

**POTENSI ANTIBAKTERI EKSTRAK DAUN JERUK PURUT
(*Citrus hystrix*) TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI
Shigella dysenteriae SECARA IN VITRO**

SKRIPSI

Oleh:

IRA RESMI MELANI

NIM. 16910045



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2020**

**POTENSI ANTIBAKTERI EKSTRAK DAUN JERUK PURUT
(*Citrus hystrix*) TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI
Shigella dysenteriae SECARA IN VITRO**

SKRIPSI

**Diajukan kepada:
Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan
Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam Memperoleh
Gelar Sarjana Kedokteran (S.Ked)**

**Oleh:
IRA RESMI MELANI
NIM. 16910045**

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2020**

**POTENSI ANTIBAKTERI EKSTRAK DAUN JERUK PURUT
(*Citrus hystrix*) TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI
Shigella dysenteriae SECARA IN VITRO**

SKRIPSI

Oleh:

IRA RESMI MELANI

NIM. 16910045

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji:
Tanggal: 20 Mei 2020

Pembimbing I,

dr. Prida Ayudianti, Sp. KK
NIDT. 19830524201701012117

Pembimbing II,

dr. Lailia Nur Rachma, M. Biomed
NIP. 198406232011012009

Mengetahui,
Ketua Program Studi Pendidikan Dokter

dr. Nurlaili Susanti, M. Biomed
NIP. 198310242011012007

**POTENSI ANTIBAKTERI EKSTRAK DAUN JERUK PURUT
(*Citrus hystrix*) TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI
Shigella dysenteriae SECARA IN VITRO**

SKRIPSI

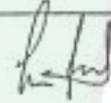
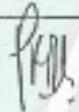
oleh:

IRA RESMI MELANI

NIM. 16910045

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran (S. Ked)

Tanggal: 20 Mei 2020

| | | |
|--------------------|--|---|
| Penguji Utama | <u>dr. Alvi Milliana, M. Biomed</u> NIP. 198204042011012011 |  |
| Ketua Penguji | <u>dr. Lailia Nur Rachma, M. Biomed</u> NIP. 198406232011012009 | |
| Sekretaris Penguji | <u>dr. Prida Ayudianti, Sp. KK</u> NIDT. 19830524201701012117 |  |
| Penguji Integrasi | <u>drg. Anik Listiyana, M. Biomed</u> NIP. 198008052009122001 |  |

Mengetahui,
Ketua Program Studi Pendidikan Dokter

dr. Nurlaili Susanti, M. Biomed
NIP. 198310242011012007

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Ira Resmi Melani

NIM : 16910045

Program Studi : Pendidikan Dokter

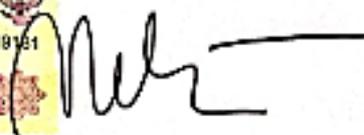
Fakultas : Kedokteran dan Ilmu Kesehatan

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 20 Mei 2020

Yang membuat pernyataan,




Ira Resmi Melani
NIM. 16910045

KATA PENGANTAR

Assalamualaikum Wr. Wb

Syukur alhamdulillah penulis haturkan kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan Rahmat dan Hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan studi di Fakultas Kedokteran dan Ilmu-ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang sekaligus menyelesaikan skripsi ini dengan baik.

Selanjutnya penulis haturkan ucapan terima kasih seiring do'a dan harapan jazakumullah ahsanal jaza' kepada semua pihak yang telah membantu terselesaikannya skripsi ini. Ucapan terima kasih ini penulis sampaikan kepada :

1. Prof. Dr. H. Abd. Haris, M.Ag selaku rektor UIN Maulana Malik Ibrahim Malang, yang telah banyak memberikan pengetahuan dan pengalaman yang berharga.
2. Prof. Dr. dr. Bambang Pardjianto, Sp. B, Sp. BP, RE (K) dilanjutkan oleh Prof. Dr. dr. Yuyun Yueniwati Prabowawati Wadjib, M. Kes, Sp. Rad (K) selaku Dekan Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. dr. Nurlaili Susanti, M. Biomed, selaku ketua Program Studi Pendidikan FKIK UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. dr. Prida Ayudianti, Sp. KK selaku dosen pembimbing pertama yang telah banyak memberikan pengarahan dan pengalaman yang berharga.
5. dr. Lailia Nur Rachma, M. Biomed selaku dosen pembimbing kedua yang telah banyak memberikan pengarahan dan pengalaman yang berharga.

6. Segenap civitas akademika Program Studi Pendidikan Dokter, terutama seluruh dosen, terimakasih atas segenap ilmu dan bimbingannya.
7. Bapak atau Ibu laboran mikrobiologi FKIK UIN Malang yang telah memberikan bantuan dalam penelitian ini.
8. Orang tua yang telah memberikan dukungan fisik atau psikologis yang tidak terbatas.
9. Saudara kandung Rosalia Valentin Margareta dan Ella Resmi Melinda yang selalu menemani di setiap langkah penelitian ini.
10. Teman-teman Neonatus dan sahabat yang sudah menyediakan tenaga dalam membantu penelitian ini.
11. Semua pihak yang ikut membantu dalam menyelesaikan skripsi ini baik materiil maupun moril.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini masih terdapat kekurangan dan penulis berharap semoga skripsi ini bisa memberikan manfaat kepada para pembaca khusus bagi penulis secara pribadi. *Amin Ya Rabbal Alamin.*
Wassalamualaikum Wr. Wb.

Malang, 20 Mei 2020

Penulis

DAFTAR ISI

| | |
|--|-------------|
| HALAMAN JUDUL | i |
| HALAMAN PERSETUJUAN | iii |
| HALAMAN PENGESAHAN | iv |
| HALAMAN PERNYATAAN | v |
| KATA PENGANTAR | vi |
| DAFTAR ISI | viii |
| DAFTAR GAMBAR | xii |
| DAFTAR TABEL | xiii |
| DAFTAR GRAFIK | xiv |
| ABSTRAK | xv |
| | |
| BAB I PENDAHULUAN | |
| 1.1 Latar Belakang | 1 |
| 1.2 Rumusan Masalah | 5 |
| 1.3 Tujuan Penelitian | 5 |
| 1.4 Manfaat Penelitian | 6 |
| | |
| BAB II TINJAUAN PUSTAKA | |
| 2.1 Daun Jeruk Purut (<i>Citrus hystrix</i>) | 7 |
| 2.1.1 Taksonomi dan Morfologi | 7 |
| 2.1.2 Manfaat | 9 |
| 2.1.3 Fitokimia | 11 |
| 2.1.4 Mekanisme Antibakteri | 18 |
| 2.2 Bakteri <i>Shigella dysenteriae</i> | 20 |
| 2.2.1 Morfologi dan Taksonomi | 20 |
| 2.2.2 Sifat Biakan | 21 |
| 2.2.3 Identifikasi Bakteri | 22 |
| 2.2.4 Struktur Antigen | 24 |
| 2.2.5 Struktur Sel Bakteri | 26 |
| 2.2.6 Faktor Virulensi | 30 |

| | |
|--|----|
| 2.2.7 Patogenesis <i>Shigella sp.</i> | 37 |
| 2.2.8 Mekanisme Resistensi Bakteri..... | 39 |
| 2.3 Disentri Basiler..... | 40 |
| 2.3.1 Definisi | 40 |
| 2.3.2 Epidemiologi | 30 |
| 2.3.3 Faktor Risiko | 41 |
| 2.3.4 Etiologi | 43 |
| 2.3.5 Patofisiologi..... | 43 |
| 2.3.6 Manifestasi Klinis..... | 44 |
| 2.3.7 Pemeriksaan Penunjang | 45 |
| 2.3.8 Tatalaksana | 47 |
| 2.3.9 Komplikasi..... | 50 |
| 2.3.10 Pencegahan | 51 |
| 2.4 Metode Ekstraksi..... | 51 |
| 2.4.1 Pelarut Ekstraksi | 51 |
| 2.4.2 Ultrasound – Assisted Extraction (UAE) | 52 |
| 2.5 Metode Uji Antimikroba | 54 |
| 2.6.1 Metode Difusi Cakram | 54 |
| 2.6.2 Metode Dilusi | 55 |
| 2.6.3 Metode Difusi Sumuran..... | 56 |
| BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS | |
| 3.1 Kerangka Konsep Penelitian..... | 57 |
| 3.2 Deskripsi Kerangka Konsep | 57 |
| 3.2 Hipotesis Penelitian..... | 58 |
| BAB IV METODE PENELITIAN | |
| 4.1 Desain Penelitian..... | 59 |
| 4.2 Tempat dan Waktu Penelitian | 59 |
| 4.3 Sampel Penelitian..... | 59 |
| 4.3.1 Sampel Bakteri..... | 59 |
| 4.3.2 Sampel Daun Jeruk Purut (<i>Citrus hystrix</i>)..... | 60 |

| | |
|---|----|
| 4.4 Bahan dan Alat yang Digunakan | 60 |
| 4.5 Definisi Operasional..... | 62 |
| 4.6 Prosedur Penelitian..... | 64 |
| 4.6.1 Sterilisasi Alat | 64 |
| 4.6.2 Pembuatan Ekstrak Daun Jeruk Purut (<i>Citrus hystrix</i>) | 65 |
| 4.6.3 Pengenceran | 66 |
| 4.6.4 Pembuatan Medium | 67 |
| 4.6.5 Peremajaan Biakan Bakteri | 68 |
| 4.6.6 Suspensi Bakteri <i>Shigella dysenteriae</i> | 68 |
| 4.6.7 Pembuatan Larutan Ciprofloxacin..... | 68 |
| 4.6.8 Uji Identifikasi Bakteri | 69 |
| 4.6.9 Estimasi Jumlah Pengulangan | 70 |
| 4.6.10 Pengujian Antibakteri | 71 |
| 4.7 Analisis Data | 74 |
| 4.8 Alur Penelitian | 76 |
| BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN | |
| 5.1 Hasil Penelitian | 77 |
| 5.1.1 Identifikasi Bakteri <i>Shigella dysenteriae</i> | 77 |
| 5.1.2 Hasil Ekstraksi Daun Jeruk Purut (<i>Citrus hystrix</i>) | 78 |
| 5.1.3 Pengaruh Ekstrak Daun Jeruk Purut (<i>Citrus hystrix</i>) terhadap Zona Hambat Pertumbuhan Bakteri <i>Shigella dysenteriae</i> | 79 |
| 5.1.4 Pengaruh Ekstrak Daun Jeruk Purut (<i>Citrus hystrix</i>) terhadap KHM Pertumbuhan Bakteri <i>Shigella dysenteriae</i> | 82 |
| 5.1.5 Pengaruh Ekstrak Daun Jeruk Purut (<i>Citrus hystrix</i>) terhadap KHM Pertumbuhan Bakteri <i>Shigella dysenteriae</i> | 86 |
| 5.2 Pembahasan..... | 89 |
| 5.2.1 Identifikasi Bakteri <i>Shigella dysenteriae</i> | 89 |
| 5.2.2 Pengaruh Ekstrak Daun Jeruk Purut (<i>Citrus hystrix</i>) terhadap Zona Hambat Pertumbuhan Bakteri <i>Shigella dysenteriae</i> | 91 |
| 5.1.3 Pengaruh Ekstrak Daun Jeruk Purut (<i>Citrus hystrix</i>) terhadap KHM Pertumbuhan Bakteri <i>Shigella dysenteriae</i> | 99 |

| | |
|---|-----|
| 5.1.4 Pengaruh Ekstrak Daun Jeruk Purut (<i>Citrus hystrix</i>) terhadap KHM Pertumbuhan Bakteri <i>Shigella dysenteriae</i> | 103 |
| 5.3 Integrasi Islam | 106 |
| BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN | |
| 6.1 Kesimpulan | 111 |
| 6.2 Saran..... | 111 |
| DAFTAR PUSTAKA | 113 |
| LAMPIRAN | 128 |



DAFTAR GAMBAR

| | |
|---|----|
| Gambar 2.1 Morfologi Daun Jeruk Purut (<i>Citrus hystrix</i>)..... | 9 |
| Gambar 2.2 Bentuk Kimia Flavonoid | 15 |
| Gambar 2.3 Bentuk Kimiawi Minyak Atsiri..... | 16 |
| Gambar 2.4 Bentuk Kimiawi Alkaloid | 17 |
| Gambar 2.5. Bentuk Kimiawi Tanin | 18 |
| Gambar 2.6 Hasil Uji Biokimiawi <i>Shigella sp.</i> | 24 |
| Gambar 2.7 Patogenesis <i>Shigella sp</i> | 38 |
| Gambar 4.1 Alur Hubungan Antar Variabel | 42 |
| Gambar 5.1 Identifikasi <i>Shigella dysenteriae</i> | 77 |
| Gambar 5.2 Hasil Ekstraksi Daun Jeruk Purut..... | 78 |
| Gambar 5.3 Pengamatan zona hambat pertumbuhan <i>Shigella dysenteriae</i> | 79 |
| Gambar 5.4 Pengamatan KHM pada metode Dilusi Tabung..... | 84 |
| Gambar 5.5 Pengamatan KHM pada Metode Difusi Sumuran..... | 84 |
| Gambar 5.6 Pengamatan KBM Pertumbuhan Bakteri <i>Shigella dysenteriae</i> | 87 |

DAFTAR TABEL

| | |
|--|----|
| Tabel 2.1 Analisis Fitokimia Daun Jeruk Purut (<i>Citrus hystrix</i>) | 12 |
| Tabel 2.2 Spesies <i>Shigella sp.</i> yang Patogen | 21 |
| Tabel 2.3 Hasil Uji Biokimiawi Spesies <i>Shigella sp.</i> | 24 |
| Tabel 2.4 Antibiotik untuk Disentri Basiler | 48 |
| Tabel 4.1 Definisi Operasional | 63 |
| Tabel 4.2 Pengenceran Konsentrasi | 66 |
| Tabel 5.1 Hasil Uji Biokimia Bakteri <i>Shigella dysentriae</i> | 78 |
| Tabel 5.2 Rata-Rata Diameter Zona Hambat Ekstrak Daun Jeruk Purut (<i>Citrus hystrix</i>) terhadap Bakteri <i>Shigella dysenteriae</i> | 80 |
| Tabel 5.3 Rata-Rata Konsentrasi Hambat Minimal Pertumbuhan <i>Shigella dysenteriae</i> | 84 |
| Tabel 5.4 Rata-Rata Konsentrasi Bunuh Minimal Pertumbuhan <i>Shigella dysenteriae</i> | 87 |

DAFTAR GRAFIK

| | |
|---|----|
| Grafik 5.1 Hasil Analisis <i>Mann Whitney</i> pada perbedaan pengaruh pemberian antibakteri ekstrak daun jeruk purut (<i>Citrus hystrix</i>) terhadap zona hambat pertumbuhan <i>Shigella dysenteriae</i> | 82 |
| Grafik 5.2 Hasil Analisis <i>Mann Whitney</i> pada perbedaan pengaruh pemberian ekstrak daun jeruk purut (<i>Citrus hystrix</i>) sebagai antibakteri terhadap KHM pertumbuhan <i>Shigella dysenteriae</i> | 86 |
| Grafik 5.3 Hasil Analisis <i>Mann Whitney</i> pada perbedaan pengaruh pemberian ekstrak daun jeruk purut (<i>Citrus hystrix</i>) sebagai antibakteri terhadap KBM pertumbuhan <i>Shigella dysenteriae</i> | 89 |



ABSTRAK

Melani, Ira Resmi. 2020. POTENSI ANTIBAKTERI EKSTRAK DAUN JERUK PURUT (*Citrus hystrix*) TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI *Shigella dysenteriae* SECARA IN VITRO. Skripsi. Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing: (I) dr. Prida Ayudianti, Sp. KK (II) dr. Lailia Nur Rachma, M. Biomed

Kata Kunci: Bakteri *Shigella dysenteriae*, Ekstrak Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix*), Diameter Zona Hambat, Konsentrasi Hambat Minimum (KHM), Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM)

Shigella dysenteriae merupakan salah satu bakteri patogen penyebab penyakit disentri basiler yang menyerang sel-sel epitel usus dan menimbulkan gejala seperti diare cair berdarah atau berlendir, nyeri perut dan demam. Angka kejadian disentri basiler yang disebabkan oleh *Shigella dysenteriae* sebesar 165 juta kasus tiap tahun di dunia dan menyumbang mortalitas sebanyak 29% pada kelompok umur satu sampai empat tahun di Indonesia. Resistensi *Shigella dysenteriae* terhadap antibiotik telah banyak di laporkan seperti ampicilin, kotrimoksazol, dan asam nalidiksat. Resistensi tersebut membuat pengobatan disentri basiler lebih sulit sehingga diperlukan untuk mengembangkan pengobatan herbal. Salah satu tanaman herbal adalah daun jeruk purut (*Citrus hystrix*). Daun jeruk purut merupakan tanaman yang sering dijumpai di Indonesia dan memiliki senyawa antibakteri seperti flavonoid, alkaloid, saponin, minyak atsiri dan tanin.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) terhadap pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae*. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan menggunakan metode difusi kertas cakram, difusi sumuran dan dilusi tabung. Ekstraksi dilakukan dengan metode *Ultrasound – Assisted Solvent Extraction* menggunakan pelarut etanol 96%. Konsentrasi yang diuji pada bakteri *Shigella dysenteriae* dengan menggunakan ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) sebesar 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, dan 5%. Data yang didapat berupa diameter zona hambat, KHM dan KBM dianalisis dengan *Kruskall wallis*.

Berdasarkan hasil uji *Kruskall wallis* menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0,00 ($\alpha < 0,05$) yang berarti terdapat pengaruh aktivitas antibakteri ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) secara signifikan pada bakteri *Shigella dysenteriae*. Konsentrasi 30% ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) merupakan konsentrasi terbaik dalam membentuk zona hambat yakni sebesar 9,75 mm. Kadar Hambat Minimum (KHM) *Shigella dysenteriae* pada konsentrasi terendah yaitu 5%, sedangkan pada Kadar Bunuh Minimum (KBM) pada konsentrasi 20%. Kesimpulan dari penelitian ini adalah ekstrak daun jeruk purut memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Shigella dysenteriae*.

ABSTRACT

Melani, Ira Resmi. 2020. ANTIBACTERIAL POTENTION OF KAFFIR LIME LEAF EXTRACT (*Citrus hystrix*) ON *Shigella dysenteriae* IN VITRO. Thesis. Medical Departement, Medical and Health Sciences Faculty, The Islamic State University Maulana Malik Ibrahim Malang. Advisor: (I) dr. Prida Ayudianti, Sp. KK (II) dr. Lailia Nur Rachma, M. Biomed

Keywords: Shigella dysenteriae, Citrus hystrix extract, Inhibitory Capability, Minimum inhibitory Concentration (MIC), Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

Shigella dysenteriae is a pathogenic bacteria that causes bacillary dysentery which attacks intestinal epithelial cells and causes symptoms such as bloody or slimy liquid diarrhea, abdominal pain and fever. The incidence of bacillary dysentery caused by *Shigella dysenteriae* is 165 million cases every year in worldwide and accounts for 29% mortality in the age group of one to four years in Indonesia. *Shigella dysenteriae* resistance to antibiotics has been widely reported as ampicillin, cotrimoxazole, and nalidixic acid. This resistance makes treatment of the bacillary dysentery more difficult so it is necessary to develop herbal medicine. One of the herbal plants is kaffir lime leaf (*Citrus hystrix*). Kaffir lime leaf is a plant that are often found in Indonesia and have antibacterial compounds such as flavonoids, alkaloids, saponins, astiri oils and tannins.

The purpose of this study was to determine the antibacterial activity of kaffir lime leaf extracts (*Citrus hystrix*) on the growth of *Shigella dysenteriae*. This research is an experimental laboratory study using paper disc diffusion methods, well diffusion and tube dilution. Extraction was carried out by the *Ultrasound - Assisted Solvent Extraction* method using 96% ethanol solvent. The concentrations tested on *Shigella dysenteriae* bacteria using extracts of kaffir lime leaves (*Citrus hystrix*) were 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, and 5%. The data obtained in the form of *Inhibitory Capability*, MIC and MBC were analyzed with kruskall wallis.

Based on the results of the Kruskal wallis test showed a significant value of 0.00 ($\alpha < 0.05$) which means there is a significant influence of the antibacterial activity of kaffir lime leaf extract (*Citrus hystrix*) on *Shigella dysenteriae*. The 30% concentration of kaffir lime leaf extract (*Citrus hystrix*) is the best concentration in forming the inhibition zone which is 9,75 mm. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of *Shigella dysenteriae* at the lowest concentration of 5%, while at the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) at a concentration of 20%. The conclusion of this study is the extract of kaffir lime leaves (*Citrus hystrix*) have antibacterial activity against *Shigella dysenteriae*.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Diare merupakan salah satu penyakit infeksi yang menjadi penyebab utama morbiditas dan mortalitas di negara berkembang termasuk Indonesia. Di Indonesia, diperkirakan setiap anak pernah mengalami episode serangan diare rata-rata 3 kali per tahun dan lebih dari 80% mortalitas terjadi pada anak berusia kurang dari 2 tahun (Ragil *et al.*, 2017). Diare merupakan penyakit endemis di Indonesia yang ditandai dengan konsistensi tinja lembek atau cair dan frekuensi buang air besar tiga kali atau lebih dalam sehari (Dinas Kesehatan Jawa Timur, 2016). Salah satu jenis diare yang sering terjadi pada anak adalah disentri basiller (Williams, 2016).

Disentri basiller merupakan penyakit infeksi akut yang menyerang sel-sel epitel usus dan mampu menyebabkan komplikasi serius pada penderita jika tidak ditangani dengan benar (Williams, 2016). Gejala pada disentri basiler meliputi demam, muntah, nyeri kolik pada perut dan diare cair berdarah atau berlendir (Baker *et al.*, 2019). Penyebab tersering disentri basiller adalah bakteri *Shigella sp.* (Liu *et al.*, 2016). Salah satu jenis bakteri *Shigella sp.* yang paling patogen adalah *Shigella dysenteriae* (Williams, 2016). *Shigella dysenteriae* merupakan bakteri yang mampu hidup pada kondisi asam di lambung dan menghasilkan toksin enterovase yang menyebabkan sel-sel usus usus menjadi rusak sehingga menimbulkan gejala diare berdarah pada penderita (Aslam, 2019).

Insiden disentri basiler sebanyak 180 juta per tahun dengan mortalitas sebanyak 1 juta kasus per tahun di dunia (Aslam, 2019). Pada negara berkembang,

disentri basiller telah diperkirakan menyebabkan mortalitas sebesar 34.000 kasus pada anak berusia kurang dari lima tahun (Sachin *et al.*, 2018). Hal ini disebabkan oleh kepadatan penduduk dan sanitasi buruk sehingga memudahkan penularan penyakit (Williams, 2016). Di Indonesia, disentri basiler menyumbang angka morbiditas sebesar 20% dari tahun 2013 hingga 2018 yang terjadi pada kelompok umur satu sampai lima tahun (Kemenkes, 2018).

Indonesia mengalami kejadian luar biasa (KLB) diare pada tahun 2010 hingga 2017 sebanyak 21 kali yang tersebar di beberapa kabupaten atau kota dengan jumlah penderita sekitar 1.725 orang dan jumlah kematian 34 orang (*case fatality rate* 1,97%). Dari hasil rekapitulasi Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, menunjukkan *case fatality rate* (CFR) diare >1%. Padahal, pemerintah Indonesia mentaksirkan CFR <1% (Kemenkes, 2017). Pada tahun 2016, kasus diare di kota Malang mencapai 13.770 kasus, sedangkan kasus diare di Surabaya ditemukan mencapai 60.627 (Dinas Kesehatan Jawa Timur, 2016).

Berdasarkan prevalensi tersebut, maka disentri basiler pada anak berusia dibawah 5 tahun merupakan masalah yang serius karena gejala yang cukup dan komplikasi dapat menyebabkan kematian (Rahmawati, 2018). Komplikasi yang mampu menyebabkan kematian pada anak meliputi dehidrasi, kejang, hiponatremi, *toxic megacolon* dan sindrom hemolitik uremik (Sulistiyawati, 2016).

Menurut *Global Enteric Multicentre Study* (GEMS), kasus disentri basiler harus segera diobati dengan antibiotik tepat agar tidak berakibat fatal (Williams, 2016). Penggunaan antibiotik mampu mengurangi risiko serius komplikasi dan kematian, mempersingkat durasi gejala, dan mempercepat eliminasi *Shigella dysenteriae* (Williams, 2016). Menurut Hussen (2019), masalah resistensi

antibiotik sering terjadi di dunia, bahkan terdapat strain *Shigella dysenteriae* yang resisten terhadap beberapa antibiotik seperti ampisilin, tetrasiklin, kotrimoksazol dan asam nalidiksat. Resistensi tersebut membuat eradikasi *Shigella sp.* menjadi lebih sulit. Penyebab terjadinya resistensi antibiotik dikarenakan penggunaan antibiotik yang tidak tepat, sehingga perlu dilakukan upaya pencegahan agar tidak terjadi resistensi bakteri terhadap antibiotik (Rahmawati, 2018).

Para peneliti berusaha untuk menemukan terapi alternatif yang memiliki efek samping yang kecil daripada obat kimia dan murah (Rahmawati, 2018). Sehingga, atensi pemerintah dan masyarakat Indonesia beberapa tahun terakhir ini dalam penggunaan obat herbal terjadi peningkatan. Hal ini membuat banyak peneliti meningkatkan penggunaan bahan herbal sebagai obat alternatif yang mempunyai efek antibakteri (Amaliah, 2018). Salah satunya adalah daun jeruk purut (*Citrus hystrix*). Menurut Dhavesia (2017), daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) merupakan daun yang memiliki bau harum yang khas dan mengandung senyawa yang berfungsi sebagai antibakteri seperti flavonoid, tanin, alkaloid, saponin, steroid dan minyak atsiri. Hal tersebut merupakan kelebihan dari tumbuhan yang diberikan oleh Allah Swt. dimana manusia harus bersyukur akan rahmat-Nya dan harus memanfaatkan tumbuhan tersebut dengan baik. Hal tersebut sejalan dengan firman Allah yaitu pada surat Ar-Ra'd (13) ayat 4 yang berbunyi :

وَفِي الْأَرْضِ قِطْعٌ مُّتَجَوِّرَاتٌ وَجَنَّاتٌ مِّنْ أَعْنَابٍ وَزُرْعٌ وَنَخِيلٌ صِنَوَانٌ وَغَيْرُ صِنَوَانٍ يُسْقَىٰ
بِمَاءٍ وَحِدٍ وَنُفْضِلُ بَعْضَهَا عَلَىٰ بَعْضٍ فِي الْأَكْلِ ۗ إِنَّ فِي ذَٰلِكَ لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ يَعْقِلُونَ (الرعد: ٤)

Artinya : “Dan di bumi ini terdapat bagian-bagian yang berdampingan, dan kebun-kebun anggur, tumbuhan-tumbuhan dan pohon korma yang bercabang dan yang tidak bercabang, disirami dengan air yang sama. Kami melebihkan sebagian tumbuh-tumbuhan itu atas sebagian yang lain tentang rasanya. Sesungguhnya pada yang demikian itu terdapat tanda-tanda (kebesaran Allah) bagi kaum yang berfikir” (QS. Ar Ra'd: 4) (Kementrian Agama RI, 2011)

Menurut tafsir Jalalayn pada surah Ar Ra'd (13) ayat 4 adalah pada berbagai macam daerah yang saling berdekatan dimana ada yang subur dan ada yang tandus, ada yang kekurangan air dan ada yang airnya melimpah yang dapat ditanami tanaman anggur, kurma atau yang lainnya. Kemudian dari situlah Allah Swt. memberikan berbagai kelebihan pada tanaman walaupun bersumber dari air yang sama. Hal tersebut merupakan kebesaran yang Allah tunjukkan kepada manusia yang mau memikirkannya (Al-Mahally, 1990).

