

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Sebagai salah satu negara beriklim tropis, Indonesia mempunyai banyak keuntungan terlebih dalam hal keanekaragaman hayati. Diketahui ada sekitar 40.000 jenis tanaman yang tumbuh di Indonesia dan tidak sedikit di antara tanaman-tanaman tersebut merupakan jenis tanaman yang dimanfaatkan sebagai obat tradisional. Salah satu tanaman yang dimanfaatkan sebagai obat tradisional adalah daun mengkudu.¹

Penggunaan daun mengkudu sebagai alternatif pengobatan tradisional sudah dikenal jauh sejak 2000 tahun yang lalu saat bangsa Polynesia datang bermigrasi ke Asia Tenggara. Daun mengkudu dinilai memiliki kandungan senyawa senyawa aktif yang dapat dimanfaatkan sebagai antimikroba, antifungal, antiprotoza, antidiabetes, antioksidan, antihipertensi, antidiare dan mempercepat penyembuhan luka.² Dalam beberapa penelitian senyawa aktif dalam daun mengkudu adalah terpenoid, flavonoid, saponin dan antrakuinon yang berperan penting aktif sebagai antimikroba yang bekerja dengan menghambat perkembangan bakteri dalam tubuh manusia, salah satunya adalah bakteri *E.coli*.³

Agen patogen paling umum penyebab diare kedua setelah rotavirus adalah bakteri *Escherichia coli*. Bakteri *E.coli* merupakan bakteri yang tumbuh sebagai flora normal dalam tubuh manusia, yang biasanya banyak ditemukan didalam usus. Bakteri bergram negatif yang mempunyai ukuran 2,4 x 0,4-0,7 μm ini akan menjadi patogen salah satunya jika makanan yang dikonsumsi oleh manusia tidak dijaga kualitas kebersihannya, bakteri tersebut dapat menginfeksi bagian saluran pencernaan manusia dan menyebabkan salah satu penyakit yaitu diare.⁴

Diare masih merupakan salah satu penyakit yang sampai saat ini menjadi masalah kesehatan utama dunia menurut *World Health Organization* terlebih di kalangan anak-anak karena diare merupakan penyebab utama kedua kematian pada anak-anak di bawah usia lima tahun dengan angka kematian sekitar 525.000 anak setiap tahunnya.⁵ Di Indonesia sendiri menurut data Kemkes RI tahun 2020 penyakit diare sampai saat ini masih menjadi penyakit dengan angka mortalitas tertinggi kedua setelah pneumonia pada balita.⁶

Secara umum penatalaksanaan utama pada penyakit diare ini adalah terapi cairan dan pemberian antibiotik sesuai dengan jenis bakteri penyebab diare tersebut. Tetapi seiring berjalannya waktu penggunaan antibiotik secara berlebihan mulai menimbulkan beberapa resiko seperti resistensi bakteri, retensi bahan toksik dan residu antibiotik yang akhirnya membuat masyarakat cenderung kembali menggunakan bahan alam dalam alternatif pengobatan diare, salah satunya adalah penggunaan daun mengkudu yang diekstraksi.⁷

Penelitian yang dilakukan oleh Rohmah, dkk menunjukkan bahwa terdapat pengaruh perbedaan konsentrasi ekstrak daun mengkudu pada zona hambat bakteri *Escherichia coli* dengan menggunakan uji antimikroba metode sumuran.³ Penelitian lain yang dilakukan oleh Priamsari, dkk menunjukkan bahwa terdapat perbedaan konsentrasi ekstrak daun mengkudu pada zona hambat bakteri *Escherichia coli* dengan menggunakan uji antimikroba *disc diffusion test* atau metode cakram.⁸

Uji antimikroba dengan menggunakan metode sumuran memiliki kelebihan yaitu lebih mudah dalam mengukur luas zona hambat tetapi saat pembuatan sumuran memiliki kesulitan karena masih terdapat sisa-sisa agar pada medianya, medianya akan mudah retak atau pecah sehingga mempengaruhi efektivitas uji. Sedangkan uji antimikroba dengan metode difusi cakram lebih mudah dan cepat untuk digunakan karena alat dan bahan yang digunakan lebih sederhana yaitu menggunakan kertas cakram yang diletakkan di atas media agar.⁹

Berdasarkan perbedaan hasil penelitian di atas, maka diperlukan pembuktian lebih lanjut tentang perbandingan metode sumuran dan metode difusi cakram dalam menguji efek antimikroba ekstrak daun mengkudu pada bakteri *E.coli* yang lebih efisien. Hal inilah yang melatarbelakangi peneliti untuk melakukan penelitian tentang perbandingan hasil uji efek antimikroba ekstrak daun mengkudu (*morinda citrifolia* l.) menggunakan metode sumuran dan metode difusi cakram pada pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.

1.2. Rumusan Masalah

Bagaimanakah perbandingan hasil uji efek antimikroba ekstrak daun mengkudu (*Morinda citrifolia* l.) menggunakan metode sumuran dan metode difusi cakram pada pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.

1.3. Hipotesis

H0: Uji efek antimikroba ekstrak daun mengkudu (*morinda citrifolia* l.) menggunakan metode sumuran pada pertumbuhan bakteri *E.coli* lebih baik daripada metode difusi cakram.

1.4. Tujuan Penelitian

1.4.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui efek antimikroba ekstrak daun mengkudu (*morinda citrifolia* l.) menggunakan metode sumuran pada pertumbuhan bakteri *E.coli* lebih baik daripada metode difusi cakram.

1.4.2 Tujuan Khusus

1. Untuk mengetahui zona hambat yang terbentuk dari ekstraksi daun mengkudu yang mempunyai sifat antimikroba pada *E.coli* dengan metode sumuran
2. Untuk mengetahui zona hambat yang terbentuk dari ekstraksi daun mengkudu yang mempunyai sifat antimikroba pada *E.coli* dengan metode difusi cakram

1.5. Manfaat Penelitian

1.5.1 Bagi Peneliti

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberi pengetahuan lebih terhadap penelitian di bidang eksperimental dan dapat lebih mengaplikasikan pembelajaran yang telah di dapat selama perkuliahan.

1.5.2 Bagi Institusi

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberi tambahan wawasan tentang efek antimikroba daun mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) dengan metode sumuran dan metode difusi cakram dan sebagai tambahan literatur untuk penelitian berikutnya.

