

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Penyakit infeksi merupakan salah satu permasalahan kesehatan di masyarakat yang sulit diatasi secara tuntas. Penyakit infeksi banyak di derita oleh penduduk di negara berkembang, termasuk Indonesia. Penyakit infeksi dapat di tularkan dari satu orang ke orang lain atau dari hewan ke manusia dan dapat disebabkan oleh beberapa mikroorganisme seperti bakteri, virus, parasit, dan jamur. Beberapa bakteri penyebab masalah kesehatan seperti *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi* yang dapat menyebabkan penyakit diare.¹

Diare adalah buang air besar (defakasi) dengan tinja berbentuk cair/setengah cair yang dimana kandungan air tinja lebih banyak dari biasanya 200 gr/200 ml /24 jam.² Diare masih merupakan salah satu penyakit yang sampai saat ini menjadi masalah kesehatan utama dunia menurut World Health Organization (WHO) 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.³ Di negara Indonesia, diare merupakan masalah kesehatan masyarakat karena morbiditas dan mortalitasnya yang masih tinggi.⁴ Diare yang disebabkan oleh *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi* merupakan agen patogen kedua dan ketiga terbesar setelah Rotavirus. Tatalaksana diare yang paling utama adalah terapi cairan, selain itu pada diare sedang-berat yang disebabkan oleh infeksi bakteri, diperlukan pemberian antimikroba/antibiotik sesuai dengan jenis bakteri penyebabnya.⁵ Seiring berjalannya waktu, penggunaan antibiotik secara berlebihan dapat menimbulkan resiko seperti resistensi bakteri, retensi bahan toksik dan residu antibiotik. Hal ini memicu masyarakat untuk kembali ke alam (*back to nature*) dalam bidang penyediaan obat-obatan, berupa tumbuhan herbal karena tidak menimbulkan resiko seperti antibiotik.⁶

Tumbuhan herbal adalah tanaman obat yang dimanfaatkan untuk pengobatan tradisional terhadap penyakit. Sejak zaman dahulu, tumbuhan herbal ini berkhasiat. Pengobatan tradisional terhadap penyakit menggunakan tanaman yang berada di alam. Sampai sekarang, hal ini banyak diminati oleh masyarakat karena biasanya tanaman herbal dapat ditemukan dengan mudah di lingkungan sekitar.⁷ Salah satu tanaman herbal yang banyak digunakan adalah mengkudu.⁸ Daun mengkudu bermanfaat bagi masyarakat terutama dalam pengobatan penyakit yang disebabkan bakteri, karena dalam daun mengkudu mengandung senyawa antibakteri, yaitu terpenoid, flavonoid, saponin, dan antrakuinon.

Antibakteri adalah suatu senyawa yang digunakan untuk mengambat bakteri. Antibakteri biasanya terdapat dalam suatu organisme sebagai metabolit sekunder. Mekanisme senyawa antibakteri secara umum dilakukan dengan cara merusak dinding sel, mengubah permeabilitas membran, mengganggu sintesis protein, dan menghambat kerja enzim. Senyawa yang berperan dalam merusak dinding sel antara lain fenol, flavonoid, dan alkaloid.⁹ Pada penelitian yang dilakukan Kameswari perasan daun mengkudu (*Morinda citrifolia*) menunjukkan bahwa terdapat senyawa aktif seperti terpenoid, saponin, dan antrakuinon yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.¹⁰ Penelitian juga dilakukan oleh Devy membuktikan ekstrak etanol daun mengkudu mempunyai efek sebagai antimikroba terhadap *Salmonella typhi* dan *Escherichia coli*.¹¹

Berdasarkan uraian di atas, maka diperlukan pembuktian lebih lanjut tentang ekstrak daun mengkudu yang bermanfaat sebagai antimikroba melalui uji antimikroba dengan metode difusi cakram pada bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi*. Hal inilah yang melatarbelakangi peneliti untuk melakukan penelitian tentang perbedaan efek antimikroba ekstrak daun mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) dengan metode maserasi pada *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi* dengan metode difusi cakram.

1.2. Rumusan Masalah

Bagaimanakah perbedaan efek antimikroba daun mengkudu (*Morinda citrifolia L.*) dengan metode ekstraksi maserasi pada *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi* dengan metode difusi cakram.

1.3. Hipotesis

1.3.1. Hipotesis Nol (H₀)

Tidak terdapat perbedaan hasil uji efek antimikroba ekstrak daun mengkudu (*Morinda citrifolia L.*) pada bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi* dengan metode difusi cakram

1.3.2. Hipotesis Alternatif (H_a)

Terdapat perbedaan hasil uji efek antimikroba ekstrak daun mengkudu pada bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi* dengan metode difusi cakram

1.4. Tujuan Penelitian

1.4.1. Tujuan Umum

Untuk mengetahui perbedaan efek antimikroba daun mengkudu (*Morinda citrifolia L.*) pada *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi* dengan metode difusi cakram

1.4.2. Tujuan Khusus

1. Untuk mengetahui zona hambat yang terbentuk dari ekstraksi daun mengkudu yang mempunyai sifat antimikroba pada *Escherichia coli* dengan difusi cakram
2. Untuk mengetahui zona hambat yang terbentuk dari ekstraksi daun mengkudu yang mempunyai sifat antimikroba pada *Salmonella typhi* dengan difusi cakram

1.5. Manfaat Penelitian

1. Bagi Masyarakat

Hasil penelitian ini diharapkan memberikan informasi tambahan kepada masyarakat tentang manfaat dari daun mengkudu sebagai pengobatan alternatif diare yang disebabkan oleh bakteri pada *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi*.

2. 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.