Ayat diatas dapat disimpulkan bahwa Allah Swt. meminta manusia untuk berfikir bahwa semua yang ada di bumi diciptakan memiliki tujuan. Seperti Allah menciptakan berbagai macam tumbuh-tumbuhan dengan kelebihan masing-masing dan sesungguhnya memiliki banyak manfaat bagi manusia. Salah satunya adalah daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) yang diduga dapat dijadikan alternatif obat lain yang dapat membantu sesama manusia (Rahmawati, 2018).

Daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) merupakan tanaman perdu yang mudah dijumpai di Indonesia. Daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) sering dimanfaatkan sebagai bahan penyedap masakan dan bahan obat-obatan herbal (Miftahendarwati, 2014). Menurut penelitian yang telah dilakukan Miftahendarwati (2014), ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* pada konsentrasi 25%.

Dikarenakan kandungan daun jeruk purut (*Citrus hystix*) yang mempunyai aktivitas antibakteri dan belum ada penelitian terhadap bakteri *Shigella dysenteriae*, maka penting dilakukan penelitian untuk menguji potensi antibakteri pada daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) terhadap bakteri *Shigella dysenteriae*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan maka didapatkan beberapa rumusan masalah:

- 1.2.1 Apakah ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) mempunyai aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* secara *in vitro*?
- 1.2.2 Berapakah diameter zona hambat ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) terhadap pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* secara *in vitro*?
- 1.2.3 Berapa konsentrasi minimum ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* secara *in vitro*?
- 1.2.4 Berapa konsentrasi minimum ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) yang mampu membunuh pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* secara *in vitro*?

1.3 Tujuan Penelitian

- 1.3.1 Untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) terhadap pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* secara *in vitro*.
- 1.3.2 Untuk mengetahui diameter zona hambat ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) terhadap pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* secara *in vitro*.
- 1.3.3 Untuk mengetahui konsentrasi minimum ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) yang memiliki aktivitas menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* secara *in vitro*.

- 1.3.4 Untuk mengetahui konsentrasi minimum ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) yang memiliki aktivitas membunuh pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* secara *in vitro*.

1.4 Manfaat Penelitian

- 1.4.1 Manfaat bagi Institusi yaitu menambah informasi dan literatur mengenai keilmuan mikrobiologi, dan memajukan UIN Maulana Malik Ibrahim Malang terutama FKIK UIN Maulana Malik Ibrahim Malang dengan mempublikasikan penelitian ini.
- 1.4.2 Manfaat bagi akademisi yaitu dapat memberikan informasi mengenai potensi ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) terhadap pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* dapat dijadikan bahan referensi bagi praktisi yang tertarik dalam penelitian mikrobiologi, dan dapat digunakan sebagai data informasi untuk melakukan penelitian lanjut tentang efek ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) terhadap pertumbuhan *Shigella dysenteriae*.
- 1.4.3 Manfaat bagi sosial yaitu meningkatkan pemanfaatan bahan alami sebagai tanaman berkhasiat obat dalam upaya peningkatan kesehatan masyarakat.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix*)

2.1.1 Taksonomi dan Morfologi

Daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) merupakan salah satu tanaman perdu yang mempunyai nilai ekonomis yang tinggi karena memiliki vitamin C dan sering digunakan sebagai penyedap masakan (Dhavaesia, 2017). Daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) merupakan daun yang beraroma harum dan sering digunakan sebagai penambah aroma khas pada masakan. Secara luas, daun jeruk purut sering digunakan di Indonesia dan Asia Tenggara seperti Laos, Thailand, Malaysia dan Vietnam. Daun ini juga berfungsi sebagai obat alami untuk menyembuhkan berbagai penyakit seperti penyakit jantung, pusing, dan gangguan pencernaan dan juga bisa digunakan untuk perawatan kecantikan (Raksakantong *et al.*, 2016).

Dalam istilah asing, jeruk purut dikenal sebagai *kaffir lime*. Jeruk purut tumbuh di daerah tropis terutama di bagian Asia Selatan (Miftahendrawati, 2014). Jeruk purut tergabung kedalam famili *Rutaceae*, yaitu bagian daun dan buahnya bisa digunakan oleh penduduk sebagai obat tradisional (Vankatachalem, 2018). Daun jeruk purut dapat digunakan dalam bentuk daun yang segar maupun yang kering dan cara menyimpan daun ini agar tetap segar yaitu harus dalam kondisi lingkungan yang dingin. Akan tetapi apabila terlalu dingin (kurang dari 8°C) dan berkepanjangan dapat menyebabkan cedera dingin pada daun dan dengan demikian akan mempercepat perubahan fisiologis dan biokimia di dalam daun sehingga

menyebabkan hilangnya seluler integritas dan menyebabkan kematian sel (Venkatachalam, 2019).

Taksonomi jeruk purut (*Citrus hystrix*) adalah sebagai berikut (Miftahendrawati, 2014):

| | |
|---------------------|-------------------------------|
| Kerajaan | : Plantae |
| Sub Kerajaan | : Tracheobionta |
| Super Divisi | : Spermatophyta |
| Divisi | : Magnoliophyta |
| Kelas | : Magnoliopsida |
| Sub Kelas | : Rosidae |
| Bangsa | : Sapindales |
| Suku | : Rutaceae |
| Marga | : Citrus |
| Jenis | : <i>Citrus hystrix</i> D. C. |

Daun jeruk purut berukuran sekitar 8 hingga 14 cm dengan lebar 2 hingga 6 cm. Daun jeruk purut memiliki permukaan yang licin dengan bagian atas berwarna hijau tua mengkilap dan bagian bawah berwarna hijau muda. Daun ini memiliki bentuk majemuk dan menyirip sehingga membentuk pola angka 8. Daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) ketika dihancurkan akan menghasilkan bau harum. Untuk tangkai daun jeruk purut melebar seperti tunas (anak) daun. Helaian tunas daun berbentuk bundar sampai lonjong dengan induk bulat, dan berpucuk tumpul hingga runcing, tepi beringgit (Soepomo, 2012).



Gambar 2.1 Morfologi Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix*). Daun jeruk purut memiliki daun majemuk, berbentuk bulat telur atau lonjong, berwarna hijau, dan ujung daun runcing atau tumpul. Sumber: Miftahendrawati, 2014.

2.1.2 Manfaat

Jeruk purut (*Citrus hystrix*) merupakan salah satu jenis rempah yang banyak menghiasi cita rasa kuliner Nusantara seperti bumbu pecel, gado-gado, mendol, mendoan dan lainnya. Perbanyakan jeruk purut dapat dilakukan dengan cara penanaman biji atau pencangkakan. Nama latin *Citrus hystrix* mempunyai arti “jeruk landak” karena keberadaan duri-duri pada batangnya (BBPP, 2017)

Kandungan kimia yang terdapat di dalam daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) seperti tanin, steroid/ triterpenoid dan minyak atsiri mempunyai manfaat untuk kesehatan. Beberapa manfaat daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) terhadap kesehatan, sebagai berikut :

1. Obat penyembuhan setelah sakit berat, yaitu dengan cara daun jeruk purut direbus bersama dengan air, kemudian air rebusan tersebut digunakan untuk mandi.

2. Obat terkilir, edema, atau fraktur, yaitu penghancuran daun jeruk purut bersama daun jambu air kemudian campuran tersebut direkatkan pada lokasi yang terkena.
3. Obat untuk influenza, yaitu dengan cara merebus daun jeruk purut dengan air kemudian diminum dalam keadaan hangat. Saran penyajian juga bisa ditambahkan dengan madu untuk meningkatkan stamina tubuh.
4. Sebagai relaksasi, karena bau harum yang istimewa dari daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) dan minyak atsiri yang terkandung didalamnya bisa merilekskan otak (pikiran) dan mengurangi stres.
5. Sebagai antibiotik, karena efek farmakologis daun jeruk purut menghalangi masuknya bakteri ke dalam tubuh.
6. Sebagai anti inflamasi.

(BBPP, 2017)

Di sisi lain senyawa minyak atsiri yang terkandung didalam daun jeruk purut dapat disuling kemudian dimanfaatkan sebagai aromaterapi. Kandungan alamiah dari tanaman ini selain mudah dibudidayakan, juga perlu adanya penyuluhan manfaat daun jeruk bagi kesehatan agar bisa digunakan sebagai apotik keluarga Indonesia yang terjangkau, mudah didapat, dan siap setiap saat diperlukan. Selain itu kuliner Nusantara yang memanfaatkan daun jeruk purut sebagai bumbu dapur baik untuk membuat makanan atau jajanan tradisional perlu dihargai karena bisa mendukung masyarakat Indonesia untuk sehat tanpa menggunakan bahan kimia (BBPP, 2017).

2.1.3 Fitokimia

Fitokimia merupakan ilmu yang berhubungan dengan senyawa organik seperti struktur kimia, biosintesis, perubahan serta metabolisme, fungsi biologis, isolasi, dan perbandingan komposisi senyawa kimia dari berbagai jenis tanaman. Analisis fitokimia berfungsi untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder tanaman yang diduga memiliki efek toksin atau efek farmakologis (Agustina, 2017). Adapun faktor-faktor yang mempengaruhi kuantitas metabolit sekunder pada tanaman yaitu faktor lingkungan seperti suhu, cahaya, tanah dan iklim dapat mempengaruhi jumlah metabolit sekunder yang ada pada daun jeruk purut. Dan apabila tanaman tumbuh dengan nutrisi yang cukup dan di lingkungan yang sesuai dengan syarat tumbuh tanaman maka terbentuknya jumlah metabolit sekunder yang optimal (Febrianasari, 2018).

Fitokimia yang terkandung di dalam daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) adalah flavanoid, triterpenoid atau steroid, alkaloid, kuinon, monoterpenoid atau sesquiterpenoid dan minyak atsiri (Arfania, 2017). Daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) merupakan salah satu keanekaragaman flora di Indonesia. Penelitian mengenai daun jeruk purut masih terbatas dilakukan dibandingkan ketersediaan daun jeruk purut di alam yang melimpah. Menurut Suratmo *et al.*, (2017), ditemukan bahwa daun jeruk purut mengandung senyawa aktif seperti alkaloid, flavonoid, minyak atsiri, tanin dan saponin.

Daun Jeruk purut (*Citrus hystrix*) merupakan tanaman berdaun yang kaya vitamin C dan vitamin E (Agusta *et al.*, 2019). Menurut Wulandari *et al.*, (2017) terdapat 38 senyawa yang dapat diidentifikasi dalam minyak atsiri jeruk purut. dimana minyak atsiri mengandung monoterpen sebanyak 87% dengan β -pinene

sebagai komponen utama (10%) dan limonene rendah (4,7%). Minyak atsiri daun jeruk purut ditandai dengan tingginya konten terpinen-4-ol (13,0%), α -terpineol (7,6%), 1,8-cineole (6,4%), dan citronellol (6,0%). Minyak daun jeruk purut memiliki beberapa bioaktivitas impotant seperti antileukemia, antitusif, anti perdarahan stres antioksidan, dan sifat antibakteri (Agusta *et al.*, 2019). Selain itu, minyak atsiri daun jeruk purut sangat diminati oleh masyarakat di Asia Tenggara karena aroma dalam makanan yang khas, dapat dijadikan wewangian atau industri kosmetik (Wulandari *et al.*, 2017). Berdasarkan penelitian-penelitian tersebut menunjukkan bahwa jeruk purut memiliki potensi sebagai kandidat obat herbal terstandar (OHT) (Anuchapreeda, 2020).

Tabel 2.1 Analisis Fitokimia Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix*)

| No. | Golongan senyawa | Hasil (+/-) | Keterangan |
|-----|------------------|-------------|------------------------------------|
| 1. | Alkaloid | + | Terbentuk endapan putih dan keruh |
| 2. | Flavonoid | + | Terbentuk endapan kuning |
| 3. | Polifenolat | + | Terbentuk endapan hitam agak pekat |
| 4. | Tannin | + | Terbentuk endapan putih |
| 5. | Kuinon | + | Terbentuk warna kuning kemerahan |
| 6. | Saponin | - | Tidak terbentuk busa |

| | | | |
|----|-----------------------------------|---|--|
| 7. | Monoterpenoid dan sesquiterponoid | + | Terbentuk warna-warna hijau hitam kebiruan |
| 8. | Triterpenoid dan steroid | - | Tidak terbentuk warna biru-ungu |

Sumber: Arfania, 2017

Flavonoid atau bioflavonoid merupakan suatu senyawa fenol yang tersebar luas pada hampir semua tumbuh-tumbuhan, kecuali alga. Flavonoid yang terdapat pada tumbuhan disintesis dalam jumlah sedikit sekitar 0,5% - 1,5%. Lebih dari 4.000 flavonoid telah diidentifikasi pada tumbuhan tingkat tinggi dan rendah hingga saat ini (Kachlicki *et al.*, 2016). Flavonoid termasuk *phenylbenzopyrones* (*phenylchromones*) berstruktur dasar berbentuk dua cincin utama (dua cincin benzen A dan B) dan disambungkan melalui cincin heterosiklik piron atau piran (dengan ikatan ganda) atau bisa dikatakan dengan cincin C. Flavonoid mempunyai berat molekul rendah (Zhang, 2017). Pada tumbuhan, flavonoid tidak hanya berperan sebagai pigmen yang memberi warna pada bunga dan daun saja, namun juga sangat penting bagi pertumbuhan, perkembangan, dan pertahanan tumbuhan, misalnya sebagai enzim *inhibitor*, prekursor bahan toksik, melindungi tumbuhan dari bakteri, virus, herbivora, radikal bebas, dan radiasi sinar ultraviolet (Kachlicki *et al.*, 2016).

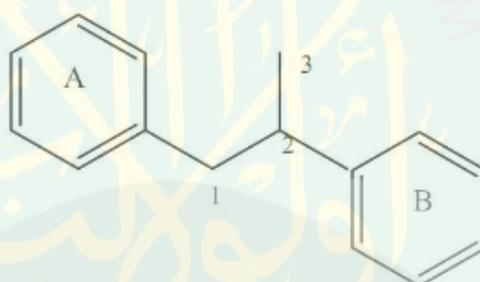
Mekanisme flavonoid bersifat antibakteri karena mampu berinteraksi dengan DNA bakteri. Hasil interaksi ini menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri, mikrosom, dan lisosom. Mekanisme antibakteri yang lain pada flavonoid adalah adanya kandungan gugus hidroksil yang dimiliki oleh flavonoid. Gugus hidroksil secara kimia menyebabkan perubahan komponen organik dan

transport nutrisi sehingga menimbulkan efek toksik terhadap sel bakteri. Flavonoid juga mampu menghasilkan energi transduksi yang akan mempengaruhi sitoplasma bakteri dan memperlambat motilitasnya (Chandra, 2016).

Mekanisme kerja flavonoid sebagai antimikroba dapat dibagi menjadi 3 yaitu menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi membran sel dan menghambat metabolisme energi. Mekanisme kerja flavonoid dalam menghambat sintesis asam nukleat dilakukan melalui cincin B pada flavonoid yang mempunyai peranan penting dalam proses interkalasi atau ikatan hidrogen dengan menumpuk basa asam nukleat yang menghambat sintesis DNA dan RNA (Xie *et al*, 2016). Mekanisme kerja flavonoid menghambat fungsi membran sel melalui ikatan kompleks dengan protein ekstraseluler yang bersifat larut sehingga dapat mengganggu integritas membran sel bakteri. Adanya gangguan dalam permeabilitas membran sel ini akan mempengaruhi gradien elektrokimia proton yang melewati membran. Gradien elektrokimia proton melintasi membran sangat penting bagi bakteri dalam mensintesis ATP, transport membran dan pergerakan bakteri, sehingga dengan adanya senyawa flavonoid akan menyebabkan terganggunya *proton motive force* yang berakibat terganggunya sintesis ATP, transport membran dan pergerakan bakteri. Selain itu penghambatan metabolisme energi bakteri oleh flavonoid dilakukan dengan cara menghambat proses respirasi bakteri sehingga adanya energi yang dihambat akan berpengaruh terhadap aktivitas penyerapan metabolit dan biosintesis makromolekul bakteri (Rahman, 2016).

Mekanisme flavonoid dalam menghambat terjadinya inflamasi melalui 2 cara, yaitu: (1) menghambat pelepasan asam arakidonat dan sekresi enzim lisosom dari sel netrofil dan sel endothelial, dan (2) menghambat fase proliferasi dan fase

eksudasi dari proses inflamasi (Foong, 2015). Pada konsentrasi tinggi dari beberapa senyawa flavonoid dapat menghambat pelepasan asam arakidonat dan sekresi enzim lisosom dari membran dengan jalan memblok jalur siklooksigenase, jalur lipoksigenase, dan fosfolipase A₂, sementara pada konsentrasi rendah hanya memblok jalur lipoksigenase (Xie *et al.*, 2016). Terhambatnya pelepasan asam arakidonat dari sel inflamasi akan menyebabkan kurang tersedianya substrat arakidonat bagi jalur siklooksigenase dan jalur lipoksigenase, yang pada akhirnya akan menekan jumlah prostaglandin, prostasiklin, endoperoksida, tromboksan disatu sisi dan asam hidroperoksida, asam hidroksieikosatetraenoat, leukotrin disisi lainnya (Parwata, 2016)



Gambar 2.2 Bentuk Kimia Flavonoid. Senyawa flavonoid mengandung 15 atom karbon yang terdiri atas 2 inti fenolat yang dihubungkan dengan 3 satuan karbon. A dan B adalah cincin benzen yang dihubungkan dengan 3 karbon (nomor 1, 2, dan 3).
Sumber: Middleton *et al.*, 2000

Minyak atsiri berperan sebagai antibakteri dengan cara mengganggu proses terbentuknya membran atau dinding sel sehingga tidak terbentuk atau terbentuk tidak sempurna. Minyak atsiri yang aktif sebagai antibakteri umumnya mengandung gugus fungsi hidroksil (-OH) dan karbonil. Turunan fenol berinteraksi dengan sel bakteri melalui proses adsorpsi yang melibatkan ikatan hidrogen. Pada kadar rendah, terbentuk kompleks protein dengan fenol dengan ikatan yang lemah dan segera mengalami penguraian, diikuti penetrasi fenol ke dalam sel dan

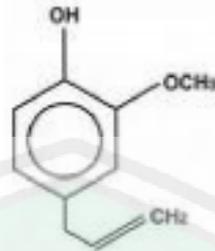
menyebabkan presipitasi serta denaturasi protein. Pada kadar tinggi, fenol dapat menyebabkan koagulasi protein dan sel membran mengalami lisis (Rachmawaty, *et al.*, 2016). Minyak atsiri mempunyai mekanisme kerja dengan mendenaturasikan protein ekstraseluler sehingga mengganggu pembentukan dinding sel, merusak membran sel secara langsung dan mempunyai aktivitas antibakteri karena senyawa ini mampu membentuk kompleks lipid. Kerusakan membran sel bakteri dapat menyebabkan terganggunya transport nutrisi yang melalui membran sel. Sehingga bakteri kekurangan nutrisi yang diperlukan dalam proses pertumbuhan bakteri (Cepeda, 2019).



Gambar 2.3 Bentuk Kimiawi Minyak Atsiri. Minyak atsiri tersusun dari unsur C, H, dan O, berupa senyawa alifatik atau aromatis meliputi kelompok hidrokarbon, ester, eter, aldehid, keton, alkohol dan asam.
Sumber: Bhat, 2009

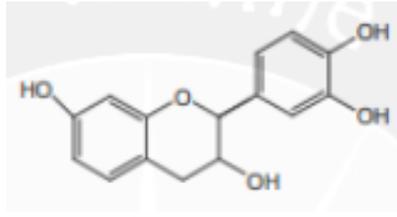
Alkaloid adalah senyawa kimia yang memiliki satu atau lebih atom nitrogen. Ciri-ciri alkaloid adalah tidak berwarna, sifat okuler yang tidak pasif, dan berbentuk kristal atau seperti garam air laut (Sirait, 2007). Mekanisme senyawa alkaloid sebagai antibakteri adalah dengan mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan mengganggu sintesis peptidoglikan sehingga pembentukan sel tidak sempurna karena tidak mengandung peptidoglikan dan dinding selnya hanya meliputi membran sel (Dwicahyani, 2018). Mekanisme Alkaloid sebagai antibakteri yang lain adalah menghambat aktivitas dihidrofolat reduktase, sehingga menghambat sintesis asam nukleat. Dihydrofolate reductase adalah enzim yang

sangat penting dalam produksi prekursor pirimidin dan purin untuk asam amino, RNA, dan biosintesis DNA (Othman, 2019).



Gambar 2.4 Bentuk Kimiawi Alkaloid. Struktur alkaloid mempunyai 2 cincin karbon dengan 1 atom nitrogen.
Sumber: Sirait, 2007

Tanin adalah senyawa yang terdiri dari senyawa fenolik yang sulit mengkristal dan sulit dipisahkan. Tanin bermanfaat sebagai astringen, antidiare, antibakteri, dan antioksidan. Tanin memiliki berat molekul mulai dari 500 hingga lebih dari 3000. Mekanisme kerja tanin yaitu dengan cara menghambat enzim reverse transkriptase dan DNA topoisomerase sehingga sel bakteri tidak dapat terbentuk (Maisetta, 2019). Selain itu, tanin menyerang polipeptida sel sehingga pembentukan dinding sel menjadi tidak utuh. Bakteri yang hidup didalam keadaan aerobik biasanya memerlukan zat besi untuk melakukan fungsinya, termasuk mengurangi dari prekursor ribonukleotida DNA. Apabila kapasitas pengikat besi diperkuat oleh tanin, maka enzim reverse transkriptase dan DNA topoisomerase sel bakteri tidak dapat terbentuk. Selain ini tanin juga bisa menghambat adhesi yang dilakukan bakteri, mengganggu transport protein dalam sel, dan menginaktifkan enzim (Kurhekar, 2016).



Gambar 2.5 Bentuk Kimiawi Tanin. Struktur tanin mempunyai 2 cincin aromatik dengan mengandung gugus OH
Sumber: Sirait, 2007

Mekanisme kerja saponin sebagai antibakteri yaitu dapat menyebabkan kebocoran protein dan enzim dari dalam sel. Saponin berfungsi sebagai antibakteri karena permukaan pada zat aktif saponin menyerupai sabun, akibatnya saponin akan mengurangi tegangan permukaan dinding sel bakteri dan merusak permeabilitas membran. Rusaknya membran sel ini sangat mengganggu kelangsungan hidup bakteri. Saponin berdifusi melalui membran luar dan dinding sel yang rentan kemudian mengikat membran sitoplasma sehingga mengganggu dan mengurangi kestabilan membran sel. Hal ini menyebabkan sitoplasma bocor keluar dari sel yang mengakibatkan kematian sel (Sapara, 2016).

2.1.4 Mekanisme Antibakteri

Antibiotik merupakan zat kimia yang memiliki khasiat menghambat atau membunuh proses dalam tubuh mikroorganisme. Antibiotik diproduksi oleh mikroorganisme yang masih hidup. Selain itu, adapun beberapa antibiotik bisa dari tumbuhan tingkat tinggi atau binatang. Salah satu jenis antibiotik yaitu antibakteri. Antibakteri merupakan senyawa yang mampu menghambat dan membunuh pertumbuhan bakteri. Antibakteri yang mempunyai toksisitas minimal merupakan antibakteri yang bagus karena hanya membahayakan mikroorganisme namun tidak membahayakan manusia (Pratiwi 2017).

Antibakteri dibagi menjadi tiga golongan, yaitu bakteristatik, bakteriosidal, dan bakteriolitik. Bakteristatik adalah antibakteri dengan aktivitas menghambat perkembangan bakteri dan memungkinkan sistem kekebalan inangnya mengambil alih sel bakteri yang dihambat dengan cara menginhibisi sintesis protein atau mengikat ribosom. Bakteriosidal adalah antibakteri dengan cara menghambat pembentukan dinding sel dan bersifat toksik pada sel bakteri (Pratiwi, 2017).

Menurut Jawetz (2013), berdasarkan mekanisme kerjanya terhadap bakteri, antibiotik dikelompokkan sebagai berikut :

- a. Cara pertama adalah menghambat sintesis dinding sel. Dinding sel terdapat peptidoglikan (*polimer mucopeptida rumit*) yang berisi gabungan rantai polipeptida tinggi dan mengandung amino *N-acetylglucosamine* dan asam *acetylmuramic* yang berperan sebagai pertahanan dan melindungi bakteri dari tekanan osmotik yang tinggi baik di dalam maupun di luar sel (3- 5x lebih besar pada bakteri Gram-positif daripada bakteri Gram-negatif). Trauma pada dinding sel atau penghambatan dalam pembentukannya dapat menimbulkan lisis pada sel.
- b. Cara yang kedua adalah menghambat membran sel. Sitoplasma semua sel hidup dibatasi oleh membran sitoplasma, yang berperan sebagai barrier permeabilitas selektif, memiliki fungsi transport aktif, dan kemudian mengontrol komposisi internal sel. Jika fungsi integritas dari membran sitoplasma rusak akan menyebabkan keluarnya makromolekul dan ion dari sel, kemudian sel rusak atau terjadi kematian. Membran sitoplasma bakteri mempunyai struktur berbeda dibanding sel binatang dan dapat dengan mudah dikacaukan oleh agen tertentu.

- c. Cara yang ketiga adalah menghambat sintesis protein (translasi dan transkripsi material genetik). RNA, DNA dan protein memiliki fungsi yang berguna untuk kehidupan sel. Hal ini menandakan jika terjadi gangguan pada pembentukan atau fungsi maka menimbulkan kerusakan keseluruhan sel. Mekanisme kerjanya adalah menghalangi RNA berikatan pada tempat spesifik ribosom, selama pemanjangan rantai peptida.
- d. Cara keempat adalah menghambat sintesis asam nukleat dengan cara menghambat pertumbuhan bakteri dengan ikatan yang sangat kuat pada enzim DNA dependent RNA polymerase bakteri.

