian dan analisis data, yang dikhususkan pada seledri, maka dapat disimpulkan bahwa ekstrak seledri mempunyai efek antibakteri terhadap *Shigella dysenteriae* secara *in vitro*. Hal ini makin diperkuat dengan adanya bukti – bukti tentang penelitian terkait yang telah dilakukan sebelumnya.

Penelitian ini memiliki validitas internal yang tinggi ditandai dengan hubungan sebab akibat yang kuat berdasarkan analisis data dengan uji ANOVA. Namun, penelitian ini belum dapat diaplikasikan secara *general*, dengan kata lain memiliki validitas eksternal yang rendah.

Uji lanjutan mengenai farmakokinetik, farmakodinamik, toksisitas, efek samping juga uji secara *in vivo* dari ekstrak ini sendiri masih diperlukan. Selain itu, perbedaan geografi antar negara dan antar daerah dalam satu negara, perlu diperhitungkan. Begitu juga dengan metode ekstraksi yang lebih efektif masih perlu dicari, sehingga penelitian ini masih belum dapat diterapkan sebagai metode intervensi secara langsung dalam kasus-kasus infeksi yang disebabkan oleh

Shigella dysenteriae. Oleh karena itu masih diperlukan penelitian yang lebih luas dari penelitian ini agar nantinya dapat diaplikasikan secara klinis pada manusia.

6.8 Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan dalam penelitian ini adalah pengamatan Kadar Hambat Minimal (KHM) yang dilakukan sebatas pengamatan visual terhadap pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae*. Selain itu, ampas sisa maserasi ekstrak seledri juga tidak terlarut dalam tabung sehingga mengganggu kejernihan visual dalam pengamatan hasil uji KHM.

Ekstrak seledri yang digunakan tidak melalui proses ekstraksi yang menargetkan secara aktif senyawa spesifik dalam seledri sehingga tidak diketahui zat mana yang memiliki peran aktif dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Dibutuhkan penelitian lebih lanjut mengenai potensi masing – masing senyawa aktif yang memiliki potensi dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Selain itu, proses ekstrak juga belum mengeleminasi sisa maserasi bahan sehingga mengganggu pengamatan hasil uji KHM.

Masa inkubasi antara uji efektivitas yang dilakukan pada penelitian ini juga merupakan suatu keterbatasan. Perbedaan lama setelah perlakuan hingga inkubasi dan pengamatan dapat menyebabkan hasil yang bervariasi sehingga pengaruh ekstrak etanol seledri (*Apium graveolens*) dapat mengalami perbedaan antar pengamatan.

Diharapkan pada masa mendatang, dapat dilakukan penelitian efek ekstrak etanol seledri (*Apium graveolens*) dilanjutkan agar dapat diterapkan secara komersil.

BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan maka dapat diambil kesimpulan bahwa :

1. Ekstrak seledri (*Apium graveolens*) mempunyai efek antibakteri terhadap bakteri *Shigella dysenteriae* secara *in vitro*.
2. Kadar hambat minimum (KHM) ekstrak seledri (*Apium graveolens*) terhadap bakteri *Shigella dysenteriae* adalah pada konsentrasi 23%, sedangkan kadar bunuh minimum (KBM) ekstrak seledri (*Apium graveolens*) terhadap bakteri *Shigella dysenteriae* adalah pada konsentrasi 27%.
3. Peningkatan konsentrasi ekstrak seledri (*Apium graveolens*) mengakibatkan penurunan pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* secara *in vitro*.

7.2 Saran

1. Diperlukan penelitian lebih lanjut tentang efek lama penyimpanan terhadap efektivitas ekstrak etanol seledri (*Apium graveolens*).
2. Pada penelitian selanjutnya, lama inkubasi yang dilakukan tiap perlakuan harus konsisten hasil yang muncul akurat dan konsisten.
3. Pengamatan kadar hambat minimum (KHM) pada penelitian selanjutnya perlu dilakukan dengan metode yang lebih objektif.
4. Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai zat-zat aktif lainnya yang terdapat dalam seledri (*Apium graveolens*) yang mempunyai efek sebagai

antibakteri dan penelitian terpisah antar senyawa untuk mengetahui seberapa besar efek tiap senyawa terhadap pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae*.

