

LEMBAR PENGESAHAN

Judul: Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Mentimun (*Cucumis Sativus L.*) dengan Metode Soxhletasi terhadap Pertumbuhan Bakteri *Salmonella Typhi* secara In Vitro

Nama: Olivia Dyskrisen Br Damanik

NPM: 20000035

Dosen Pembimbing I



(dr. Hendra, MKT)

Dosen Pembimbing II



(dr. David M. T Simungunsong, M.Kes)

Dosen Penguji



(Dr. dr. Christine V Sibuea, M.Biomed)

Ketua PSSK



(dr. Ade P Simaremare, M. Biomed)

Dekan Fakultas Kedokteran

Universitas HKRP Nommensen



(Dr. dr. Leo Simanjuntak, Sp. OG)

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Salmonella typhi (*S. typhi*) merupakan bakteri patogen penyebab demam tifoid. Demam tifoid ini dapat ditularkan melalui makanan dan minuman yang terkontaminasi *S. typhi* dan dapat ditularkan melalui feses dan urin manusia yang terinfeksi demam tifoid. Penyakit ini menyerang sistem pencernaan manusia dengan gejala yang bervariasi, diantaranya demam, sakit kepala, anoreksia, myalgia, arthralgia, nausea, nyeri perut, konstipasi atau diare yang umumnya lebih banyak dikeluarkan oleh anak-anak dan penderita *Human Immunodeficiency Virus (HIV)*.^{1,2}

Demam tifoid menjadi masalah kesehatan di seluruh dunia dan prevalensinya tinggi di negara berkembang yaitu Afrika, Mediterania Timur, Asia Tenggara, serta pasifik barat. Diperkirakan tahun 2019 angka insiden demam tifoid terdapat 9 juta/tahun, dan angka kematian sekitar 110.000/tahun.^{3,4} Insiden demam tifoid berkisar 350-810 per 100.000 penduduk, menduduki urutan ke-5 penyakit menular dan menduduki urutan ke-15 dalam penyebab kematian di Indonesia.⁴ Penyakit ini sering terjadi pada anak-anak, remaja serta pada usia produktif.⁵

Terapi antibiotik yang cepat dan efektif adalah andalan pengobatan demam tifoid, pengobatan lini pertama yaitu Kloramfenikol, Ampisilin atau *Amoxicillin*, Trimetropim-Sulfametoksazol dan pada lini kedua yaitu *Ceftriaxone*, *Cefixime* dan *Quinolone*.^{6,7} Tetapi terapi antibiotik sering disalahgunakan dengan penggunaannya yang tidak prosedural dan tidak terkontrol menyebabkan resistensi bakteri terhadap antibiotik sehingga sering dihubungkan dengan meningkatkan morbiditas dan mortalitasnya.^{5,8} Resistensi bakteri *S. typhi* terhadap antibiotik terjadi akibat adanya mutasi genetik sehingga dapat menyebabkan kondisi emergensi, yaitu *multidrug-resistant Salmonella typhi (MDRST)* dan *extensively drug-resistant (XDR) Salmonella typhi*.⁹

Dari permasalahan tersebut adanya peluang untuk ditemukannya obat-obatan baru yang efektif dan mampu mengatasi infeksi bakteri, sehingga perlu alternatif yang tepat yaitu

memanfaatkan tanaman herbal sebagai antibiotik alami yang aman digunakan tanpa efek samping.^{10,11}

Indonesia adalah negara tropis yang kaya akan berbagai jenis tumbuhan yang dapat menghasilkan metabolit sekunder berupa bahan antibakteri. Senyawa antibakteri yaitu senyawa yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri.¹²

Salah satu tanaman yang cukup banyak dibudidayakan di Indonesia dan mudah diperoleh yaitu buah mentimun (*Cucumis sativus L.*).¹³ Mentimun merupakan tanaman sayuran yang memiliki banyak manfaat di kehidupan sehari-hari sebagai lalapan, bahan obat-obatan dan bahan kosmetik. Mentimun juga memiliki kandungan nutrisi yang tinggi seperti karbohidrat, zat besi, protein, vitamin C, fosfor, dan kalsium serta efek antibakteri.¹⁴ Namun, belum banyak diketahui mengenai manfaat buah mentimun yang berasal dari Indonesia sebagai bahan antibakteri.¹³

Penelitian E. Suriaman dkk (2016) dengan konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100%, kemudian pada penelitian Alda dkk (2021) dan Luly dkk (2022) dengan konsentrasi 30%, 50% dan 70% melaporkan bahwa ekstrak buah mentimun menunjukkan aktivitas antibakteri *S. typhi* dan *Bacillus cereus* dengan menggunakan metode ekstraksi maserasi.^{13,15,16}

Penelitian Yosua dkk (2019) melaporkan bahwa ekstrak mentimun dengan metode maserasi dari bagian kulit dan buahnya dengan konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100% memiliki efek antibakteri dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. typhi*.¹⁷

Penelitian Hermiaty dkk (2021) dengan menggunakan metode ekstraksi maserasi melaporkan bahwa ekstrak mentimun dengan konsentrasi 100% memiliki efek antibakteri dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. typhi*.¹⁸