2.2 Bakteri *Shigella dysenteriae*

2.2.1 Morfologi dan Taksonomi

Bakteri *Shigella dysenteriae* merupakan bakteri patogen usus yang menginfeksi saluran pencernaan dan dikenal sebagai penyebab penyakit disentri basiler. *Shigella dysenteriae* merupakan bakteri gram negatif dan bersifat fakultatif anaerob. *Shigella dysenteriae* memiliki bentuk batang yang ramping dan pada biakan muda. Bakteri ini masuk ke dalam *Enterobacteriaceae* genus *Shigella* (Jawetz *et al*, 2016). Bakteri ini memiliki ukuran $0,5 - 0,7 \mu\text{m} \times 2 - 3 \mu\text{m}$, tidak berspora dan tidak berflagel sehingga tidak mampu bergerak. Koloni bakteri ini berbentuk bulat, konveks, dan berwarna pucat dengan tepi utuh dengan diameter kurang lebih 2 mm dalam 24 jam (Jawetz, 2016).

| | |
|---------|-------------------------------|
| Kingdom | : Bacteria |
| Filum | : Proteobacteria |
| Kelas | : Gammaproteobacteria |
| Ordo | : Enterobacteriales |
| Famili | : Enterobacteriaceae |
| Genus | : Shigella |
| Spesies | : <i>Shigella dysenteriae</i> |

Tabel 2.2 Spesies *Shigella sp.* yang Patogen

| Identifikasi saat ini | Grup dan tipe | Manitol | Ornithin Dekarboksilase |
|-----------------------------|---------------|---------|-------------------------|
| <i>Shigella dysenteriae</i> | A | - | - |
| <i>Shigella flexneri</i> | B | + | - |
| <i>Shigella boydii</i> | C | + | - |
| <i>Shigella sonnei</i> | D | + | + |

Sumber: Jawetz, 2013

Keterangan : *Shigella dysenteriae* tidak memfermentasikan manitol dan ornithin dekarboksilase, sedangkan *Shigella flexneri* dan *Shigella boydii* memfermentasikan manitol tapi tidak memfermentasikan ornithin dekarboksilase, dan *Shigella sonnei* memfermentasikan manitol dan ornithin dekarboksilase

2.2.2 Sifat Biakan

Bakteri *Shigella dysenteriae* memperbanyak dirinya dengan cara pembelahan biner. Pembelahan biner merupakan cara reproduksi aseksual yang memiliki sifat sel anakan mirip dengan sel induknya. Dalam proses pembelahan biner sel memanjang pada sumbu longitudinal, apabila telah mencapai panjang yang memadai, septum (struktur dinding) muncul dan berkembang searah dengan sumbu transversal sel. Apabila septum telah terbentuk dengan sempurna, maka septum dan

sel tempat asalnya akan berpisah dan diikuti terpisahnya kedua sel anak yang identik (Kim, 2016). Pada keadaan normal, umumnya bakteri mampu membelah dirinya setiap 20 menit sekali. Apabila pembelahan berlangsung selama satu jam, maka akan dihasilkan delapan anakan sel. Tetapi terdapat faktor yang mempengaruhi pembelahan bakteri tidak maksimal seperti kekurangan nutrisi makanan, suhu tidak sesuai, dan adanya organisme pemangsa bakteri (Jawetz, 2013).

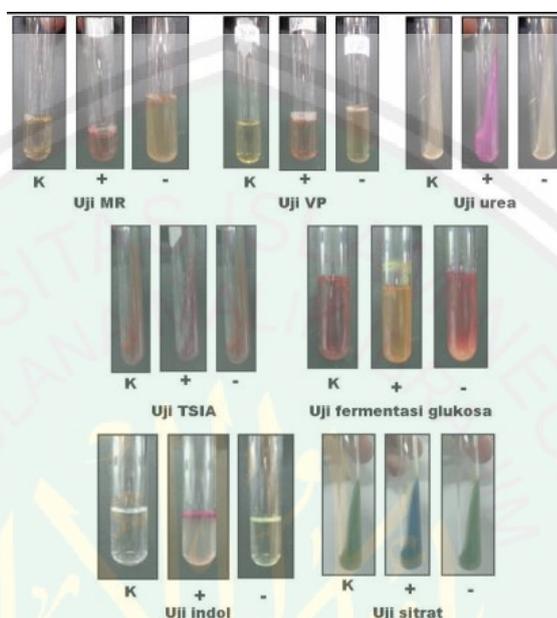
2.2.3 Identifikasi Bakteri

Uji identifikasi bakteri merupakan pengujian yang sangat penting untuk mengetahui jenis bakteri yang menyebabkan penyakit atau berada dalam makanan, dan yang lainnya. Bakteri berukuran sangat kecil dan tipis sehingga sukar dilihat struktur tubuhnya walaupun dengan bantuan mikroskop. Untuk melihat morfologi bakteri secara lebih jelas dikembangkan teknik pewarnaan bakteri. Prinsip pewarnaan bakteri adalah pertukaran antara ion zat warna dengan ion protoplasma sel. Selain zat warna diperlukan zat tambahan yang berfungsi untuk mengendapkan hasil reaksi zat warna dengan komponen dinding sel bakteri. Pada bakteri gram positif mampu mempertahankan zat warna utama dalam pewarnaan Gram, yaitu Gentian Violet, sehingga nampak warna ungu saat pengamatan dikarenakan dinding sel kelompok bakteri ini tersusun oleh sebagian besar peptidoglikan, yang mampu mengikat zat warna dan tidak rusak saat dicuci dengan alkohol. Sementara itu, pada bakteri gram negatif memiliki komposisi dinding sel yang sebagian besar tersusun dari lapisan lipid, sehingga pada saat pewarnaan kurang dapat mempertahankan zat warna utama terutama saat dicuci dengan alkohol (lipid rusak

saat dicuci dengan alkohol), akibatnya kelompok bakteri ini memberikan kenampakan warna merah (warna dari zat warna kedua: safranin atau air fuchsin) (Hardy, 2016).

Pada uji biokimia, uji indol digunakan untuk mengetahui adanya enzim triptofanase pada bakteri yang dapat menghidrolisis asam amino triptofan menjadi indol dan asam piruvat. Asam amino triptofan merupakan asam amino yang lazim terdapat pada protein, sehingga asam amino ini dengan mudah dapat digunakan oleh mikroorganisme sebagai sumber energi. Adanya indol dapat dideteksi dengan menggunakan reagen Kovac's yang akan membentuk lapisan atau cincin merah pada permukaan medium. Uji indol juga dapat digunakan untuk melihat adanya motilitas dari bakteri. Dengan menggunakan media SIM dapat diketahui pergerakan bakteri. Apabila pertumbuhan bakteri menyebar dari tusukan maka dapat dikatakan positif untuk motilitas. Pada uji TSIA berfungsi untuk mengetahui apakah bakteri menghasilkan gas, H₂S atau tidak. Media yang digunakan mempunyai dua bagian yaitu *slant* (miring) dan *butt* (tusuk). Reaksi spesifik untuk salmonella pada TSIA adalah pada bagian *slant* berwarna merah/alkaline (reaksi basa), memproduksi H₂S (kehitaman pada agar hingga menutupi warna agar dasar, dengan atau tanpa memproduksi gas) (Hardy, 2016). Uji *Simmon's citrate* bertujuan untuk menentukan apakah bakteri menggunakan natrium sitrat sebagai sumber karbon. Bakteri yang dapat menggunakan sitrat akan menggunakan garam amonium dan menghasilkan amonia, sehingga asam akan dihilangkan dari medium dan menyebabkan peningkatan pH. Peningkatan pH ini yang akan mengubah warna medium dari hijau menjadi biru (Putri, 2016).

Menurut Madigan *et al.* (2009) *Shigella sp.* menghasilkan reaksi positif uji MR dan uji fermentasi glukosa (tanpa menghasilkan gas); reaksi negatif pada uji VP, urea, dan sitrat; memfermentasikan glukosa dan tidak dapat menghasilkan H₂S pada media TSIA; dan hasil bervariasi pada uji indol (Normande 2014).



Gambar 2.6 Hasil Uji Biokimiawi *Shigella sp.* *Shigella sp.* menghasilkan reaksi positif uji MR dan uji fermentasi glukosa (tanpa menghasilkan gas); reaksi negatif pada uji VP, urea, dan sitrat; memfermentasikan glukosa dan tidak dapat menghasilkan H₂S pada media TSIA; dan hasil bervariasi pada uji indol.
 Sumber: Normande, 2014

Tabel 2.3 Hasil Uji Biokimiawi Spesies *Shigella sp.*

| Uji Biokimia | 1 | 2 | 3 | 4 |
|-------------------|---|---|---|---|
| Motilitas | - | - | - | - |
| Penggunaan Sitrat | - | - | - | - |
| Glukosa | + | + | + | + |
| Mannitol | - | - | + | + |
| Maltosa | - | + | + | + |
| Sukrosa | - | - | - | + |
| Laktosa | - | - | - | + |
| H ₂ S | - | - | - | - |

| | | | | |
|------------|---|---|---|---|
| Methyl Red | + | + | + | + |
| VP | - | - | - | - |
| Urease | - | - | - | - |
| Indol | - | - | + | - |

(Sumber: Arta, 2016)

Keterangan : (1) *Shigella dysenteriae*, (2) *Shigella flexneri*, (3) *Shigella boydii*, dan (4) *Shigella sonnei*

Bakteri *Shigella sp.* meragi glukosa kecuali spesies *Shigella sonnei*, yang tidak memfermentasikan laktosa. Ketidakmampuan untuk memfermentasikan laktosa diperlihatkan *Shigella sp.* dalam media diferensial. *Shigella sp.* membentuk asam dari karbohidrat tetapi jarang memproduksi gas. *Shigella sp.* juga dapat dibedakan ke dalam bagian yang dapat memfermentasikan manitol dan yang tidak dapat memfermentasikan manitol. Pada uji sitrat tidak terjadi perubahan warna hijau ke biru (sitrat), karena bakteri tersebut tidak menggunakan sitrat sebagai sumber karbon. Media selektif yang digunakan adalah Deoksi Cholatesitrat Agar (DCA) (Aini, 2018).

2.2.4 Struktur Antigen

Shigella sp. memiliki pola antigen yang kompleks yaitu antigen O. Antigen O somatik *Shigella sp.* tersusun atas lipopolisakarida (LPS). Spesifitasnya serologiknya bergantung pada polisakarida. Terdapat lebih dari 40 serotipe. *Shigella* dibagi dalam empat serogrup berdasarkan komponen-komponen utama antiagen O yaitu : (Jawetz, 2001).

Grup A : *Shigella dysenteriae*

Grup B : *Shigella flexneri*

Grup C : *Shigella boydii*

Grup D : *Shigella sonnei*

Setiap serogroup dibagi lagi dalam serotip berdasarkan komponen minorantigen O. Sampai saat ini sudah ditemukan 10 serotip *S.dysenteriae*, 6 serotip *S. Flexneri*, 15 *S. Bodyii*, 1 serotip *S. Sonnei* (Jawetz, 2001). Antigen O merupakan bagian terluar dari lipopolisakarida dinding sel. Beberapa polisakarida spesifik O mengandung gula yang unik. Antigen O bersifat tahan panas dan alkohol. Antigen O bisa terdeteksi melalui aglutinasi bakteri. Antibodi terhadap antigen O paling utama adalah IgM (Jawetz, 2013).

2.2.5 Struktur Sel Bakteri

Sebagian besar sel bakteri memiliki lapisan pembungkus sel, berupa membran plasma, dinding sel yang mengandung protein dan polisakarida. Sejumlah bakteri dapat membentuk kapsul dan lendir, juga flagela dan pili. Dinding selnya merupakan struktur yang kaku berfungsi membungkus dan melindungi protoplasma dari kerusakan akibat faktor fisik dan menjada pengaruh lingkungan luar seperti kondisi tekanan osmotik yang rendah. Protoplasma terdiri dari membran sitoplasma beserta komponen-komponen seluler yang ada di dalamnya. Beberapa jenis bakteri dapat membentuk endospora sebagai pertahanan dikala lingkungan tidak sesuai untuk pertumbuhannya. Struktur dinding sel dapat menentukan perbedaan tipe sel bakteri, seperti bakteri gram positif dan gram-negatif (Putri *et al.*, 2017).

Bakteri gram negatif memperlihatkan tiga lapis pembungkus sel, yaitu : membran luar (OM=outer membran), lapisan tengah yang merupakan dinding sel atau lapisan murein yang terdapat ruang periplasma, dan membran plasma dalam.

Membran luar mengandung fosfolipid, lipopolisakarida (LPS) atau yang diketahui juga sebagai antigen permukaan O somatik atau endotoxin, dan berbagai protein, dimana protein (porin) dan lipoprotein jumlahnya sangat banyak. Membran luar tersedia sebagai organel aktif secara fisiologik, yang membentuk suatu barrier untuk senyawa hidrofilik, berfungsi sebagai molekul penyaring untuk molekul larut-air, terdapat tempat menempel untuk bakteriofaga dan sel inang dan konyugasi bakteri, dalam hal patogenesis dapat mengandung protease dan enzim lain, aggresin, evasin, dan toxin untuk sel inang, menutup dan melindungi dari racun lingkungan dan lisis peptidoglikan dinding sel, komponen gel periplasmik, dan membran plasma, melepaskan vesicular bleb dari LPS dan protein yang tersedia sebagai fungsi sekretori, dan memiliki LPS dan protein yang mengandung molekul sinyal yang dirasakan/diterima oleh sel hewan (Putri *et al.*, 2017).

Membran luar mengandung protein unik yang berbeda dari protein membran plasma. Dua lembaran (leaflet) luar dan dalam pada membran luar juga merupakan bentuk asimetrik yang unik. Pada bakteri enterik (contoh, *Salmonella*), fosfatidiletanolamin terdapat seluruhnya pada bagian dalam, sedangkan lipopolisakarida hidrofilik, anionik terdapat hanya pada bagian luar dari membran luar. Pada spesies *Neisseria* dan *Haemophilus*, fosfolipid terdapat pada bagian luar dan dalam dari membran plasma. Protein yang disebut porin yang terdapat pada membran luar membentuk saluran difusi transmembran. Porin terdapat sebagai saluran untuk senyawa larut-air dengan berat molekul-kecil, atau sebagai reseptor bakteriofaga (virus) (Putri *et al.*, 2017).

Pada sel bakteri gram negatif, titik hubungan di antara membran luar dan 36 dalam disebut sebagai daerah perlekatan atau Bayer junctions. Bayer junction aktif

secara fisiologi. Pada bagian luar merupakan tempat masuknya DNA-yang menempel pada bakteriofaga dan lisis yang diperantarai oleh suatu komplemen. Di bagian dalam, daerah perlekatan memperlihatkan suatu zona pertumbuhan (sebagai tempat septa periannular), dan tersedia sebagai tempat untuk translokasi protein sekretori, protein membran luar, lipopolisakarida, dan polisakarida kapsuler dan sebagai daerah munculnya pili seks dan fagel (Putri *et al.*, 2017).

Daerah periplasma di antara membran luar dan membran sitoplasma diisi dengan suatu cairan kental (gel), yang dikenal sebagai gel periplasma (termasuk protein dan turunan-membran oligosakarida (Membrane-derived Oligosaccharides/ MDOs). Protein gel periplasma merupakan protein terikat-substrat yang menyebabkan konsentrasi substrat dapat melawan gradien dan berbagai enzim hidrolitik. Fluktuasi MDOs kebalikan dari kekuatan ionik medium eksternal, dan dengan cara ini bakteri dapat mengatur osmolaritas sel (Putri *et al.*, 2017).

Membran plasma dan membran luar tebalnya sekitar $0,0075 \mu\text{m}$. Dengan mikroskop elektron transmisi, kedua membran tersebut dilihat dalam irisan melintang membran, memperlihatkan bentuk struktur “sandwich bileaflet-trilayer” yang berurutan: terdapat dua lapisan hidrofilik masing-masing $2,5 \text{ nm}$ (25A), lapisan tengah merupakan suatu lapisan hidrofobik $2,5 \text{ nm}$ yang biasanya disusun oleh rantai alkil asam lemak. Suatu heliks /uliran lipoprotein, satu dari ketiga lapisan yang berikatan secara kovalen pada ujung satu kepada permukaan luar peptidoglikan, menyisipkan ujung lipidnya ke dalam membran luar, menancapkan membran luar kepada sel. Pembungkus sel dapat diisolasi secara bebas dari cairan sitoplasma dengan merusak sel dan sentrifugasi diferensial. Membran dalam dapat dilarutkan dengan sedikit deterjen nonionik, melepaskan ikatan membran luar dari

peptidoglikan yang tidak larut. Membran luar dapat dirusak oleh EDTA, detergen ionik kuat, fenol encer, ekstraksi butanol (Putri *et al.*, 2017).

Peptidoglikan eubakteri Gram-negatif merupakan struktur tipe A. Diikat molekul lipoprotein secara kovalen, dengan mikroskop elektron terlihat sebagai daerah setiap 10-12 nm pada permukaan luar struktur peptidoglikan. Murein tidak larut ada sekitar 1-2% dari berat kering sel, setelah dihancurkan oleh tripsin untuk membuang sejumlah lipoprotein (lebih dari 4% berat kering sel). Sepertiga dari 37 lipoprotein total terikat secara kovalen pada ujung karboksinya melalui urutan sensitif-tripsin, Lys-Tyr-Arg-Lys, kepada unit asam meso-diaminopimelat (DAP) peptidoglikan. Pada ujung-N, karena berikatan kovalen dengan asam lemak jenuh (contoh, palmitat) dan takjenuh (contoh, palmitoleat dan vaksenat) yang disisipkan ke dalam bilayer lipid membran plasma, lipoprotein bersifat lipofilik kuat dan menancapkan membran plasma bagian luar kepada dinding sel. Lipoprotein juga berhubungan dengan protein OmpA. Lipoprotein tidak mengandung histidin, prolin, fenilalanin, atau triptofan. Lipoprotein merupakan antigen permukaan utama dari dua spiroket (tanpa dinding sel) (Putri *et al.*, 2017).

Endotoksin merupakan istilah yang digunakan sebelum ditemukan identitas endotoksin sebagai komponen lipid A dari LPS. Sekitar 100 tahun endotoksin digambarkan sebagai suatu yang tahan-panas, pyrogenik berhubungan dengan sel (penyebab demam), dan toxin mematikan dari bakteri gram-negatif yang bersifat kebalikan dari exotoksin protein tidak tahan-panas, contohnya toksin tetanus, yang ditemukan di luar sel dalam filtrat kultur. Sekitar 50 tahun yang lalu, LPS diisolasi dan ditemukan mengandung aktivitas endotoksik. Selanjutnya, komponen lipid A

dari LPS bakteri gram-negatif endotoksik, memperlihatkan struktur dasar yang identik dan mampu melakukan aktivitas endotoksik (Putri *et al.*, 2017).

Lipopolisakarida (LPS) merupakan suatu gugus amfifil (satu ujung hidrofilik, ujung lain hidrofobik), dengan tiga daerah : daerah I (polisakarida Ospesifik), daerah II (core polisakarida), dan daerah III (lipid A). Beberapa bakteri, sebagai contoh, spesies *Neisseria*, dan *Haemophilus*, yang tidak menghasilkan polisakarida daerah I, menghasilkan polimer terpendek yang disebut lipooligosakarida (LOS) yang tercatat sebagai daerah II. Spesifisitas serologik terutama terletak pada daerah I, juga kadang-kadang daerah II, dan pusat bioaktif, atau endotoxin, pada daerah III. Lipid A, dengan asam lemak pada ujung satu dan grup fosfat pada ujung lainnya, juga merupakan amfifil (Putri *et al.*, 2017).

2.2.6 Faktor Virulensi

Shigella sp. merupakan penyebab utama disentri basiler yang berada seluruh dunia. Gejala disentri basiler meliputi diare berdarah, kram perut, dan demam. Kemampuan *Shigella sp.* untuk menyebabkan penyakit telah dikaitkan dengan faktor virulensi yaitu plasmid virulensi, toksin dan quorum sensing (Yang, 2015).

2.2.6.1 Plasmid Virulensi

Shigella sp. menggunakan Sistem Sekresi Tipe III untuk mengirimkan protein efekturnya ke sitoplasma sel inang. Beberapa protein efektor yang dikodekan pada plasmid virulensi *Shigella sp.* memungkinkan patogen menyerang sel inang dan bergerak melalui sitoplasma eukariotik. Banyak dari protein yang sama ini membantu patogen menempel pada dinding sel inang. Invasi antigen B plasmid (IpaB) memulai pengikatan pada sel inang sementara juga memulai jalur yang

membunuh makrofag setelah infeksi, IpaC mengaktifkan protein untuk membentuk kompleks polimerisasi aktin yang memungkinkan *Shigella sp.* untuk bergerak dan menyebar di dalam sel inang (Yang, 2015).

Untuk mengendalikan dan waktu sekresi protein efektor, *Shigella* merasakan kondisi oksigen lingkungan dan menggunakan protein efektor esensial. Dalam lingkungan oksigen rendah, patogen memanjang jarum T3SS sehingga mencegah protein efektor dari yang dikeluarkan. Saat bakteri mendekati sel inang, yang membutuhkan oksigen, bakteri itu menglikosilasi LPS untuk mempersingkat mereka dan dengan demikian mengekspos jarum T3SS. Setelah *Shigella sp.* mentranslokasi IpaB dan IpaC ke ujung jarum, IpaB mengikat ke permukaan sel inang, mengakhiri perubahan dalam membran sel sel inang, dan bekerja dengan IpaC untuk memasukkan jarum ke dalam sel inang (Yang, 2015)

Ekspresi protein IpaB diatur oleh protein faktor transkripsi VirB. VirB diatur oleh faktor transkripsi VirF. VirF dan VirB adalah regulator transkripsi virulensi yang dikodekan pada virasmeni plasmid, mengendalikan ekspresi gen yang terkait virulensi. VirF secara langsung mengaktifkan ekspresi gen virulensi *icsA* dan *virB*. Gen *icsA* mengkodekan protein IcsA (VirG), yang berinteraksi langsung dengan protein Wuralott-Aldrich syndrome (N-WASP). N-WASP pada gilirannya merekrut nuklear aktin (Arp2/3) dalam sel inang. Proses ini mengarah pada polimerisasi tidak langsung dari aktin sel inang untuk memajukan pergerakan intraseluler bakteri (Yang, 2015).

2.2.6.2 Toksin

Shigella sp. memproduksi toksin dimana akan berikatan dengan reseptor dan menyebabkan aktivasi proses sekresi sehingga terjadi diare cair yang merupakan

gejala awal penyakit. Selanjutnya, perjalanan penyakit melibatkan usus besar dan invasi jaringan sekitar. *Shigella sp.* menghasilkan toksin yang dapat dibedakan menjadi tiga jenis yaitu : Shigella enterotoksin 1 (ShET-1), Shigella enterotoksin 2 (ShET-2), dan toksin Shiga (Stx). ShET-1 dan ShET-2 memiliki kemampuan untuk menginduksi sekresi cairan ke dalam usus, sehingga menyebabkan gejala diare berair yang parah. ShET-1 merupakan racun AB yang mengandung satu subunit A dan beberapa subunit B, yang dikodekan oleh gen set1A dan set1B pada kromosom. Subunit B dapat berikatan dengan reseptor spesifik pada sel target. Subunit A tunggal melakukan reaksi enzimatik toksik dalam sel. ShET-2 dikodekan oleh gen sen pada plasmid virulensi dan disekresikan oleh T3SS. ShET-2 memiliki kemampuan untuk menginduksi proses inflamasi sel epitel melalui sekresi IL-8 (Yang, 2015).

Shiga toksin (Stx) adalah eksotoksin yang hanya diproduksi oleh *S. dysenteriae* serotipe 1 dan serotipe E. coli tertentu (Pacheco dan Sperandio, 2012). Stx merupakan sitotoksik untuk berbagai jenis sel dan bertanggung jawab untuk pengembangan lesi vaskular di usus besar, ginjal, dan sistem saraf pusat. Stxs menampilkan struktur AB₅-toksin yang mengandung subunit A enzimatik yang secara kovalen terkait dengan lima subunit B, yang dikodekan oleh stxA dan gen stxB, masing-masing, pada kromosom. Subunit A merupakan protein sitotoksik yang bekerja pada komponen 28S rRNA ribosom eukariotik dan menghambat sintesis protein serta merusak sel oleh apoptosis . Pentamer subunit B mengarahkan bentuk pengikatan holotoxin ke reseptor Gb₃ glikolipid yang sensitif pada permukaan sel eukariotik. Setelah mengikat Gb₃, Stx diinternalisasi oleh endositosis dan diangkut dari endosom awal ke jaringan trans-Golgi dan kemudian

ke retikulum endoplasma. Setelah diinternalisasi, subunit A dibelah menjadi fragmen A1 k1A A1 yang aktif secara enzimatis dan fragmen 4 kDa A2 oleh Furin. Hanya fragmen A1-toksin yang ditranslokasi ulang ke sitoplasma dan memicu proses apoptosis sel (Ranjbar, 2016).

2.2.6.3 Quorum Sensing

Quorum sensing adalah mekanisme pensinyalan di mana bakteri memodulasi sejumlah fungsi seluler (gen), termasuk sporulasi, pembentukan biofilm, produksi bakteriosin, respons virulensi, serta yang lainnya. Penginderaan quorum adalah mekanisme komunikasi sel-ke-sel dan dimediasi oleh sinyal kimia ekstraseluler yang dihasilkan oleh bakteri ketika kepadatan sel tertentu tercapai. Ketika konsentrasi sinyal (dan populasi sel) cukup tinggi, target gen atau gen diaktifkan atau ditekan. Quorum sensing meningkatkan kemampuan bakteri untuk memiliki akses ke nutrisi atau ke lingkungan yang lebih menguntungkan dan meningkatkan pertahanan bakteri terhadap inang eukariotik, dan menghindari tekanan lingkungan (Weiner *et al.*, 2016).

Quorum sensing pada bakteri gram negatif dapat menghasilkan *autoinduser*, *N-acyl homoserine lactone* (AHL), melalui sintesis AHL. Pada konsentrasi rendah, molekul AHL dari ekstraksel masuk ke dalam sitoplasma melalui ATP-dependent transport. Sedangkan pada konsentrasi tinggi, molekul AHL dapat berdifusi pasif masuk ke dalam sel. Ketika konsentrasi AHL mencapai ambang batas (*Quorum state*), molekul AHL akan berinteraksi dengan protein regulator R, yang dikenal sebagai regulator transkripsi. Kemudian kompleks R-

AHL akan berikatan dengan promoter pada target dan memulai proses transkripsi (Bouyahya *et al.*, 2017).

Quorum sensing mengatur ekspresi faktor virulensi dalam berbagai macam patogen, termasuk anggota Enterobacteriaceae. Studi ekspresi gen virulensi *Shigella sp.* telah menunjukkan bahwa ekspresi maksimal gen yang mengkode sistem sekresi tipe III dan substratnya dan aktivitas maksimal organel virulensi ini terjadi pada kepadatan sel yang tinggi. Dalam hal ini menunjukkan bahwa ekspresi operasi invasi *ipa*, *mxi*, dan *spa* maksimal pada bakteri fase-stasioner dan bahwa media terkondisi yang berasal dari kultur fase-stasioner. Sebaliknya, ekspresi *virB*, faktor transkripsi penting untuk ekspresi lokus invasi dan memuncak pada fase log akhir, dengan demikian, ekspresi *virB* ditingkatkan oleh sinyal yang hadir dalam media terkondisi yang berasal dari kultur fase log akhir. Autoinducer 2 (AI-2), molekul pensinyalan kuorum yang aktif pada fase log akhir, disintesis oleh spesies *Shigella sp.* dan terbukti bertanggung jawab atas pengamatan puncak ekspresi *virB* (Ashida *et al.*, 2015).

Organisme invasif seperti spesies *Shigella* dapat mengirim, menerima, dan menanggapi sinyal yang menunjukkan kepadatan populasi baik di lumen usus sebelum invasi (sinyal berasal dari flora normal) dan dalam sitosol sel yang terinfeksi (sinyal berasal dari *Shigella*). Ekspresi *ipa*, *mxi*, dan *spa* operon dan aktivator transkripsi yang mengatur ekspresi *virB* diperlukan untuk penetrasi sel host dan penyebaran antar sel (Pilla *et al.*, 2017). *Shigella* menggunakan sinyal kuorum untuk mengatur ekspresi gen virulensi, satu atau lebih gen ini akan dipengaruhi, karena masing-masing diperlukan selama semua fase siklus infeksi. Molekul pensinyalan yang secara dekat mencerminkan AI-2 dalam aktivitas

temporal meningkatkan ekspresi *virB* dan memberikan dorongan untuk menyelidiki peran *luxS* dan AI-2 dalam ekspresi *virB* dan virulensi *Shigella* (Weiner *et al.*, 2016).