3. Bagi Institusi

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

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tanaman Obat Tradisional

Tanaman obat merupakan tanaman yang berkhasiat menghilangkan rasa sakit, meningkatkan daya tahan tubuh, membunuh bibit penyakit dan memperbaiki organ yang rusak seperti ginjal, jantung dan paru-paru. Tanaman obat tradisional terbagi atas: jamu, obat herbal terstandar, dan fitofarmaka.¹² Jamu adalah obat tradisional yang disediakan secara tradisional, misalnya dalam bentuk serbuk seduhan atau cairan yang berisi seluruh bahan tanaman yang menjadi penyusun jamu tersebut serta digunakan secara tradisional. Pada umumnya, jamu ini dibuat dengan mengacu pada resep peninggalan leluhur yang disusun dari berbagai tanaman obat yang jumlahnya cukup banyak, berkisar antara 5 – 10 macam bahkan lebih.¹²

Obat Herbal Terstandar (OHT) adalah obat tradisional yang berasal dari ekstrak bahan tumbuhan, hewan maupun mineral. Perlu dilakukan uji praklinik untuk pembuktian ilmiah mengenai standar kandungan bahan yang berkhasiat, standar pembuatan ekstrak tanaman obat, standar pembuatan obat yang higienis dan uji toksisitas akut maupun kronis.¹²

Fitofarmaka adalah sediaan obat bahan alam yang telah dibuktikan keamanan dan khasiatnya secara ilmiah dengan uji praklinik dan uji klinik, bahan baku dan produk jadinya telah di standarisasi. Pada dasarnya sediaan fitofarmaka mirip dengan sediaan jamu-jamuan karena juga berasal dari bahan-bahan alami, meskipun demikian jenis sediaan obat ini masih belum begitu populer di kalangan masyarakat, dibandingkan jamu-jamuan dan herbal terstandar. Khasiat dan penggunaan fitofarmaka dapat lebih dipercaya dan efektif daripada sediaan jamu-jamuan biasa, karena telah memiliki dasar ilmiah yang jelas, dengan kata lain fitofarmaka menurut ilmu pengobatan merupakan sediaan jamu-jamuan yang telah tersentuh oleh ilmu pengetahuan dan teknologi modern salah satunya adalah Mengkudu (*Morinda citrifolia*).

Mengkudu (*Morinda citrifolia*) merupakan tanaman yang banyak digunakan oleh masyarakat sebagai obat tradisional untuk berbagai macam penyakit. Beberapa penelitian melaporkan tentang khasiat mengkudu antara lain sebagai efek kemoterapi, anti depresan, aktivitas hepatoprotektif, antioksidan, antidislipidemia, antimikroba, efek immunomodulator. Aktivitas tersebut diperkirakan salah satunya karena adanya aktivitas antioksidan dalam mengkudu dengan kandungan flavonoid dan senyawa fenolik.^{8,12}

2.1.1. Daun Mengkudu

Mengkudu atau pace (*Morinda citrifolia L.*) merupakan salah satu tanaman obat yang dalam beberapa tahun terakhir banyak peminatnya. Mengkudu merupakan tanaman tropis dan liar, mengkudu dapat tumbuh di tepi pantai hingga ketinggian 1500 m dpl (di atas permukaan laut), baik di lahan subur maupun marginal.¹³



Gambar 2.1 Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia L.*).¹⁴

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Sub divisi	: Angiosperma
Kelas	: Dicotyledone
Sub kelas	: Sympetalae
Bangsa	: Rubiales
Suku	: Rubiaceae
Genus	: Morinda

Bentuk daun secara umum adalah hampir bulat, bulat panjang sampai jorong, warna daun hijau mengkilap, permukaan daun bergelombang agak kasar. Pangkal daun berbentuk runcing-tumpul dan ujung daun runcing.¹³ Mengkudu memiliki berbagai senyawa seperti xeronine, steroid tanaman, alizarin, lisin, sodium, asam kaprilik, arginine, proxeronine, dan magnesium. Zat terpenoid yang terkandung di dalamnya dapat membantu proses sintesis organik dan pemulihan sel-sel tubuh. Daun mengkudu bermanfaat bagi masyarakat terutama dalam pengobatan penyakit yang disebabkan bakteri seperti diare, karena dalam daun mengkudu terkandung senyawa antibakteri yaitu terpenoid, flavonoid, saponin, dan antrakuinon.¹⁰

2.2. Ekstraksi

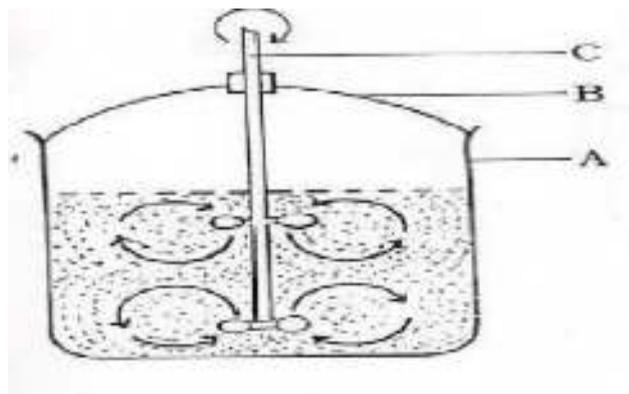
Ekstrak merupakan sediaan sari pekat tumbuh-tumbuhan atau hewan yang diperoleh dengan cara melepaskan zat aktif dari masing-masing bahan obat.¹⁵ Ekstraksi adalah pemisahan bahan dari campurannya menggunakan pelarut yang sesuai.¹⁶ Ekstraksi mempunyai beberapa metode dalam pengolahannya tergantung pada sifat serta senyawa yang akan digunakan. Teknik ekstraksi senyawa aktif bahan alam yang sering digunakan adalah maserasi, sokletasi, perkolasi, Refluks, ultrasonik dan Pressurized Solvent Extraction.