Metode ekstraksi terdapat beberapa jenis yaitu maserasi, perkolasi, soxhletasi dan refluks. Metode maserasi merupakan metode ekstraksi yang paling sering dilakukan, dimana keseluruhan peneliti-peneliti terdahulu melakukan ekstraksi buah mentimun dengan metode maserasi. Tetapi, metode maserasi ini memiliki kelemahan yaitu proses ekstraksinya kurang sempurna dan proses ekstraksinya lebih lama.^{19,20}

Pada penelitian yang dilakukan Hendri dkk (2022) mengenai perbandingan metode maserasi dan sokletasi dalam pembuatan ekstrak bawang putih mendapatkan hasil bahwasanya metode soxhletasi lebih efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dibandingkan dengan metode maserasi.²¹ Pada metode ekstraksi soxhletasi memiliki kelebihan dimana sampel dapat terekstraksi secara sempurna karena dilakukan secara berulang-ulang dan proses dari ekstraksi lebih singkat.²²

Maka dari uraian tersebut membuat peneliti tertarik untuk mengembangkan metode ekstraksi yang berbeda dari peneliti terdahulu terhadap buah mentimun yaitu metode soxhletasi untuk menguji aktivitas antibakteri ekstrak mentimun dengan berbagai variasi konsentrasi yang berbeda dari peneliti sebelumnya dan untuk mengetahui konsentrasi efektif ekstrak mentimun yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. typhi*.

1.2. Rumusan Masalah

Bagaimana uji aktivitas antibakteri ekstrak mentimun (*Cucumis sativus L.*) terhadap bakteri *S. typhi* secara in vitro?

1.3. Hipotesis

Hipotesis penelitian ini adalah:

- a. Hipotesis Nol (H₀): Ekstrak Mentimun (*Cucumis sativus L.*) tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. typhi*.
- b. Hipotesis Alternatif (H_a): Ekstrak Mentimun (*Cucumis sativus L.*) memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. typhi*.

1.4. Tujuan Penelitian

1.4.1. Tujuan Umum

Tujuan umum pada penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak mentimun (*Cucumis sativus L.*) dengan metode soxhletasi terhadap pertumbuhan bakteri *S. typhi* secara in vitro.

1.4.2. Tujuan Khusus

Yang menjadi tujuan khusus yaitu

- a. Untuk mengetahui efektifitas mentimun dengan konsentrasi 15%, 35%, 55%, 75% dan 95 % sebagai antibakteri *S. typhi*.
- b. Untuk mengetahui konsentrasi efektif ekstrak mentimun yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. typhi*.

1.5. Manfaat Penelitian

1.5.1. Peneliti

Memberikan manfaat dalam menambah pengetahuan dan pengalaman dalam melakukan penelitian dan penulisan karya tulis ilmiah, terkhusus mengenai uji aktivitas antibakteri ekstrak mentimun (*Cucumis sativus L.*) dengan metode soxhletasi terhadap bakteri *S. typhi* secara in vitro.

1.5.2. Institusi

Penelitian ini dapat menjadi tambahan literatur yang berkaitan tentang fitofarmaka mengenai mentimun di Fakultas Kedokteran Universitas HKBP Nommensen Medan, sehingga dapat menjadi dasar untuk dapat melakukan penelitian selanjutnya.

1.5.3. Masyarakat

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah wawasan mengenai manfaat mentimun sebagai obat antibiotik alternatif yang lebih aman dan alami bagi masyarakat

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Demam tifoid

2.1.1. Definisi

Demam tifoid yaitu suatu penyakit infeksi sistemik yang bersifat akut. Demam tifoid ini ditandai dengan demam berkepanjangan, bakteremia, dan invasi bakteri serta bermultifikasi kedalam sel fagosit mononuklear dari hati, limpa, kelenjar limfe usus dan *Peyer's patch*.²³

2.1.2. Etiologi

Demam tifoid disebabkan oleh *S. typhi* yang sebagian besar penularannya melalui makanan atau minuman yang terkontaminasi oleh bakteri yang berasal dari pasien atau pembawa bakteri tersebut.²⁴

2.1.3. Manifestasi Klinis

Gejala klinis demam tifoid sangat bervariasi, mulai dari gejala klinis ringan yang tidak memerlukan perawatan khusus hingga gejala berat sehingga harus dirawat.²⁴ Gejala demam tifoid berkembang selama satu sampai dua minggu diantaranya demam, sakit kepala, anoreksia, myalgia, arthralgia, nausea, nyeri perut, konstipasi atau diare setelah pasien terinfeksi bakteri tersebut. Demam gejala yang paling penting pada semua pasien demam tifoid.^{2,25} Selanjutnya pada minggu ketiga suhu tubuh akan menurun dan gejalanya berkurang, serta pada minggu keempat keadaan pasien membaik dan mengalami penyembuhan.²⁶

2.1.4. Patogenesis

S. typhi masuk kedalam tubuh manusia melalui makanan atau minuman yang terkontaminasi oleh bakteri tersebut. Ketika melewati lambung dengan suasana asam ($\text{pH} < 2$), sebagian bakteri dimusnahkan oleh asam lambung dan sebagian bakteri lagi yang bertahan hidup akan masuk ke usus halus.^{24,27} Jika respon imunitas humoral mukosa usus kurang baik, bakteri dapat menembus sel-sel epitel dan akan masuk ke lamina propria. *S. typhi* akan difagosit dan dapat berkembangbiak di dalam makrofag kemudian akan dibawa ke plak peyeri serta menuju ke kelenjar getah bening. Selanjutnya melalui duktus torasikus, bakteri yang terdapat di dalam makrofag tersebut masuk ke dalam sirkulasi darah (mengakibatkan bakteremia pertama yang asimtomatik)

dan menyebar keseluruh organ retikuloendotelial tubuh. Di organ-organ ini, bakteri tersebut meninggalkan sel-sel fagosit dan berkembangbiak diluar sel atau ruang sinusoid dan selanjutnya masuk ke dalam sirkulasi darah lagi mengakibatkan bakteremia yang kedua kalinya dengan disertai tanda-tanda dan gejala penyakit infeksi sistemik.²⁸