1.5.3 Bagi Masyarakat

Hasil penelitian ini diharapkan memberikan informasi tambahan kepada masyarakat tentang manfaat dari daun mengkudu sebagai pengobatan alternatif diare.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tanaman Obat

Definisi tanaman obat menurut Departemen Kesehatan Republik Indonesia sesuai dengan SK Menkes No. 149/SK/Menkes/IV/1978 merupakan tanaman atau bagian tanaman yang dapat digunakan sebagai bahan obat tradisional seperti jamu, dan dapat pula sebagai bahan baku obat-obatan, serta juga merupakan tanaman atau bagian tanaman yang sudah diekstraksi dan ekstraknya digunakan sebagai obat.¹⁰

Meskipun tidak sepopuler tanaman lain, tetapi saat ini penggunaan tanaman obat sudah banyak sekali dikenal oleh masyarakat luas, dimana tanaman obat sudah banyak digunakan sebagai bahan baku obat tradisional dan jamu. Dalam penggunaannya tanaman obat dapat dikonsumsi secara langsung sebagai bumbu dapur, dan juga dapat diolah dalam bentuk bahan baku makanan dan minuman, obat tradisional dan kosmetik. Tanaman berkhasiat obat dibagi menjadi tiga kelompok, diantaranya: tanaman obat tradisional adalah jenis tanaman yang dianggap masyarakat memiliki khasiat dan digunakan sebagai bahan baku obat tradisional, tanaman obat modern adalah jenis tanaman obat yang khasiatnya telah terbukti secara ilmiah, dan tanaman obat potensial adalah jenis tanaman obat yang dipercaya memiliki khasiat obat tetapi belum dibuktikan penggunaannya secara ilmiah.¹¹

Tanaman obat yang bermanfaat tentunya mempunyai artian bahwa tanaman yang digunakan mempunyai zat-zat aktif atau kandungan tertentu yang bisa mengobati beberapa penyakit. Tanaman obat ini bisa berasal dari tanaman yang tumbuh secara liar maupun tanaman yang sengaja ditanam. Tanaman yang digunakan sebagai obat ini pun merupakan tanaman murni yang sederhana dan belum diolah.¹² Bagian-bagian dari tanaman yang digunakan sebagai obat dapat berasal dari akar, batang, daun, bunga, buah, rimpang dan umbi. Ada beberapa tanaman obat yang digunakan masyarakat Indonesia sebagai pengobatan alternatif dari suatu penyakit seperti mengkudu, lengkuas, kencur, kunyit, temulawak, lidah buaya, dan jahe.¹³

2.2. Mengkudu

Mengkudu merupakan salah satu tanaman terpopuler di beberapa kawasan seperti Asia Tenggara, Cina, India, Filipina, Hawaii, Australia dan Afrika dimana tanaman ini

terkenal karena seluruh bagian tanamannya dapat dimanfaatkan sebagai obat. Di beberapa daerah di Indonesia mengkudu mempunyai nama seperti Pace (Jawa), Cengkudu (Sunda), Kodhuk (Madura) dan Wengkudu (Bali). Penggunaan mengkudu saat ini semakin populer karena khasiatnya yang dapat menjadi alternatif berbagai penyakit seperti antimikroba, antifungal, antiprotoza, antidiabetes, antioksidan, antihipertensi, antidiare dan mempercepat penyembuhan luka.¹⁴

Tanaman mengkudu merupakan tanaman yang mudah tumbuh pada daerah-daerah tropis yang biasanya tanaman mengkudu tumbuh secara liar meskipun pada daerah yang mengandung unsur hara yang sedikit. Tetapi meskipun demikian tanaman mengkudu dapat tetap tumbuh subur dan menghasilkan buah dikarenakan tanaman ini memiliki sifat xerofit yang artinya dapat beradaptasi pada tempat yang kering. Klasifikasi dari tanaman mengkudu diantaranya adalah :

Kingdom	: Planta
Divisi	: Spermatophyta
Class	: Dicotyledoneae
Ordo	: Gentianales
Family	: Rubiaceae
Genus	: Morinda
Spesies	: <i>Morinda citrifolia</i> L. ¹⁵

Tanaman mengkudu dapat menjadi tanaman yang multiguna dikarenakan hampir seluruh bagian dari tanamannya mengandung senyawa-senyawa kimia dan nutrisi yang dapat berguna sebagai alternatif pengobatan tradisional. Penggunaan daun mengkudu sebagai alternatif pengobatan didorong orang beberapa kampanye yang mengatakan *consume less chemicals and back to nature* sehingga saat ini potensi tanaman mengkudu sebagai pengobatan tradisional telah didukung dengan beberapa penelitian terhadap senyawa-senyawa aktif yang dikandung.¹⁶

2.2.1. Morfologi Daun Mengkudu

Mengkudu merupakan salah satu tanaman yang tumbuh secara liar maupun pada pekarangan dan memiliki arah tumbuh membengkok dan termasuk dalam kategori pohon kecil, dimana tingginya rata-rata hanya mencapai 3-8 m. Tanaman mengkudu ini memiliki banyak cabang dan ranting yang biasanya berbentuk persegi empat. Daun mengkudu biasanya berbentuk jorong lanset dan mempunyai panjang 15-50 cm serta lebar 5-17 cm, daun mengkudu memiliki pinggiran yang rata, daunnya mengkilap dan

tebal, bersudut lancip, tidak berbulu, berurat menyirip, daunnya tunggal, berhadapan dan mempunyai panjang tangkai 0,5-2,5 cm. Bagian bunga pada tanaman mengkudu ini biasanya terletak diantara daun-daunnya yang bisa berkumpul sebanyak 5-8 bunga. Ciri bunga daripada tanaman mengkudu ini adalah berwarna putih, mempunyai bau yang harum dan berbentuk seperti terompet. Kemudian untuk buah dari tanaman daun mengkudu sendiri memiliki ciri bertangkai, berbentuk bulat sedikit lonjong dengan panjang 5-20 cm, dan mempunyai permukaan buah yang tidak rata, dan pada usia muda buah tanaman mengkudu memiliki tekstur yang keras dan berwarna hijau pekat, sedangkan akan berwarna kekuningan jika buah mengkudu telah masak dan akan disertai juga dengan bau busuk dan berair serta biji yang berwarna hitam.¹⁷

2.2.2. Kandungan Daun Mengkudu

Daun mengkudu dalam hal sebagai antimikroba memiliki berbagai senyawa-senyawa seperti terpenoid, flavonoid, saponin, dan antrakuinon. Berikut penguraian tentang senyawa-senyawa yang terkandung dalam daun mengkudu :

Senyawa terpenoid merupakan senyawa yang berpotensi sebagai antimikroba dengan cara melibatkan kerusakan membran oleh senyawa lipofilik. Senyawa terpenoid bereaksi dengan protein transmembran pada membran luar dinding sel bakteri yang nantinya akan membentuk polimer yang kuat dan merusak porin, mengurangi permeabilitas dinding sel bakteri sehingga sel bakteri kekurangan nutrisi dan membuat bakteri mati ataupun terhambat dalam pertumbuhannya.¹⁸

Senyawa flavonoid sudah dikenal memiliki sifat antimikroba dikarenakan senyawa ini mampu melepaskan energi transduksi terhadap membran sitoplasma bakteri dan menghambat motilitas bakteri. Senyawa flavonoid juga mempunyai gugus hidroksil yang dapat menimbulkan perubahan komponen organik dan transpor nutrisi yang pada akhirnya akan menimbulkan efek toksik terhadap bakteri.¹⁹

Senyawa saponin merupakan senyawa yang dapat merusak permeabilitas dinding sel sehingga dapat menimbulkan kematian sel dalam hal sebagai antimikroba, dimana mekanisme polifenol sebagai agen antimikroba berperan sebagai toksin pada protoplasma, merusak dan menembus dinding sel. Polifenol yang terdapat pada senyawa saponin dapat menyebabkan kerusakan sel bakteri, denaturasi protein, inaktivasi enzim dan juga dapat menyebabkan kebocoran sel.²⁰