1. Maserasi

Maserasi berasal dari bahasa latin "*Macerace*" berarti mengairi dan melunakkan.¹⁵ Maserasi yaitu metode ekstraksi dengan proses perendaman bahan dengan pelarut yang sesuai dengan senyawa aktif yang akan diambil dengan pemanasan rendah atau tanpa adanya proses pemanasan. Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisa dalam cairan penyari. Cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif, zat aktif akan larut karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dengan larutan yang diluar sel, maka larutan yang terpekat didesak keluar.

Peristiwa tersebut berulang sehingga terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel.

Ekstraksi metode maserasi memiliki kelebihan dimana maserasi merupakan cara sederhana dan paling banyak digunakan, peralatannya mudah digunakan, pengerjaan maserasi sederhana, dan terjaminnya zat aktif yang diekstrak tidak akan rusak. Dimana pada saat proses perendaman bahan akan terjadi pemecahan dinding sel dan membran sel yang diakibatkan oleh perbedaan tekanan antara luar sel dengan bagian dalam sel sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan pecah dan terlarut pada pelarut organik yang digunakan dan juga prosedur dan peralatan yang digunakan sederhana.^{17,18} Lama maserasi memengaruhi kualitas ekstrak yang akan diteliti. Lama maserasi pada umumnya adalah 4-10 hari. Maserasi akan lebih efektif jika dilakukan proses pengadukan secara berkala karena keadaan diam selama maserasi menyebabkan turunnya perpindahan bahan aktif. Melalui usaha ini diperoleh suatu keseimbangan konsentrasi bahan ekstraktif yang lebih cepat masuk ke dalam cairan pengeksrak.¹⁵



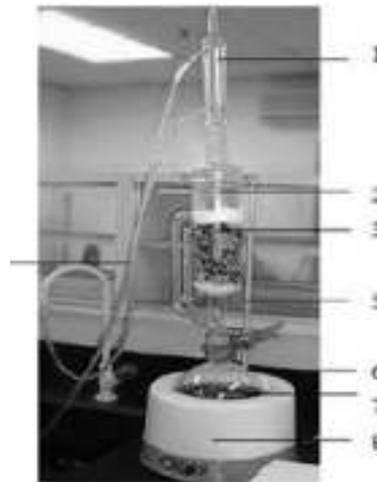
- A. Bejana untuk meletakkan simplisia
- B. Tutup
- C. Pengaduk yang digerakan secara mekanik

Gambar 2.2 Alat Maserasi

2. Sokletasi

Sokletasi adalah suatu metode atau proses pemisah suatu komponen yang terdapat dalam zat padat dengan cara penyaringan berulang-ulang dengan menggunakan pelarut tertentu, sehingga semua komponen yang diinginkan akan terisolasi. Metode ini dilakukan dengan menempatkan serbuk sampel dalam sarung selulosa (dapat digunakan kertas saring) dalam klonsong yang ditempatkan di atas labu dan kondensor. Pelarut yang sesuai dimasukkan ke dalam labu dan suhu diatur di bawah suhu reflux. Dengan cara pemanasan, sehingga uap yang timbul setelah dingin secara kontinyu akan membahasi sampel, secara teratur pelarut tersebut dimasukkan kembali ke dalam labu dengan membawa senyawa kimia yang akan diisolasi tersebut. Pelarut yang telah membawa senyawa kimia pada labu distilasi yang diuapkan dengan rotary evaporator sehingga pelarut tersebut dapat diangkat lagi bila suatu campuran organik berbentuk cair atau padat ditemui pada suatu zat padat, maka dapat diekstrak dengan menggunakan pelarut yang diinginkan.¹⁹

Keunggulan metode ini antara lain: dapat digunakan untuk sampel dengan tekstur yang lunak dan tidak tahan terhadap pemanasan secara langsung. Digunakan pelarut yang lebih sedikit, pemanasannya dapat diatur. Sedangkan kelemahan metode ini antara lain: tidak cocok untuk senyawa-senyawa yang tidak stabil terhadap panas, contoh : beta karoten. Cara mengetahui ekstrak telah sempurna atau saat sokletasi harus dihentikan, dimana pelarutnya sudah bening atau tidak berwarna lagi, jika pelarut bening, maka diuji dengan meneteskan setetes pelarut pada kaca arloji dan biarkan menguap. Bila tidak ada lagi bercak noda, berarti sokletasi telah selesai. Untuk mengetahui senyawa hasil penyarian (kandungannya), dapat dilakukan dengan tes identifikasi dengan menggunakan beberapa pereaksi.¹⁵



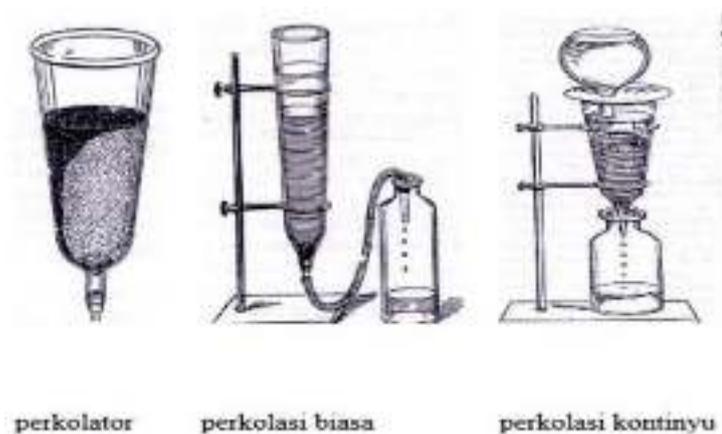
- | | |
|-----------------------|---------------------------|
| 1. Kondesor | 2. Tabung soklet |
| 3. Selongsong | 4. Selang |
| 5. Statif | 6. Labu didih dasar bulat |
| 7. Minyak dan pelarut | 8. Mantel pemanas |

Gambar 2.3 Seperangkat Alat Sokletasi

3. Perkolasi

Perkolasi berasal dari bahasa latin yaitu “*per*” yang artinya melalui dan colare yang artinya merembes. Perkolasi adalah penyarian dengan mengalirkan cairan penyari melalui serbuk simplisia yang telah dibasahi. Alat yang digunakan untuk mengekstraksi disebut perkulator, dengan ekstrak yang telah dikumpulkan disebut perkolat. Pada metode perkolasi, serbuk simplisia dibasahi secara perlahan dalam sebuah perkulator (wadah silinder yang dilengkapi dengan kran pada bagian bawahnya). Kemudian berikan pelarut pada bagian atas serbuk dan biarkan menetes perlahan sampai ke bagian bawah. Keuntungan dari adanya aliran cairan penyari menyebabkan adanya pergantian larutan dan ruang di antara butir-butir serbuk simplisia membentuk saluran kapiler tempat mengalir cairan penyari. Kedua hal ini meningkatkan derajat perbedaan konsentrasi yang memungkinkan proses penyarian lebih sempurna.