Shigella dan EIEC menghasilkan molekul pensinyalan kuorum AI-2. Selain itu, salah satu target sistem pensinyalan *Shigella* AI-2 adalah *VirB*, faktor transkripsi yang penting untuk ekspresi virulensi *Shigella*. Memang, ekspresi *virB* maksimal membutuhkan sistem AI-2 quorum sensing fungsional. Temuan ini menambah kepadatan populasi pada induksi termal sebagai cara kedua untuk mengontrol ekspresi *virB* dan elaborasi sifat-sifat virulensi. Induksi *virB* yang dimediasi AI-2 dapat mencerminkan aktivitas elemen responsif AI-2 yang epistatik terhadap *virB*. Salah satu target yang mungkin dari pensinyalan AI-2 yang mengatur ekspresi *virB* adalah H-NS. Studi oleh Withers dan Nordstrom menunjukkan bahwa pensinyalan AI-2 dapat menargetkan proses seluler yang dikonservasi yang memengaruhi replikasi DNA, karena media terkondisi yang mengandung AI-2 menghambat replikasi DNA dan pembelahan sel. Ada kemungkinan bahwa modulasi ekspresi *virB* dalam menanggapi kepadatan populasi secara tidak langsung mencerminkan modifikasi AI-2 yang dimediasi oleh H-NS (Di Martino *et al.*, 2016).

Fungsi sistem penginderaan kuorum AI-2 yang sangat terkonservasi dalam patogen intraseluler *Shigella* fakultatif. Temuan ini konsisten dengan ekologi patogen. *Shigella* secara efisien menginvasi sel inang dan berkembang di sitosol eukariotik. Dengan demikian, organisme ini kemungkinan terkena level AI-2 luminal tinggi hanya untuk waktu yang singkat. Alih-alih mengeksploitasi sinyal yang mungkin hanya ada di lingkungan bersama dengan flora usus, *Shigella*

mengeksploitasi isyarat lingkungan, suhu, yang terdistribusi secara seragam di jaringan inang baik di dalam lumen usus dan dalam sitosol epitel kolon. Sinyal tunggal ini memungkinkan ekspresi faktor virulensi tingkat tinggi yang penting untuk keberhasilan patogen di beberapa lingkungan host. Sebagai contoh, protein Ipa, Mxi, dan Spa diperlukan dalam lumen usus untuk mengarahkan invasi sel inang serta sel di dalam untuk meningkatkan penyebaran antar sel. Oleh karena itu, kami mengusulkan bahwa pensinyalan AI-2 mungkin bukan mekanisme yang digunakan untuk memodulasi ekspresi gen virulensi untuk patogen bakteri yang menjajah jaringan inang yang tidak ditempati oleh flora normal. Kemungkinan ini harus dipertimbangkan ketika para peneliti mengejar terapi yang menargetkan dan mengurangi ekspresi gen virulensi dengan mengganggu sintesis AI-2 (32). Terapi-terapi ini, yang mungkin terbukti efektif dalam mengendalikan kolonisasi oleh luminal patogen usus, mungkin tidak efektif dalam mengendalikan invasi dan penyebaran organisme, seperti *Shigella*, yang menjajah ceruk-ceruk intraseluler dan lapisan subepitel usus, yang keduanya biasanya bebas flora penduduk (Dorman, 2018).

2.2.6.4 Siderofor

Kelangsungan hidup *Shigella* dalam inang sangat tergantung pada kemampuan patogen untuk memperoleh nutrisi penting, seperti zat besi. Sebagai pertahanan kekebalan bawaan terhadap patogen yang menyerang, tingkat zat besi yang tersedia secara biologis di dalam inang manusia dipertahankan pada tingkat yang lebih rendah, dengan penyerapan unsur dalam heme dan senyawa inang yang mengikat zat besi lainnya. Apabila terjadi defisiensi besi maka bakteri menghasilkan suatu agen “chelator”(pengikat besi), yang disebut siderophore, yang

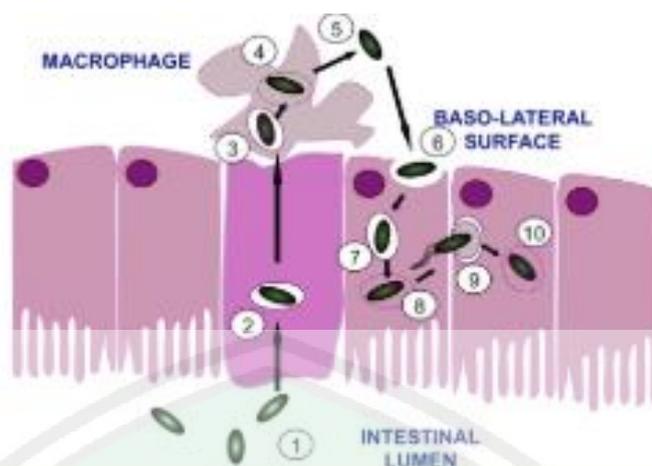
diekresikan ke sekelilingnya dan berfungsi untuk mengikat besi dan mengangkutnya ke dalam sel dengan menggunakan protein reseptor yang sesuai dan mekanisme transpor yang cocok. Sintesis siderophore di bawah kendali gen kromosomal atau plasmid. Dalam semua bentuk hubungan inang-parasit (komensal dan konvensional dan patogen oportunistik), bakteri berkompetisi dengan inangnya dalam hal besi. Protein eukariot seperti transferrin dan laktoferrin, dengan afinitas besi tinggi, menyebabkan sel prokariotik kekurangan besi. Suatu produksi yang menghasilkan siderophore dapat menentukan nasib suatu invader. Dari gambaran tersebut, siderophore dapat dipertimbangkan sebagai satu faktor virulensi dari bakteri *Shigella sp.* (kemampuan invasi) (Wei, 2016).

2.2.7 Patogenesis *Shigella sp.*

Shigella sp. menyebar melalui penularan *fecal-oral* dan dari manusia ke manusia. *Shigella sp.* akan masuk ke dalam tubuh dengan menelan makanan atau air yang terkontaminasi. Ketika *Shigella sp.* tiba di usus, bakteri diangkut melintasi lapisan epitel kolon melalui sel-M. Setelah melewati sel-M, *Shigella sp.* ditelan oleh makrofag yang menetap di kantong limfoid yang mendasarinya. Namun, *Shigella sp.* akan menggunakan T3SS untuk menyembunyikan berbagai faktor virulensi, untuk menghindari fagosom dan menginduksi apoptosis makrofag. Kematian makrofag memicu pelepasan sitokin proinflamasi seperti IL 1 β dan IL 18. IL 1 β memicu peradangan usus kuat dan IL-18 terlibat dalam menghasilkan respons antibakteri yang efektif. IL-18 mengaktifkan sel-sel pembunuh alami (NK) dan mendorong produksi gamma interferon (IFN- γ), sehingga memperkuat respon imun bawaan (*innate immune responses*) (Sureshabu, 2018).

Setelah dilepaskan dari makrofag yang mati, *Shigella sp.* akan bergerak dengan polimerasi aktin yang distimulasi oleh *GTPase Rho-family* sehingga mampu menginvasi sel epitel (EC) sekitar dan bermultiplikasi. Invasi EC akan menimbulkan respons peradangan yang kuat. Sistem pengawasan intraseluler yang dimediasi Nod1 merasakan fragmen peptidoglikan bakteri yang dirilis oleh *Shigella sp.* dan mengaktifkan faktor nuklir κ B (NF- κ B), yang memicu regulasi dan sekresi kemokin chemokine IL-8. IL-8 memediasi rekrutmen besar leukosit neutrofil polimorfonuklear (PMN) ke lokasi infeksi (Sureshabu, 2018).

PMN menghancurkan integritas lapisan epitel, sehingga memungkinkan lebih banyak bakteri luminal untuk mencapai submukosa tanpa membutuhkan sel M. Dengan demikian, pembunuhan makrofag, penghancuran lapisan epitel, dan masuknya PMN secara masif memperburuk infeksi bakteri dan lesi jaringan. Proses-proses ini sangat penting untuk pengembangan diare dan patologi khas dari disentri basiler. Namun, pada akhirnya, PMN direkrut ke lokasi infeksi untuk menjebak dan membunuh bakteri, sehingga menyelesaikan infeksi. Selain itu, IFN- γ memainkan peran penting untuk resistensi bawaan terhadap infeksi *Shigella sp* (Sureshabu, 2018).



Gambar 2.9 Patogenesis *Shigella sp.* Patogenesis seluler *Shigella sp.* melewati penghalang EC melalui sel M dan bertemu dengan makrofag. Bakteri bebas menginvasi EC dari sisi basolateral, bergerak ke sitoplasma dengan polimerisasi aktin, dan menyebar ke sel yang berdekatan. Pensinyalan proinflamasi oleh makrofag dan EC lebih lanjut mengaktifkan respon imun bawaan yang melibatkan sel NK dan menarik PMN. PMN memfagositosis dan membunuh *Shigella sp.*, sehingga berkontribusi pada resolusi infeksi.
(Sumber: Winner *et al.*, 2016).

2.2.7 Mekanisme Resistensi Bakteri

Agen antibakteri dapat efektif setelah mencapai lokasi aksi spesifik dan terakumulasi pada konsentrasi spesifik. *Efflux pump* (EPs) bertindak sebagai sistem ekspor atau eflux yang dapat menyebabkan resistensi terhadap berbagai agen antibakteri. Melalui mekanisme ini, zat antibakteri dipompa keluar lebih cepat daripada waktu yang diperlukan untuk berdifusi dalam sel bakteri dan akibatnya, konsentrasi intrabakteri menjadi jauh lebih sedikit daripada nilai efektif. Sebagai contoh, sistem sintesis protein seperti ribosom terletak di sitoplasma. Sehingga, inhibitor sintesis protein dipaksa untuk melewati membran sel dan kemudian terakumulasi hingga konsentrasi yang cukup untuk menginduksi blokade sintesis protein. Dengan mengurangi konsentrasi *intrabacterial inhibitor*, yang dimediasi oleh EP, prosedur sintesis protein bakteri dapat dilakukan tanpa interupsi (Huda, 2016).

EP mampu membawa molekul lipofilik atau amphipathic keluar dari bakteri. Dalam aspek lain, mereka juga mampu mengangkut satu jenis substrat dan atau berbagai agen antibakteri yang berbeda secara struktural, yang telah terdeteksi dan ditemukan pada beberapa bakteri yang kebal obat. Lima keluarga besar EP telah dikenali pada bakteri, yang meliputi fasilitator utama superfamili (MFS), multidrug dan penghabisan racun (MATE), divisi resistensi-nodulasi (RND), resistensi multidrug kecil (SMR), dan kaset pengikat ATP (ABC). Keluarga MFS, ABC, SMR, dan MATE terutama ditemukan pada bakteri Gram-positif dan negatif, sedangkan superfamili RND secara khusus ditemukan pada bakteri Gram-negatif (Huda, 2016).

Resistensi antibiotik melalui mekanisme ini dapat diamati dalam berbagai bakteri gram positif dan negatif patogen dan jamur. Oleh karena itu, menggunakan inhibitor EP, EPI, dalam kombinasi dengan agen antibakteri dapat direnungkan sebagai pendekatan yang efektif untuk tujuan memerangi infeksi mikroba (Huda, 2016).

2.3 Disentri Basiler

2.3.1 Definisi

Disentri basiler atau shigellosis adalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri genus *Shigella*. Bakteri *Shigella* menginvasi epitel yang melapisi ileum, usus besar, dan rektum (Kotloff, 2018). Disentri basiler merupakan salah satu masalah kesehatan di di negara berkembang dengan tingkat higienitas yang rendah. Disentri basiler menyebar melalui transmisi *fecal oral* (Kroser, 2018).

2.3.2 Epidemiologi

Pada skala global, dari perkiraan 165 juta episode disentri yang diperkirakan terjadi setiap tahun, 99% terjadi di negara berkembang, terutama pada anak-anak. Pada 2013-2016, tinjauan sistematis melaporkan Shigella ke bertanggung jawab atas 1,1 juta kematian per tahun, 61% di antaranya pada anak di bawah 5 tahun dimana data ini berbasis tentang prevalensi dalam kasus diare dan data yang terbatas pada tingkat fatalitas kasus di antara anak-anak yang dirawat di rumah sakit (Sureshbabu, 2018).

Pada 2013, estimasi ini menggunakan strategi pemodelan yang serupa, tetapi dengan risiko kematian yang diperbarui data, menunjukkan antara 28.000 dan 48.000 kematian setiap tahun di antara anak di bawah 5 tahun karena Shigellosis. Pada 2016, analisis molekuler kuantitatif dari Global Enteric Multicentre Study (GEMS) mengidentifikasi peningkatan beban disentri dan melaporkannya bahwa *shigella dysenteriae* sebagai patogen utama di antara enam patogen penyebab utama yang menyebabkan diare pada masa kanak-kanak. Data GEMS dan pertimbangan risiko tidak langsung malnutrisi yang timbul sehubungan dengan episode diare dapat menyebabkan revisi lebih lanjut perkiraan kematian akibat disentri.

Negara-negara berkembang sering mengalami kejadian disentri basiler karena kepadatan dan sanitasi yang buruk. Bayi, anak-anak yang tidak diberi ASI atau kurang gizi dan orang dewasa berusia > 50 tahun memiliki risiko kematian yang tinggi (WHO, 2016). Bakteri *S. boydii* dan *S. sonnei* biasanya menyebabkan gejala yang cukup ringan (berair atau diare berdarah saja), *S. flexneri* dan *S. dysenteriae* masing-masing bertanggung jawab atas endemik dan epidemi di negara

berkembang, dengan tingkat penularan tinggi dan signifikansi fatalitas kasus disentri basiler. *Shigella dysenteriae* (Tipe 1, juga dikenal sebagai *Shiga bacillus*) mampu menyebabkan penyakit yang lebih parah dan berkepanjangan karena produksi sitotoksin kuat (*Shiga*) yang dikaitkan dengan pengembangan sindrom hemolitik-uraemik (Huressabubu, 2018).

2.3.3 Faktor Risiko

- a. Jenis Kelamin, didapatkan pada perempuan mempunyai resiko lebih tinggi dibandingkan laki-laki karena perempuan sering terlibat dalam kegiatan rumah tangga yang menjadi sumber patogen (Ranjbar, 2017).
- b. Tingkat pendidikan, semakin tinggi pendidikan maka pengetahuan yang dimiliki banyak dan semakin rendah pendidikan maka pengetahuan yang dimiliki cukup rendah terutama pengetahuan dalam merawat anak (Ranjbar, 2017).
- c. Perilaku cuci tangan yang tidak bersih akan meningkatkan resiko diare sebab makanan yang telah diolah dengan higienis bisa menjadi makanan terkontaminasi akibat penjamahan oleh tangan kotor. Perilaku cuci tangan adalah kebiasaan yang menghubungkan kebersihan seseorang dalam mencegah penularan patogen yang menyebabkan (Kemenkes RI, 2017).
- d. Kurangnya air bersih, dimana sumber air bersih yang tidak terjaga higienitasnya dapat menyumbang 88% penyebab diare. Kualitas air bersih yang tinggi dapat mengurangi risiko terkena diare sebesar 20%. Air yang tidak tercemar (bersih) bisa menjadi lokasi terbaik untuk berkembang biakan bakteri penyebab penyakit, salah satunya bakteri penyebab disentri (Carrel *et al*, 2017).

- e. Sarana pembuangan kotoran yang tidak memadai, seperti jamban yang tidak sesuai dengan syara. Syarat untuk membuat jamban seperti pembuatan jamban perlu diperhatikan jarak dan sumber air bersih/ sumur terdekat yaitu > 10 meter, meghindarkan munculnya lalat, tidak bebau, kontruksi bangunan yang kokoh dan kuat (Kemenkes RI, 2016).
- f. Pengelolaan sampah yang tidak baik, merupakan pembungan sampah dengan cara dibuang ke sungai atau dibuang sembarangan atau dibakar agar tidak menjadi tempat bekembangnya vektor dan perantara penyakit (Kemenkes RI, 2017).

2.3.4 Etiologi

Penyebab disentri adalah bakteri *shigella* dan amoeba. Bakteri *shigella* merupakan penyebab disentri yang terpenting dan tersering ($\pm 60\%$ kasus disentri yang dirujuk serta hampir semua kasus disentri yang berat dan mengancam jiwa disebabkan oleh Bakteri *Shigella* sp.). Dan amoeba adalah penyebab disentri amoeba (*Entamoeba hystolitica*) dimana lebih sering terjadi pada anak usia > 5 tahun (William, 2016).

2.3.5 Patofisiologi

Disentri basiler menyebar dengan cara transmisi fecal-oral. Cara penularan bisa juga karena mengkonsumsi makanan atau minuman yang terkontaminasi, kontak dengan barang yang terinfeksi, atau melalui seksual. Hewan perantara seperti lalat mampu menyebarkan penyakit dengan membawa kotoran yang terkontaminasi. Untuk menyebabkan suatu penyakit, sedikitnya 10 basil *Shigella*

dysenteriae sedangkan 100-200 basil *Shigella sonnei* atau infeksi *Shigella flexneri*. Virulensi *Shigella* mampu menahan pH rendah pada asam lambung. Masa inkubasi bakteri ini dari 12 jam sampai 7 hari, tapi biasanya 2-4 hari (Sureshabu, 2016).

Infeksi shigella hampir selalu terbatas di saluran cerna. Penyakit ini sangat menular karena menghasilkan dosis infeksi sebesar 10^3 organisme. Proses patogenesis yang terlibat yaitu berawal dari invasi ke sel epitel mukosa, kemudian menginduksi proses fagositosis, berhasil meloloskan diri dan keluar dari vakuola fagositik, bermultiplikasi dan menjalar ke sel sekitarnya. Mikroabses pada dinding usus besar dan ileum terminal menyebabkan nekrosis membran mukosa, ulserasi superfisial, perdarahan dan pembentukan pseudomembran pada daerah ulserasi. *Pseudomembran* ini terdiri dari fibrin, leukosit, debris sel, membran mukosa yang nekrotik, dan bakteri. Saat proses mereda, jaringan granulasi mengisi ulkus dan terbentuk jaringan parut (Ranjbar, 2017).

2.3.6 Manifestasi Klinis

Munculnya gejala disentri ditandai adanya gangguan pada usus yaitu menyebabkan inflamasi pada kolon sehingga menyebabkan nyeri perut, dan BAB berdarah. Tempat alamiah bakteri penyebab disentri berada di usus besar manusia. Infeksi *Shigella dysenteriae* terbatas pada saluran pencernaan saja, dan penyebaran melalui aliran darah sangat jarang ditemui. Bakteri *Shigella dysenteriae* mampu menyebabkan tiga bentuk diare yaitu disentri sederhana (tinja lembek disertai adanya darah, mukus, atau pus), diare berair, dan diare kombinasi antara disentri sederhana dengan *watery diarrhea*.

Pasien yang terinfeksi bakteri *Shigella sp.* biasanya mulai mengalami gejala 1 hingga 2 hari setelah kontak dengan kuman. Gejala disentri meliputi: diare (terkadang berdarah), demam, sakit perut, merasa perlu untuk buang air besar bahkan ketika ususnya kosong. Beberapa orang dengan shigellosis tidak akan memiliki gejala apa pun. Gejala biasanya berlangsung 5 hingga 7 hari, tetapi beberapa orang mungkin mengalami gejala mulai dari beberapa hari hingga 4 minggu atau lebih. Dalam beberapa kasus, mungkin diperlukan beberapa bulan sebelum kebiasaan buang air besar (misalnya, seberapa sering seseorang buang air besar dan konsistensi tinja mereka) sepenuhnya normal (Berkley, 2018).

Orang dengan diare harus menghubungi penyedia layanan kesehatan mereka jika mereka memiliki gejala-gejala seperti demam, diare berdarah kram perut parah atau nyeri tekan, dan orang yang berada dalam kesehatan yang buruk atau yang memiliki sistem kekebalan yang melemah dari penyakit seperti HIV / AIDS, atau kemoterapi untuk kanker, lebih mungkin untuk sakit dalam jangka waktu yang lebih lama jika mereka memiliki shigellosis (Berkley, 2018).

Gejala yang jarang diderita oleh pasien disentri adalah sekitar 2% 1-4 orang yang terinfeksi dengan bakteri *Shigella flexneri* akan mengalami artritis pasca infeksi, yang menyebabkan nyeri sendi, iritasi mata, dan buang air kecil yang menyakitkan. Sindrom ini hanya terjadi pada orang yang memiliki susunan genetik tertentu yang menempatkan mereka pada risiko. Hal ini bisa berlangsung berbulan-bulan atau bertahun-tahun, dan dapat menyebabkan radang sendi kronis. Artritis pasca infeksi biasanya tidak terjadi pada orang yang sakit dari jenis *Shigella* lain, yang disebut *S. Sonnei*, *S. boydii*, atau *S. Dystenteriae* (CDC, 2018).

Adapun manifestasi ekstraintestinal disentri basiller seperti gejala pernapasan, gejala neurologis (meningismus), dan *Hemolytic Uremic Syndrome*. Untuk mendiagnosis secara pasti bisa dilakukan pulasan feses yang menunjukkan adanya PMN dan sel darah merah. Kultur feses dapat bermanfaat untuk mengidentifikasi bakteri atau melihat sensitivitas antibiotik (Mazumder, 2016).

2.3.7 Pemeriksaan Penunjang

2.3.7.1 Hematologi

Jumlah WBC total tidak mengungkapkan temuan yang konsisten, akan tetapi pergeseran ke kiri (peningkatan jumlah sel band) dalam jumlah WBC diferensial pada pasien dengan diare menunjukkan disentri basiler. Leukopenia atau reaksi leukemoid kadang terdeteksi. Kultur darah harus dilakukan pada anak-anak yang tampak terinfeksi, sangat muda, sakit parah, kurang gizi, atau *immunocompromised* karena mampu meningkatkan risiko terjadinya bakteremia (Sureshabu, 2018).

2.3.7.2 Pemeriksaan feses

Isolasi *Shigella* dari tinja atau spesimen usap dubur bersifat diagnostik tetapi kurang spesifik. Mikroskopi rutin dapat mengungkapkan lembaran leukosit pada noda berwarna metilen biru, yang merupakan tes sensitif untuk kolitis tetapi tidak spesifik untuk spesies *Shigella*. Pada sekitar 70% pasien dengan disentri basiler bisa terdeteksi melalui pemeriksaan feses (Sureshabu, 2018).

2.3.7.3 Kultur tinja

Sampel untuk kultur tinja harus diperoleh dalam semua kasus yang diduga terkena disentri basiler. Hasil dari kultur tinja paling besar pada awal perjalanan penyakit. Adapun pedoman untuk mendapatkan spesimen untuk meningkatkan hasil adalah sebagai berikut: (Sureshabu, 2018).

- a. Setelah pengumpulan spesimen, proses pengkulturan harus segera dilakukan. Apabila pemrosesan tertunda, bisa menggunakan media transportasi (misalnya : *Buffered salin gliserol*).
- b. Setelah mengumpulkan sampel feses, segera dilakukan inokulasi pada setidaknya 2 media kultur yang berbeda.
- c. Media untuk meletakkan pesimen bisa menggunakan MacConkey, xylose-lysine-deoxycholate, Hektoen enteric, atau Salmonella-Shigella, atau agar biru eosin-metilen.
- d. Jika pemrosesan tertunda, sampel swab rektal dapat ditempatkan dalam media transpor Cary-Blair atau salin gliserol yang disangga.
- e. Setelah dilakukan inkubasi semalaman, koloni yang tidak berwarna dan tidak berfermentasi dapat diuji dengan aglutinasi lateks untuk menentukan identifikasi awal infeksi Shigella.

(Sureshabu, 2018).

2.3.7.4 Pemeriksaan lain

Alat diagnostik tambahan, seperti probe gen dan analisis tinja PCR untuk gen spesifik seperti ipaH, virF, atau virA dapat mendeteksi kasus yang tidak didiagnosis oleh kultur tetapi biasanya tersedia di laboratorium penelitian (Sureshabu, 2018).

2.3.8 Tatalaksana

2.3.8.1 Terapi medikamentosa

Tanda-tanda penting apabila kondisi pasien yang mengalami perbaikan seperti demam berkurang, darah dalam feses sedikit, dan perbaikan nafsu makan. Jika penyakit mereka tidak terjadi perbaikan dalam dua hari, maka bisa ditransfer dan melakukan perawatan khusus di rumah sakit (WHO, 2016). Untuk anak-anak, adapun indikasi ke rumah sakit : (a) Bayi muda dengan usia kurang dari dua bulan (b) anak yang terlihat lesu, memiliki perut kembung dan nyeri tekan atau kejang-kejang (c) anak dengan kondisi lain yang memerlukan perawatan di rumah sakit.

a. Terapi antibiotik

Pemberian antibiotik harus diberikan, jika mungkin bisa didasarkan pada data kerentanan dari strain *Shigella* yang diisolasi di daerah tersebut. Resistensi *Shigella* terhadap ampisilin, kotrimoksazol dan asam nalidixat telah menyebar dan ini tidak lagi direkomendasikan. Ciprofloxacin, sebelumnya digunakan sebagai obat cadangan untuk mengobati disentri basiller, sekarang adalah obat pilihan untuk semua pasien dengan darah diare, terlepas dari usia mereka. Azitromisin juga dianggap sebagai alternatif untuk perawatan orang dewasa. Ketika antimikroba yang efektif diberikan, perbaikan harus jelas di dalam 48 jam

Pada pedoman WHO (2016) saat ini mendukung penggunaan fluoroquinolones (lini pertama), β -laktam (lini kedua) dan sefalosporin (lini kedua) sesuai dengan bukti saat ini tersedia dan internasional lainnya pedoman, dan tidak ada bukti kuat untuk berubah panduan ini. Azitromisin dapat dianggap sebagai terapi lini kedua yang sesuai di daerah dengan yang diketahui tingginya tingkat non-kerentanan ciprofloxacin. Cefixime juga merupakan alternatif yang

masuk akal, meskipun penggunaannya harus seimbang terhadap risiko peningkatan antimikroba resistensi dan penyebaran *extended-spectrum β -lactamase* (ESBLs) (Phoebe, 2018).

Tabel 2.4 Antibiotik untuk Disentri Basiler

| Guideline | Rekomendasi |
|---------------------------------------|---|
| American Academy of Pediatrics (2015) | Terapi empiris : a. Ciprofloxacin 15 mg / kg bb selama 3 hari b. Azitromisin 12 mg / kg pada hari 1; kemudian 6 mg / kg pada hari 2–4 (total kursus: 4 hari) c. Ceftriaxone parenteral (50-75 mg / kg setiap hari) selama 2-5 hari - untuk pasien yang sakit parah |
| BMJ Clinical Evidence (2016) | Terapi empiris (sambil menunggu sensitivitas lokal) : Terapi lini pertama : a. Ciprofloxacin: 15 mg/kg (maks 500 mg) PO bd, atau b. Norfloxacin: 10 mg/kg (maks 400 mg) PO bd Terapi lini kedua: a. Ceftriaxone: 50-100 mg/kg IM sekali sehari (dewasa: 1-2 gr intramuskuler sekali sehari), atau b. Azitromisin: 6-20 mg/kg PO sekali sehari |
| British National Formulary (2016) | Ciprofloxacin 20 mg/kg bd (dosis lebih tinggi dari 15 mg/kg yang direkomendasikan sebelumnya) |

Sumber: Phoebe, 2018

b. Terapi untuk Dehidrasi dan Asupan Makan

Dehidrasi karena kehilangan air dan elektrolit. *Oral Rehydration Solutions* (ORS) dapat digunakan untuk semua pasien, termasuk anak-anak. Jika ORS tidak tersedia, bisa diganti dengan menggunakan larutan rehidrasi oral sendiri

dengan cara menyiapkan air beras yang diberi sedikit garam, air kelapa hijau atau bahkan air biasa dapat diberikan. Penggunaan ringer laktat IV adalah juga bisa digunakan untuk kasus rehidrasi, tapi penggunaan pada anak-anak yang kekurangan gizi harus hati-hati karena dapat meningkatkan risiko hipokalemia dan hipoglikemia (WHO, 2016).