5. Diperlukan penelitian lanjutan mengenai efek antibakteri ekstrak seledri (*Apium graveolens*) secara *in vivo* pada berbagai hewan coba maupun *clinical trial* untuk melihat farmakodinamik, farmakokinetik dan toksisitas ekstrak seledri (*Apium graveolens*) agar pemanfaatan ekstrak ini dapat diaplikasikan ke manusia.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Asmari, A., Athar, M. and Kadasah, S. 2017. An updated phytopharmacological review on medicinal plant of arab region: *Apium graveolens* Linn. *Pharmacognosy Reviews*; 11(21): 13.
- Al-Snafi, Ali. 2014. The Pharmacology of *Apium graveolens*. - Review. *International Journal for Pharmaceutical Research Scholars*; 3 : 671-677.
- Banga Singh, KK., Ojha, S.C., Deris, Z.Z. et al.2011. A 9-year study of shigellosis in Northeast Malaysia: Antimicrobial susceptibility and shifting species dominance. *Journal of Public Health.*; 19: 231.
- Baxt L. A., Goldberg M. B. 2014. Host and bacterial proteins that repress recruitment of LC3 to *Shigella* early during infection. *PLoS ONE* 9:e94653. 10.13
- Bhattacharya, D., Bhattacharjee, H., Thamizhmani, R., Sayi, D., Bharadwaj, A., Singhanian, M., Sugunan, A. and Roy, S. 2012. Prevalence of the plasmid-mediated quinolone resistance determinants among clinical isolates of *Shigella* sp. in Andaman & Nicobar Islands, India. *Letters in Applied Microbiology*; 53(2) : 247-251.
- Birdi, T., Daswani, P., Brijesh, S., Tetali, P., Natu, A., & Antia, N. 2010. Newer insights into the mechanism of action of *Psidium guajava* L. leaves in infectious diarrhoea. *BMC complementary and alternative medicine*, 10;1: 33.
- Bopp CA, Brenner FW, Fields PI. 2015. *Escherichia, Shigella, and Salmonella*. *Manual of Clinical Microbiology*. Eight Edition. Washington DC: ASM press; 645-671.

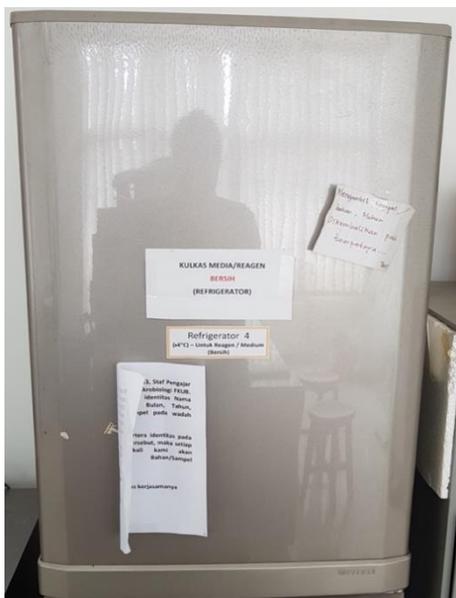
- Brink, B. 2018. ASMscience | Urease Test Protocol. Asmscience.org.
<http://www.asmscience.org/content/education/protocol/protocol.3223>.
Diakses pada 14 Nov. 2018.
- Carroll K.C. 2016. Jawetz, Melnick and Adelberg's Medical Microbiology International Edition. Twenty Sixth Edition. McGraw-Hill ; 237-239.
- Christopher PRH., David KV., John SM, Sankarapandian V. 2010. Antibiotic therapy for Shigella dysentery. Chochrane Database of Systematic Reviews; 8.
- Donnenberg MS. In: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Bennett JE, Mandell GL, Dolin R, editors.2010. chap 218. Elsevier Inc; Philadelphia, PA : 2815–2833.
- Dzen, S. M., 2003. Bakteriologi Medik. Malang: Bayumedia. 3: 57-65.
- Espina, L., Gelaw, T. K., de Lamo-Castellví, S., Pagán, R., & García-Gonzalo, D. 2013. Mechanism of bacterial inactivation by (+)-limonene and its potential use in food preservation combined processes. *PloS one*, 8(2), e56769.
- Faherty C., Wu T., Morris C., Grassel C., Rasko D., Harper J. 2016. The synthesis of OspD3 (ShET2) in *Shigella flexneri* is independent of OspC1. *Gut Microbes* 7, 486–502. 10.1080.
- Farfán M. J., Toro C. S., Barry E. M., Nataro J. P. 2011. Shigella enterotoxin-2 is a type III effector that participates in Shigella-induced interleukin 8 secretion by epithelial cells. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 61, 332–339. 10.1111.
- Hosettmann, K. 1991. *Methods in Plant Biochemistry*. Vol 6, Academic Press New York. 6 : 462-478
- Iswantini, Dyah & Ramdhani, Tuti & Darusman, Latifah. 2012. In vitro inhibition of celery (*Apium graveolens* L.) extract on the activity of xanthine oxidase and determination of its active compound. *Indonesian Journal of Chemistry*. 12.