2.2. *Salmonella typhi*

2.2.1. Morfologi dan Fisiologi

S. typhi merupakan bakteri gram negatif berbentuk batang, tidak memiliki spora, motil, berkapsul, berflagela (bergerak dengan rambut getar) dengan ukuran $1-3,5 \mu\text{m} \times 0,5-0,8 \mu\text{m}$ dan dalam media pembenihan besar koloni rata-rata 2-4 mm.^{29,30}

Bakteri ini dapat tumbuh pada kondisi aerob dan anaerob fakultatif, pada suhu 15-45°C dengan suhu pertumbuhan optimum 37,5°C dan jika menempel pada feses, mentega, susu, keju serta air beku dapat bertahan hidup selama beberapa bulan sampai satu tahun.^{30,31} Bakteri ini dapat mati dengan pemanasan 54,4°C selama satu jam dan suhu 60°C selama 15-20 menit.²⁹



Gambar 2. 1 Mikroskopis bakteri *S.typhi*²⁹

2.2.2. Taksonomi

Taksonomi dari *S. typhi* sebagai berikut:

Kingdom	: <i>Bacteria</i>
Filum	: <i>Proteobacteria</i>
Kelas	: <i>Gammaproteobacteria</i>
Ordo	: <i>Enterobacteriales</i>
Famili	: <i>Enterobacteriaceae</i>
Genus	: <i>Salmonella</i>

Spesies : *Salmonella typhi*³²

2.3. Buah Mentimun (*Cucumis sativus* L.)

2.3.1. Karakteristik

Mentimun merupakan keluarga *cucurbitaceae* yang berasal dari Asia Utara dan dikenal di seluruh dunia. Tanaman ini termasuk dalam kategori tanaman semusim yang tumbuh dengan cara menjalar.³³ Buah mentimun memiliki ukuran yang bervariasi antara 8-25 cm dengan diameter 2,3-7 cm. Buah mentimun terdiri dari kulit buah, daging dan biji. Kulit buah mentimun ada yang berbintik-bintik, ada pula yang halus. Warna kulit buah antara hijau keputih-putihan, hijau muda dan hijau gelap sesuai dengan varietasnya. Mentimun memiliki biji yang banyak berbentuk pipih.^{34,35}



Gambar 2. 2 Mentimun (*Cucumis sativus* L.).^{34,36}

2.3.2. Taksonomi

Taksonomi dari mentimun (*Cucumis sativus* L) yaitu:

Divisi : *Spermatophyta*

Sub divisi : *Angiospermae*

Kelas : *Dicotyledonae*

Ordo : *Cucurbitales*

Genus : *Cucumis*

Spesies : *Cucumis sativus* L.³⁵

2.3.3. Kandungan Antibakteri

Kandungan ekstrak mentimun yang mempunyai aktivitas sebagai antibakteri yaitu flavonoid, saponin, alkaloid, terpenoid dan tanin.^{13,17,18}

Flavonoid merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam semua tumbuhan hijau yang termasuk kedalam golongan polifenol yang terkandung dalam tanaman yang dapat ditemukan pada bagian akar, daun, kayu, biji, dan kulit tumbuhan. Selain memiliki efek sebagai antibakteri, flavonoid juga memiliki efek farmakologi sebagai antioksidan, antipenuaan, antiinflamasi, antivirus dan lainnya.^{37,38} Flavonoid tidak mengalami kerusakan sampai pada suhu 90°C.³⁹

Saponin adalah banyak ditemukan dalam tumbuhan tingkat tinggi dan memiliki rasa pahit.³⁸ Senyawa saponin bersifat polar yaitu larut dalam air (hidrofilik) dan berfungsi sebagai antibakteri, antijamur, antioksidan dan antiinflamasi.⁴⁰ Saponin tahan pada suhu 70°C.³⁹

Alkaloid merupakan suatu golongan senyawa organik yang terdapat di alam bersifat basa atau alkali. Alkaloid hampir menyeluruh berasal dari tumbuh-tumbuhan dan tersebar luas dalam berbagai jenis tumbuhan tingkat tinggi.⁴¹ Alkaloid memiliki peranan secara farmakologis untuk mengobati diare, diabetes, malaria dan antimikroba.⁴² Alkaloid memiliki titik didih 87-238°C.⁴³

Terpenoid merupakan salah satu metabolit sekunder yang dapat ditemukan pada bagian akar, batang, daun, buah maupun biji tanaman. Terpenoid memiliki aktivitas farmakologi sebagai antiviral, antibakteri, antiinflamasi, sebagai inhibisi terhadap sintesis kolesterol dan antikanker.⁴⁴ Terpenoid memiliki titik leleh pada suhu 140°C-142°C.⁴⁵