Gambar 2.1. Daun Mengkudu.²¹

2.3. Bakteri *Escherichia coli*

Bakteri *Escherichia coli* merupakan bakteri yang secara alami tumbuh dan menjadi flora normal dalam pencernaan manusia maupun hewan. Bakteri ini ditemukan pertama kali oleh seorang bakteriologis Jerman tahun 1885 yaitu Theodor Von Escherich. Bakteri *E.coli* merupakan bakteri bergram negatif, anaerob fakultatif dan berbentuk batang yang bermanfaat dalam hal memproduksi vitamin K2 dan juga menghambat bakteri yang menjadi patogen dalam saluran pencernaan terutama pada usus.²²

Bakteri *Escherichia coli* mempunyai morfologi yaitu berbentuk batang atau basil dan memiliki ukuran sel dengan panjang sekitar 2 μm dan lebar 0,4-0,7 μm . *E.coli* memiliki flagela yang dapat berfungsi sebagai alat gerak sehingga bakteri dapat bergerak secara bebas. *E.coli* dapat membentuk koloni yang bundar, halus, cembung dan memiliki tepian yang nyata, dapat hidup pada suhu 20-40⁰C dengan suhu optimum berada pada 37⁰C.²³ Bakteri *Escherichia coli* memiliki klasifikasi sebagai berikut :

Kingdom : Protista Filum
 : Protophyta Kelas :
 Schyzomycutes
 Ordo : Enterovacterales
 Family : Enterobacteriaceae
 Genus : Escherichia
 Species : *Escherichia Coli*.²⁴

2.3.1. Sifat Virulensi Bakteri *Escherichia coli*

Bakteri *Escherichia coli* yang dikenal sebagai flora normal dalam tubuh manusia dapat menjadi patogen jika jumlah bakterinya meningkat pada saluran pencernaan ataupun jika bakteri *E.coli* berada di luar usus. Bakteri *E.coli* dapat pula menghasilkan enterotoksin yang jika berikatan dengan eneteropatogenik akan menghasilkan enterotoksin pada sel epitel yang dalam beberapa kasus dapat menyebabkan diare.

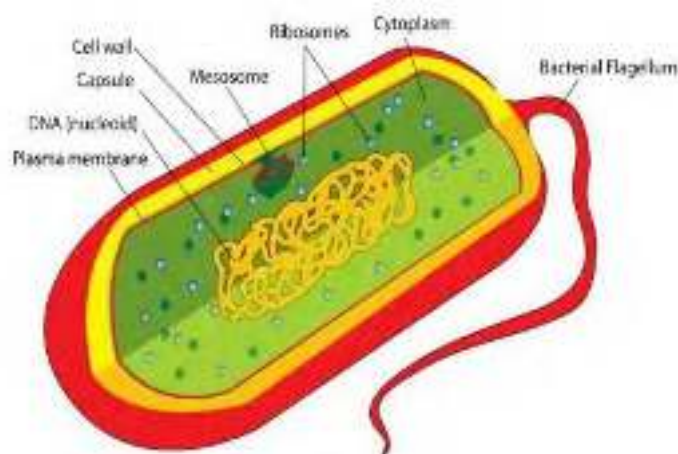
Bakteri *E.coli* yang meningkat pada saluran pencernaan dapat terjadi salah satunya jika makanan yang dikonsumsi oleh manusia tidak dijaga kebersihannya, dan juga air yang tercemar oleh kotoran manusia yang dikonsumsi oleh manusia dapat menyebabkan diare dan juga infeksi saluran pencernaan.

Berdasarkan sifat sifat virulensi dan mekanisme penyebab diare yang berbeda maka bakteri *E.coli* diklasifikasikan, antara lain :

1. *Enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC) yang merupakan penyebab utama diare pada bayi yang dapat berlangsung selama lebih dari 2 minggu dan terjadi terlebih khusus pada negara berkembang. EPEC mempunyai karakteristik utama dalam kemampuannya untuk menginduksi luka (*attaching-effacing*) dengan cara merusak mikrovili usus pada saluran pencernaan, dimana hal tersebut terjadi karena adanya komponen genetik berupa lokus yang dikenal sebagai lokus pemindah enterosit. Akibat yang dapat ditimbulkan dari infeksi EPEC adalah diare yang cair dan biasanya susah diatasi namun tidak kronis. Orang dewasa yang terkena infeksi dapat ditandai dengan timbulnya gejala mual, muntah, kram perut, sakit kepala, demam, menggigil yang dapat berlangsung hingga 6 jam sampai 3 hari.
2. *Enterotoxigenic Escherichia coli* (ETEC) merupakan infeksi bakteri yang sering terjadi pada bayi di negara berkembang. ETEC dapat melekat pada sel epitel usus kecil dikarenakan faktor kolonisasinya dan juga menghasilkan enterotoksin menyebabkan lumen usus terengang oleh cairan dan mengakibatkan hipermotilitas dan diare yang dapat berlangsung beberapa hari. Ada beberapa strain ETEC yang memproduksi eksotoksin yang tidak tahan panas. ETEC dapat ditularkan melalui *fecal-oral* dan umumnya terjadi karena pangan maupun air pada daerah tersebut sudah tercemar dan terkontaminasi oleh ETEC. Toksikoinfeksi ETEC umumnya dialami oleh para wisatawan dari negara maju yang awalnya menerapkan kebersihan yang baik tetapi terinfeksi

karena mengunjungi negara-negara dengan standar kebersihan yang buruk sehingga sering juga disebut sebagai “diare wisatawan” .

3. *Enterohemorrhagic Escherichia coli* (EHEC) merupakan infeksi bakteri yang dapat menyebabkan diare hingga berujung pada sindrom hemolitik uremik, dimana gejala yang timbul jika seseorang terinfeksi EHEC adalah kram perut parah, yang diikuti dengan diare berdarah dimana masa inkubasi biasanya 3-9 hari.
4. *Enteroinvasive Escherichia coli* (EIEC) yang merupakan bakteri yang menyebabkan penyakit yang mirip dengan shigellosis. Penyakit infeksi yang disebabkan oleh EIEC lebih sering terjadi pada anak-anak di negara berkembang dan wisatawan yang menuju negara tersentu. EIEC berinvansi ke sel epitel mukosa usus untuk menimbulkan suatu penyakit. Gejala yang dapat timbul ketika seseorang terinfeksi EIEC adalah menggigil, demam, sakit kepala, nyeri otot, kram perut, dan diare yang dapat timbul 8-24 jam setelah mengkonsumsi makanan atau minuman yang mengandung EIEC. EIEC juga dapat menginvasi sel jaringan kolon dikarenakan memiliki virulensi spesifik berupa plasmid invasi.
5. *Enteraggregative Escherichia coli* (EAEC) merupakan infeksi bakteri yang dapat menyebabkan diare akut maupun kronik di negara-negara berkembang, dimana bakteri ini ditandai dengan pola khas pelekatannya pada sel manusia. EAEC menghasilkan hemolisin dan ST enterotoksin yang sama dengan ETEC.