Penunjang pemulihan kondisi pasien yang lainnya yaitu intake makanan yang adekuat. Makanan yang dikonsumsi harus kaya akan energi dan protein yang dihaluskan. Anak-anak harus diberi makan setidaknya setiap empat jam. Bayi dan anak-anak yang menyusui harus disusui sesering mungkin. Anak kecil sembuh dari diare berdarah harus diberi makan ekstra setiap hari selama setidaknya dua minggu untuk membantu mereka memulihkan berat badan yang hilang selama sakit (WHO, 2016).

c. Terapi Suportif

Demam harus dikontrol dengan obat antipiretik dan analgetik (parasetamol atau asetaminofen). Pemberian zinc direkomendasikan untuk anak-anak hingga usia lima tahun. Dosis harian adalah 20 mg unsur zinc (seperti seng sulfat, atau seng asetat atau seng glukonat) sekali sehari selama 10 hingga 14 hari (10 mg per hari untuk bayi di bawah enam bulan). Hal tersebut bertujuan untuk mengurangi keparahan dan lamanya diare (WHO, 2016).

2.3.9 Komplikasi

- a. Dehidrasi adalah komplikasi paling umum dari disentri, dan anak-anak harus dinilai dan dikelola untuk dehidrasi terlepas dari komplikasi lain. Berikan cairan sesuai rencana perawatan A, B atau C, yang sesuai.
- b. Apabila anaka mengalami demam tinggi sekitar $\geq 39\text{ }^{\circ}\text{C}$ atau $\geq 102,2\text{ }^{\circ}\text{F}$ maka berikan parasetamol dan pertimbangkan infeksi bakteri yang parah.
- c. Prolaps rektum. Dorong kembali prolaps dubur dengan lembut menggunakan tangan yang dilindungi sarung tangan atau kain basah. Bisa juga dengan menggunakan larutan hangat magnesium sulfat jenuh, dan berikan kompres dengan larutan ini untuk mengurangi prolaps dan edema.
- d. Kejang. Kejang tunggal paling sering terjadi. Jika mereka diperpanjang atau diulang, berikan diazepam. Hindari pemberian diazepam dubur. Selalu periksa hipoglikemia.
- e. Sindrom uremik hemolitik. Jika tes laboratorium tidak memungkinkan, curigai sindrom hemolitik uraemik pada pasien yang mudah memar, pucat, kesadaran berubah, dan output urin rendah atau tidak ada sama sekali.
- f. Megakolon beracun. Megakolon toksik biasanya disertai demam, distensi abdomen, nyeri, dan nyeri tekan disertai hilangnya bunyi usus, takikardia, dan dehidrasi. Berikan cairan IV untuk dehidrasi, berikan tabung nasogastrik, dan mulai antibiotik.

(Sureshababu, 2018).

2.3.10 Pencegahan

Menurut, Kemenkes (2017), langkah-langkah untuk mencegah agar tidak terkena diare yaitu dengan menjaga kebersihan diri dan lingkungan, seperti :

- a. Mencuci tangan harus dengan air mengalir dan sabun atau larutan klorin encer.
- b. Air dan persediaan lain untuk pasien dengan disentri harus disimpan terpisah dari air dan persediaan untuk pasien lain.
- c. Pengumpulan, pengangkutan, dan pembuangan tinja harus diatur secara terpisah dari pasien lain.
- d. Menkonsumsi makanan seimbang yang matang dan bersih.
- e. Selalu menerapkan pola hidup bersih dan sehat agar dapat memutus rantai penyebaran penyebab diare.

2.4 Metode Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses penarikan senyawa metabolit sekunder yang dibantu oleh pelarut. Proses ekstraksi diawali dari gumpalan ekstrak dengan pelarut kemudian terjadi gabungan antara pelarut dan bahan sehingga terjadi pengendapan massa dengan cara difusi (Susanti, 2016).

2.4.1 Pelarut Ekstraksi

Pelarut yang paling sering digunakan adalah air dan bahan kimia organik (mengandung karbon). Pelarut mempunyai sifat seperti mudah menguap, mempunyai titik didih rendah dan meninggalkan substansi terlarut yang didapatkan. Agar bisa memilah antara zat terlarut dengan pelarut yaitu dimana pelarut umumnya terdapat dalam jumlah lebih besar (Mukhriani, 2014).

Pemilihan jenis pelarut harus mempertimbangkan beberapa faktor antara lain selektivitas, kemampuan untuk mengekstrak, toksisitas, kemudahan untuk diuapkan dan harga pelarut. Larutan pengestraksi yang digunakan disesuaikan dengan kepolaran senyawa yang diinginkan. Menurut prinsip *like dissolves like*, suatu pelarut akan cenderung melarutkan senyawa yang mempunyai tingkat kepolaran yang sama. Pelarut polar akan melarutkan senyawa polar dan sebaliknya. Salah satu pelarut yang polar adalah etanol (Suryani, 2016).

Pelarut etanol 96% sering digunakan untuk mengeluarkan senyawa bioaktif karena pelarut etanol mudah untuk menembus membran sel untuk mengekstrak senyawa bioaktif seperti tanin, fenol dan flavonoid dari bahan tumbuhan. Pelarut etanol 96% merupakan pelarut umum yang memiliki indeks polaritas 5,2 sehingga berbagai senyawa baik polar maupun non polar seperti alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, serta steroid dan terponoid yang terkandung pada tumbuhan dapat keluar dari tumbuhan (Dwicahyani, 2018).

2.4.2 *Ultrasound – Assisted Solvent Extraction (UAE)*

Salah satu metode ekstraksi adalah *Ultrasound – Assisted Solvent Extraction (UAE)*. UAE merupakan modifikasi metode maserasi yang memakai *ultrasound* (sinyal dengan frekuensi tinggi, 20 kHz). Wadah yang berisi sampel simplisia diletakkan dalam wadah *ultasonic* dan *ultrasound*. Hal ini tersebut bertujuan untuk memberikan tekanan mekanis pada sel sampai menghasilkan rongga pada sampel (Mukhriani, 2014).

UAE bisa difungsikan untuk mendapatkan kandungan antioksidan yang lebih tinggi dengan waktu yang cepat. Ultrasonik mempunyai sifat *non-destructive* dan

non *invasive*, sehingga dapat dengan mudah diadaptasikan ke berbagai aplikasi. Dengan adanya ultrasonik, maka waktu yang dibutuhkan proses ekstraksi senyawa organik pada tanaman dengan pelarut organik lebih cepat dan pemecahan dinding sel dari bahan keandungan yang ada di dalamnya dapat keluar dengan mudah (Sholihah, 2017)

UAE menggunakan kativasi akustik untuk memproduksi gelembung kativasi sehingga menghasilkan gaya gesek yang tinggi. Hal tersebut bertujuan untuk merusak dinding sel sehingga pelarut dapat masuk ke dalam bahan uji dan meningkatkan kontak antara pelarut dengan senyawa yang akan diekstraksi. Keuntungan UAE yaitu dapat meningkatkan hasil ekstraksi, waktu ekstraksi cepat menggunakan suhu rendah, dan volume pelarut yang sedikit. Sedangkan, kekurangannya adalah memerlukan energi dan biaya yang besar. Rendemen yang dihasilkan dengan menggunakan metode ini lebih tinggi dibandingkan dengan menggunakan metode konvensional (Sholihah, 2017)

2.5 Metode Uji Antimikroba

2.5.1 Metode Difusi cakram

Metode difusi cakram merupakan metode yang sering digunakan di laboratorium mikrobiologi klinis untuk pengujian keefektifan antimikroba secara rutin. Prosedur pertama yang dilakukan dalam metode difusi cakram yaitu menumbuhkan mikroorganisme uji yang terstandarisasi pada pelat agar. Prosedur kedua yaitu cakram kertas cakram (berdiameter sekitar 6 mm) yang sudah mengandung senyawa uji dengan konsentrasi yang sesuai dan ditempatkan pada permukaan agar. Cawan Petri diinkubasi dalam kondisi yang sesuai. Agen

antimikroba akan berdifusi ke dalam agar dan menghambat pertumbuhan mikroorganisme uji dan kemudian dilakukan pengukuran dengan menggunakan parameter zona hambat pertumbuhan bakteri (Balouiri *et al.*, 2016).

Menurut Greenwood (1995) yang disitasi oleh Jamaluddin (2017), efektifitas suatu zat antibakteri bisa diklasifikasikan sebagai berikut yaitu diameter zona hambat > 20 mm termasuk respon hambatan pertumbuhan kuat, diameter zona hambat 16-20 mm termasuk respon hambatan pertumbuhan sedang, diameter zona hambat 1-15 mm termasuk respon hambatan lemah, dan diameter zona hambat 0 mm termasuk respon hambatan tidak ada.

Metode ini memiliki kekurangan yaitu area penghambatan pertumbuhan bakteri tidak berarti kematian bakteri, sehingga tidak dapat membedakan efek bakterisidal dan bakteristatik. Metode difusi cakram tidak tepat untuk menentukan konsentrasi penghambatan minimum (KHM), karena tidak mungkin untuk mengukur jumlah agen antimikroba yang digunakan dalam media agar. Namun demikian, perkiraan KHM dapat dihitung untuk beberapa mikroorganisme dan antibiotik dengan membandingkan zona penghambat dengan algoritma yang telah ditentukan. Metode ini memiliki banyak keuntungan dibandingkan dengan metode yang lain yaitu kesederhanaan, biaya yang murah, dapat menguji jumlah mikroorganisme dan agen antimikroba yang sangat banyak (Balouiri *et al.*, 2016).

2.5.2 Metode Dilusi

Metode dilusi merupakan metode yang paling tepat dalam menentukan nilai KHM, karena metode ini mampu untuk memperkirakan konsentrasi agen antimikroba yang diuji dalam agar (dilusi agar) atau media kaldu (*macrodilution*

atau mikrodilusi). Baik metode kaldu atau dilusi yang dapat digunakan untuk mengukur aktivitas antimikroba *in vitro* secara kuantitatif terhadap bakteri dan jamur. Nilai KHM yang diperoleh didefinisikan sebagai konsentrasi terendah dari agen antimikroba yang diuji yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme yang diuji, dan biasanya dinyatakan dalam mg/ml atau µg/l (Balouiri *et al.*, 2016).

Broth mikro atau makro dilusi adalah salah satu metode pengujian aktivitas antimikroba yang paling dasar. Prosedur ini melakukan pembuatan pengenceran agen antimikroba dua kali lipat (misalnya 1, 2, 4, 8, 16 dan 32 mg/ml) dalam media pertumbuhan cair yang dituangkan dalam tabung yang berisi volume minimal 2 ml (*macrodilution*) atau dengan yang lebih kecil volume menggunakan plat mikrotitrasi 96-well (*mikrodilution*). Kemudian, setiap tabung atau sumur diinokulasi dengan inokulum mikroba yang disiapkan dalam media yang sama setelah pengenceran suspensi mikroba standar yang disesuaikan dengan skala 0,5 McFarland. Setelah pencampuran dengan baik, tabung yang diinokulasi atau pelat mikrotitrasi 96-well diinkubasi kondisi yang sesuai tergantung pada mikroorganisme uji (Balaouiri *et al.*, 2016)

Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) merupakan konsentrasi terendah agen antimikroba yang sepenuhnya menghambat pertumbuhan organisme dalam tabung atau sumur mikrodilusi seperti yang terdeteksi oleh mata tanpa bantuan. Tidak seperti metode mikrodilusi, kelemahan utama dari metode makrodilusi adalah pekerjaan yang menjenuhkan, manual, risiko kesalahan dalam persiapan solusi antimikroba untuk setiap tes, dan jumlah reagen dan ruang yang relatif besar diperlukan (Balaouiri *et al.*, 2016).

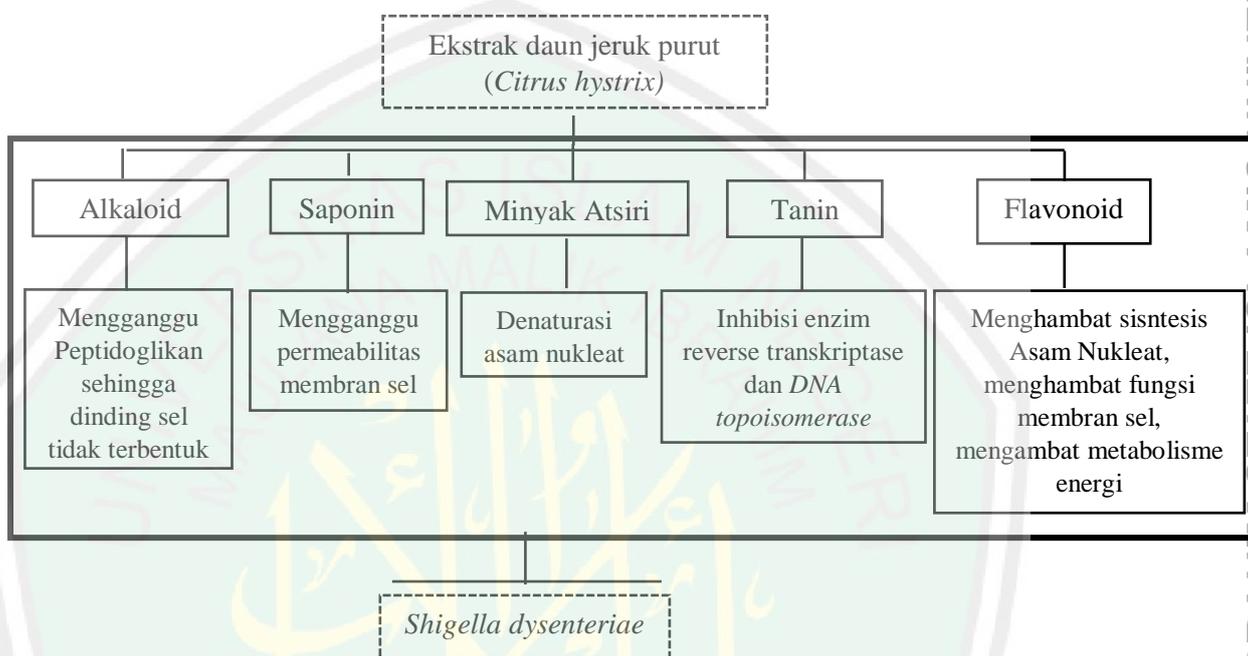
2.5.3 Metode Difusi Sumuran

Metode lubang atau sumuran merupakan metode yang menggunakan lubang pada media padat yang telah diinokulasikan dengan bakteri yang kemudian diisi dengan zat antimikroba uji. Kemudian diinkubasi pada suhu dan waktu yang sesuai dengan mikroba uji. Setelah diinkubasi, maka dilakukan pengamatan dengan melihat adanya zona bening di sekitar lubang dan diukur dengan penggaris (CLSI, 2016).



BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konsep



Keterangan :

- : Variabel yang diteliti ————— : Mempunyai
 : Variabel yang tidak diteliti ————| : Menghambat

3.2 Deskripsi Kerangka Konsep

Daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) mempunyai senyawa metabolit sekunder yang bisa berfungsi sebagai antibakteri. Metabolit sekunder sebagai antibakteri seperti alkaloid, saponin, minyak atsiri, tanin, flavonoid. Sehingga daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) diharapkan bisa menjadi obat alternatif untuk disentri basiler.

Mekanisme antibakteri metabolit sekunder dari Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix*) seperti seperti Alkaloid bekerja dengan mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel. Minyak atsiri bekerja dengan mendenaturisasi asam nukleat sehingga akan kehilangan aktivitas fisiologisnya dan tidak dapat berfungsi baik. Saponin bekerja dengan cara mengganggu permeabilitas membran sel bakteri sehingga menyebabkan sel bakteri lisis. Tanin bekerja dengan menghambat enzim reverse transkriptase serta *DNA topoisomerase* sehingga struktur sel bakteri tidak dapat terbentuk. Mekanisme kerja flavonoid sebagai antimikroba dapat dibagi menjadi tiga yaitu menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi membran sel dan menghambat metabolisme energi.

3.3 Hipotesis

- H₀ : Ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan *Shigella dysenteriae*
- H₁ : Ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) memiliki aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan *Shigella dysenteriae*

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan penelitian kuantitatif jenis eksperimental dengan desain eksperimen sederhana (*Posttest Only Control Group Design*) yang bertujuan untuk mengetahui potensi antibakteri ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) terhadap bakteri *Shigella dysenteriae*.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

a. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Pendidikan Dokter, UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.

b. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari 2020 – April 2020.

4.2 Sampel Penelitian

4.3.1 Sampel Bakteri

Sampel pada penelitian ini adalah bakteri *Shigella dysenteriae* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang. Bakteri ini didapatkan dari subkultur feses sebanyak 5 kali pada pasien disentri basiller dengan kode 2060-F.

- a. Kriteria inklusi : koloni *Shigella dysenteriae* yang tumbuh pada media *Salmonella-Shigella Agar (SSA)* dengan perlakuan dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
- b. Kriteria Eksklusi : koloni *Shigella dysenteriae* yang tumbuh pada media *Salmonella-Shigella Agar (SSA)* disertai pertumbuhan jamur atau kontaminan lain.

4.3.2 Sampel Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix*)

Sampel pada penelitian yang digunakan untuk penelitian ini adalah daun jeruk purut yang diambil dari UPT. Materia Medica Batu.

- a. Kriteria inklusi : daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) yang digunakan harus segar, mengkilap, dan bebas dari noda kecoklatan maupun hama.
- b. Kriteria eksklusi : daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) berwarna kuning kecoklatan, berlubang, kering, dan terdapat hama.

4.4 Bahan dan Alat yang Digunakan

4.4.1 Bahan yang Digunakan

| No. | Bahan | Jumlah |
|-----|--|----------|
| 1. | Daun jeruk purut (Simplisia daun jeruk purut yang berasal dari UPT. Materia Medica Batu) | 500 gr |
| 2. | Alkohol 70 % | 300 ml |
| 3. | Aquadest 1000 ml | 2 botol |
| 5. | MHB/ 10 petri | 21 gr |
| 6. | MHA/ 10 petri | 38 gr |
| 7. | Spirtus | 1000 ml |
| 8. | Kultur murni <i>Shigella dysenteriae</i> | 1 tabung |
| 9. | Etanol 96 % | 5000 ml |

| | | |
|-----|----------------------------------|---------|
| 10. | Cakram kosong | 28 buah |
| 11. | Cakram antibiotik (Ciproflxacin) | 25 buah |
| 12. | DMSO | 10 ml |

4.4.2 Alat yang Digunakan

| No. | Alat | Jumlah |
|-----|---|------------|
| 1. | Autoklaf | 1 buah |
| 2. | Neraca analitik | 1 buah |
| 3. | Ose bulat | 1 buah |
| 4. | Korek api | 1 buah |
| 5. | Kertas label | 3 lembar |
| 6. | Labu erlenmayer | 1 buah |
| 7. | Inkubator | 1 buah |
| 8. | Penggaris 30 cm | 1 buah |
| 9. | <i>Rotatory evaporator</i> | 1 buah |
| 10. | Kulkas | 1 buah |
| 11. | Tabung reaksi | 35 buah |
| 12. | Rak tabung reaksi | 2 buah |
| 13. | <i>Beaker glass</i> | 10 buah |
| 14. | Mikropipet 100-1000 μ l | 1 buah |
| 15. | Cawan petri disposable (Diameter 90 mm) | 50 buah |
| 16. | <i>Colony counter</i> | 1 buah |
| 19. | Kertas hitam | 1 lembar |
| 20. | Kertas saring | 15 lembar |
| 20. | Gunting | 1 buah |
| 22. | Batang pengaduk | 3 buah |
| 23. | Pinset | 1 buah |
| 24. | Bunsen | 1 buah |
| 27. | Kapas dan tisu | Secukupnya |
| 28. | Toples kecil | 3 buah |
| 29. | Handscoon | Secukupnya |

| | | |
|-----|----------------------------|------------|
| 30. | Masker kesehatan | Secukupnya |
| 31. | <i>Cotton swab</i> | 50 buah |
| 32. | Gelas ukur 10 ml dan 50 ml | 2 buah |
| 33. | Alumunium foil | 1 gulung |
| 34. | Plastik wrap | 1 gulung |
| 35. | Plastik 1 kg | 1 pak |
| 36. | <i>Magnetic stirer</i> | 1 buah |
| 37. | Spreader L | 1 buah |
| 40. | Mikropipet 10-100 μ l | 1 |
| 41. | Tip biru dan Tip kuning | 60 buah |

4.5 Definisi Operasional

a. Variabel dependen :

Adalah variabel yang menjadi akibat dari variabel independen atau dipengaruhi oleh variabel independen. Variabel dependen pada penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* pada medium MHA.

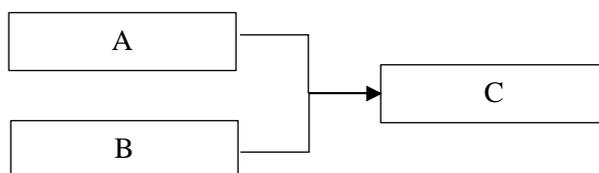
b. Variabel independen :

Adalah variabel yang mempengaruhi variabel dependen atau yang menjadi sebab perubahan variabel dependen. Variabel independen pada penelitian ini adalah ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hytrix*) dengan konsentrasi 5%, 10%, 15%, 20%, 25% dan 30%.

c. Variabel kontrol :

Adalah variabel yang berpengaruh pada penelitian tetapi dapat dikendalikan atau dinetralisir oleh peneliti. Variabel kontrol dibagi menjadi dua, yaitu variabel kontrol negatif dan variabel kontrol positif. Variabel

kontrol positif yang digunakan adalah ciprofloxacin dan variable kontrol negatif yang digunakan adalah DSMO 5%.



Gambar 4.1 Alur hubungan antara variabel independen dan variabel kontrol terhadap variabel dependen. Keterangan : A : variabel independen (konsentrasi *Citrus hystrix*), B : variabel kontrol (ciprofloxacin dan aquades), C : variabel dependen (pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae*)

Tabel 4.1 Definisi Operasional

| Variabel | Definisi Operasional | Indikator |
|--|--|---|
| <i>Ekstrak daun jeruk purut (Citrus hystrix)</i> | Hasil ekstraksi berupa cairan kental yang diperoleh dari cara UAE dengan pelarut etanol 96%. | Konsentrasi ekstrak pada setiap tabung |
| Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) | Merupakan konsentrasi minimal bahan coba yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri setelah diinkubasi 24 jam dan tidak tumbuh koloni bakteri yang diketahui dengan cara mengamati kekeruhan pada media perbenihan dengan menggunakan metode dilusi tabung. | Tingkat kekeruhan pada media perbenihan |

| | | |
|---------------------------------|--|---|
| Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) | Konsentrasi minimal bahan coba yang dapat membunuh bakteri sebesar 99 % atau 100 % pada media MHA. | Jumlah koloni bakteri <i>Shigella dysenteriae</i> di media MHA. |
| Zona hambat | Zona hambat yang ditandai dengan adanya daerah jernih pada medium biakan bakteri. | Diameter zona hambat disekitar kertas cakram |

4.6 Prosedur Penelitian

Prosedur yang dilakukan terdiri dari sterilisasi alat, pembuatan ekstrak daun jeruk purut dengan metode UAE, pengenceran, pembuatan medium kultur, peremajaan bakteri, pembuatan suspensi bakteri, identifikasi bakteri, dan menentukan KHM, KBM, dan zona hambat antimikroba.

4.6.1 Sterilisasi Alat

Semua alat yang digunakan dalam penelitian ini harus disterilkan terlebih dahulu. Alat yang digunakan untuk sterilisasi alat adalah autoklaf. Autoklaf adalah alat sterilisasi yang digunakan dalam penelitian mikrobiologi dengan menggunakan uap air panas yang bertekanan. Pada umumnya tekanan yang digunakan yaitu 15 Psi atau sekitar 2 atm dan dengan pada suhu 121⁰C selama 15 menit. Sebelum dimasukkan ke dalam autoklaf, perlu pembungkusan alat terlebih dahulu agar alat tidak rusak. Pembungkus dari kertas untuk membungkus sarung tangan, tip mikropipet, dan gelas ukur. Pembungkus dari alumunium foil untuk membungkus pinset, batang pengaduk, cawan petri, dan tabung reaksi. Dan untuk membungkus

labu erlenmeyer ditutup dengan kapas yang dipadatkan. Semua alat yang akan disterilisasikan dimasukkan ke dalam plastik.

4.6.2 Pembuatan Ekstrak Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix*)

4.6.2.1 Pembuatan simplisia

Daun jeruk purut (*Citrus hytrix*) yang digunakan untuk membuat simplisia harus segar, warna daun tidak terlalu tua atau muda, mengkilap, dan bebas dari noda kecokalatan. Kemudian diproses di UPT. Materia Medica Batu. Sekitar 3000 gram daun jeruk purut (*Citrus hytrix*) yang sudah terpilih dan dirajang berukuran 3-5 mm dengan menggunakan mesin perajang rimpang yang bertujuan untuk mempercepat pengeringan. Kemudian dikeringkan di dalam ruang pengeringan selama kurang lebih 48 jam hingga daun jeruk purut (*Citrus hytrix*) tersebut benar-benar kering. Daun yang sudah kering tersebut dihaluskan hingga menjadi serbuk dengan menggunakan mesin penggiling sehingga menghasilkan total 500 gram simplisia. Serbuk daun jeruk purut (*Citrus hytrix*) dimasukkan ke dalam wadah plastik dan diberi *silica gel* untuk mengurangi kelembapan, kemudian disimpan di dalam almari penyimpanan simplisia. Adapun surat determinasi untuk membenarkan bahwa simplisia yang digunakan berasal dari famili *Rutaceae* dan ordo *Citrus* (Lampiran 1).

4.6.2.2 Pembuatan Ekstrak Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix*)

Simplisia daun jeruk purut (*Citrus hytrix*) ditimbang sebanyak 500 gram dan dimasukkan kedalam labu erlenmeyer, kemudian dilarutkan dengan pelarut etanol 96% sebanyak 5000 ml (perbandingan simplisia dan pelarut 1 : 10). Selanjutnya dilakukan ekstraksi dengan bantuan gelombang ultrasonik (>20 kHz) selama 6

menit dengan 3 kali jeda tiap 2 menit, pada tiap jeda pengulangan diaduk menggunakan batang pengaduk. Masing-masing filtrat diuapkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 50°C dan putaran 70 rpm hingga ekstrak menjadi kental. Ekstrak kental ditampung kedalam wadah platik.

4.6.3 Pengenceran

Pengenceran terbuat dari ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hytrix*) untuk menghasilkan berbagai konsentrasi yang akan digunakan dalam menghambat pertumbuhan *Shigella dysenteriae*. Konsentrasi pengenceran yaitu 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, dan 30%. Pelarut yang digunakan untuk mengencerkan ekstrak adalah DMSO 5%.