Tanin adalah salah satu senyawa aktif metabolit sekunder yang termasuk kedalam golongan polifenol yang larut dalam air yang dapat ditemukan pada daun, tunas, biji, akar dan batang. Tanin memiliki beberapa khasiat seperti sebagai astringen, anti diare, antibakteri dan antioksidan.^{41,46} Tanin akan terurai pada suhu 98,89°C-101,67°C.³⁹

2.4. Ekstraksi

2.4.1. Definisi dan Prinsip Ekstraksi

Ekstraksi merupakan pemisahan satu atau beberapa bahan dari suatu padatan atau cairan.¹⁵ Ekstraksi juga dapat didefinisikan sebagai suatu proses yang dilakukan untuk memperoleh kandungan senyawa kimia dari jaringan tumbuhan maupun hewan dengan pelarut yang sesuai dalam standar prosedur ekstraksi.⁴⁷ Tujuan dari ekstraksi adalah untuk menarik komponen kimia atau zat aktif dalam sampel.⁴⁸

Pada proses ekstraksi, bahan yang akan diekstrak kontak secara langsung dengan pelarut. Pada saat itu, akan terjadi proses yang secara umum dapat dikelompokkan menjadi tiga tahap, yaitu: pelarut akan merusak dinding sel dan jaringan, serta masuk ke dalam sel, kemudian pelarut akan melarutkan senyawa-senyawa metabolit, dan kemudian pelarut bersama senyawa metabolit yang terlarut dikeluarkan atau dipisahkan dari bahan penghasilnya. Selanjutnya, proses evaporasi digunakan untuk memisahkan pelarut dari senyawa metabolit yang terlarut di dalamnya untuk menghasilkan ekstrak kasar, baik dalam bentuk cairan kental atau padatan (solid).¹⁵

2.4.2. Jenis-jenis Metode Ekstraksi

Secara umum metode ekstraksi dibedakan berdasarkan ada tidaknya proses pemanasan, yaitu:

2.4.2.1. Ekstraksi Cara Dingin

Metode ekstraksi dingin ini tidak ada proses pemanasan selama proses ekstraksi berlangsung, tujuannya untuk menghindari rusaknya senyawa yang dimaksud rusak karena pemanasan.⁴⁷ Jenis ekstraksi dingin adalah sebagai berikut:

A. Metode Maserasi

Metode maserasi merupakan cara ekstraksi yang paling sederhana yang dilakukan dengan merendam serbuk simplisia dengan pelarut selama beberapa hari pada suhu ruang 20-30°C dan terlindungi dari cahaya, dimana pelarut akan masuk ke dalam sel melewati dinding sel.¹⁹



Gambar 2. 3 Proses maserasi.⁴⁷

Keuntungan dari metode ini:

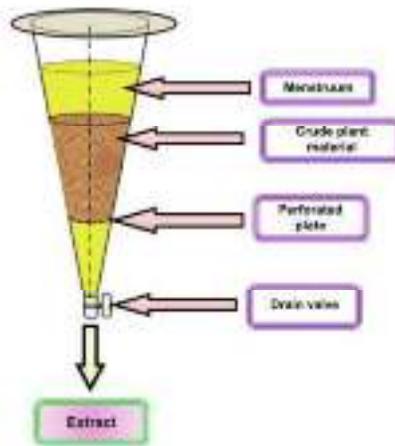
- a. Zat aktif yang diekstraksi terjamin tidak rusak.
- b. Alat yang digunakan sederhana.
- c. Biaya operasionalnya yang relatif rendah.

Kerugian dari metode ini:

- a. Proses ekstraksinya kurang sempurna, karena zat aktif hanya mampu terekstraksi 50% saja.
- b. Prosesnya juga lama dikarenakan membutuhkan waktu beberapa hari.^{19,20}

B. Metode Perkolasi

Perkolasi adalah ekstraksi yang dilakukan pada suhu ruangan dengan pelarut yang selalu baru. Prinsip kerja dari perkolasi adalah simplisia dimasukan ke dalam percolator dan pelarut dialirkan dari atas melewati simplisia sehingga zat terlarut mengalir kebawah dan ditampung.⁴⁹



Gambar 2. 4 Teknik perkolasi.¹⁹

Keuntungan metode ini:

- a. Lebih banyak senyawa yang akan didapatkan karena proses dilakukan dengan cara mengalirkan pelarut terus menerus dengan waktu yang relatif singkat
- b. Mampu melindungi senyawa yang tidak tahan terhadap pemanasan.

Kerugian metode ini:

- a. Jumlah cairan penyari lebih banyak
- b. Risiko terkontaminasi mikroba untuk penyari air karena dilakukan secara terbuka.⁵⁰

2.4.2.2. Ekstraksi Cara Panas

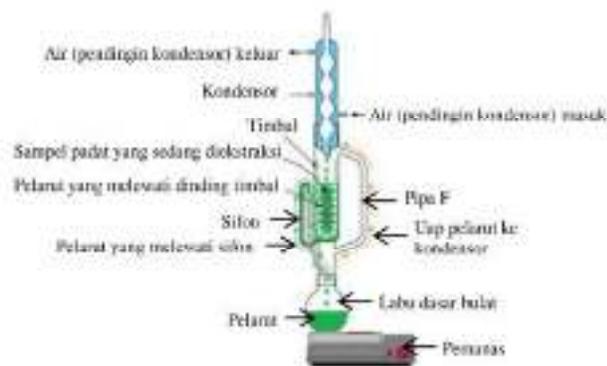
Metode ekstraksi ini melibatkan panas dalam prosesnya.⁴⁷ Jenis ekstraksi panas adalah sebagai berikut:

A. Metode Soxhletasi

Proses pemisahan suatu komponen yang terdapat dalam zat padat yang dilakukan secara terus menerus menggunakan pelarut yang relatif sedikit dikenal sebagai metode soxhletasi. Dalam metode ekstraksi ini, alat soxhlet digunakan untuk menempatkan pelarut dan sampel secara terpisah.^{19,49}

Nama-nama peralatan yang digunakan dalam soxhletasi adalah:

- a. Kondensor: berfungsi sebagai pendingin.
- b. Timbal: berfungsi sebagai wadah untuk menyimpan sampel.
- c. Pipa F: berfungsi sebagai saluran bagi uap pelarut yang dipanaskan pada labu alas bulat ke kondensor.
- d. Sifon: berfungsi sebagai perhitungan siklus, jika larutan pada sifon penuh dan jatuh ke dalam labu las bulat maka dihitung sebagai satu siklus.
- e. Labu alas bulat: berfungsi sebagai tempat penyimpanan pelarut.
- f. Pemanas: berfungsi untuk memanaskan pelarut.



Gambar 2. 5 Rangkaian alat soxhletasi.⁴⁹

Keuntungan dari metode ini:

- a. Pelarut yang digunakan lebih sedikit.
- b. Waktu ekstraksi lebih singkat.
- c. Sampel dapat terekstraksi secara sempurna karena dilakukan secara berulang-ulang.²²

Kerugian metode ini:

- a. Dapat berisiko merusak senyawa kimia dalam sampel, karena proses ekstraksi berjalan dengan pemanasan.⁵¹

B. Metode Refluks

Prinsip proses refluks adalah bahwa pelarut yang mudah menguap diuapkan pada suhu tinggi, tetapi didinginkan oleh kondensor, sehingga pelarut yang berbentuk uap mengembun di kondensor dan kemudian kembali ke wadah.



Gambar 2. 6 Peralatan refluks.⁵²

Keuntungan dari metode ini:

- Dapat digunakan untuk mengekstraksi sampel-sampel yang memiliki tekstur kasar dan tahan terhadap pemanasan langsung.

Kerugian dari metode ini:

- Membutuhkan pelarut dalam jumlah besar.¹⁹

2.5. Uji Aktivitas Antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri bertujuan untuk mengetahui sensitivitas bakteri terhadap sampel yang diuji.⁵³ Metode untuk uji antibakteri dibagi menjadi dua, yaitu metode difusi dan metode dilusi.⁵⁴

2.5.1. Metode Difusi

Prinsip kerja metode difusi adalah terdifusinya senyawa antibakteri ke dalam media padat dimana mikroba uji telah diinokulasikan. Metode difusi adalah metode yang paling sering digunakan untuk analisis aktivitas antibakteri.

A. Metode Difusi Cakram

Metode difusi cakram merupakan pengukuran daerah zona bening yang terbentuk di sekitar kertas cakram yang digunakan untuk mengetahui aktivitas antimikroba.



Gambar 2. 7 Metode Cakram.⁵³

Kelebihan dari metode ini:

- a. Proses pengujiannya cepat.
- b. Biaya relatif murah.
- c. Mudah dan tidak memerlukan keahlian khusus.⁵⁵

Kelemahan dari metode ini:

- a. Tingkat osmolaritas larutan uji yang rendah.⁵⁶

B. Metode Difusi Sumuran

Prinsip metode ini adalah membuat lubang pada agar yang telah diinokulasikan dengan bakteri, kemudian larutan diteteskan pada lubang sumuran yang telah dibuat. Penghambatan pertumbuhan mikroorganisme terlihat adanya zona hambat (wilayah jernih) di sekitar lubang sumuran.



Gambar 2. 8 Metode sumuran.⁵³

Kelebihan dari metode ini:

- a. Mudah mengukur luas zona hambat yang terbentuk karena isolat beraktivitas tidak hanya di permukaan agar tetapi juga sampai bawah.

Kekurangan dari metode ini:

- a. Media sangat rentan terkontaminasi pada saat pembuatan lubang dan memasukan sampel karena sering membuka cawan daripada metode seperti difusi cakram.⁵⁴
- b. Pengerjaannya lebih sulit dibandingkan metode difusi disk karena harus menggunakan alat khusus untuk melubangi media agar.⁵⁷

2.5.2. Metode Dilusi

Metode dilusi dibagi menjadi dua, yaitu cair dan padat. Metode dilusi cair digunakan untuk mengukur KHM (kadar hambat minimum), sedangkan metode dilusi padat digunakan untuk menentukan KBM (kadar bakterisidal minimum). Pada metode dilusi cair dilakukan dengan membuat seri pengenceran agen antimikroba pada medium cair yang ditambahkan dengan mikroba uji. Pada metode dilusi padat dilakukan dengan menginokulasi mikroba uji pada media agar yang mengandung agen antimikroba.