Gambar 2.2. Struktur Bakteri *Escherichia coli*

2.4. Metode Ekstraksi

Pengolahan suatu tanaman dengan mengambil manfaat dari kandungan senyawa aktif ataupun sari dari tanaman tersebut untuk dijadikan sebagai alternatif pengobatan tradisional dapat menggunakan salah satu cara yaitu dengan metode ekstraksi. Ekstraksi mempunyai beberapa metode dalam pengolahannya tergantung pada sifat serta senyawa yang akan digunakan. Beberapa cara ekstraksi yang paling sering digunakan dalam hal pengelolaan bahan alam yaitu metode maserasi, sokletasi dan perkolasi. Terdapat beberapa faktor yang dapat mempengaruhi suatu ekstraksi yaitu, waktu, suhu, jenis pelarut, perbandingan pelarut dan bahan serta ukuran dari partikel.²⁵

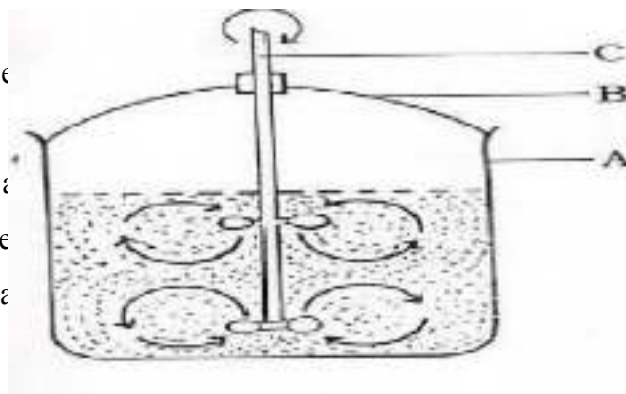
2.4.1. Metode Maserasi

Metode maserasi merupakan metode ekstraksi dengan cara melakukan perendaman pelarut dan bahan alam tanpa adanya proses pemanasan dalam pembuatannya. Keuntungan dalam menggunakan metode maserasi sebagai metode ekstraksi bahan alam adalah menjamin zat yang akan diekstrak tidak rusak dikarenakan selama proses perendaman bahan akan terjadi pemecahan dari dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara luar dan dalam sel, sehingga metabolit sekunder yang terdapat pada sitoplasma akan pecah dan terlarut pada pelarut organik yang digunakan.²⁶

Dalam hal proses ekstraksi dengan menggunakan metode maserasi umumnya menggunakan suhu ruang, tetapi hal tersebut dapat membuat proses ekstraksi menjadi kurang sempurna yang akhirnya menyebabkan senyawa menjadi kurang terlarut secara optimal. Sehingga dilakukan modifikasi pada suhu agar proses ekstraksi dengan menggunakan metode maserasi menjadi lebih optimal yang nantinya akan mempengaruhi kelarutan dari zat aktif pada suatu bahan alam sehingga bertambah besar. Tetapi, perlu diperhatikan peningkatan suhu yang terlalu tinggi akan menyebabkan kerusakan pada bahan alam yang sedang di proses. Dalam metode maserasi pula waktu maserasi mempengaruhi kualitas ekstrak yang akan didapatkan, dimana semakin lama waktu ekstraksinya maka akan semakin lama kontak antara pelarut dan bahan alam yang akan memperbanyak jumlah sel yang akan pecah dan senyawa aktif yang terlarut.²⁷

Maserasi dikerjakan dengan cara merendam serbuk bahan alam sebanyak 400 gram dengan cairan pelarut etanol 96% sebanyak 4 liter dan diaduk secara kontinyu, kemudian disimpan pada tabung yang tertutup rapat dan dilakukan pengadukan secara

berulang. Cairan pe
yang mengandung
antara larutan zat
keluar. Peristiwa te
antara larutan di luar



dalam rongga sel
dan konsentrasi
arutan mendesak
tara konsentrasi

Gambar 2.3 Alat Maserasi

Keterangan gambar :

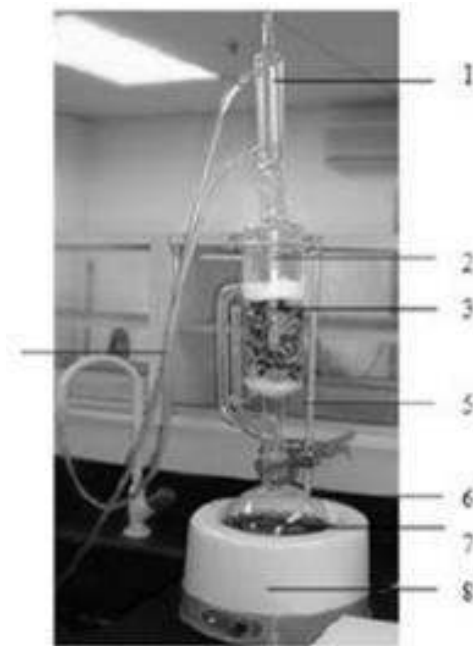
1. Bejana untuk meletakkan simplisia
2. Tutup
3. Pengaduk yang digerakan secara mekanik

2.4.2. Metode Sokletasi

Metode sokletasi merupakan salah satu metode ekstraksi yang digunakan untuk mengekstraksi zat terlarut dari matrik padat dengan proses pemasanan, dalam hal ini teknik ekstraksi yang digunakan bertujuan untuk memisahkan padatan dari padatan yang lainnya dengan menggunakan pelarut yang mempunyai kelarutan yang berbeda.²⁸

Dalam penelitian ini ekstraksi daun mengkudu menggunakan metode sokletasi dikarenakan metode ini mempunyai keuntungan dalam hal proses ekstraksinya yang tidak memakan waktu lama karena terjadi proses sirkulasi secara terus menerus oleh pelarut yang selalu membasahi sampel dan juga dapat menghasilkan rendemen yang lebih besar daripada metode maserasi dikarenakan kemampuan pelarutnya yang meningkat dalam mengekstraksi suatu senyawa yang tidak larut dalam kondisi suhu kamar karena adanya perlakuan panas yang diberikan pada pelarut dan juga penarikan senyawa yang maksimal oleh pelarut saat proses sirkulasi dengan bahan ekstraksi dapat membuat meningkatnya rendemen yang dihasilkan.²⁹

Pada metode sokletasi ini peralatan yang digunakan yaitu labu soklet yang dimana nantinya sampel padatan akan dibungkus oleh suatu sarung yang memiliki dinding bersifat liquid-permiabel yang diletakkan pada pusat *chamber*, pelarut yang digunakan tersebut akan ditempatkan pada tabung yang letaknya lebih rendah lalu dipanaskan sampai mendidih, kemudian akan dikondensasi lalu dimasukkan pada *chamber* ekstraksi. Pada *chamber* ekstraksi ini akan dipenuhi cairan sampai ketinggian pipa sifon yang dimana pada titik itu semua cairan akan dipindahkan kembali ke labu yang lebih rendah dan proses akan diluang kembali. Kelarutan dari komponen-komponen yang ada akan meningkat oleh karena adanya suhu yang berguna untuk mempertahankan temperatur dari *chamber* ekstraksi saat mendekati titik didih dari pelarut. Hal tersebut akan lebih efisien dengan mengalirkan uap pelarut melalui *chamber*. Kerugian dari ekstraksi dengan metode sokletasi ini adalah teknik senyawa yang bersifat termolabil dapat terdegradasi pada metode ini karena ekstrak yang di peroleh terus menerus berada pada titik didih.²⁸