Tabel 4.2 Pengenceran Konsentrasi

| | | | |
|----|-----------------|---|---|
| 1. | Konsentrasi 5% | : | Pencampuran sediaan ekstrak daun jeruk purut (<i>Citrus hytrix</i>) 0,05 ml dengan 0,95 ml DMSO 5% steril |
| 2. | Konsentrasi 10% | : | Pencampuran sediaan ekstrak daun jeruk purut (<i>Citrus hytrix</i>) 0,1 ml dengan 0,9 ml DMSO 5% steril |
| 3. | Konsentrasi 15% | : | Pencampuran sediaan ekstrak daun jeruk purut (<i>Citrus hytrix</i>) 0,15 ml dengan 0,85 ml DMSO 5% steril |
| 4. | Konsentrasi 20% | : | Pencampuran sediaan ekstrak daun jeruk purut (<i>Citrus hytrix</i>) 0,2 ml dengan 0,8 ml DMSO 5% steril |

| | | | |
|----|-----------------|---|--|
| 5. | Konsentrasi 25% | : | Pencampuran sediaan ekstrak daun jeruk purut (<i>Citrus hystrix</i>) 0,25 ml dengan 0,75 ml DSMO 5% steril |
| 6. | Konsentrasi 30% | : | Pencampuran sediaan ekstrak daun jeruk purut (<i>Citrus hystrix</i>) 0,3 ml dengan 0,7 ml DSMO 5% steril |

4.6.4 Pembuatan Medium

4.6.4.1 Media MHA

Media MHA (*Muller Hinton Agar*) sebanyak 38 gram ditambahkan akuades 100 ml kedalam labu erlenmayer, kemudian dipanaskan diatas hot plate pada suhu 200°C kemudian dimasukkan *magnetic stirer* untuk mempercepat pelarutan sampai didapatkan larutan media menjadi berwarna kuning jernih, setelah itu media disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit dengan mengatur tekanan sebesar 15 dyne/cm³ (1 atm) hingga suhu mencapai 60 - 70°C. Larutan tersebut dituangkan ke dalam cawan petri sebanyak 10 ml. Kemudian didinginkan sampai konsistensi menyerupai agar.

4.6.4.2 Media MHB

Media MHB (*Muller Hinton Broth*) sebanyak 21 gram ditambahkan akuades 100 ml, kemudian dididihkan diatas hot plate pada suhu 200°C kemudian dimasukkan *magnetic stirer* untuk mempercepat pelarutan sampai didapatkan larutan media menjadi berwarna kuning jernih, setelah itu media disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit dengan mengatur tekanan sebesar 15

dyne/cm³ (1 atm). Kemudian larutan tersebut dituangkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 10 ml.

4.6.5 Peremajaan Biakan Bakteri

Bakteri yang akan diuji dibiakmudakan terlebih dahulu, dengan cara *streak* menggunakan ose dari kultur bakteri murni ke dalam cawan petri yang berisi MHA dan tabung reaksi bersis MHB. Kemudian diinkubasi di dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam.

4.6.6 Suspensi Bakteri *Shigella dysenteriae*

Diambil 1 ml dari hasil peremajaan biakan murni bakteri *Shigella dysenteriae* kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 5 ml NaCl fisiologi 0,9%, kemudian divortex supaya homogen, kemudian dibandingkan dengan standart 0,5 Mc Farland dengan kepadatan bakteri sebanyak 10⁸ sel/ ml. kemudian diencerkan 100x pada media NaCl fisiologis 0,9% dan media MHB dan didapatkan suspensi bakteri sebanyak 10⁶ bakteri sel/ml, bakteri siap diujikan.

4.6.7 Pembuatan Larutan Ciprofloxacin

Larutan kontrol positif dibuat dari sediaan obat tablet Ciprofloxacin 500 mg, dengan cara satu tablet Ciprofloxacin digerus. Setelah itu ditimbang 65 mg dan dilarutkan dalam 50 ml aquades, selanjutnya dibuat dengan cara diambil 1 ml larutan dan ditambahkan aquades hingga 10 ml untuk memperoleh larutan ciprofloxacin 5µg/50µl. Larutan ini digunakan sebagai kontrol positif pada pengujian.

4.6.8 Identifikasi Bakteri

4.6.8.1 Pewarnaan Gram

Menyiapkan kaca objek yang akan digunakan, kemudian dipanaskan diatas api (bunsen) untuk mensterilkan kaca objek, kemudian kaca objek ditandai dengan spidol untuk menandai tempat meletakkan koloni. Ambil larutan NaCl dengan ose dan letakkan pada kaca objek. Selanjutnya, ambil koloni yang akan diperiksa dari media SSA dengan ose kemudian ratakan pada kaca objek. Kemudian, dilakukan fiksasi preparat dengan melewati diatas api sebanyak 8 – 10 kali dan didinginkan preparat pada suhu ruangan. Untuk pewarnaan gram yang pertama dilakukan adalah preparat ditetaskan larutan gentian violet didiamkan selama 3 menit kemudian dibilas dengan air yang mengalir, setelah itu tetaskan lugol dan didiamkan selama 1 menit kemudian dibilas dengan air yang mengalir. Langkah selanjutnya tetaskan alkohol 96% lalu dibilas dengan air yang mengalir. Tetaskan safranin diamkan selama 45-60 detik kemudian bilas dengan air yang mengalir. Setelah itu keringkan dengan tisu. Lalu tetaskan minyak immersi sebanyak 1 tetes dan lihat di mikroskop dengan perbesaran 100x.

4.6.8.2 Uji Sitrat

Koloni diambil dari media dengan ose kemudian diinokulasikan ke media *Simmon's Citrate Agar* (SCA) dengan cara di gores pada media agar miring kemudian diinkubasi pada temperatur 35°C selama 96 jam \pm 2 jam.

4.6.8.3 Uji TSIA

Selain uji Sitrat, untuk menentukan jenis bakteri juga dapat dilakukan uji TSIA. Prosedur pemeriksaan TSIA yaitu koloni diambil dari media yang diduga positif (+) dari media tersebut kemudian diinokulasikan ke TSIA dengan cara

menusuk sampai sepertiga dasar tabung kemudian diangkat dan digores secara zig zag pada media agar miring kemudian inkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam.

4.6.8.4 Uji SIM (Sulfur, Indol, Motility)

Uji motilitas dapat dilakukan dengan cara koloni diambil dari media yang diduga positif kemudian diinokulasikan dengan cara menusukkan jarum ose secara tegak lurus hingga setengah tinggi media *Sulfit Indol Motility* pada tabung reaksi. Tabung diinkubasi selama 48 jam pada suhu 40°C selama 48 jam.

4.6.9 Estimasi Jumlah Pengulangan

Jumlah estimasi dihitung dengan rumus (Lukito, 1998):

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

Keterangan :

n = jumlah pengulangan

p = jumlah perlakuan atau konsentrasi

Penelitian ini menggunakan 6 konsentrasi (5%, 10%, 15%, 20%, 25%, dan 30%) dari ekstrak daun jeruk purut (p=6), maka didapatkan jumlah pengulangan :

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

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

$$6n - 6 \geq 16$$

$$6n \geq 22 ; n \geq 3,6 \approx 4$$

Dengan demikian untuk memenuhi uji statistik diperlukan 4 kali pengulangan.

4.6.10 Pengujian antibakteri

4.6.10.1 Metode Difusi

Uji efektivitas antibakteri ini dilakukan dengan menggunakan ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*), ciprofloxacin sebagai kontrol positif, dan DMSO 5% sebagai kontrol negatif terhadap bakteri *Shigella dysenteriae*. Berikut cara-cara melakukan pengujian bakteri :

- a. Menyiapkan 8 buah cawan petri yang berisi medium MHA.
- b. Masukkan suspensi bakteri *Shigella dysenteriae* dengan menggunakan *cotton swab*, kemudian dicelupkan dalam biakan bakteri kemudian kapas ditekan pada sisi tabung agar tiris. *Cotton swab* diulaskan pada seluruh permukaan cawan petri yang berisi medium secara merata.
- c. Menyiapkan 32 buah kertas cakram, yang masing-masing dibagi delapan kelompok untuk ekstrak daun jeruk purut dengan konsentrasi 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, ciprofloxacin dan DMSO 5%.
- d. Pada satu cawan petri diletakkan 4 buah kertas cakram yang sudah diisi ekstrak dengan konsentrasi berbeda-beda. Pengambilan kertas cakram menggunakan pinset steril, dan diletakkan dengan jarak cakram dengan tepi petri agar tidak kurang dari 15 mm dan jarak cakram dengan cakram tidak kurang dari 24 mm. Cakram ditekan agar terfiksasi.
- e. Selanjutnya cawan petri tersebut diinkubasi dengan temperatur 37°C selama 18-24 jam.
- f. Pengukuran antibakteri diperoleh dengan mengukur zona bening pada media yang padat dengan menggunakan penggaris. Zona bening yang menjadi

petunjuk tidak adanya bakteri *Shigella dysenteriae* yang tumbuh pada setiap perlakuan.

4.6.10.2 Metode Dilusi Tabung

Uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Uji KHM adalah konsentrasi terkecil ekstrak yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri secara makroskopik. Berikut langkah-langkah uji KHM pada metode dilusi tabung :

- a. Menyiapkan tabung reaksi sebanyak 8 tabung (6 tabung untuk perlakuan, 2 tabung untuk kontrol).
- b. Kontrol negatif diisi dengan 1 ml aquades dan 1 ml suspensi bakteri. Sehingga didapatkan 2 ml pada tabung rekasi. Kemudian ditandai dengan K⁻ pada kertas label.
- c. Kontrol positif diisi dengan 1 ml larutan *ciprofloxacin* dan 1 ml suspensi bakteri. Sehingga didapatkan 2 ml pada tabung rekasi. Kemudian ditandai dengan K⁺ pada kertas label.
- d. Menandai 6 tabung untuk perlakuan pada kertas label sesuai dengan jumlah konsentrasi dan kontrol yang dipakai.
- e. Tabung 1 diisi dengan 1 ml ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) dengan konsentrasi 5% dan 1 ml suspensi bakteri. Sehingga didapatkan total 2 ml pada tabung rekasi tersebut.
- f. Tabung 2 diisi dengan 1 ml ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) dengan konsentrasi 10% dan 1 ml suspensi bakteri. Sehingga didapatkan total 2 ml pada tabung rekasi tersebut.

- g. Tabung 3 diisi dengan 1 ml ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) dengan konsentrasi 15% dan 1 ml suspensi bakteri. Sehingga didapatkan total 2 ml pada tabung rekasi tersebut.
- h. Tabung 4 diisi dengan 1 ml ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) dengan konsentrasi 20% dan 1 ml suspensi bakteri. Sehingga didapatkan total 2 ml pada tabung rekasi tersebut.
- i. Tabung 5 diisi dengan 1 ml ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) dengan konsentrasi 25% dan 1 ml suspensi bakteri. Sehingga didapatkan total 2 ml pada tabung rekasi tersebut.
- j. Tabung 6 diisi dengan 1 ml ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) dengan konsentrasi 30% dan 1 ml suspensi bakteri. Sehingga didapatkan total 2 ml pada tabung rekasi tersebut.
- k. Seluruh tabung dihomogenkan dengan menggunakan *vortex*.
- l. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam dengan inkubator.
- m. Kemudian dilakukan pengamatan kekeruhan untuk menentukan Kadar Hambat Minimum (KHM).
- n. Langkah ini diulang sebanyak 4 kali.

Berikut langkah-langkah uji KBM pada metode dilusi tabung :

- a. Hasil tiap tabung KHM kemudian *dispread* pada media *Muller Hinton Agar* (MHA).
- b. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
- c. Diamati ada tidaknya pertumbuhan (koloni) bakteri dan dilakukan penghitungan koloni bakteri dengan menggunakan *colony counter*

- d. Langkah ini diulang sebanyak 4 kali

4.6.10.3 Metode Difusi Sumuran

Uji Konsentrasi Hambat Minimal ini dilakukan dengan menggunakan metode difusi sumuran karena hasil pada metode dilusi tabung tidak bisa diamati akibat ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) bewarna pekat dan keruh. Berikut cara-cara melakukan pengujian bakteri dengan menggunakan difusi sumuran :

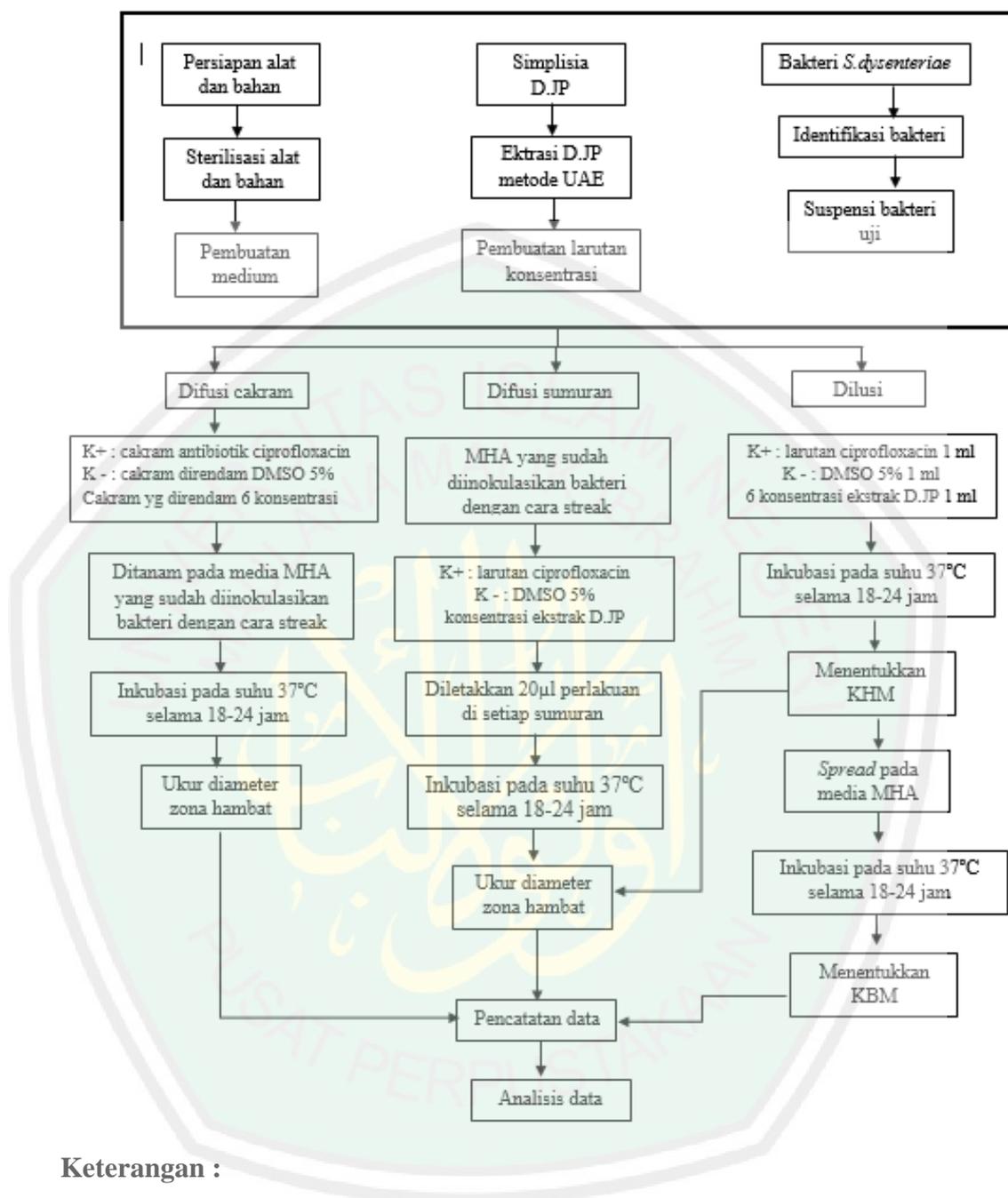
- a. Menyiapkan 12 buah cawan petri yang berisi medium MHA.
- b. Masukkan suspensi bakteri *Shigella dysenteriae* dengan menggunakan *cotton swab*, kemudian dicelupkan dalam biakan bakteri kemudian kapas ditekan pada sisi tabung agar tiris. *Cotton swab* diulaskan (*streaking*) pada seluruh permukaan cawan petri yang berisi medium secara merata.
- c. Menyiapkan spuit 5 ml steril untuk membuat sumuran pada medium MHA. Pada satu cawan petri dibuat sumuran sebanyak 3 buah. Kemudian tiap sumuran diisi dengan ekstrak berbagai konsentrasi dan kontrol sebanyak masing masing 20 μ l.
- d. Selanjutnya cawan petri tersebut diinkubasi dengan temperatur 37°C selama 1x24 jam.
- e. Pengukuran antibakteri diperoleh dengan mengukur zona bening pada media yang padat dengan menggunakan penggaris.

4.7 Analisis Data

Pada penelitian ini, data analisis yang digunakan adalah Uji *One-Way Analysis of Variance (ANOVA)* karena variabel yang diuji hanya satu yaitu diameter zona hambat yang dihasilkan oleh masing-masing konsentrasi ekstrak daun jeruk purut

(*Citrus hytrix*) terhadap *S. dysenteriae* yang diinokulasikan pada medium agar. Syarat Uji *One-Way Analysis of Variance (ANOVA)* adalah data yang diuji harus homogen (homogenitas) dan berdistribusi normal (normalitas). Uji normalitas menggunakan *Kalmogorov-Smirnov Test* dengan tujuan untuk mengetahui apakah data yang diuji berdistribusi normal atau tidak. Jika hasil uji signifikan dengan standar signifikansi ($\alpha = 0,05$) maka normalitas dan homogenitas terpenuhi. Apabila nilai signifikansi (p) lebih besar dari $\alpha = 0,05$ maka data terdistribusi normal sedangkan jika nilai signifikansi (p) lebih kecil dari $\alpha = 0,05$ maka data tidak terdistribusi normal. Uji homogenitas menggunakan *Levene Test* dengan tujuan mengetahui apakah dua atau lebih kelompok data berasal dari populasi yang memiliki varians sama atau tidak. Uji Normalitas, Uji Homogenitas, dan Uji *One-Way Analysis of Variance (ANOVA)* diolah menggunakan program analisis statistik yaitu *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)* versi 23.

4.8 Alur Penelitian



Keterangan :

D.JP : Daun jeruk purut

KHM : Konsentrasi Hambat Minimal

KBM : Konsentrasi Bunuh Minimal

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Hasil Penelitian

5.1.1 Identifikasi Bakteri *Shigella dysenteriae*

Kultur murni bakteri *Shigella dysenteriae* diperoleh dari Universitas Brawijaya, Malang. Hasil identifikasi menunjukkan bahwa bakteri *Shigella dysenteriae* berasal dari famili *Enterobacteriaceae* dan genus *Shigella sp.* (Lampiran 2). Hal tersebut juga dibuktikan dalam pengujian mikroskopis, makroskopis dan biokimia (Gambar 5.1). Pengujian tersebut dilakukan oleh CV. Wiyasa Mandiri. Pada pengujian mikroskopis, didapatkan hasil bahwa bakteri *Shigella sp.* berbentuk basil dan berwarna merah sehingga bakteri ini termasuk kedalam bakteri gram negatif. Pada pengujian makroskopis, didapatkan hasil bahwa bakteri *Shigella sp.* memiliki bentuk koloni yang bulat dengan tepi tidak rata dan bewarna pucat. Pada pengujian biokimia, didapatkan hasil yang disajikan dalam bentuk tabel 5.1.

Tabel 5.1 Hasil Uji Biokimia Bakteri *Shigella dysenteriae*

| | |
|--------|------------------------|
| TSI | Alk/ As, HS (-), G (-) |
| Indol | Positif |
| MR | Positif |
| VP | Negatif |
| Citrat | Negatif |
| Urease | Negatif |



Gambar 5.1 Determinasi bakteri *Shigella* sp.
Keterangan : a) Uji Makroskopis, b) Uji Mikroskopis, dan c) Uji biokimia

5.1.2 Hasil Ekstraksi Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix*)

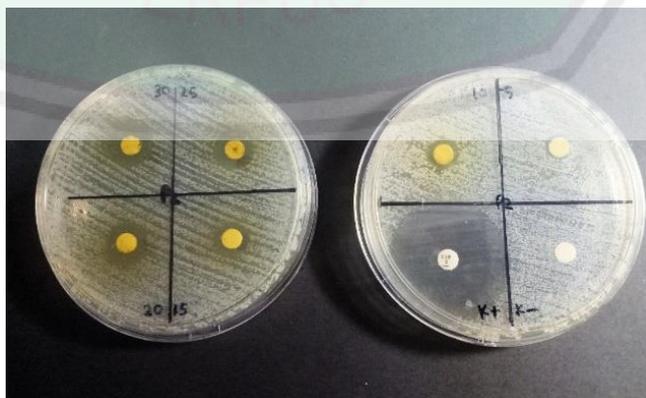
Daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) yang didapatkan dari UPT. Materia Medika Batu dengan berat total simplisia sebanyak 500 gram. Setelah mendapatkan simplisia, proses pengekstrakan dengan metode *Ultrasound – Assisted Solvent Extraction* (UAE) dimulai dengan perendaman simplisia menggunakan pelarut etanol 96% (perbandingan 1 : 10). Larutan simplisia tersebut kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* sehingga mendapatkan ekstrak kental (Gambar 5.2). Pada penelitian ini terdapat kelemahan yaitu tidak dilanjutkan pengujian fitokimia, sehingga kandungan metabolit sekunder pada ekstrak daun jeruk purut menningikuti penelitian terdahulu.



Gambar 5.2 Ekstrak Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix*)

5.1.3 Pengaruh Ekstrak Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix*) terhadap Zona Hambat Pertumbuhan Bakteri *Shigella dysenteriae*

Uji daya antibakteri pada penelitian ini adalah metode difusi dengan menggunakan kertas cakram yang sudah direndam ke dalam ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) dengan konsentrasi 30%, 25%, 20%, 15%, 10% dan 5%, kontrol positif berupa ciprofloxacin dan kontrol negatif berupa *diemetilsulfoksida* (DMSO). Kertas cakram kemudian diletakkan diatas media MHA yang telah berisi suspensi bakteri uji dengan menggunakan pinset dan diinkubasi selama 24 jam. Metode ini bertujuan untuk mengetahui besarnya diameter zona hambat pertumbuhan bakteri. Zona hambat adalah zona bening yang terdapat di sekitar kertas cakram pada media yang sudah ditumbuhi bakteri *Shigella dysenteriae* dan diukur dengan menggunakan penggaris. Cara mengukur diameter zona hambat adalah dengan dikurangi dengan diameter kertas cakram (6 mm) pada masing-masing perlakuan. Pada penelitian ini dilakukan sebanyak empat kali pengulangan. Pengamatan zona hambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* dapat dilihat pada gambar 5.3 dan hasil pengukuran rata-rata zona hambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* yang telah diberi perlakuan pada metode difusi dapat dilihat pada tabel 5.2.



Gambar 5.3 Pengamatan zona hambat pertumbuhan *Shigella dysenteriae*

Tabel 5.2 Rata-Rata Diameter Zona Hambat Ekstrak Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix*) terhadap Bakteri *Shigella dysenteriae*

| | Konsentrasi (mm) | | | | | | | K- |
|------------------|------------------|------|------|------|------|------|------|----|
| | K+ | 30% | 25% | 20% | 15% | 10% | 5% | |
| P1 | 25 | 9 | 8 | 7 | 6 | 4 | 2 | 0 |
| P2 | 29 | 10 | 9 | 6 | 5 | 4 | 2 | 0 |
| P3 | 29 | 9 | 8 | 7 | 6 | 5 | 3 | 0 |
| P4 | 31 | 11 | 10 | 10 | 9 | 6 | 4 | 0 |
| Rata-rata | 28.50 | 9.75 | 8.75 | 7.50 | 6.50 | 4.75 | 2.75 | 0 |

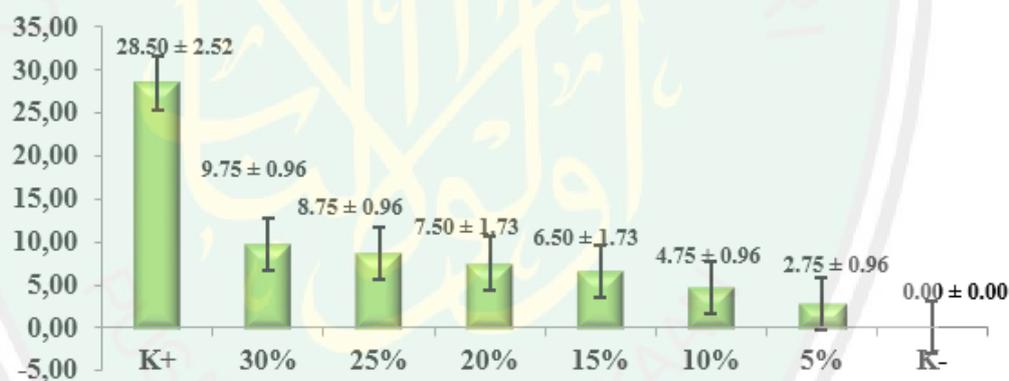
Tabel diatas menjelaskan bahwa untuk pemberian ciprofloxacin (kontrol positif) memiliki rata-rata zona hambat bakteri *Shigella dysenteriae* sebesar 28,50 mm. Kemudian pemberian ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) dengan konsentrasi 30% memiliki rata-rata zona hambat bakteri *Shigella dysenteriae* sebesar 9,75 mm. Selanjutnya pemberian ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) dengan konsentrasi 25% memiliki rata-rata zona hambat bakteri *Shigella dysenteriae* sebesar 8,75 mm. Kemudian pemberian ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) dengan konsentrasi 20% memiliki rata-rata zona hambat bakteri *Shigella dysenteriae* sebesar 7,50 mm. Pada pemberian ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) dengan konsentrasi 15% memiliki rata-rata zona hambat bakteri *Shigella dysenteriae* sebesar 6,50 mm. Kemudian pemberian ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) dengan konsentrasi 10% memiliki rata-rata zona hambat bakteri *Shigella dysenteriae* sebesar 4,75 mm. Selanjutnya pemberian ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) dengan konsentrasi 5% memiliki rata-rata zona hambat bakteri *Shigella dysenteriae* sebesar 2,75 mm. Dan pada perlakuan pemberian DMSO (kontrol negatif) memiliki rata-rata zona hambat bakteri *Shigella dysenteriae* sebesar 0,00 mm. Sehingga dapat disimpulkan bahwa kelompok pemberian ciprofloxacin (kontrol positif) dan memiliki rata-rata zona hambat

pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* yang paling tinggi, sedangkan kelompok pemberian DMSO (kontrol negatif) memiliki rata-rata zona hambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* yang paling rendah.