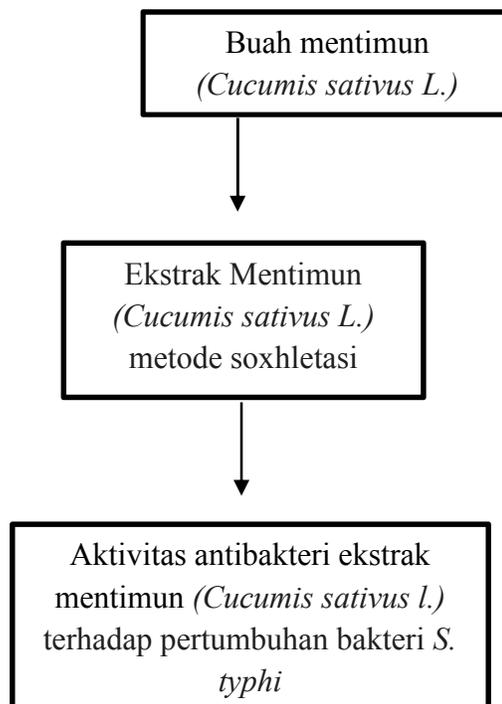
Kelebihan metode ini:

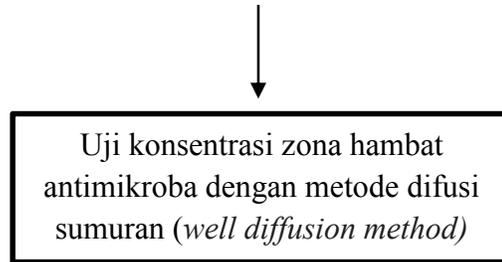
- a. Satu konsentrasi agen anti mikroba yang diuji dapat digunakan untuk menguji beberapa mikroba uji.⁵⁸

Kekurangan metode ini:

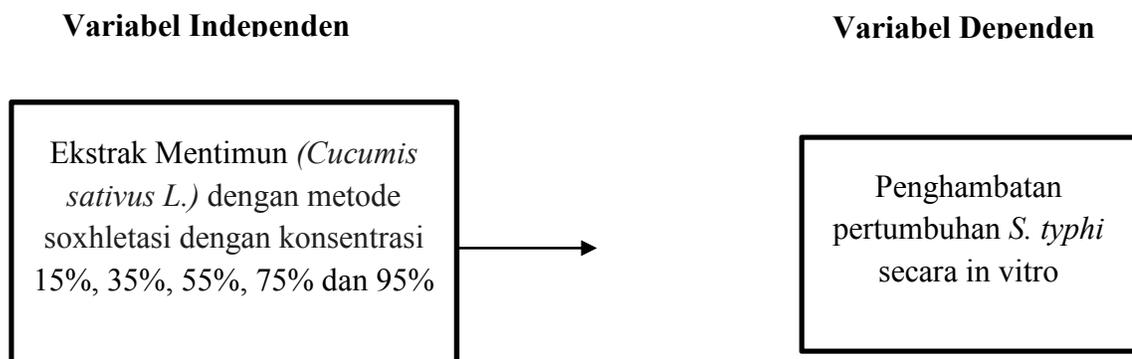
- a. Pengerjaannya rumit.
- b. Memerlukan banyak alat dan bahan.
- c. Proses pengerjaan memerlukan ketelitian, termasuk persiapan konsentrasi antimikroba yang bervariasi.⁵⁹

2.6. Kerangka Teori





2.7. Kerangka Konsep



BAB 3 METODE PENELITIAN

3.1. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang dilakukan di laboratorium secara *in vitro* dalam berbagai konsentrasi dengan metode sumuran untuk melihat aktivitas antibakteri ekstrak mentimun (*Cucumis sativus L.*) terhadap pertumbuhan bakteri *S. typhi*.

3.2. Tempat dan Waktu Penelitian

3.2.1. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di dua tempat, untuk ekstraksi mentimun dan skrining fitokimia dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Universitas Sumatera Utara (USU) dan untuk pengujian bakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Sumatera Utara (USU).

3.2.2. Waktu Penelitian

Waktu penelitian dilaksanakan pada bulan September sampai November 2023.

3.3. Sampel Bakteri dan Sampel Uji

3.3.1. Sampel Bakteri

Sampel dalam penelitian ini adalah bakteri *S. typhi*

3.3.2. Sampel Uji

Sampel dalam penelitian ini adalah ekstrak mentimun metode soxhletasi dengan berbagai konsentrasi yaitu 15%, 35%, 55%, 75% dan 95%

3.4. Estimasi Besar Sampel

Pada penelitian ini dilakukan pengulangan sampel untuk mendapatkan hasil yang valid. Jumlah pengulangan yang dilakukan dalam penelitian ini menggunakan rumus Federer:

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

Keterangan:

n = Jumlah pengulangan tiap perlakuan

t = Jumlah perlakuan yang dilakukan

Dalam penelitian ini dilakukan sebanyak 7 perlakuan yaitu ekstrak mentimun masing-masing dengan konsentrasi 15%, 35%, 55%, 75% dan 95%, DMSO digunakan sebagai kontrol negatif dan *ciprofloxacin* sebagai kontrol positif. Maka:

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

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

$$(n-1)(6) \geq 15$$

$$6n - 6 \geq 15$$

$$6n \geq 15 + 6$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 3,5$$

Untuk mendapatkan hasil yang valid, jumlah pengulangan tiap perlakuan (n) yang digunakan dalam penelitian ini adalah 4 kali pengulangan dalam pembulatan hasil.

3.5. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

3.5.1. Kriteria Inklusi

Mentimun yang dipilih merupakan mentimun hijau yang segar.

3.5.2. Kriteria Eksklusi

Bila terdapat media agar yang retak atau pecah pada saat proses pengerjaan.