Serbuk simplisia yang akan diperkolasi tidak langsung dimasukkan ke dalam bejana perkolator, tetapi dibasahi dan dimaserasi terlebih dahulu dengan cairan penyari. Hal ini dimaksudkan untuk memberikan kesempatan sebesar-besarnya kepada cairan penyari memasuki seluruh pori-pori dalam simplisia sehingga mempermudah penyarian selanjutnya.¹⁵ Sedangkan kerugiannya adalah jika sampel dalam perkolator tidak homogen maka pelarut akan sulit menjangkau seluruh area. Selain itu, metode ini juga membutuhkan banyak pelarut dan memakan banyak waktu.¹⁹

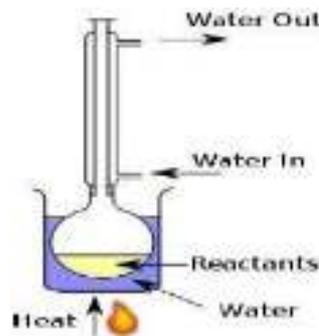


Gambar 2.4 Alat Perkolasi.

4. Refluks

Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Umumnya dilakukan pengulangan proses pada residu pertama sampai 3-5 kali sehingga dapat termasuk proses ekstraksi sempurna. Dilakukan dengan menggunakan alat destilasi, dengan merendam simplisia dengan pelarut / solven dan memanaskannya hingga suhu tertentu. Pelarut yang menguap sebagian akan mengembang kembali kemudian masuk ke dalam campuran simplisia kembali, dan sebagian ada yang menguap. Keunggulan dari metode ini antara lain: digunakan untuk mengekstraksi sampel-sampel

yang mempunyai tekstur kasar, digunakan untuk mengekstraksi sampel – sampel yang tahan pemanasan langsung. Kelemahan dari metode ini antara lain: membutuhkan volume total pelarut yang besar, sejumlah manipulasi dari operator.¹⁵



Gambar 2.5 Alat Refluks

5. Ultrasonik

Ini adalah jenis dari metode maserasi yang dimodifikasi dimana ekstraksi difasilitasi dengan menggunakan ultrasound. Ekstrak ditempatkan dalam botol. Vial ditempatkan dalam penangas ultrasonik, dan USG digunakan untuk menginduksi mekanik pada sel melalui produksi kavitasasi dalam sampel. Kerusakan seluler meningkat pelarutan metabolit dalam ekstraksi pelarut dan meningkatkan hasil. Efisiensi ekstraksi tergantung pada frekuensi instrumen, dan panjang dan suhu sonikasi. Ultrasonication jarang diterapkan untuk ekstraksi skala besar; itu adalah sebagian besar digunakan untuk awal ekstraksi dari sejumlah kecil bahan. Hal ini umumnya diterapkan untuk memfasilitasi ekstraksi metabolit intraseluler dari kultur sel tanaman. Penggunaan ultrasonik pada dasarnya menggunakan prinsip dasar yaitu dengan mengamati sifat akustik gelombang ultrasonik yang dirambatkan melalui medium yang dilewati. Pada saat gelombang merambat, medium yang dilewatinya akan mengalami getaran. Getaran akan memberikan pengadukan yang intensif

terhadap proses ekstraksi. Pengadukan akan meningkatkan osmosis antara bahan dengan pelarut sehingga akan meningkatkan proses ekstraksi.

Keuntungan metode ekstraksi dengan bantuan ultrasonic: mempercepat waktu ekstraksi, lebih efisien dalam penggunaan pelarut, tidak ada kemungkinan pelarut yang digunakan dalam ekstraksi menguap sampai kering. Berbeda halnya apabila menggunakan hot plate, terutama apabila menggunakan sedikit pelarut dalam proses peleburan atau pelarutan, aman digunakan karena prosesnya tidak mengakibatkan perubahan yang signifikan pada struktur kimia, partikel, dan senyawa-senyawa bahan yang digunakan, meningkatkan ekstraksi lipid dan protein dari biji tanaman, seperti kedelai (misalnya tepung kedelai atau yg dihilangkan lemak) atau bibit minyak lainnya. Kekurangan dari metode ekstraksi dengan bantuan ultrasonic: membutuhkan biaya yang tidak sedikit, karena relatif mahal.¹⁵



Gambar 2.6 Alat Ultrasonik

6. Pressurized Solvent Extraction

Bertekanan ekstraksi pelarut, juga disebut "dipercepat ekstraksi pelarut" metode ini menggunakan suhu yang lebih tinggi daripada yang digunakan dalam metode ekstraksi lain, dan membutuhkan tekanan tinggi untuk cepat dan direproduksi ekstraksi awal dari sejumlah sampel. Mempertahankan pelarut dalam keadaan cair pada suhu tinggi. Hal ini

paling cocok untuk bahan tanaman yang dimuat ke dalam sel ekstraksi, yang ditempatkan di sebuah oven. Pelarut kemudian dipompa dari reservoir untuk mengisi sel, yang dipanaskan dan bertekanan pada tingkat diprogram untuk jangka waktu. Sel memerah dengan gas nitrogen, dan ekstrak, yang otomatis disaring, dikumpulkan dalam termos. Pelarut segar digunakan untuk mencampur sel dan untuk melarutkan komponen yang tersisa. Sebuah pembersihan akhir dengan nitrogen gas dilakukan untuk mengeringkan.