- Nüesch-Inderbini M, Heini N, Zurfluh K, Althaus D, Hächler H, Stephan R. 2016. Shigella Antimicrobial Drug Resistance Mechanisms, 2004-2014. *Emerg Infect Disease*;22(6):1083-5.
- Peng, J., Yang, J., & Jin, Q. 2009. The molecular evolutionary history of Shigella spp. and enteroinvasive Escherichia coli. *Infection, Genetics and Evolution*. 9;1: 147–152.
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., & Pouysegu, L. 2011. ChemInform Abstract: Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *ChemInform*, 42;17.
- Redfern, J., Kinninmonth, M., Burdass, D., & Verran, J. 2014. Using soxhlet ethanol extraction to produce and test plant material (essential oils) for their antimicrobial properties. *Journal of microbiology & biology education*; 15(1) : 45-6.
- Roehrich-Doenitz A. D., Guillosoy E., Blocker A. J., Martinez-Argudo I. 2013. Shigella IpaD has a dual role: signal transduction from the type III secretion system needle tip and intracellular secretion regulation. *Mol. Microbiol.* 87, 690–706. 10.1111.
- Schwepe, C., Karch, H., Friedrich, A., & Müthing, J. 2009. Shiga toxins, glycosphingolipid diversity, and endothelial cell injury. *Thrombosis and Haemostasis*, 101;2:, 252–264.
- Shields, Patricia., Cathcart, Laura,. 2018. ASMscience | Oxidase Test Protocol. <http://www.asmscience.org/content/education/protocol/protocol.3229>. Diakses pada 14 Nov. 2018.
- Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., & Cliver, D. O. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food control*, 21;9: 1199-1218.

Wijaya T. 2009. Analisis Data Penelitian Menggunakan SPSS. Yogyakarta: Universitas Atma Jaya.

Zohary, D., and M.,Hopf. 2000. Domestication of plants in the old world: the origin and spread of cultivated plants in West Asia, Europe and the Nile Valley. Oxford. University Press; 14-23

LAMPIRAN 1
ALAT DAN BAHAN PENELITIAN



(a)



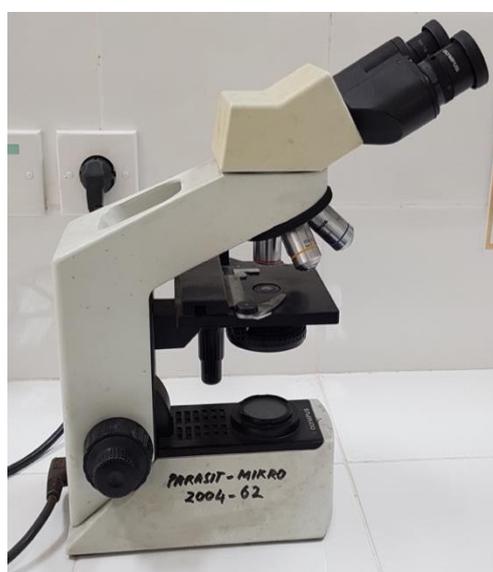
(b)



(c)