3.6. Alat dan Bahan Penelitian

3.6.1. Alat

1. Oven
2. *Rotary evaporator*
3. Timbangan
4. Gelas beker
5. Tabung Erlenmeyer
6. Mikropipet
7. Cawan petri
8. Rak dan tabung reaksi
9. Jarum ose
10. Lampu Bunsen

11. Inkubator
12. Jangka sorong
13. Autoklaf
14. *Cork borer*
15. Alat soklet
16. Aluminium foil

3.6.2. Bahan

1. Aquadest
2. *Ciprofloxacin* Tab 500 mg
3. Bakteri *S. typhi*
4. Mentimun Lalap
5. Etanol 96%
6. Media *Mueller Hinton Agar* (MHA)
7. Larutan McFarland 0,5
8. HCL pekat
9. Besi Klorida (FeCl_3) 5%
10. Besi Klorida (FeCl_3) 1%
11. Pereaksi Dragendroff
12. Pereaksi Bouchardart
13. Pereaksi Mayer
14. Pereaksi Wagner
15. Pereaksi Salkowsky
16. Pereaksi Lieberman-Burchad
17. Asam sulfat pekat (H_2SO_4)
18. Natrium Hidroksa (NaOH) 10%

19. Serbuk Magnesium (Mg)
20. Pereaksi Mollish
21. Dimetil sulfoksida (DMSO)
22. Tissue

3.7. Prosedur Kerja

3.7.1. Sterilisasi Alat yang Digunakan

Alat-alat yang akan digunakan dicuci bersih kemudian dikeringkan dan disterilkan terlebih dahulu. Lapsi semua alat-alat menggunakan *aluminium foil* dan sterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit atau oven dengan suhu 170⁰C selama 1 jam. Ose disterilkan dengan dipijarkan menggunakan api bunsen.⁶⁰

3.7.2. Pembuatan Ekstrak Mentimun

Jenis buah yang digunakan mentimun lalap yang diperoleh dari pasar Setia Budi Tanjung Sari sebanyak 15 kg. Buah yang digunakan terdiri dari kulit, daging dan biji. Buah dicuci bersih dengan air mengalir dan kemudian dipotong menjadi potongan kecil. Kemudian dikeringkan di dalam oven lalu diblender hingga menjadi serbuk dan diperoleh sebanyak 274,76 gram. Selanjutnya alat sokletasi dipasang, kemudian serbuk mentimun dibungkus sebanyak 53 gram dengan kertas saring, kemudian dimasukkan kedalam alat soklet. Sokletasi dilakukan sekitar 5-6 siklus sampai tidak berwarna lagi. Selanjutnya ekstrak cair yang diperoleh kemudian dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak kental.

3.7.3. Uji Skrining Fitokimia

Sampel yang digunakan untuk skrining fitokimia yaitu ekstrak mentimun.

- a. Uji flavonoid

Ekstrak kental ditambah dengan etanol, lalu diaduk sampai homogen. Kemudian tambahkan 1 ml ke masing-masing 4 tabung reaksi berikut :

1. Tabung 1: ditambah FeCl_3 , hasil positif akan ditandai dengan terbentuknya warna hijau atau merah.
2. Tabung 2: ditambah sepucuk spatula serbuk Mg dan 4 tetes HCL. Setelah itu dikocok kuat. Hasil positif jika terjadi perubahan warna menjadi jingga-merah.
3. Tabung 3: ditambah Natrium Hidroksida (NaOH) 10 % sebanyak 2 tetes dan dikocok kuat. Hasil positif mengandung flavonoid bila larutan mengalami perubahan warna yang sangat mencolok menjadi warna kuning, merah atau coklat.
4. Tabung 4: ditambah H_2SO_4 sebanyak 2 tetes dan dikocok kuat. Sampel mengandung flavonoid bila larutan mengalami perubahan warna yang sangat mencolok dari warna awal menjadi kuning, merah atau coklat.

b. Uji saponin

Ekstrak sebanyak 0,1 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Tambahkan aquades kemudian dikocok secara vertikal selama kurang lebih 1 menit. Selanjutnya, tambahkan HCL 1N 2-3 tetes. Jika terdapat busa setinggi 1-3 cm yang stabil \pm 10 menit menunjukkan hasil positif saponin.

c. Uji alkaloid

Untuk mengidentifikasi kandungan alkaloid sebagai berikut:

Sebanyak 1 ml ditambah dengan 5 tetes ammonia pekat. Setelah itu, disaring kemudian ditambah 2 ml asam sulfat 2N dan dikocok hingga memberikan lapisan atas bawah. Larutan dibagi menjadi 4 bagian sebagai berikut:

1. Tabung 1: ditambahkan 2 tetes pereaksi Bouchardat, hasil positif alkaloid terbentuk warna kuning kecoklatan.
2. Tabung 2: ditambah 1 tetes pereaksi Mayer, hasil positif alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan putih.
3. Tabung 3: ditambah 1 tetes pereaksi Dragendorff, hasil positif alkaloid jika terbentuk endapan kuning.
4. Tabung 4: ditambahkan 2 tetes pereaksi Wagner, hasil positif alkaloid jika terbentuk warna kuning kecoklatan.

d. Uji terpenoid

Uji terpenoid sebagai berikut:

1. Ekstrak ditambahkan 3 tetes pereaksi *Liebermann-Burchard*. Larutan dikocok perlahan dan dibiarkan beberapa menit. Hasil positif Steroid akan memberikan warna biru atau hijau Sedangkan hasil Triterpenoid akan memberikan warna merah atau violet.
2. Salkowski test dilakukan dengan cara 5 ml larutan ekstrak dalam kloroform ditambah 3 ml asam sulfat pekat, bila pada batas antara kedua fase terbentuk warna merah kecoklatan menandakan adanya terpenoid.

e. Uji tanin

Sampel ditimbang seberat 0,5 gram kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi. Selanjutnya, ditambahkan dengan 2-3 tetes FeCl_3 1%. Jika mengandung senyawa kimia tanin maka akan muncul warna biru kehitaman atau hijau kehitaman.