Suhu tinggi dan tekanan meningkatkan penetrasi pelarut ke dalam bahan dan meningkatkan metabolit solubilisasi, meningkatkan kecepatan ekstraksi dan hasil. Bahkan dengan persyaratan pelarut rendah, bertekanan ekstraksi pelarut lebih alternatif ekonomis dan ramah lingkungan dengan pendekatan konvensional. Sebagai bahan dikeringkan secara menyeluruh setelah ekstraksi adalah untuk melakukan ekstraksi diulangi dengan pelarut yang sama atau berturut-turut ekstraksi dengan pelarut meningkatkan polaritas.¹⁵



Gambar 2.7 Pressurized Solvent Extraction

2.3. Uji Efek 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 disebut dengan metode difusi

yang mempunyai prinsip kerja dan prosedur yang sederhana yaitu terdifusinya senyawa antimikroba ke dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Dalam penelitian ini metode yang digunakan 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 silinder. Pada penelitian ini digunakan metode difusi cakram (*disc diffusion test*) untuk melihat perbandingan diameter zona hambat terhadap bakteri uji.

1. Metode Difusi (Cakram)

Metode difusi cakram merupakan metode yang menggunakan kertas cakram sebagai media dalam uji aktivitas antimikroba yang masa inkubasinya selama 24 jam dengan suhu 37°C, dimana hasil pengujian ini nantinya diukur dengan cara 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. Metode cakram atau (*disc diffusion test*) ini memiliki kelebihan dimana dapat dilakukan dengan lebih cepat pada penyiapan kertas cakram.^{20,21}

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. Nilai KHM yang diperoleh ditentukan berdasarkan konsentrasi terendah yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri dengan hasil media nampak jernih.²²

3. Bioautografi

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.²³

2.4. Bakteri *Escherichia coli*

Escherichia coli merupakan bakteri gram negatif berbentuk batang pendek yang memiliki panjang sekitar 2 μm , diameter 0,7 μm , lebar 0,4–0,7 μm dan bersifat anaerob. *Escherichia coli* membentuk koloni yang bundar, cembung, dan halus dengan tepi yang nyata. *Escherichia coli* menjadi patogen jika jumlah bakteri dalam saluran pencernaan meningkat atau berada di luar usus. *Escherichia coli* menghasilkan enterotoksin yang menyebabkan beberapa kasus diare. Bakteri ini merupakan bakteri komensal, patogen intestinal dan patogen ekstra intestinal yang dapat menyebabkan infeksi saluran kemih, meningitis dan septicemia. Penyakit yang ditimbulkan oleh *Escherichia coli* disebabkan karena kemampuannya untuk beradaptasi dan bertahan pada lingkungan yang berbeda.

Kingdom : *Protista* Filum

: *Protophyta* Kelas :

Schyzomycutes

Ordo : *Enterobacteriales*

Family : *Enterobacteriaceae*

Genus : *Escherichia*

Species : *Escherichia coli*



Gambar 2.8.Bakteri *Escherichia coli* pada pewarnaan gram.²⁴

Ada beberapa jenis kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan bagi *Escherichia coli* untuk dapat tetap bertahan, misalnya lingkungan asam (pH rendah) seperti pada saluran pencernaan manusia, perubahan suhu, serta tekanan osmotik. Kemampuan *Escherichia coli* untuk bertahan hidup selama pendinginan dan pembekuan telah terbukti menjadikan *Escherichia coli* toleran terhadap kondisi kering. *Escherichia coli* dapat hidup dan bertahan pada tingkat keasaman yang tinggi di dalam tubuh manusia. *Escherichia coli* juga dapat hidup dan bertahan di luar tubuh manusia yang penyebarannya melalui feses. Kedua habitat hidup *Escherichia coli* ini cukup berlawanan. Saluran pencernaan manusia merupakan habitat yang relatif stabil, hangat, bersifat anaerob, dan kaya nutrisi. Sementara itu, di luar saluran pencernaan, kondisi lingkungan dapat sangat beragam, jauh lebih dingin, aerobik, serta kandungan nutrisi yang lebih sedikit. *Escherichia coli* memiliki waktu generasi sekitar 30 sampai 87 menit bergantung pada suhu. Waktu generasi merupakan waktu yang dibutuhkan bagi sel *Escherichia coli* untuk membelah diri menjadi dua kali lipat. Suhu optimum bagi pertumbuhan *Escherichia coli* adalah 37°C dengan waktu generasi tersingkat, yaitu selama 30 menit.²⁵

Escherichia coli dapat menimbulkan suatu gejala penyakit bila mampu masuk ke tubuh inangnya dan mampu beradaptasi serta bertahan di dalam tubuh manusia, kemudian menyerang sistem imun dan akhirnya menimbulkan penyakit. Mekanisme patogenesis ini dilakukan melalui beberapa tahapan seperti bakteri patogen lainnya. Tahapan tersebut adalah kolonisasi pada titik tertentu di bagian sel permukaan usus (sel mukosa), pembelahan sel, perusakan sel usus, melintasi sel usus dan memasuki aliran darah, penambatan ke organ target dan akhirnya menyebabkan kerusakan organ.²⁶

Keberadaan bakteri ini sering dikaitkan dengan dengan adanya kontaminasi yang berasal dari kotoran (feses), karena *Escherichia coli* pada umumnya adalah bakteri yang hidup pada usus manusia (maupun hewan) sehingga keberadaan bakteri tersebut pada air atau pangan menunjukkan adanya proses pengolahan yang mengalami kontak dengan kotoran.