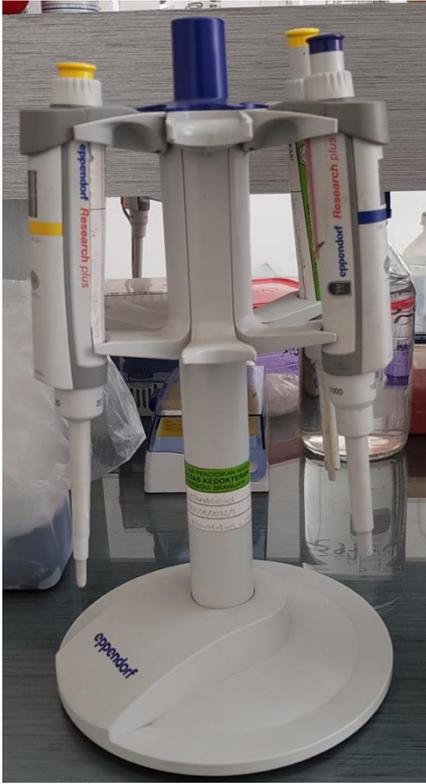
(d)



(e)



(f)



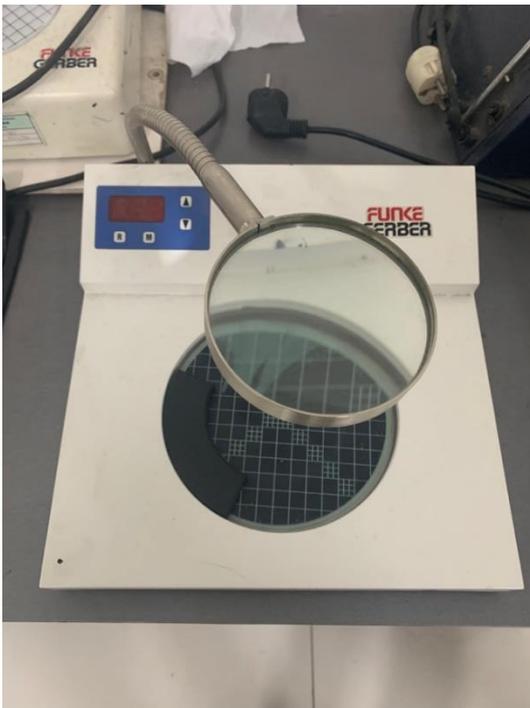
(g)



(h)



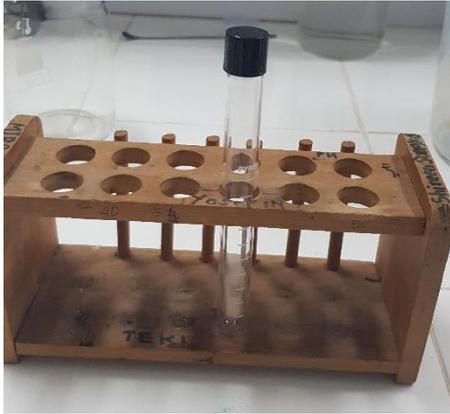
(i)



(j)



(k)



(l)



(m)

Gambar 1 (a) Kulkas Reagen; (b) Inkubator; (c) Spektrofotometer; (d) Vortex; (e) Colony counter; (f) Ose; (g) Micropipet; (h) Object glass; (i) Bunsen; (j) Colony counter; (k) Oxidase strip, (l) Rak dan tabung reaksi; (m) Pipet.



Gambar 2 Seledri

LAMPIRAN 2

UJI NORMALITAS DAN HOMOGENITAS

2.1 Uji Normalitas Sebaran Data untuk Jumlah Koloni

Untuk menguji apakah sampel penelitian mempunyai sebaran data yang normal, maka dalam penelitian ini digunakan uji *Shapiro-Wilk* terhadap tiap-tiap variabel.

		Tests of Normality ^b					
		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
konsentrasi		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
jumlah_kolonibakteri	Konsentrasi 22%	.192	4	.	.971	4	.850
	Konsentrasi 23%	.208	4	.	.950	4	.714
	Konsentrasi 24%	.279	4	.	.923	4	.556
	Konsentrasi 25%	.298	4	.	.926	4	.572
	Konsentrasi 26%	.151	4	.	.993	4	.972

a. Lilliefors Significance Correction

b. jumlah_kolonibakteri is constant when konsentrasi = Konsentrasi 27%. It has been omitted.

Nilai signifikansi > 0.05 berarti bahwa distribusi data normal.

2.2 Uji Homogenitas Variansi Data Untuk Jumlah Koloni

Test of Homogeneity of Variances

jumlah_kolonibakteri

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.954	5	18	.135

Nilai signifikansi = 0,135 ($p > 0,05$) yang berarti data mempunyai ragam (varians) yang relatif homogen.