Pada penelitian ini, data yang terkumpul akan dianalisis dengan pengujian *One Way ANOVA* pada SPSS. Syarat dalam uji *One Way ANOVA* adalah data harus berdistribusi normal dan memiliki varian yang homogen. Berdasarkan uji normalitas, data zona hambat yang diuji tidak berdistribusi normal karena nilai signifikansi $0,010 < 0,05$. Kemudian berdasarkan uji homogenitas, data yang diperoleh memiliki variasi yang sama yang dibuktikan dengan nilai signifikansi $0,134 > 0,05$ sehingga terbukti bahwa data homogen. Mengingat data pada penelitian ini tidak normal, maka pengujian tidak bisa menggunakan *One Way ANOVA*, melainkan non parametrik yaitu *Kruskal wallis* (Sutomo, 2001). Uji *Kruskal wallis* merupakan uji non parametrik yang bertujuan untuk menentukan signifikansi antara 2 atau lebih variabel independen pada variabel dependen secara statistik. Pengujian *Kruskal wallis* dipilih pada penelitian ini karena hampir mirip dengan ANOVA, namun data yang diuji tidak harus memiliki data yang normal atau homogen. Dari pengujian *Kruskal wallis* diperoleh nilai signifikansi $0,000 < 0,05$ yang berarti bahwa terdapat perbedaan signifikan antar kelompok sehingga H_0 ditolak dan H_1 diterima.

Kemudian dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui perlakuan yang memberikan perbedaan bermakna. Hasil dari uji *Mann Whitney* menunjukkan terdapat perbedaan bermakna secara statistik antara zona hambat yang dihasilkan oleh kontrol positif (ciprofloxacin) dengan zona hambat yang dihasilkan oleh ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) pada konsentrasi 30%, 25%, 20%,

15%, 10%, dan 5%. Hal tersebut dikarenakan diameter zona hambat yang dihasilkan oleh kontrol positif memiliki selisih yang besar daripada ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*). Akan tetapi, hasil analisis hubungan pada ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) dengan konsentrasi 30%, 25%, 20%, 15%, dan 10% tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna, karena selisih antar perlakuan kecil. Tetapi pada perlakuan ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) pada konsentrasi 5% menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan oleh karena selisih yang dihasilkan jauh dengan semua perlakuan. Hasil analisis *Mann Whitney* pada perbedaan pengaruh pemberian ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) sebagai antibakteri terhadap zona hambat pertumbuhan *Shigella dysenteriae* disajikan dalam grafik 5.1.



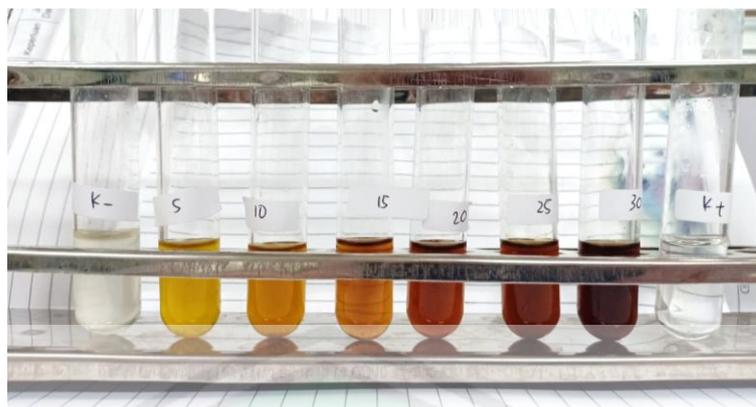
Grafik 5.1 Hasil Analisis *Mann Whitney* pada perbedaan pengaruh pemberian antibakteri ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) terhadap zona hambat pertumbuhan *Shigella dysenteriae*

5.1.4 Pengaruh Ekstrak Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix*) terhadap Kadar Hambat Minimum (KHM) Pertumbuhan Bakteri *Shigella dysenteriae*

Konsentrasi ekstrak daun jeruk purut (*Shigella dysenteriae*) yang diujikan aktivitasnya pada metode dilusi adalah 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, dan 5%. Kontrol yang digunakan pada penelitian ini adalah ciprofloxacin sebagai kontrol

positif dan *diemethylsulfoksida* (DMSO) sebagai kontrol negatif. Kemudian dimasukkan 1 ml ekstrak dan 1 ml suspensi bakteri uji kedalam pada masing-masing tabung reaksi yang sudah dilabeli. Setelah diinkubasi selama 24 jam, dilakukan pengamatan kekeruhan untuk menentukan Konsentrasi Hambat Minimal (KHM). Akan tetapi, pada penelitian ini tidak dapat diamati kekeruhannya karena ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hytrix*) berwarna pekat dan keruh sehingga sukar untuk membedakan kekeruhan karena ekstrak atau pertumbuhan bakteri. Sehingga metode untuk menentukan KHM diganti dengan menggunakan metode difusi sumuran.

Metode difusi sumuran hampir sama dengan metode difusi kertas cakram karena sama-sama mengukur zona bening yang dihasilkan oleh bakteri uji. Pada difusi sumuran dilakukan pembuatan sumuran dengan menggunakan spuit 5 ml karena memiliki diameter yang sesuai dengan kertas cakram yaitu 6 mm yang selanjutnya diisi dengan berbagai perlakuan. KHM pada metode difusi sumuran adalah konsentrasi terkecil yang memiliki zona bening yang diukur dengan menggunakan penggaris (dalam mm). Pada penelitian ini dilakukan sebanyak empat kali pengulangan. Pengamatan KHM menggunakan metode difusi tabung dan difusi sumuran dilihat pada gambar 5.4 dan 5.5, sedangkan hasil pengukuran rata-rata zona hambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* yang telah diberi perlakuan ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) pada metode difusi sumuran dapat dilihat pada tabel 5.3.



Gambar 5.4 Pengamatan KHM pada metode Dilusi Tabung



Gambar 5.5 Pengamatan KHM pada Metode Difusi Sumuran

Tabel 5.3 Rata-Rata Konsentrasi Hambat Minimal Pertumbuhan *Shigella dysenteriae*

| Pengulangan | Konsentrasi (mm) | | | | | | | |
|------------------|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|
| | K+ | 30% | 25% | 20% | 15% | 10% | 5% | K- |
| P1 | 45 | 26 | 23 | 20 | 18 | 16 | 13 | 0 |
| P2 | 46 | 25 | 23 | 21 | 19 | 17 | 14 | 0 |
| P3 | 46 | 26 | 24 | 21 | 19 | 15 | 14 | 0 |
| P4 | 44 | 24 | 22 | 19 | 17 | 15 | 12 | 0 |
| Rata-rata | 45,25 | 25,25 | 23,00 | 20,25 | 18,25 | 15,75 | 13,25 | 0,00 |

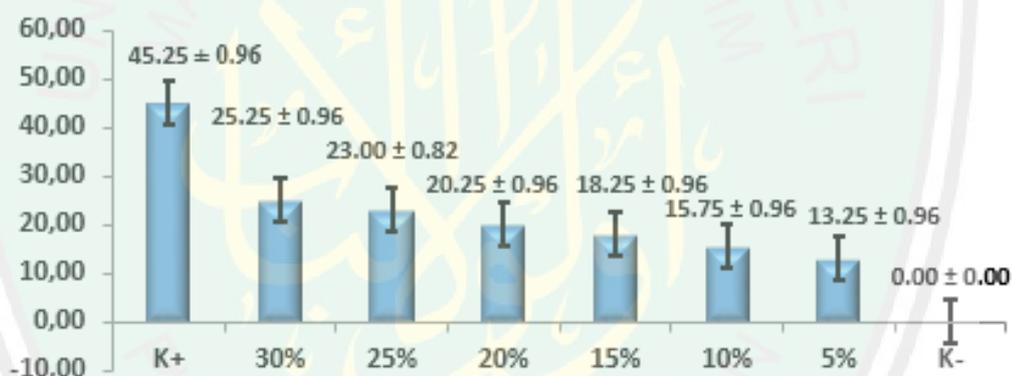
Tabel diatas menjelaskan bahwa untuk pemberian ciprofloxacin (kontrol positif) memiliki rata-rata zona hambat bakteri *Shigella dysenteriae* sebesar 45,25 mm. Kemudian pemberian ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) dengan konsentrasi 30% memiliki rata-rata zona hambat bakteri *Shigella dysenteriae* sebesar 25,25 mm. Selanjutnya pemberian ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*)

dengan konsentrasi 25% memiliki rata-rata zona hambat bakteri *Shigella dysenteriae* sebesar 23,00 mm. Kemudian pemberian ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) dengan konsentrasi 20% memiliki rata-rata zona hambat bakteri *Shigella dysenteriae* sebesar 20,25 mm. Pada pemberian ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) dengan konsentrasi 15% memiliki rata-rata zona hambat bakteri *Shigella dysenteriae* sebesar 18,25 mm. Kemudian pemberian ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) dengan konsentrasi 10% memiliki rata-rata zona hambat bakteri *Shigella dysenteriae* sebesar 15,75 mm. Selanjutnya pemberian ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) dengan konsentrasi 5% memiliki rata-rata zona hambat bakteri *Shigella dysenteriae* sebesar 13,25 mm. Dan pada perlakuan pemberian DMSO (kontrol negatif) memiliki rata-rata zona hambat bakteri *Shigella dysenteriae* sebesar 0,00 mm. Sehingga dapat disimpulkan bahwa konsentrasi hambat minimal (KHM) adalah pada ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) dengan konsentrasi 5%, karena memiliki rata-rata diameter zona hambat paling kecil yaitu 13,25 mm.

Selanjutnya untuk data konsentrasi hambat minimal (KHM) dilanjutkan ke uji analisis statistik yaitu *One Way ANOVA*. Syarat dalam uji *One Way ANOVA* adalah data harus berdistribusi normal dan homogen. Berdasarkan uji normalitas, data zona hambat yang diuji tidak berdistribusi normal karena signifikansi $0,001 < 0,05$. Kemudian pada uji homogenitas didapatkan nilai signifikansi $0,153 > 0,05$ sehingga data yang diperoleh homogen. Mengingat data pada penelitian ini tidak normal, maka pengujian tidak bisa menggunakan *One Way ANOVA*, melainkan non parametrik yaitu *Kruskal wallis* (Sutomo, 2001). Dari pengujian *Kruskal wallis*

diperoleh nilai signifikansi $0,000 < 0,05$ yang berarti bahwa terdapat perbedaan signifikan antar kelompok.

Kemudian dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui perlakuan yang memberikan perbedaan bermakna. Hasil uji *Mann Whitney* menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$), baik pada setiap perlakuan daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) dalam berbagai konsentrasi, kontrol negatif (DMSO), dan kontrol negatif (ciprofloxacin). Hasil analisis *Mann Whitney* pada perbedaan pengaruh pemberian ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) sebagai antibakteri terhadap zona hambat pertumbuhan *Shigella dysenteriae* disajikan dalam grafik 5.2.

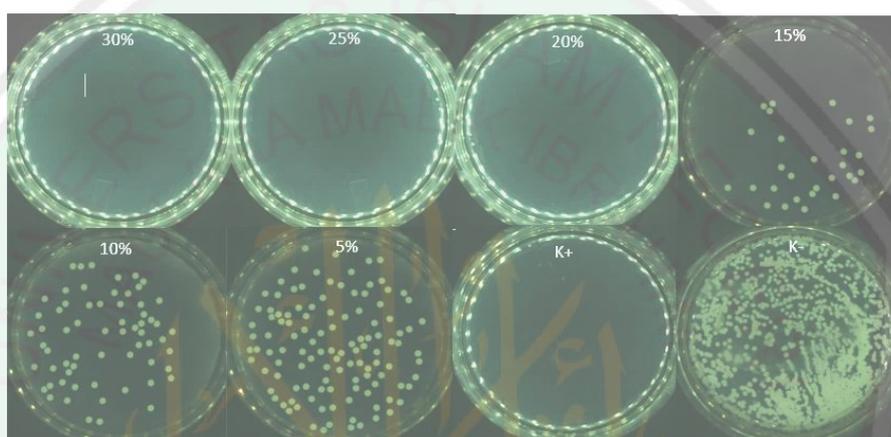


Grafik 5.2 Hasil Analisis *Mann Whitney* pada perbedaan pengaruh pemberian ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) sebagai antibakteri terhadap KHM pertumbuhan *Shigella dysenteriae*

5.1.5 Pengaruh Ekstrak Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix*) terhadap Kadar Bunuh Minimum (KBM) Pertumbuhan Bakteri *Shigella dysenteriae*

Penentuan Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM) berdasarkan KHM yang selanjutnya dikultur ulang dengan cara *spread* tanpa penambahan bakteri uji maupun ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) menggunakan *L-spreader*. Kemudian, media kultur diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Media kultur

yang tidak terdapat pertumbuhan koloni setelah diinkubasi ditetapkan sebagai KBM. Penghitungan koloni bakteri menggunakan *colony counter* (CFU/ ml). Pada masing-masing konsentrasi dilakukan pengulangan sebanyak empat kali. Pengamatan KBM dapat dilihat pada gambar 5.6, sedangkan hasil jumlah koloni pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* yang telah diberi perlakuan ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) dapat dilihat pada tabel 5.4.



Gambar 5.6 Pengamatan KBM Pertumbuhan Bakteri *Shigella dysenteriae*

Tabel 5.4 Rata-Rata Konsentrasi Bunuh Minimal Pertumbuhan *Shigella dysenteriae*

| Pengulangan | Konsentrasi (CFU/ ml) | | | | | | | |
|-------------|-----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|--------|--------|
| | K+ | 30% | 25% | 20% | 15% | 10% | 5% | K- |
| P1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 26 | 70 | 115 | 365 |
| P2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 29 | 64 | 117 | 324 |
| P3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 23 | 58 | 107 | 452 |
| P4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 18 | 72 | 120 | 374 |
| Rata -rata | 0 | 0 | 0 | 0 | 24 | 66 | 114,75 | 378,75 |

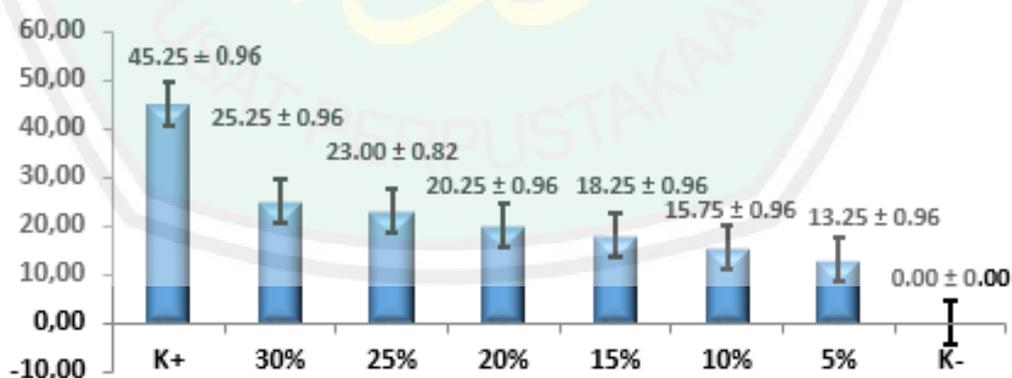
Gambar diatas menjelaskan bahwa untuk pemberian ciprofloxacin (kontrol positif) memiliki rata-rata jumlah koloni bakteri *Shigella dysenteriae* sebesar 0,00 mm. Kemudian pemberian ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) dengan konsentrasi 30% memiliki rata-rata jumlah koloni bakteri *Shigella dysenteriae*

sebesar 0 CFU/ ml. Selanjutnya pemberian ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) dengan konsentrasi 25% memiliki rata-rata jumlah koloni bakteri *Shigella dysenteriae* sebesar 0 CFU/ ml. Kemudian pemberian ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) dengan konsentrasi 20% memiliki rata-rata jumlah koloni bakteri *Shigella dysenteriae* sebesar 0 CFU/ ml. Pada pemberian ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) dengan konsentrasi 15% memiliki rata-rata jumlah koloni bakteri *Shigella dysenteriae* sebesar 24 CFU/ ml. Kemudian pemberian ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) dengan konsentrasi 10% memiliki rata-rata jumlah koloni bakteri *Shigella dysenteriae* sebesar 66 CFU/ ml Selanjutnya pemberian ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) dengan konsentrasi 5% memiliki rata-rata jumlah koloni bakteri *Shigella dysenteriae* sebesar 114,75 CFU/ ml. Dan pada perlakuan pemberian DMSO (kontrol negatif) memiliki rata-rata jumlah koloni bakteri *Shigella dysenteriae* sebesar 378,75 CFU/ ml. Sehingga dapat disimpulkan bahwa konsentrasi bunuh minimal (KBM) adalah pada ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) dengan konsentrasi 20%, karena tidak terdapat pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* yang ditandai dengan nol koloni bakteri.

Selanjutnya untuk data konsentrasi hambat minimal (KHM) dilanjutkan ke uji analisis statistik yaitu *One Way ANOVA*. Syarat dalam uji *One Way ANOVA*, data harus berdistribusi normal dan homogen. Berdasarkan uji normalitas, data jumlah koloni yang diuji tidak berdistribusi normal karena nilai signifikansi $0,000 < 0,05$. Kemudian pada uji homogenitas, data yang diperoleh tidak homogen yang dibuktikan dengan nilai signifikansi $0,002 < 0,05$. Mengingat data pada penelitian ini tidak normal dan tidak homogen, maka pengujian tidak bisa menggunakan *One Way ANOVA*, melainkan non paramtrik yaitu *Kruskal wallis* (Sutomo, 2001). Dari

pengujian *Kruskal wallis* diperoleh nilai signifikansi $0,000 < 0,05$ yang berarti bahwa terdapat perbedaan signifikan antar kelompok.

Kemudian dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui perlakuan yang memberikan perbedaan bermakna. Hasil uji *Mann Whitney* menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) yaitu kelompok kontrol positif (ciprofloxacin) dan kelompok ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) pada konsentrasi 30%, 25% dan 20% tidak berbeda signifikan dikarenakan tidak didapatkan selisih pada rata-rata jumlah koloni. Namun berbeda signifikan dengan kelompok ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) pada konsentrasi 15%, 10%, 5% dan perlakuan pemberian DMSO. Sedangkan perlakuan pemberian DMSO menghasilkan jumlah koloni bakteri *Shigella dysenteriae* yang paling tinggi dan berbeda signifikan dengan semua kelompok perlakuan. Hasil analisis *Mann Whitney* pada perbedaan pengaruh pemberian ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) sebagai antibakteri terhadap zona hambat pertumbuhan *Shigella dysenteriae* disajikan dalam grafik 5.3.



Grafik 5.3 Hasil Analisis *Mann Whitney* pada perbedaan pengaruh pemberian ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) sebagai antibakteri terhadap KBM pertumbuhan *Shigella dysenteriae*

5.2 Pembahasan

5.2.1 Identifikasi Bakteri *Shigella dysenteriae*

Pada penelitian ini dilakukan pengujian untuk mengidentifikasi bakteri seperti uji makroskopis, uji mikroskopis, dan uji biokimia. Dari hasil uji makroskopis didapatkan koloni yang berbentuk bulat dengan tepian yang tidak rata dan cembung. Warna koloni bakteri *Shigella sp.* adalah pucat. Hal tersebut dikarenakan bakteri *Shigella sp.* tidak memfermentasikan laktosa. Pada uji mikroskopis didapatkan bahwa bakteri *Shigella sp.* berbentuk basil dan pada saat pewarnaan gram didapatkan hasil berwarna merah, sehingga bakteri *Shigella sp.* termasuk bakteri gram negatif. Hal ini disebabkan pada saat dicuci dengan alkohol, bakteri gram negatif kehilangan kompleks kristal violet-lugol karena lapisan peptidoglikan pada bakteri gram negatif lebih tipis sehingga menjadi tidak berwarna. Ketika ditambahkan dengan safranin yang berwarna merah maka bakteri gram negatif akan menyerapnya (Nurhidayanti, 2015). Pada uji biokimia terhadap bakteri *Shigella sp.* yang dilakukan pada penelitian ini adalah *Tripel Sugar Iron (TSI)*, indol, *Methyl Red (MR)*, *Voges Proskauer (VP)*, citrat, dan urease. Pada TSI didapatkan hasil Alk/ as yang berarti lereng alkali (merah) dan dasar asam (kuning) tanpa produksi gas H₂S. Hal ini menandakan hanya terjadi fermentasi glukosa dengan pembentukan asam pada permukaan lereng yang dioksidasi secara cepat. Selanjutnya uji indol didapatkan hasil positif, hal ini menandakan bahwa bakteri mengandung enzim triptofanase yang merupakan katalis pengurai gugus indol yang terkandung dalam asam amino triptofan. Kemudian uji MR didapatkan hasil positif, hal ini menandakan bahwa bakteri *Shigella sp.* mampu memproduksi dan mempertahankan produk akhir asam yang stabil dari fermentasi glukosa. MR

adalah indikator pH, yang tetap berwarna merah pada pH 4,4 atau kurang (Rahayu, 2017). Pada uji VP didapatkan hasil tes negatif, hal ini menandakan bahwa bakteri *Shigella sp.* memfermentasikan karbohidrat menjadi produk asam dan tidak menghasilkan produk netral seperti asetonin (Rahayu, 2017). Pada uji sitrat didapatkan hasil negatif yang ditunjukkan tidak adanya perubahan warna pada media uji sitrat yang mana menandakan bahwa bakteri *Shigella sp.* merupakan bakteri yang tidak menggunakan sitrat sebagai sumber karbon di lingkungan. Pada uji urease didapatkan hasil negatif, hal tersebut menandakan bahwa bakteri *Shigella sp.* tidak mampu mengubah urea menjadi amoniak (Ulfa, 2016).

5.2.2 Pengaruh Ekstrak Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix*) terhadap Zona Hambat Pertumbuhan Bakteri *Shigella dysenteriae*

Berdasarkan tabel 5.2, dapat diketahui rata-rata zona hambat yang terbentuk akibat ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) yaitu pada konsentrasi 30% sebesar 9,75 mm, konsentrasi 25% sebesar 8,75 mm, konsentrasi 20% sebesar 7,50 mm, konsentrasi 15% sebesar 6,50 mm, konsentrasi 10% sebesar 4,75 mm, dan konsentrasi 5% sebesar 2,75 mm. Berdasarkan hasil penelitian, konsentrasi ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) pada konsentrasi 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, dan 5% memiliki aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae*. Aktivitas antibakteri tersebut ditunjukkan dengan adanya zona hambat di sekitar kertas cakram dimana semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun jeruk purut, maka semakin tinggi pula rerata zona hambat yang terbentuk.

Berdasarkan kategori zona hambat menurut Greendwood (1995) yang disitasi oleh Jamaluddin (2017), maka diketahui ekstrak daun jeruk purut pada konsentrasi

30%, 25%, 20%, 15%, 10% dan 5% memiliki daya hambat lemah terhadap pertumbuhan bakteri. Sedangkan pada kontrol positif termasuk kategori daya hambat kuat dan pada kontrol negatif tidak menunjukkan daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri.

Hasil uji statistik *Kruskal wallis* menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar perlakuan karena $p < 0,05$. Adanya perbedaan yang signifikan menunjukkan bahwa ekstrak daun jeruk purut memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Shigella dysenteriae*. Kemudian dilanjutkan dengan uji *mann whitney*. Berdasarkan hasil uji *mann whitney*, antara perlakuan ekstrak daun jeruk purut konsentrasi 30%, 25%, 20%, 15%, dan 10% tidak berbeda secara signifikan. Hal tersebut bisa dikarenakan kenaikan ekstrak daun jeruk purut tidak selalu mempengaruhi besarnya diameternya zona hambat. Menurut Tambun (2015), diameter zona hambat bisa juga terganggu pada perbandingan zat terlarut dan jumlah pelarut yang mana dapat mempengaruhi kecepatan difusi pada media agar. Pada konsentrasi yang rendah didapatkan jumlah pelarut lebih banyak daripada zat terlarut, maka kerapatan molekul antar senyawa antibakteri juga rendah sehingga lebih cepat berdifusi pada media agar daripada senyawa yang berkonsentrasi tinggi. Adapun faktor lain yaitu suhu inkubator. Pada saat melakukan penelitian, inkubator mati karena listrik padam sehingga menyebabkan suhu inkubator menjadi turun. Oleh sebab itu, antar perlakuan konsentrasi ekstrak 30%, 25%, 20%, 15%, dan 10% tidak berbeda secara signifikan.

Ciprofloxacin sebagai kontrol positif berbeda secara signifikan dengan perlakuan ekstrak daun jeruk purut dan memiliki zona hambat paling besar yaitu 28,50 mm sehingga dikategorikan memiliki daya hambat yang kuat dan menurut

CLSI, ciprofloxacin termasuk kedalam kategori sensitif terhadap *Shigella dysenteriae* yang ditandai dengan zona hambat sebesar lebih dari 21 mm. Hal tersebut dikarenakan ciprofloxacin termasuk golongan kuinolon yang bersifat bakterisidal dengan cara menghambat DNA *gyrase* pada bakteri gram negatif maupun bakteri gram positif (Andries *et al*, 2014). DNA *gyrase* dikenal sebagai enzim yang bertanggung jawab untuk melakukan supercoiling dan uncoiling DNA bakteri dan replikasi DNA. Enzim ini sangat penting untuk sintesis, replikasi, perbaikan, dan prosedur transkripsi dan akibatnya, *gyrase* dapat dianggap sebagai target yang baik untuk agen antibakteri (Khameneh, 2019). Menurut WHO (2016) telah melaporkan bahwa obat ciprofloxacin mampu menghambat pertumbuhan *Shigella dysenteriae* dan sekitar 96% ciprofloxacin dapat mempercepat durasi gejala. Kemudian DMSO yang digunakan sebagai kontrol negatif tidak menghasilkan zona hambat yang mana menunjukkan bahwa DMSO tidak memiliki aktivitas antibakteri.

Pada hasil penelitian yang dilakukan Mifathendarwati (2014) berbeda dengan penelitian ini dimana pada penelitian yang dilakukan Miftahendramawati (2014), ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) pada konsentrasi 5% memiliki zona hambat sebesar 7,2 mm dalam menghambat pertumbuhan *Streptococcus mutans*. Hasil penelitian ini dapat berbeda dengan penelitian yang dilakukan dengan Mifathendarwati (2014) karena bakteri yang digunakan berbeda.

Bakteri *Shigella dysenteriae* merupakan bakteri gram negatif yang memiliki tiga lapis pembungkus sel, yaitu : membran luar (OM=outer membran), lapisan tengah yang merupakan dinding sel atau lapisan murein yang terdapat ruang periplasma, dan membran plasma dalam. Membran luar mengandung fosfolipid,

lipopolisakarida (LPS) atau yang diketahui juga sebagai antigen permukaan O somatik atau endotoxin, dan berbagai protein, dimana protein (porin) dan lipoprotein jumlahnya sangat banyak, sehingga antibakteri akan lebih sukar menembus dinding sel bakteri (Kemenkes, 2017).

Komponen khusus dinding sel bakteri gram negatif terdiri lipoprotein dan selaput luar. Selaput luar mempunyai saluran khusus yang mengandung molekul protein yang disebut porin yang memudahkan difusi pasif senyawa hidrofil dengan berat molekul rendah (gula, asam amino, ion-ion tertentu). Molekul antibakteri dapat menembus, tetapi relatif lebih lambat, sehingga bakteri gram negatif relatif lebih resisten terhadap antibakteri (Koohsari, 2015). Menurut Septiani *et al* (2017) menambahkan bahwa pada dasarnya dinding sel yang paling mudah terjadi denaturasi adalah dinding sel yang tersusun oleh polisakarida di bandingkan dengan dinding sel yang tersusun oleh fosfolipid. Gram positif dinding selnya mengandung peptidoglikan dan juga asam teikoat dan asam teikuronat. Oleh sebab itu dinding sel bakteri gram positif sebagian adalah polisakarida. Sedangkan pada dinding sel bakteri gram negatif terdapat peptidoglikan yang sedikit sekali dan berada diantara selaput luar dan selaput dalam dinding sel. Dinding sel bakteri gram negatif sebelah luar merupakan komponen yang terdiri dari fosfolipid dan beberapa protein yang sering disebut sebagai auto layer. Dapat disimpulkan bakteri gram positif mengalami proses denaturasi sel terlebih dahulu dibandingkan dengan bakteri gram negatif.