Escherichia coli merupakan etiologi utama penyebab diare, pada beberapa kasus dapat meimbulkan gejala *haemolytic uraemik syndrome* (HUS) yang dapat mengakibatkan gagal ginjal, *hemorrhagic colitis* (HC), dan keracunan makanan. Angka kejadian diare secara nasional di Indonesia masih tergolong tinggi yaitu 6,8% dari jumlah penduduk Indonesia. Sedangkan angka kejadian diare di Sumatera Utara menurut diagnosis tenaga kesehatan mencapai 14,2% Riskesdas .²⁷

2.5. Bakteri *Salmonella typhi*

Bakteri ini merupakan bakteri gram negatif batang, tidak membentuk spora, motil, berkapsul dan berflagella (bergerak dengan rambut getar). Bakteri ini dapat hidup pada pH 6-8 pada suhu 15-41 C (suhu optimal 37 °C). Bakteri ini dapat mati dengan pemanasan 54,4°C selama satu jam dan suhu selama 15 – 20 menit, pasteurisasi, pendidihan dan khlorinisasi. Terjadinya penularan *Salmonella typhi* pada manusia yaitu secara jalur fekal-oral. Sebagian besar akibat kontaminasi makanan atau minuman yang tercemar. Bakteri ini tersusun atas dinding sel dan isi sel. Di sebelah luar dinding sel terdapat selubung atau kapsul. Di dalam sel bakteri tidak terdapat membrane dalam (endomembran) dan organel bermembran seperti kloroplas dan mitkondria. Struktur tubuh bakteri dari lapisan luar hingga bagian dalam sel yaitu flagela, dinding sel, membrane sel, mesosom, lembaran fotosintetik, sitoplasma, DNA, plasmid, ribosom, dan endospore.

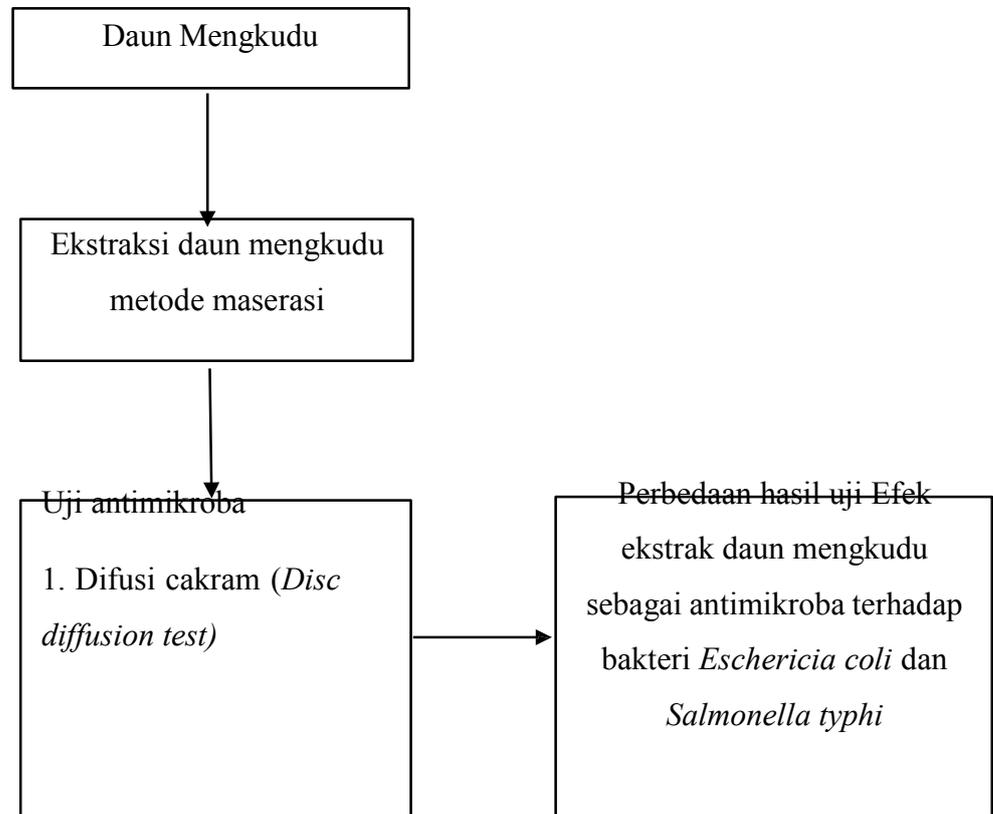


Gambar 2.9 Bakteri *Salmonella typhi* pada pewarnaan gram.²⁸

Superkingdom	: <i>Bacteria</i>
Phylum	: <i>Proteobacteria</i>
Kelas	: <i>Gammaprotobacteria</i>
Ordo	: <i>Enterobacteriales</i>
Famili	: <i>Enterobacteriaceae</i>
Genus	: <i>Salmonella</i>
Spesies	: <i>Salmonella typhi</i>

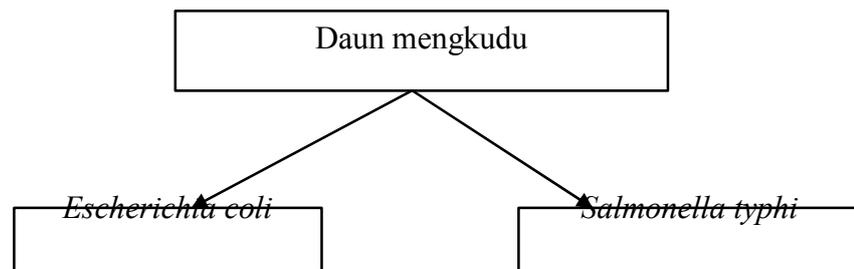
Salmonella typhi adalah salah satu penyebab diare terbesar setelah *Escherichia coli*. Diare yang disebabkan *Salmonella typhi* adalah diare invasif dengan karakteristik demam panjang, nyeri perut, dan manifestasi sistemik lainnya seperti delirium atau sakit kepala.²⁹ Patogenesis *Salmonella typhi* bersifat invasive yakni menyerang bagian epithelium dari ileum. *Salmonella typhi* menghasilkan enterotoksin yang menyebabkan diare berair. Bila selaput lendir menjadi rusak diare yang terjadi disertai darah. Transmisi kuman terjadi secara meatborne, yaitu melalui makanan yang berasal dari hewan seperti daging, unggas, telur, susu; tetapi dapat pula terjadi secara waterborne. *Salmonella typhi* mampu bertahan hidup selama beberapa bulan sampai setahun jika melekat dalam tinja, mentega, susu, dan keju.³⁰