LAMPIRAN 3

ANALISIS One Way ANOVA

3.1 Oneway

ANOVA

jumlah_kolonibakteri

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2617907.708	5	523581.542	132273.232	.000
Within Groups	71.250	18	3.958		
Total	2617978.958	23			

Nilai signifikansi = 0,000 ($p < 0,05$) yang berarti bahwa ada perbedaan signifikan pada perubahan konsentrasi terhadap jumlah koloni bakteri.

3.2 Post Hoc Tests

Tukey HSD

(I) konsentrasi	(J) konsentrasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Konsentrasi 22%	Konsentrasi 23%	350.250*	1.407	.000	345.78	354.72
	Konsentrasi 24%	786.000*	1.407	.000	781.53	790.47
	Konsentrasi 25%	845.000*	1.407	.000	840.53	849.47
	Konsentrasi 26%	857.750*	1.407	.000	853.28	862.22
	Konsentrasi 27%	870.250*	1.407	.000	865.78	874.72
Konsentrasi 23%	Konsentrasi 22%	-350.250*	1.407	.000	-354.72	-345.78
	Konsentrasi 24%	435.750*	1.407	.000	431.28	440.22
	Konsentrasi 25%	494.750*	1.407	.000	490.28	499.22
	Konsentrasi 26%	507.500*	1.407	.000	503.03	511.97
	Konsentrasi 27%	520.000*	1.407	.000	515.53	524.47
Konsentrasi 24%	Konsentrasi 22%	-786.000*	1.407	.000	-790.47	-781.53
	Konsentrasi 23%	-435.750*	1.407	.000	-440.22	-431.28
	Konsentrasi 25%	59.000*	1.407	.000	54.53	63.47
	Konsentrasi 26%	71.750*	1.407	.000	67.28	76.22
	Konsentrasi 27%	84.250*	1.407	.000	79.78	88.72
Konsentrasi 25%	Konsentrasi 22%	-845.000*	1.407	.000	-849.47	-840.53
	Konsentrasi 23%	-494.750*	1.407	.000	-499.22	-490.28
	Konsentrasi 24%	-59.000*	1.407	.000	-63.47	-54.53
	Konsentrasi 26%	12.750*	1.407	.000	8.28	17.22
	Konsentrasi 27%	25.250*	1.407	.000	20.78	29.72
Konsentrasi 26%	Konsentrasi 22%	-857.750*	1.407	.000	-862.22	-853.28
	Konsentrasi 23%	-507.500*	1.407	.000	-511.97	-503.03
	Konsentrasi 24%	-71.750*	1.407	.000	-76.22	-67.28
	Konsentrasi 25%	-12.750*	1.407	.000	-17.22	-8.28
	Konsentrasi 27%	12.500*	1.407	.000	8.03	16.97
Konsentrasi 27%	Konsentrasi 22%	-870.250*	1.407	.000	-874.72	-865.78
	Konsentrasi 23%	-520.000*	1.407	.000	-524.47	-515.53
	Konsentrasi 24%	-84.250*	1.407	.000	-88.72	-79.78
	Konsentrasi 25%	-25.250*	1.407	.000	-29.72	-20.78
	Konsentrasi 26%	-12.500*	1.407	.000	-16.97	-8.03

Keterangan :

Dengan uji Post Hoc Tukey dapat diketahui perbedaan antar tiap pasangan kelompok sampel (konsentrasi dan jumlah koloni). Terdapat perbedaan yang signifikan hampir di setiap pasangan kelompok sampel yang ditunjukkan oleh angka signifikansi 0,000 ($p < 0,05$).

3.3 Homogeneous Subsets

jumlah_kolonibakteri

Tukey HSD^a

konsentrasi	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
Konsentrasi 27%	4	.00					
Konsentrasi 26%	4		12.50				
Konsentrasi 25%	4			25.25			
Konsentrasi 24%	4				84.25		
Konsentrasi 23%	4					520.00	
Konsentrasi 22%	4						870.25
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

Keterangan :

Rata-rata perbedaan berada pada kolom yang berbeda menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna (signifikan).