Gambar 2.4 Seperangkat Alat Sokletasi.³⁰

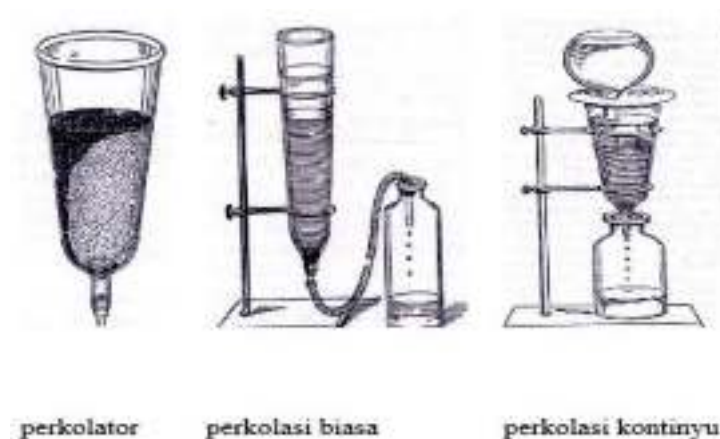
Keterangan gambar :

1. Kondensor
2. Tabung soklet
3. Selongsong
4. Selang
5. Statif

6. Labu didih dasar bulat
7. Minyak dan pelarut
8. Mantel pemanas

2.4.3. Perkolasi

Proses ekstraksi dengan menggunakan metode perkolasi merupakan proses ekstraksi dengan cara membasahi serbuk bahan alam pada sebuah perkolator secara perlahan, dimana pada proses ekstraksi ini pelarut akan ditambahkan pada bagian atas serbuk bahan alam dan dibiarkan menetes perlahan pada bagian bawah. Kelebihan dari pada metode perkolasi adalah sampel yang akan digunakan akan selalu dialiri oleh pelarut baru. Sedangkan kerugiannya adalah jika sampel yang berada dalam perkolator tidak homogen maka pelarut akan sulit menjangkau seluruh area sampel dan juga membutuhkan banyak pelarut serta memakan banyak waktu dalam proses ekstraksinya. Proses ekstraksi dengan menggunakan metode perkolasi umumnya dilakukan pada temperatur ruang, dengan parameter berhentinya pelarut ditambahkan adalah perkolat yang sudah tidak mengandung senyawa aktif lagi. Pengamatan hal tersebut dapat dilakukan secara fisik pada ekstraksi bahan alam dimana terlihat pada tetesan perkolat yang sudah tidak berwarna. Pada metode perkolasi, serbuk bahan alam yang digunakan dibasahi secara perlahan dalam sebuah perkolator (wadah silinder yang dilengkapi dengan kran pada bagian bawahnya). Kemudian diberikan pelarut pada bagian atas serbuk dan dibiarkan menetes perlahan sampai ke bagian bawah.³¹



Gambar 2.5 Alat Perkolasi

2.5. Uji Aktivitas Antimikroba

Uji aktivitas antimikroba secara umum dapat dilakukan dengan menggunakan beberapa metode yaitu, metode difusi, dilusi dan bioautografi. Uji aktivitas antimikroba tidak hanya digunakan dalam hal menentukan zona bening yang terbentuk dalam suatu cakram tetapi juga dapat menentukan konsentrasi minimum dari zat antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Dalam penelitian ini metode yang digunakan adalah metode difusi yang mempunyai prinsip kerja dan prosedur yang sederhana yaitu terdifusinya senyawa antimikroba ke dalam media padat yang dimana mikroba uji nya telah diinokulasikan. Dalam metode difusi pun ada 3 cara yang dapat digunakan diantaranya yaitu metode sumuran, metode cakram (*disc diffusion test*), dan metode parit.⁹ Pada penelitian ini digunakan 2 cara metode difusi yang berbeda yaitu metode sumuran dan *disc diffusion test* untuk melihat perbandingan diameter zona hambat dengan mekanisme yang berbeda terhadap bakteri uji.

2.5.1. Metode Difusi

1. Metode Sumuran

Terdifusinya senyawa antimikroba ke dalam suatu media padat yang di dalamnya terdapat mikroba uji yang telah diinokulasikan merupakan prinsip dari pengujian aktivitas antimikroba metode sumuran. Pembuatan lubang tegak lurus pada media agar padat yang telah diinokulasi dengan bakteri uji merupakan hal yang dilakukan dalam uji antibakteri dengan menggunakan metode sumuran.³²

Dalam metode ini jumlah lubang yang dibuat disesuaikan dengan tujuan dari penelitian, lalu kemudian lubang tersebut akan diisi dengan sampel yang akan diuji, kemudian dilakukan inkubasi. Pada metode sumuran ini pertumbuhan bakteri dapat diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan di sekeliling lubang yang sudah dibuat sebelumnya. Uji aktivitas antimikroba dengan menggunakan metode sumuran ini memiliki kelebihan berupa kemudahan dalam pengukuran luas zona hambat yang dibentuk oleh aktivitas bakteri yang tidak hanya dipermukaan atas media agar tetapi sampai ke bawah. Kesulitan dalam uji aktivitas antimikroba dengan menggunakan antimikroba ini berupa terdapatnya sisa-sisa agar pada suatu media yang digunakan dan kemungkinan media agar retak atau pecah saat lubang dibuat sehingga hal tersebut akan mengganggu proses peresapan bahan uji yang digunakan ke dalam media yang kemudian akan mempengaruhi diameter zona bening saat melakukan uji sensitivitas.⁹

2. Metode Difusi Cakram

Metode cakram atau *disc diffusion test* merupakan bagian dari metode difusi yang menggunakan kertas cakram sebagai media dalam uji aktivitas antimikroba yang nantinya akan direndam pada sampel uji selama kurang lebih 15 menit kemudian diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°. Hasil pengujian ini nantinya diukur secara manual dengan menggunakan jangka sorong ataupun penggaris dengan mengukur diameter zona bening yang terbentuk di sekeliling kertas cakram yang menunjukkan adanya respon penghambatan suatu bakteri oleh senyawa antimikroba dalam bahan yang telah diekstraksi.³³ Metode cakram atau *disc diffusion test* ini memiliki kelebihan dimana dapat dilakukan dengan lebih cepat pada penyiapan kertas cakram dan mudah dalam pengerjaannya tetapi kekurangan dari metode ini disebabkan jika kertas saring ditumpuk terlalu banyak maka penyerapan ekstraksi yang digunakan tidak maksimal yang akhirnya akan mempengaruhi ukuran dari diameter zona hambat yang dibentuk.⁹

Tabel 2.1 Kekuatan Daya Antimikroba dengan Diameter Zona Hambat

Ukuran Diameter yang Terbentuk	Kekuatan Daya
>20 mm	Kuat
16-20 mm	Sedang
10-15 mm	Lemah
<10 mm	Tidak Ada

3. Metode Parit

Metode difusi parit merupakan metode uji efek antimikroba yang hampir tidak berbeda dengan metode sumuran, dimana pada metode ini menggunakan parit pada sepanjang diameter media padat yang kemudian di inokulasikan dengan bakteri uji pada waktu dan suhu yang optimum, dan penilaiannya dapat dilihat dengan ada tidaknya zona hambat yang terbentuk di sekitar parit.⁹