2.6. Kerangka Teori



Gambar 2.10 Kerangka Teori

2.7. Kerangka Konsep



Gambar 2.11 Kerangka konsep

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1. Desain Penelitian

Jenis penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental yang dilakukan di laboratorium dengan menguji perbandingan efek antimikroba ekstrak daun mengkudu dengan metode ekstraksi maserasi terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi* dengan metode difusi cakram.

3.2. Tempat dan Waktu Penelitian

3.2.1. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di dua tempat, untuk ekstraksi daun mengkudu dilakukan di Fakultas Farmasi Laboratorium Fitokimia Universitas Sumatera Utara (USU) pintu tiga lokasi ini berada di Jalan Tri Dharma, Padang Bulan, Kec. Medan Baru, Kota Medan, Sumatera Utara 20155 pada bulan oktober awal dan untuk pengujian bakteri dilakukan di Laboratorium Fakultas Kedokteran Universitas HKBP Nommensen Medan dilantai tiga (III), Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Penelitian. Lokasi ini berada di Jalan Sutomo No.4A, Perintis, Kecamatan Medan Timur, Kota Medan, Sumatera Utara 20235.

3.2.2. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Mei 2022- Desember 2022.

3.3. Sampel dan Cara Pemilihan Sampel

3.3.1. Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan bakteri *Escherichia coli* dan bakteri *Salmonella typhi* yang didapatkan dari laboratorium Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara yang dibiakkan pada media MacConkey.

3.3.2. Estimasi Besar Sampel

Jumlah sampel dari tiap kelompok perlakuan dihitung menggunakan rumus Federer. kelompok perlakuan terdiri dari 3 yaitu ekstrak daun mengkudu metode maserasi konsentrasi 100%, kontrol positif ciprofloxacin dan kontrol negatif dengan aquades.

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

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

$$(n-1) \times (2) \geq 15$$

$$2n-2 \geq 15$$

$$2n \geq 15 + 2$$

$$2n \geq 17$$

$$n \geq 8.5$$

$$n \geq 9$$

Jadi pengulangan yang dilakukan pada penelitian ini sebanyak 9 kali.

Keterangan :

t = jumlah kelompok perlakuan

n = banyaknya pengulangan

3.4. Alat dan Bahan penelitian

3.4.1. Alat

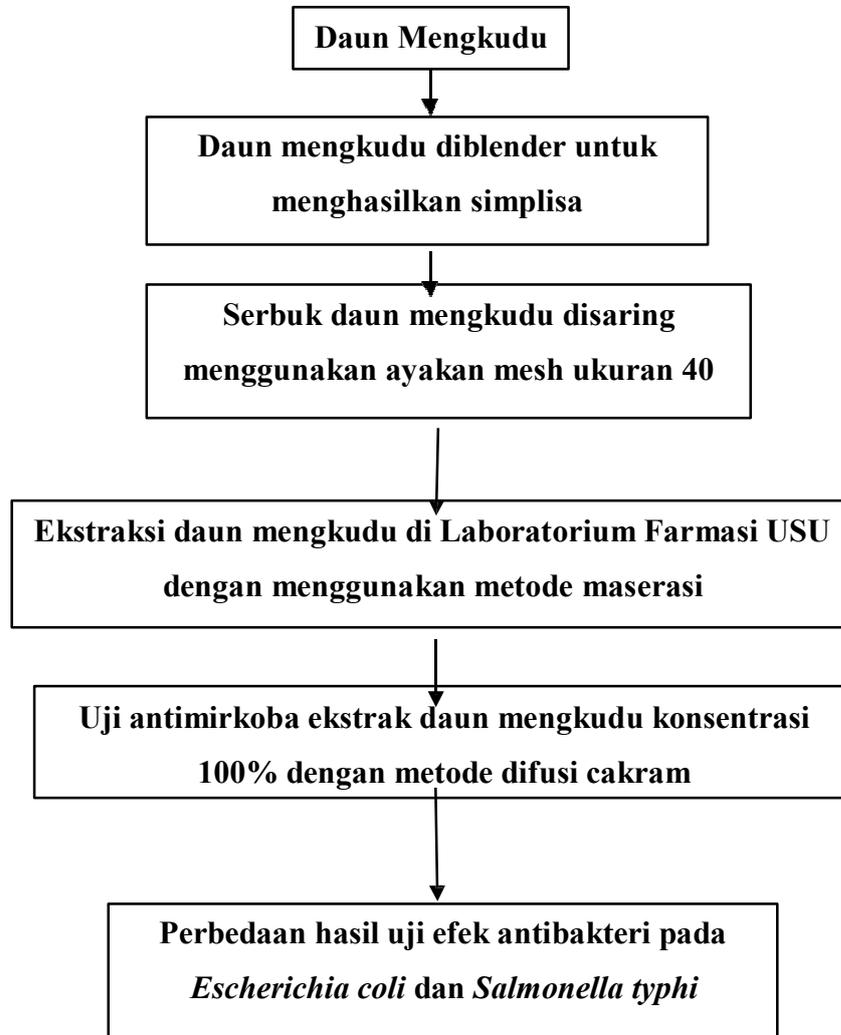
- | | |
|--|--------------------------------------|
| a) Timbangan analitik | k) Kertas saring Whatman No. 1 |
| b) Pisau | l) Corong |
| c) Aluminium foil | m) Kertas label |
| d) Tisu | n) Oven (Memert), |
| e) Blender | o) Inkubator (Incucell) |
| f) Ayakan 60 mesh (Retsch), | p) Pipet volume |
| g) Erlenmeyer 100 ml, 50 ml
(Pyrex) | q) Pipet tetes |
| h) Botol maserasi 500 ml | r) Beaker glass |
| i) Gelas ukur (Pyrex) | s) Rotary evaporator vacuum
(IKA) |
| j) Kertas saring kasar | t) Tabung reaksi (Pyrex) |