LAMPIRAN 4
ANALISIS KORELASI DAN REGRESI

4.1 Correlations

Correlations

		jumlah_kolon ibakteri	konsentrasi
jumlah_kolonibakteri	Pearson Correlation	1	-.877**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	24	24
konsentrasi	Pearson Correlation	-.877**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	24	24

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Keterangan:

- Nilai signifikansi = 0,000 ($p < 0,05$) menunjukkan adanya hubungan yang signifikan antara perlakuan dan jumlah koloni.
- Nilai koefisien korelasi ($r = -0,877$) menunjukkan kekuatan korelasinya sangat kuat dan mempunyai hubungan terbalik.

4.2 Regression

Variables Entered/Removed^a

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	konsentrasi ^b	.	Enter

a. Dependent Variable: jumlah_kolonibakteri

b. All requested variables entered.

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.877 ^a	.768	.758	166.063

a. Predictors: (Constant), konsentrasi

ANOVA^a

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	2011287.004	1	2011287.004	72.934	.000 ^b
	Residual	606691.955	22	27576.907		
	Total	2617978.958	23			

a. Dependent Variable: jumlah_kolonibakteri

b. Predictors: (Constant), konsentrasi

Coefficients^a

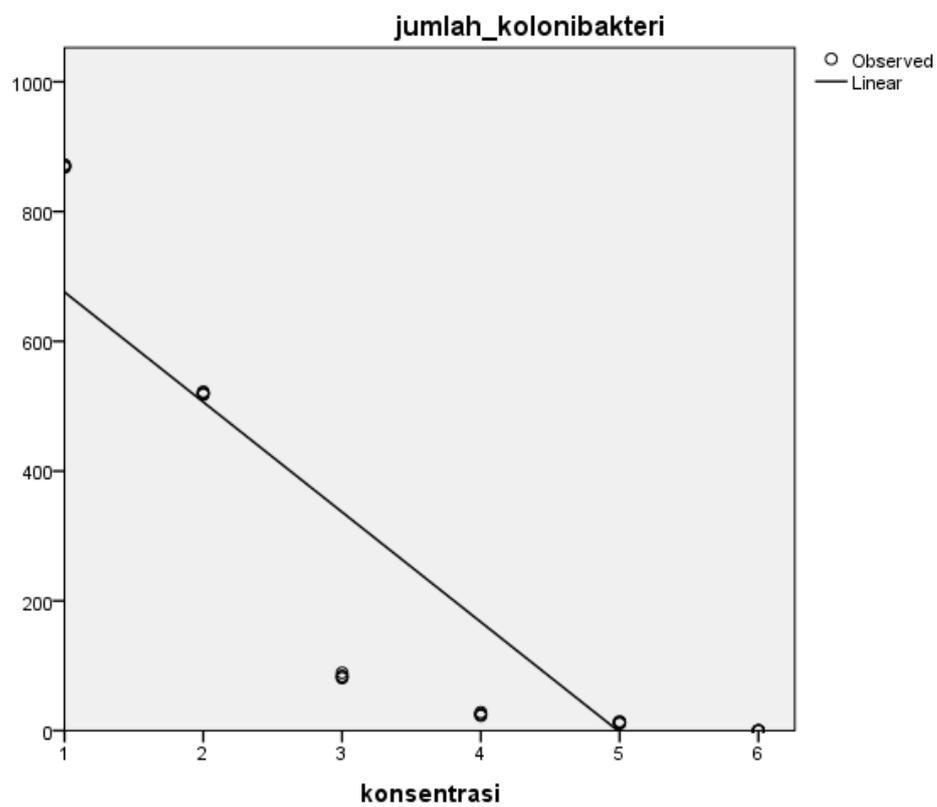
Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	845.317	77.298		10.936	.000
	konsentrasi	-169.507	19.848	-.877	-8.540	.000

a. Dependent Variable: jumlah_kolonibakteri

Keterangan:

- Nilai signifikansi $p < 0,05$ menunjukkan ada pengaruh yang signifikan antara variabel independen terhadap variabel dependen
- Estimasi ekstrak yang dibutuhkan hingga tidak ada koloni bakteri yang tumbuh (jumlah koloni = 0) adalah $Y = 845.317 - 169.507X$.

4.3 Curve Fit



Keterangan: Grafik persamaan regresi linier dengan persamaan

$$Y = 845.317 - 169.507X$$