2.5.2. Metode Dilusi

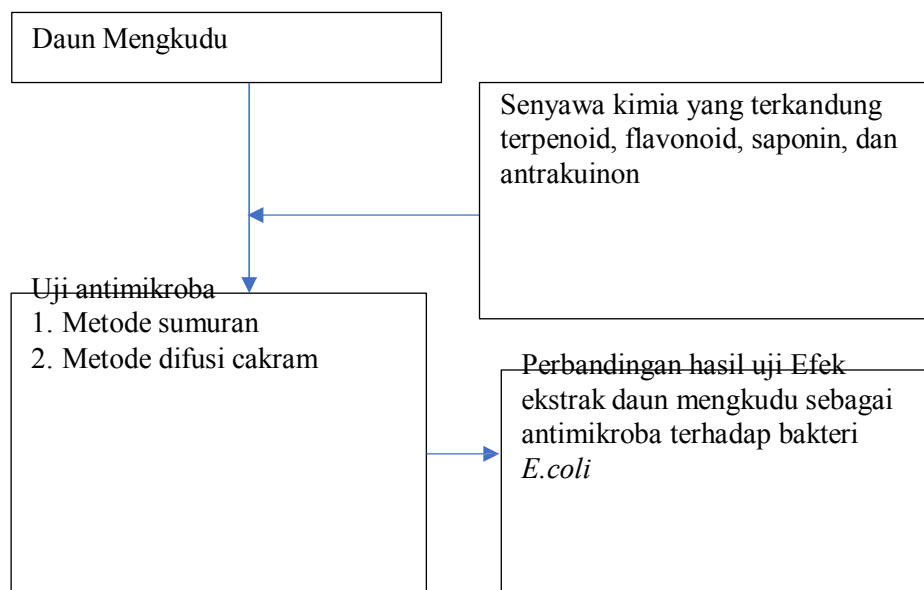
Dalam melihat potensi suatu senyawa terhadap aktivitas mikroba dengan menentukan Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM) dapat menggunakan suatu cara yaitu dengan metode dilusi. Prinsip pada metode dilusi adalah membuat seri pengenceran agen antimikroba pada medium cair yang sebelumnya telah ditambahkan dengan mikroba uji. Nilai KHM yang diperoleh ditentukan berdasarkan konsentrasi terendah yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri dengan hasil media nampak jernih, dimana proses pengerjaannya dengan membuat seri pengenceran ekstrak bahan yang akan digunakan pada medium cair yang kemudian juga ditambahkan dengan mikroba uji. Sedangkan dalam penentuan nilai KBM akan ditunjukkan dengan konsentrasi terendah ekstrak yang digunakan dengan tidak terdapat pertumbuhan koloni mikroba uji, dimana proses pengerjaannya dengan cara menginokulasikan sebuah mikroba uji pada media agar yang mengandung ekstrak bahan alam yang digunakan sebagai agen antimikroba.³⁴

Metode dilusi memiliki keuntungan dalam hal satu konsentrasi agen antimikroba yang diuji dapat digunakan dalam menguji beberapa agen mikroba uji dan senyawa antibakteri yang terkandung dalam suatu ekstraksi dapat dinilai secara kuantitatif dan kualitatif, tetapi kekurangan daripada metode uji ini adalah biaya yang digunakan lebih mahal dan lebih rumit pada proses pengerjaannya.³⁵

2.5.3. Bioautografi

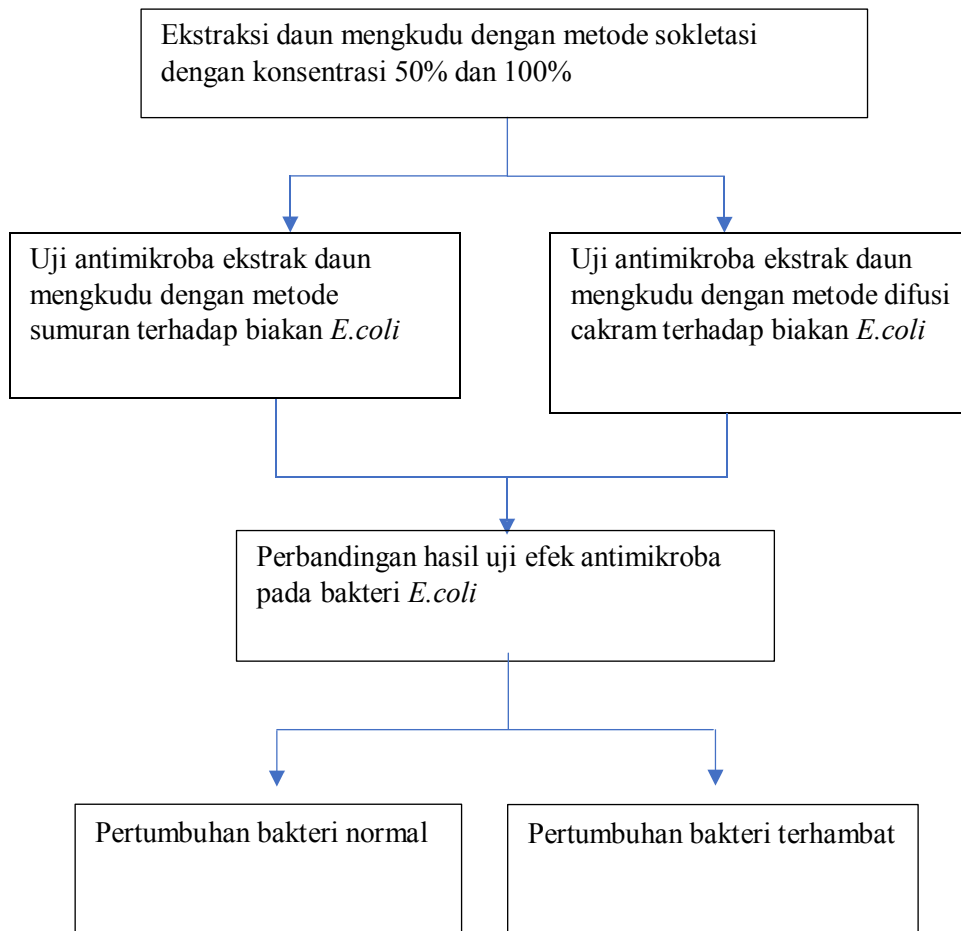
Bioautografi merupakan suatu metode uji aktivitas antimikroba yang bekerja dengan cara mendeteksi suatu senyawa antimikroba yang belum teridentifikasi dengan melokalisasi aktivitas antimikroba tersebut pada suatu kromatogram. Metode uji ini memanfaatkan pengertian kromatografi lapis tipis. Pengujian suatu aktivitas antimikroba dengan menggunakan metode bioautografi bertujuan untuk menilai senyawa yang dapat mempengaruhi pertumbuhan bakteri uji yang berada didalam matrik. Prinsip kerja dari metode bioautografi menggunakan metode difusi dan mempunyai keuntungan selain dalam hal pemisahan dan indentifikasi suatu senyawa yang bersifat antimikroba, juga dapat digunakan dalam mengetahui aktivitas biologis matrik yang kompleks secara langsung terlebih dalam keterkaitannya dalam menghambat suatu pertumbuhan bakteri.³⁶

2.6. Kerangka Teori



Gambar 2.6 Kerangka Teori

2.7. Kerangka Konsep



Gambar 2.7 Kerangka Konsep

BAB 3

METODOLOGI

3.1. Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang dilakukan di laboratorium dengan menguji perbandingan hasil uji efek antimikroba ekstrak daun mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) menggunakan metode sumuran dan metode difusi cakram pada pertumbuhan bakteri *E.coli*.