3.4.2. Bahan Penelitian

- a) Daun mengkudu
- b) Bakteri *Escherichia coli*
- c) Bakteri *Salmonella typhi*
- d) Antibiotik ciprofloxacin
- e) Aquades
- f) Etanol 96%
- g) Media Mueller-Hinton Agar

3.5. Prosedur Kerja

3.5.1. Alur Penelitian



Gambar 3.1 Alur Penelitian

3.5.2. Sterilisasi Alat & Bahan yang Digunakan

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

3.5.3. Identifikasi Tanaman Obat

Morfologi daun mengkudu 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.

3.5.4. Ekstraksi daun Mengkudu Metode Maserasi

Seratus gram serbuk simplisa daun mengkudu dimasukan ke dalam bejana maserasi kemudian ditambahkan etanol 70-96% dan ditutup rapat serta terhindar dari cahaya matahari yang akan direndam selama 3 hari dan diaduk sesekali, disaring dan dipisahkan ampas dengan imfiltratnya (Maserat 1). Selanjutnya ampas dimaserasi kembali dengan selama 1 hari (Maserat 2). Maserat 1 & 2 dipekatkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 40°C.¹⁸

3.5.5. Pembuatan Suspensi bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi*

Bakteri yang telah diinokulasi diambil dengan ose steril lalu disuspensikan kedalam tabung yang berisi 2 ml larutan NaCl 0,9% hingga di peroleh kekeruhan yang sama dengan standar kekeruhan larutan Mc. Farland. Perlakuan yang sama dilakukan pada setiap jenis bakteri uji.

3.6. Uji *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi* dengan metode Difusi Cakram

Suspensi bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi* yang telah disiapkan kemudian diinokulasikan pada media Mueller Hinton Agar (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 100% selama 15 menit,

kontrol negatif berupa aquadest dan kontrol positif berupa ciprofloxacin 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.³¹

Rumus:

$$d = \frac{A+B}{2}$$

Keterangan:

d = diameter zona hambat

A = diameter vertikal

B = diameter horizontal

3.7. Identifikasi Variabel

3.7.1. Variabel bebas

Ekstrak daun mengkudu

3.7.2. Variabel terikat

Efek antimikroba terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi*.

3.8. Definisi Operasional

Tabel 3.1. Definisi Operasional

No.	Variabel	Definisi operasional	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
1	Ekstrak daun mengkudu	Adalah daun yang telah mengalami proses pemanasan dengan metode maserasi sehingga didapatkan cairan kental etanol.	mikropipet	Konsentrasi 100%	Rasio
2	Efek antibakteri pada bakteri <i>Escherichia coli</i> dan <i>salmonella typhi</i>	Zona hambat pertumbuhan bakteri pada medium MHA.	Jangka sorong	Aktivitas lemah <5 mm. Aktivitas sedang 6-10 mm. Aktivitas kuat >11-20 mm. sangat kuat >21 mm.	Kategorik
3	Kontrol Positif	Kontrol positif adalah kelompok perlakuan yang dapat memberikan efek perubahan pada pertumbuhan	Jangka sorong	Resistance ≤ 15 mm. Intermediate 16 - 20 mm. Sensitive > 21 mm.	kategorik

		<p>bakteri yang ditandai dengan terbentuknya zona bening yang bertujuan untuk memastikan eksperimen yang dilakukan sudah tepat dan menghasilkan efek positif pada pertumbuhan bakteri. Kontrol positif yang digunakan dalam penelitian ini adalah antibiotik ciprofloaxacin.</p>			
4	Kontrol Negatif	<p>Kontrol negatif adalah kelompok perlakuan yang tidak memberikan efek pada pertumbuhan bakteri dengan tujuan untuk mengetahui apakah pelarut yang digunakan memiliki efek antibakteri. Kontrol</p>	Jangka sorong	<p>Aktivitas lemah <5 mm Aktivitas sedang 6-10 mm Aktivitas kuat >11-20 mm Aktivitas sangat kuat >21 mm</p>	katégorik

negatif yang
digunakan dalam
penelitian ini
adalah aquades.

3.9. Analisis Perbedaan Hasil Uji Antibakteri Daun Mengkudu

Tabel 3.2. Kekuatan Daya Antibakteri dengan Diameter Zona Hambat.

Ukuran Diameter yang Terbentuk	Kekuatan Daya
≥ 5 mm	Lemah
6 - 10 mm	Sedang
11 - 20 mm	Kuat
≥ 21 mm	Sangat kuat

Kategori Daya Hambat Ciprofloaxacin Menurut The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) dengan Diameter Zona Hambat.

Ukuran Diameter yang Terbentuk	Kekuatan Daya
≤ 15	Resistance
16 - 20	Intermediate
≥ 21	Sensitive

3.10. Analisa Data

Penelitian ini menggunakan analisa data menggunakan perangkat lunak yaitu *statistical product and service solutions* (SPSS), yang diawali dengan uji normalitas untuk menilai apakah data yang saya dapatkan terdistribusi dengan normal atau tidak, kemudian dilanjutkan penilaian homogenitas dengan uji homogenitas untuk menilai apakah varian data yang saya dapatkan homogen atau tidak, karena data tidak normal dan tidak homogen maka dilanjutkan dengan uji *Kruskal-Wallis*.