3.7.4. Pembuatan Suspensi Bakteri *S. typhi*

Biakan bakteri *S. typhi* yang telah dilakukan peremajaan (subkultur) pada media *Mueller Hinton Agar* (MHA). Kemudian dibuat suspensi bakteri uji dari bakteri yang tumbuh menggunakan larutan NaCl 0,9% fisiologis sampai kekeruhan sesuai dengan standar Mc Farland 0,5, yang diperkirakan mengandung lebih kurang 10^8 CFU/ml. Selanjutnya yang akan digunakan sebagai bakteri uji.

3.7.5. Uji Aktivitas Antibakteri

Pada penelitian ini uji aktivitas antibakteri menggunakan metode difusi sumuran, dengan menggunakan 5 konsentrasi ekstrak etanol mentimun masing-masing dengan konsentrasi 15%, 35%, 55%, 75% dan 95% serta *ciprofloxacin* 10 mg sebagai kontrol positif dan sebanyak DMSO sebagai kontrol negatif.

Kemudian pada metode ini suspensi bakteri diinokulasikan pada media MHA dengan ose. Setelah itu, media MHA yang telah ditanami oleh suspensi bakteri *S. typhi* dilubangi dengan menggunakan *Cork borer* dengan diameter 6mm. Pada masing-masing

lubang diberi berbagai konsentrasi ekstrak beserta kontrol positif dan negatif sebanyak 50 μ L. Selanjutnya, setiap kelompok perlakuan diberi label lalu diinkubasi. Media inkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Setelah inkubasi, aktivitas antibakteri dalam cawan petri diamati dengan melihat adanya zona bening (clear zone), sedangkan yang tidak mempunyai daya antibakteri tidak akan menghasilkan *clear zone*. Diameter yang terbentuk diukur dengan jangka sorong. Pengujian aktivitas antibakteri ini dilakukan 4 kali pengulangan pada setiap perlakuan.

3.8. Identifikasi Variabel

3.8.1. Variabel Independen

Ekstrak mentimun (*Cucumis sativus L.*) dengan dengan berbagai berbagai konsentrasi.

3.8.2. Variabel Dependen

Diameter zona hambat dari pertumbuhan *S. typhi*.

3.9. Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala ukur
1.	Ekstrak mentimun (<i>Cucumis Sativus L.</i>)	Merupakan buah mentimun yang mengalami proses ekstraksi metode soxhletasi untuk memperoleh senyawa kimia pada buah	Mikropipet	Konsentrasi ekstrak mentimun 15%, 35%, 55%, 75% dan 95 %.	Rasio

		mentimun tersebut.			
2.	Aktivitas antibakteri	Kemampuan ekstrak mentimun dalam menghambat pertumbuhan bakteri <i>S. typhi</i> yang dianalisis menggunakan metode difusi sumuran dengan diameter zona bening yang terbentuk di sekitar tempat yang dilubangi.	Jangka sorong	Aktivitas lemah < 5 mm Aktivitas sedang 5-10 mm Aktivitas kuat 11-20 mm Aktivitas sangat kuat > 20 mm.	Kategorik
3.	Kontrol positif	Kontrol positif merupakan bahan pembanding dalam memastikan sampel yang digunakan menimbulkan efek positif terhadap pertumbuhan <i>S. typhi</i> . Pada penelitian ini	Jangka sorong	Aktivitas lemah < 5 mm Aktivitas sedang 5-10 mm Aktivitas kuat 11-20 mm Aktivitas sangat kuat > 20 mm.	Kategorik

		menggunakan kontrol positif yaitu <i>ciprofloxacin</i> 10mg.			
4.	Kontrol negatif	Kontrol negatif merupakan kelompok perlakuan yang tidak memberikan efek pada pertumbuhan bakteri dengan tujuan untuk mengetahui apakah pelarut yang digunakan memiliki efek antibakteri. Pada penelitian ini menggunakan kontrol negatif yaitu DMSO.	Jangka sorong	Aktivitas lemah < 5 mm Aktivitas sedang 5-10 mm Aktivitas kuat 11-20 mm Aktivitas sangat kuat > 20 mm.	Kategorik

3.10. Analisis Hasil Uji Antibakteri

Kategori kekuatan daya hambat bakteri mensurut Davis dan Stout.⁶¹

Ukuran Diameter yang Terbentuk	Kekuatan Daya
--------------------------------	---------------

< 5 mm	Lemah
5-10 mm	Sedang
11-20 mm	Kuat
>20 mm	Sangat kuat

3.11. Analisa Data

Penelitian ini menggunakan analisa data dengan perangkat lunak *Statistical Product and Service Solutions* (SPSS). Pada pengolahan data menggunakan Uji *One Way Anova* dikarenakan data berdistribusi normal dan varians data sama (homogen).