3.2. Tempat dan Waktu Penelitian

3.2.1. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada dua tempat yaitu Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Sumatera Utara untuk melakukan ekstraksi daun mengkudu dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas HKBP Nommensen untuk melakukan uji aktivitas antimikroba metode difusi cakram dan sumuran.

3.2.2. Waktu Penelitian

Ekstraksi daun mengkudu dilaksanakan pada tanggal 12 September 2022 dan selesai pada tanggal 4 Oktober 2022 dan uji efek antimikroba metode sumuran dan metode difusi cakram dilaksanakan pada tanggal 5 Oktober 2022 dan selesai pada tanggal 7 Oktober 2022.

3.3. Sampel, Estimasi Besar Sampel dan Bahan Uji

3.3.1 Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan ekstrak daun mengkudu dengan konsentrasi 50% dan 100%, daun mengkudu sebelumnya diidentifikasi pada Laboratorium Sistematika Tumbuhan Herbarium Medanense (MEDA) Universitas Sumatera Utara kemudian dilakukan proses ekstraksi untuk menghasilkan ekstrak kental etanol daun mengkudu.

3.3.2 Estimasi Besar Sampel

Jumlah sampel dari tiap kelompok perlakuan dihitung menggunakan rumus Federer. Dimana kelompok perlakuan terdiri dari 4 yaitu ekstrak daun mengkudu dengan konsentrasi 50% dan 100%, kontrol positif ciprofloxacin dan kontrol negatif dengan aquades.

Keterangan : t = jumlah kelompok perlakuan
 n = banyaknya pengulangan

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

$$(n-1) \times (4-1) \geq 15$$

$$(n-1) \times (3) \geq 15$$

$$3n-3 \geq 15$$

$$3n \geq 15 + 3$$

$$3n \geq 18$$

$$n \geq 6$$

Jadi pengulangan yang dilakukan pada penelitian ini sebanyak 6 kali.

3.3.3 Bahan Uji

Penelitian ini menggunakan bakteri *Escherichia coli*

3.4. Alat dan Bahan Penelitian

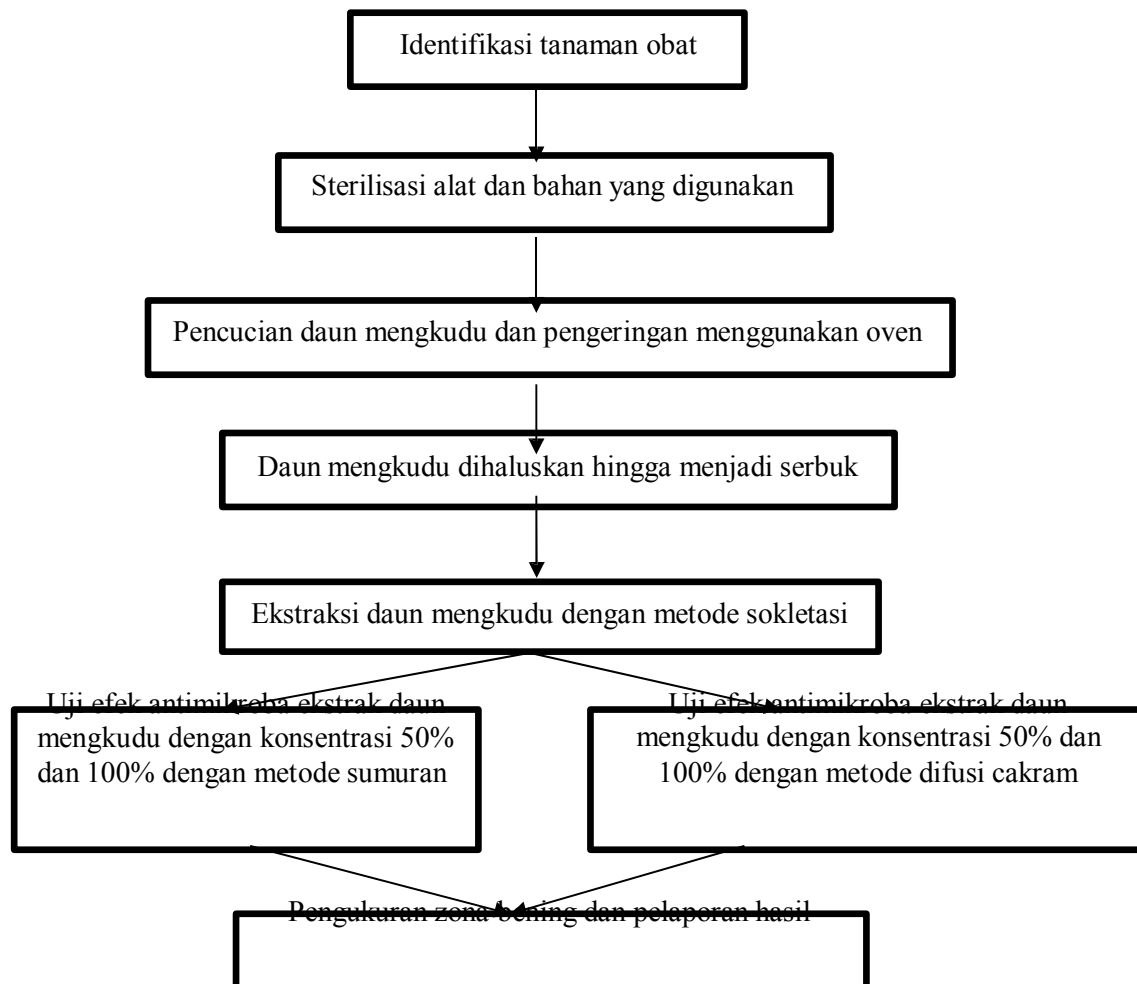
3.4.1 Alat

Oven (Memmert)
 Autoklaf
 Blender
 Ayakan (ukuran 40 mesh)
 Timbangan Elektrik (Ohaus)
 Seperangkat alat sokletasi
 Alat *rotary evaporator*
 Benang kasur dan gunting
 Kertas saring
 Spreader glass
 Cork borer
 Micropipet
 Kertas cakram
 Pinset steril
 Jangka sorong

3.4.2 Bahan Penelitian

Ekstrak daun mengkudu
 Bakteri *E.coli*
 Pelarut etanol 96%
 Aquades
 Media Mueller Hinton Agar (MHA)
 Antibiotik ciprofloxacin 10
 Kertas Cakram Kosong

3.5. Alur Penelitian



Gambar 2.8 Alur Penelitian

3.6. Prosedur Kerja

3.6.1 Identifikasi Tanaman Obat

Morfologi daun mengkudu adalah memiliki daun yang tunggal, berbentuk jorong lanset, berhadap-hadapan dengan panjang 15-50 cm dan lebar 5-17 cm. Daun mengkudu mempunyai pinggir yang rata, berurat menyirip, ujung yang lancip, tidak memiliki bulu dan panjang tangkainya yaitu 0,5-2,5 cm.

3.6.2 Sterilisasi Alat & Bahan yang Digunakan

Alat dan bahan yang digunakan akan disterilisasi terlebih dahulu menggunakan autoklaf dengan tekanan tinggi yaitu tekanan 2 atm dan suhu 121⁰C selama 15-30 menit.

3.6.3 Ekstraksi daun Mengkudu

Daun mengkudu yang telah dicuci bersih di bawah air mengalir ditiriskan kemudian dikeringkan dalam sebuah oven sampai kering dengan suhu 40-50⁰C. Setelah kering daun tersebut diblender lalu kemudian diayak sampai didapatkan serbuk dari daun mengkudu tadi.

Kemudian sebanyak 45 gram serbuk daun mengkudu yang telah dibuat akan dibungkus dengan kertas saring, diikat dengan benang, serta pelarut etanol 96% dimasukkan ke dalam labu bundar pada alat soklet yang sudah terpasang. Pembuatan ekstrak dengan metode sokletasi ini dilakukan hingga tetesan siklusnya tidak berwarna lagi pada suhu 70⁰C. Ekstraksi cair yang didapat selanjutnya akan dipekatan pada suhu 40⁰C dengan menggunakan *rotary evaporator* hingga akhirnya diperoleh ekstrak kental etanol. Setelah di dapatkan ekstrak yang kental kemudian ekstrak tersebut akan dibagi menjadi 2 konsentrasi yaitu konsentrasi 50% dan 100% dengan rumus :

$$\text{Konsentrasi (\%)} = \frac{\text{Volume ekstrak}}{\text{Volume ekstrak} + \text{Volume pelarut}} \times 100\%$$

Maka dari rumus konsentrasi larutan tersebut didapatkan:

- Pada konsentrasi 50% dilarutkan 50 ml ekstrak daun mengkudu pada 50 ml aquades.
- Pada konsentrasi 100% dilarutkan 100 ml ekstrak daun mengkudu pada 0 ml aquades.

3.6.4 Uji Efektivitas Antimikroba

3.6.4.1 Uji aktivitas antimikroba ekstrak daun mengkudu terhadap *Escherichia coli* dengan Metode Sumuran

Suspensi bakteri *Escherichia coli* yang telah disiapkan kemudian diinokulasikan pada media MHA sebanyak 1 ml, kemudian diratakan dengan *spreader glass* lalu didiamkan sampai kering. Kemudian dibuat sebanyak 4 sumuran dengan kedalaman 1 mm dan diameter 6 mm menggunakan *cork borer*. Pada sumuran akan dimasukkan ekstrak daun mengkudu dengan menggunakan micro pipet sebanyak 10 μ l yang telah dibuat dengan konsentrasi 50% dan 100%, kontrol negatif berupa aquadest dan kontrol positif berupa ciprofloxacin sebanyak 10 μ l yang selanjutnya akan dilakukan inkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Setelah 24 jam maka diamati zona bening di sekitar sumuran dan ukur dengan menggunakan jangka sorong, kemudian dihitung

menggunakan rumus $\frac{(D_v - D_h) + (D_c - D_h)}{2}$.^{37,38}

Keterangan : Dv = diameter vertikal

Dh = diameter horizontal

Dc = diameter sumuran

3.6.4.2 Uji aktivitas antimikroba ekstrak daun mengkudu terhadap *Escherichia coli* dengan Metode Difusi Cakram

Suspensi bakteri *Escherichia coli* yang telah disiapkan kemudian diinokulasikan pada media MHA sebanyak 1 ml, kemudian diratakan dengan *spreader glass* lalu didiamkan sampai kering. Kemudian kertas cakram yang telah disiapkan akan direndam dalam ekstrak daun mengkudu dengan konsentrasi 50 % dan 100% sebanyak 10 μ l selama 15 menit, kontrol negatif berupa aquadest dan kontrol positif berupa ciprofloxacin sebanyak 10 μ l dengan menggunakan micropipet lalu kemudian diletakan pada permukaan MHA dengan menggunakan pinset yang steril. Inkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰C. Setelah 24 jam maka amati zona bening disekitar kertas cakram tersebut dan ukur dengan menggunakan jangka sorong, kemudian dihitung menggunakan rumus

$$Z = \frac{D_v + D_h}{2} \quad 39,40$$

Keterangan : Dv = diameter vertikal

Dh = diameter horizontal

3.7. Identifikasi Variabel

Variabel Bebas

Ekstrak daun mengkudu dengan metode sokletasi

Variabel Terikat

Efek antimikroba pada bakteri *E.coli*

3.8. Definisi Operasional

Tabel 3.2 Definisi Operasional

No.	Variabel	Definisi Operasional	Alat ukur	Skala ukur	Hasil skala ukur
1.	Konsentrasi ekstrak daun mengkudu 50% dan 100%	Ekstrak daun mengkudu adalah daun mengkudu yang telah mengalami proses pemanasan dengan metode sokletasi, sehingga didapati cairan kental etanol.	Micropipet	Rasio	%
2.	Efek antimikroba pada bakteri <i>E.coli</i> dengan metode sumuran dan metode difusi cakram	Efek antimikroba merupakan keadaan dimana bakteri <i>E.coli</i> mengalami gangguan	Jangka sorong	Ordinal	Aktivitas tidak ada <10 mm Aktivitas lemah 10-15 mm

		pertumbuhan atau bahkan mematikan bakteri dengan cara menggangu metabolisme mikroba tersebut.			Aktivitas sedang 16- 20 mm Aktivitas kuat >20 mm
3.	Kontrol positif (ciprofloxacin)	Kontrol positif (ciprofloxacin) merupakan bahan pembanding dalam memastikan apakah sampel yang digunakan sudah tepat dan menimbulkan efek yang positif terhadap pertumbuhan bakteri <i>E.coli</i>	Jangka sorong	Ordinal	Resistent ≤ 15 mm Intermediate 16-20 mm Sensitive \geq 21 mm
4.	Kontrol negatif (aquades)	Kontrol negatif berupa aquades merupakan perlakuan yang	Jangka sorong	Ordinal	Aktivitas tidak ada <10 mm Aktivitas lemah 10-15 mm

digunakan	Aktivitas
untuk mengetahui pengaruh dari pemberian pelarut terhadap zona hambat yang terbentuk	sedang 16-20 mm Aktivitas kuat >20 mm

3.9. Analisa Data

Pada penelitian ini dilakukan analisa data menggunakan perangkat lunak yaitu *statistical product and service solutions* (SPSS), yang diawali dengan uji normalitas dan homogenitas untuk menilai apakah data terdistribusi normal dan homogen dan karena data tidak terdistribusi normal dan tidak homogen maka dilakukan alternatif penilaian dengan menggunakan uji non-parametik uji *Kruskal-Wallis*. Kemudian dilakukan uji T untuk melakukan perbandingan metode uji efek antimikroba yang lebih efektif dalam pertumbuhan bakteri *E.coli*.