Hal ini juga berbeda dengan penelitian yang dilakukan oleh Ariyani (2018), dimana pada ekstrak daun jeruk purut pada konsentrasi 25% tidak memiliki zona hambat (0 mm) pada bakteri *Eschericia coli*. Hal ini bisa dikarenakan adanya faktor

perbedaan tempat pengambilan sampel daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) yang dapat mempengaruhi senyawa (metabolit sekunder) yang ada pada tanaman. Pada penelitian Ariyani (2018), didapatkan sampel dari Kota Banjarmasin sedangkan dalam penelitian ini sampel didapatkan dari Kota Batu. Menurut Febrianasari (2018), faktor lingkungan seperti suhu, cahaya, tanah dan iklim dapat mempengaruhi jumlah metabolit sekunder yang ada pada daun jeruk purut. Dan apabila tanaman tumbuh dengan nutrisi yang cukup dan di lingkungan yang sesuai dengan syarat tumbuh tanaman maka terbentuknya jumlah metabolit sekunder yang optimal.

Menurut Ergina (2014), metabolit sekunder berfungsi pertahanan diri tanaman dari lingkungannya, oleh sebab itu lingkungan tanaman sangat mempengaruhi kadar metabolit sekunder yang dihasilkan oleh tumbuhan tersebut. Menurut Salim (2016), unsur hara yang terkandung di dalam tanah seperti nitrogen, kalium, bahan organik, dan kalsium mempunyai hubungan linier dengan pembentukan metabolit sekunder pada tumbuhan. Hal ini menunjukkan bahwa semakin banyak unsur hara pada tanah maka tumbuhan dapat memiliki kualitas dan kuantitas metabolit sekunder yang lebih baik dan banyak. Usia daun memiliki pengaruh terhadap metabolit sekunder yang terkandung pada tumbuhan. Usia daun yang masih muda memiliki kandungan metabolit sekunder sedikit sedangkan pada daun yang berusia tua mempunyai kandungan metabolit sekunder yang ditimbun lebih banyak karena sintesis metabolit sekunder yang optimal (Yusnawan, 2016).

Berdasarkan data pada penelitian ini didapatkan bahwa ada ada kemungkinan penyebab ekstrak daun jeruk purut mempunyai daya hambat lemah yaitu usia daun yang digunakan. Pada saat pemanenan, tidak dilakukan penyortiran daun jeruk

purut mengenai usia daun sehingga tidak dapat diketahui usia tumbuhan yang dipanen. Sehingga kemungkinan daun yang terambil lebih banyak yang muda daripada daun yang tua. Dan juga pada penelitian ini tidak dilakukan pengujian fitokimia ekstrak sehingga tidak dapat diketahui jumlah dan jenis metabolit sekunder yang terkandung pada ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*).

Kemampuan ekstrak daun jeruk purut dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* karena terdapat metabolit sekunder yang berfungsi sebagai antibakteri. Menurut Jawetz *et al.* (2016) pertumbuhan bakteri bisa terhambat atau mati akibat suatu senyawa antibakteri dapat disebabkan oleh terhambatnya sintesis dinding sel, terhambatnya fungsi membran sel, terhambatnya sintesis protein, atau terhambatnya sintesis asam nukleat. Membran sel yang rusak dapat mengakibatkan transpor nutrisi terganggu sehingga nutrisi yang diperlukan pertumbuhan sel bakteri mengalami kekurangan.

Mekanisme flavonoid bersifat antibakteri karena mampu berinteraksi dengan DNA bakteri. Hasil interaksi ini menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri, mikrosom, dan lisosom. Mekanisme antibakteri yang lain pada flavonoid adalah adanya kandungan gugus hidroksil yang dimiliki oleh flavonoid. Gugus hidroksil secara kimia menyebabkan perubahan komponen organik dan transport nutrisi sehingga menimbulkan efek toksik terhadap sel bakteri. Flavonoid juga mampu menghasilkan energi transduksi yang akan mempengaruhi sitoplasma bakteri dan memperlambat motilitasnya (Chandra, 2016). Selain itu flavonoid juga mampu mengganggu jalur quorum sensing dengan cara mengganggu sinyal AHL, mengganggu penghambatan penyebaran sinyal AHL atau penghambatan penerimaan sinyal AHL sehingga menghambat kemampuan populasi bakteri dan

menyebabkan Vir B (faktor virulensi) kurang berekspresi terhadap sel inang dalam proses patogenesisnya (Vasavi *et al.*, 2016). VirB diperlukan untuk penetrasi sel host dan penyebaran antar sel (Pilla *et al.*, 2017). Menurut flavonoid juga menghambat peradangan yang diinduksi LPS melalui penghambatan aktivasi NF- κ b sehingga dapat mengurangi peradangan dan secara khusus flavonoid mengganggu NLRP3 dan kemudian menghambat aktivasi caspase-1 pada makrofag. Produksi NLRP3 yang dimediasi inflamasi dari IL-1 β merupakan sebagai mediator penting dalam perkembangan penyakit yang berfungsi sebagai master sitokin yang selanjutnya dapat menginduksi ekspresi sitokin proinflamasi lainnya, seperti IL-6 dan TNF- α , kemokin, molekul adhesi, dan molekul terkait peradangan lainnya untuk memperkuat respons inflamasi (Zhang *et al.*, 2015).

Mekanisme alkaloid sebagai antibakteri yang lain adalah menghambat aktivitas dihidrofolat reduktase, sehingga menghambat sintesis asam nukleat. Dihydrofolate reductase adalah enzim yang sangat penting dalam produksi prekursor pirimidin dan purin untuk asam amino, RNA, dan biosintesis DNA (Othman, 2019) dan juga dapat menghambat *efflux pump* (EPs) sehingga resistensi terhadap antibakteri menjadi berkurang (Huda, 2016). Tanin menyerang polipeptida sel sehingga pembentukan dinding sel menjadi tidak utuh. Menurut Iwatsuki (2015), tanin juga dapat berikatan dengan siderofor untuk mengurangi kebutuhan nutrisi (besi) sehingga bakteri ini kekurangan nutrisi yang berakibat bakteri tidak dapat hidup. Selain ini tanin juga bisa menghambat adhesi yang dilakukan bakteri, mengganggu transport protein dalam sel, dan menginaktifkan enzim termasuk enzim reverse transkriptase dan DNA topoisomerase sel bakteri tidak dapat terbentuk (Kurhekar, 2016).

Saponin berfungsi sebagai antibakteri karena permukaan pada zat aktif saponin menyerupai sabun, akibatnya saponin akan mengurangi tegangan permukaan dinding sel bakteri dan merusak permeabilitas membran. Rusaknya membran sel ini sangat mengganggu kelangsungan hidup bakteri (Sapara, 2016). Minyak atsiri yang aktif sebagai antibakteri umumnya mengandung gugus fungsi hidroksil (-OH) dan karbonil. Turunan fenol berinteraksi dengan sel bakteri melalui proses adsorpsi yang melibatkan ikatan hidrogen. Pada kadar rendah, terbentuk kompleks protein dengan fenol dengan ikatan yang lemah dan segera mengalami penguraian, diikuti penetrasi fenol ke dalam sel dan menyebabkan presipitasi serta denaturasi protein. Pada kadar tinggi, fenol dapat menyebabkan koagulasi protein dan sel membran mengalami lisis (Rachmawaty, *et al.*, 2016).

Menurut Susanti (2016), mikroorganisme dapat dihambat atau dibunuh karena dipengaruhi oleh adanya metabolit sekunder yang ada pada tumbuhan. Metabolit sekunder ini dapat diperoleh melalui proses ekstraksi. Metode ekstraksi yang dipilih dapat mempengaruhi keluarnya senyawa metabolit sekunder pada tumbuhan. Pada penelitian ini menggunakan metode *Ultrasound-Assisted Extraction* (UAE) dengan menggunakan pelarut etanol 96%. Metode UAE dapat mengeluarkan senyawa dari matriks tanpa merusak struktur ekstrak, dan mencegah hilangnya atau menguapnya senyawa yang memiliki titik didih rendah dan pemecahan dinding sel dari bahan kandungan yang ada di dalamnya dapat keluar dengan mudah dan lebih banyak (Sholihah, 2017).

Senyawa antibakteri yang terdapat pada daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) seperti alkaloid, flavonoid, saponin, tanin dan minyak atsiri dapat terangkat karena menggunakan pelarut yang bersifat polar. Salah satu pelarut polar yang dapat

melarutkan senyawa kimia pada ekstrak adalah etanol 96%. Pelarut etanol 96% sering digunakan untuk mengeluarkan senyawa bioaktif karena pelarut etanol mudah untuk menembus membran sel untuk mengekstrak senyawa bioaktif seperti tanin, fenol dan flavonoid dari bahan tumbuhan. Menurut Savitri (2014), flavonoid merupakan senyawa polar yang larut dalam pelarut etanol, methanol, aseton, dimetil sulfoksida, butanol, dimetil formamida dan air. Hal ini juga sejalan dengan Dwicahyani (2018) bahwa pelarut etanol 96% merupakan pelarut umum yang memiliki indeks polaritas 5,2 sehingga berbagai senyawa baik polar maupun non polar seperti alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, serta steroid dan terponoid yang terkandung pada tumbuhan dapat keluar dari tumbuhan.

5.2.3 Pengaruh Ekstrak Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix*) terhadap

Konsentrasi Hambat Minimal Pertumbuhan Bakteri *Shigella dysenteriae*

Berdasarkan rata-rata diameter zona hambat pada uji difusi didapatkan hasil positif diperlihatkan pada grafik 5.2 yaitu konsentrasi terbesar dimulai dari 30%, 25%, 20%, 15%, 10% dan terkecil pada konsentrasi 5%. Menurut penelitian terdahulu yang telah melakukan uji fitokimia, ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) ditemukan adanya senyawa flavonoid, minyak atsiri, saponin dan tanin. Akan tetapi pada uji dilusi dengan konsentrasi 30%, 25%, 20%, 15%, 10% dan 5% tidak dapat ditentukan nilai KHM karena terdapat kekeruhan pada seluruh tabung. Kekeruhan yang terjadi diduga berasal dari organisme kontaminan atau ekstrak. Kemungkinan adanya kontaminan dapat disingkirkan dengan hasil uji subkultur yang bersih pada kontrol positif dan beberapa konsentrasi uji. Oleh sebab itu, dapat disimpulkan bahwa penyebab konsentrasi hambat minimal (KHM) tidak dapat

ditentukan karena kondisi ekstrak yang gelap dan pekat sehingga tingkat kekeruhan yang diamati secara visual tiap konsentrasi sulit diamati. Hal tersebut sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Sunartha (2018) bahwa konsentrasi hambat minimal daun jeruk purut tidak dapat ditentukan terhadap bakteri Grup A *B-Hemolyticus Streptococcus* (GABHS) karena ekstrak daun jeruk purut terlalu pekat dan keruh.

Penelitian ini juga tidak dapat menggunakan metode turbidimetri karena dalam metode ini, nilai OD (*Optical Density*) diukur menggunakan spektrofotometer dimana sampel yang diuji harus transparan atau tidak ada bahan pengganggu yang lain. Oleh sebab itu dilakukan penggantian metode dilusi untuk menentukan KHM dengan menggunakan metode difusi sumuran. Metode difusi sumuran yaitu metode yang menggunakan lubang pada agar padat yang telah diinokulasi dengan bakteri uji dan setiap lubang diisi dengan zat uji kemudian diinkubasi pada suhu dan waktu yang sesuai dengan mikroba uji. Setelah diinkubasi, dilakukan pengamatan dengan melihat zona bening yang ada disekitar lubang (Cappucino, 2019). Menurut Singh (2013), penentuan konsentrasi hambat minimal pada metode difusi sumuran memiliki korelasi yang baik dengan metode *broth dilution* terhadap antibakteri *Salvia Officinalis L. Sage Oil* terhadap beberapa bakteri yang ditandai dengan tidak ada perbedaan signifikan dari kedua metode yang berarti penentuan KHM bisa menggunakan metode difusi sumuran atau metode dilusi tabung.

Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) didefinisikan sebagai konsentrasi terendah yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Akan tetapi kekurangan pada metode ini yaitu alat yang digunakan untuk membuat lubang pada metode difusi sumuran. Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah spuit 5 ml karena

memiliki diameter yang sama dengan kertas cakram yaitu 6 mm. Akan tetapi pada saat proses pembuatan lubang menghasilkan tepian yang tidak rapi.

Berdasarkan grafik 5.2, dapat diketahui rata-rata zona hambat yang dibentuk oleh setiap perlakuan konsentrasi ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) 30% sebesar 25,25 mm, konsentrasi 25% sebesar 23,00 mm, konsentrasi 20% sebesar 20,25 mm, konsentrasi 15% sebesar 18,25 mm, konsentrasi 10% sebesar 15,75 mm, dan konsentrasi 5% sebesar 13,25 mm. Berdasarkan hasil statistik, konsentrasi ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) pada konsentrasi 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, dan 5% memiliki aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* secara signifikan dimana semakin tinggi konsentrasi maka semakin besar zona hambat yang dihasilkan. Sehingga dapat disimpulkan bahwa konsentrasi hambat minimal (KHM) adalah pada ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) dengan konsentrasi 5%, karena memiliki rata-rata diameter zona hambat paling kecil yaitu 13.25 mm.

Menurut Susilowati (1997) yang disitasi oleh Nomer *et al* (2019), zona hambat yang dihasilkan pada metode sumuran menghasilkan diameter yang besar. Hal ini disebabkan karena terjadi proses osmolaritas yang lebih menyeluruh dan lebih homogen daripada metode difusi yang menggunakan kertas cakram sehingga zona hambat yang dihasilkan lebih tinggi dan lebih kuat menghambat pertumbuhan bakteri. Hal tersebut juga sesuai dengan penelitian Osuntokun (2007) dan Parhusip (2011) yaitu bahwa penentuan konsentrasi hambat minimal lebih baik ditentukan dengan menggunakan difusi sumuran dikarenakan zona hambat yang dihasilkan pada difusi sumuran lebih besar serta didapatkan hasil yang signifikan dan sensitif daripada difusi kertas cakram akibat osmolaritas lebih menyeluruh. Hal tersebut

juga sesuai dengan penelitian Khusuma *et al.*, (2019) yang mengatakan bahwa metode difusi sumuran memiliki daya hambat yang lebih kuat karena ekstrak langsung dimasukkan ke dalam setiap lubang sumuran sehingga lebih terlihat secara jelas mengenai visual dari zona hambat sehingga memudahkan peneliti untuk menentukan konsentrasi hambat minimum walaupun dalam menggunakan metode difusi sumuran harus hati-hati karena terdapatnya sisa-sisa agar pada suatu media yang digunakan untuk membuat sumuran, selain itu juga besar kemungkinan media agar retak atau pecah disekitar lokasi sumuran sehingga dapat mengganggu proses peresapan ekstrak kedalam media yang akan mempengaruhi terbentuknya diameter zona bening saat melakukan uji sensitivitas, sehingga diperlukan teknik yang cukup baik untuk mendapatkan sumuran utuh yang tidak mengganggu kerja dari uji sensitivitas ekstrak terhadap suatu bakteri.

Menurut Brooks *et al.*, (2013), menerangkan bahwa mekanisme yang menyebabkan pertumbuhan bakteri terhambat akibat senyawa antibakteri karena terdapat kerusakan pada membran sel. Kerusakan membran sel menyebabkan terganggunya komponen-komponen seluler dan menyebabkan proses respirasi bakteri tidak terjadi. Pada akhirnya mengakibatkan tidak tercukupinya energi sehingga pertumbuhan bakteri terganggu. Menurut CLSI (2016), tinggi rendahnya aktifitas antibakteri memang dapat dilihat dari diameter zona hambat akan tetapi kekuatan aktifitas antibakteri lebih ditentukan oleh nilai KHM, karena KHM menunjukkan kemampuan antimikroba yang mampu menginhibisi pertumbuhan mikroba dalam konsentrasi minimalnya, sedangkan penilaian berdasarkan zona hambat hanya menggambarkan kekuatan daya hambat suatu zat antibakteri tanpa

menggambarkan konsentrasi minimal suatu zat antibakteri untuk memberikan efek antiibakteri.

Metabolit sekunder yang ada pada ekstrak daun jeruk purut yaitu flavonoid sebagai antimikroba dapat dibagi menjadi 3 yaitu menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi membran sel dan menghambat metabolisme energi. Mekanisme kerja favonoid dalam menghambat sintesis asam nukleat dilakukan melalui cincin B pada favonoid yang mempunyai peranan penting dalam proses interkalasi atau ikatan hidrogen dengan menumpuk basa asam nukleat yang menghambat sintesis DNA dan RNA (Xie *et al*, 2016). Mekanisme kerja flavonoid menghambat fungsi membran sel melalui ikatan kompleks dengan protein ekstraseluler yang bersifat larut sehingga dapat mengganggu integritas membran sel bakteri. Adanya gangguan dalam permeabilitas membran sel ini akan mempengaruhi gradien elektrokimia proton yang melewati membran. Gradien elektrokimia proton melintasi membran sangat penting bagi bakteri dalam mensintesis ATP, transport membran dan pergerakan bakteri, sehingga dengan adanya senyawa favonoid akan menyebabkan terganggunya *proton motive force* yang berakibat terganggunya sintesis ATP, transport membran dan pergerakan bakteri. Selain itu penghambatan metabolisme energi bakteri oleh favonoid dilakukan dengan cara menghambat proses respirasi bakteri sehingga adanya energi yang dihambat akan berpengaruh terhadap aktivitas penyerapan metabolit dan biosintesis makromolekul bakteri (Rahman, 2016).

Mekanisme senyawa alkaloid sebagai antibakteri adalah dengan mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan mengganggu sintesis peptidoglikan sehingga

pembentukan sel tidak sempurna karena tidak mengandung peptidoglikan dan dinding selnya hanya meliputi membran sel (Dwicahyani, 2018). Mekanisme kerja tanin yaitu dengan cara menghambat enzim reverse transkriptase dan DNA topoisomerase sehingga sel bakteri tidak dapat terbentuk (Maisetta, 2019). Saponin berdifusi melalui membran luar dan dinding sel yang rentan kemudian mengikat membran sitoplasma sehingga mengganggu dan mengurangi kestabilan membran sel. Hal ini menyebabkan sitoplasma bocor keluar dari sel yang mengakibatkan kematian sel (Sapara, 2016).

5.2.4 Pengaruh Ekstrak Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix*) terhadap

Konsentrasi Bunuh Minimal Pertumbuhan Bakteri *Shigella dysenteriae*

Jumlah koloni bakteri dapat dihitung dengan *colony counter*. Satuan dalam perhitungan jumlah koloni adalah CFU (*Colony Forming Unit*) untuk populasi mikroba (Andries *et al*, 2014). Kemudian pada uji difusi sumuran didapatkan nilai KHM pada konsentrasi 5% karena pada konsentrasi terkecil sudah mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* yang ditandai dengan munculnya diameter zona hambat dan berdasarkan perhitungan dengan *colony counter* didapatkan konsentrasi 20% sudah tidak terdapat pertumbuhan koloni ini berarti menunjukkan nilai Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM) pada penelitian ini, karena syarat KBM yaitu tidak ada pertumbuhan koloni (Julianti *et al.*, 2017). KBM pada penelitian ini menggunakan metode dilusi.

Hasil konsentrasi bunuh minimum yang telah diinkubasi selama 18 – 24 jam pada suhu 37°C dapat dilihat pada tabel 5.3. Berdasarkan hasil uji aktivitas antibakteri dari ekstrak daun jeruk purut terhadap bakteri *Shigella dysenteriae*

diperoleh hasil pada konsentrasi 30%, 25%, dan 20% tidak terdapat pertumbuhan bakteri, pada konsentrasi 15%, 10%, dan 5% terdapat pertumbuhan bakteri yang diuji secara statistik berbeda secara signifikan.

Hasil penelitian ini berhubungan dengan adanya senyawa fitokimia yang terkandung di dalam ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*). Faktor-faktor yang mempengaruhi aktivitas antibakteri adalah kandungan senyawa antibakteri pada tanaman, konsentrasi ekstrak, daya difusi ekstrak dan jenis bakteri yang dihambat. Kemampuan antibakteri dari ekstrak etanol 96% daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* sangat dipengaruhi oleh beberapa kandungan senyawa metabolit sekunder yang berperan sebagai senyawa antibakteri. Keadaan ini secara perlahan akan menghambat *Shigella dysenteriae* untuk membentuk sistem pertahanannya. Setelah sistem pertahanannya terganggu, maka akan lebih mudah untuk menyerang bagian sel lain pada *Shigella dysenteriae* sehingga pertumbuhannya terhambat bahkan terbunuh (Jawetz, 2013).

Hal tersebut juga dikarenakan kandungan senyawa antibakteri yang terdapat pada ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) seperti flavonoid, tanin, alkaloid, saponin, dan minyak atsiri. Mekanisme antibakteri metabolit sekunder dari ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) seperti Mekanisme kerja flavonoid sebagai antimikroba dapat dibagi menjadi 3 salah satunya adalah menghambat sintesis asam nukleat dilakukan melalui cincin B pada favonoid yang mempunyai peranan penting dalam proses interkalasi atau ikatan hidrogen dengan menumpuk basa asam nukleat yang menghambat sintesis DNA dan RNA (Xie *et al*, 2016). Mekanisme senyawa alkaloid sebagai antibakteri adalah dengan mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri sehingga lapisan dinding sel tidak

terbentuk secara utuh dan mengganggu sintesis peptidoglikan sehingga pembentukan sel tidak sempurna karena tidak mengandung peptidoglikan dan dinding selnya hanya meliputi membran sel (Dwicahyani, 2018).

Mekanisme kerja tanin yaitu dengan cara menginhibisi enzim reverse transkriptase dan DNA topoisomerase sehingga sel bakteri tidak dapat terbentuk (Maisetta, 2019). Saponin berdifusi melalui membran luar dan dinding sel yang rentan kemudian mengikat membran sitoplasma sehingga mengganggu dan mengurangi kestabilan membran sel. Hal ini menyebabkan sitoplasma bocor keluar dari sel yang mengakibatkan kematian sel (Sapara, 2016). Minyak atsiri mempunyai mekanisme kerja dengan mendenaturasikan protein ekstraseluler sehingga mengganggu pembentukan dinding sel, merusak membran sel secara langsung dan mempunyai aktivitas antibakteri karena senyawa ini mampu membentuk kompleks lipid. Kerusakan membran sel bakteri dapat menyebabkan terganggunya transport nutrisi yang melalui membran sel. Sehingga bakteri kekurangan nutrisi yang diperlukan dalam proses pertumbuhan bakteri (Cepeda, 2019).

Menurut penelitian Jannah (2019), konsentrasi bunuh minimal (KBM) tidak dapat ditentukan pada bakteri *Lactobacillus acidophilus*. Berbeda dengan penelitian ini, dimana KBM-nya adalah pada konsentrasi 20%. Hal tersebut dikarenakan perbedaan bakteri uji. Pada penelitian ini menggunakan bakteri *Shigella dysenteriae* yang merupakan bakteri gram negatif, dan pada penelitian Jannah (2019), menggunakan bakteri gram positif.

5.5 Integrasi Islam

Herbalogi merupakan ilmu yang menggunakan bahan herbal yang berasal dari tumbuhan dan tidak menggunakan bahan yang bersifat sintetis. Herbal terbaik yang disarankan oleh Rasulullah saw. adalah *habbatusaudah*, *minyak zaitun*, *madu* dan termasuk tanaman obat (Wahyuni, 2016). Obat herbal tersebut sering dipakai oleh Rasulullah dalam menyembuhkan berbagai penyakit pada zamannya seperti infeksi atau mencegah perdarahan (Nurhayati 2016). Hal tersebut juga dipertegas oleh Wahyuni (2016) bahwa berdasarkan ilmu pengetahuan modern, tumbuhan merupakan tanaman herbal yang mempunyai manfaat untuk mencegah suatu penyakit. Salah satunya adalah penggunaan ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) yang memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Shigella dysenteriae*. Hal tersebut sesuai dengan firman Allah Swt. yaitu meminta manusia untuk merenungkan ciptaan-Nya (tumbuhan) agar dapat dimanfaatkan dengan baik sebagaimana pada QS. Thaha (20) ayat 53 sebagai berikut :

الَّذِي جَعَلَ لَكُمُ الْأَرْضَ مَهْدًا وَسَوَّلَ لَكُمْ فِيهَا سُبُلًا وَأَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ أَزْوَاجًا
مِّن نَّبَاتٍ شَتَّىٰ (طه: ٥٣)

Artinya: “Yang telah menjadikan bagimu bumi sebagai hamparan dan Yang telah menjadikan bagimu di bumi itu jalan-jalan, “dan menurunkan dari langit air hujan”. Maka Kami tumbuhkan dengan air hujan itu berjenis-jenis dan tumbuh-tumbuhan yang bermacam-macam.” (Q.S. Thaha: 53) (Kementrian Agama RI, 2011)

Menurut Shihab (2002) dalam tafsir Al Mishbah pada surah At-Thaha ayat 53 yaitu Allah Swt. menganugerahkan nikmat kehidupan dan pemeliharaan seluruh semesta dengan kekuasaan-Nya, dia telah menjadikan bumi sebagai hamparan untukmu, membuka jalan-jalan untuk kamu lalui dan menurunkan hujan diatas

bumi sehingga tercipta sungai-sungai. Dengan air itulah Allah Swt. menumbuhkan tumbuh-tumbuhan yang berbeda-beda warna, rasa dan manfaatnya. Ada yang berwarna putih dan hitam, ada pula yang rasanya manis dan pahit.

Ayat diatas disimpulkan bahwa nikmat yang Allah Swt. berikan pada manusia begitu besar, salah satunya adalah menurunkan hujan sehingga sungai dan danau bisa tercipta, dan dengan bantuan air, tumbuhan dapat tumbuh beserta dengan manfaat dan keberagaman yang dibawanya (Kementrian Agama RI, 2012). Salah satu tumbuhan yang memiliki manfaat adalah daun jeruk purut (*Citrus hystrix*). Daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) memiliki bau yang harum dan bisa dimanfaatkan sebagai obat atau penyedap masakan. Senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) seperti flavonoid, tannin, steroid, minyak atsiri, saponin, dan alkaloid yang mana bisa berfungsi sebagai antibakteri. Hal tersebut sudah dibuktikan pada penelitian ini yaitu terdapat aktivitas antibakteri daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) terhadap pertumbuhan bakteri terutama pada bakteri *Shigella dysenteriae* bahkan pada konsentrasi terkecil yang digunakan pada penelitian ini.

Hal tersebut juga diterangkan dalam QS. An-Nahl (16) ayat 11 yang menerangkan bahwa bukti kekuasaan Allah swt. yang sangat luas yang ditujukan kepada orang-orang yang punya akal (Kementrian Agama RI, 2012). Menurut Agustin (2019), tumbuhan merupakan sumberdaya hayati yang telah diciptakan oleh Allah Swt. dan dimanfaatkan oleh manusia untuk diolah dengan sebaik mungkin, sebagaimana firman Allah Swt. dalam QS. Al-Hijr (15) ayat 19-20, sebagai berikut :

وَالْأَرْضَ مَدَدْنَاهَا وَأَلْقَيْنَا فِيهَا رَوْسِيَ وَأَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ شَيْءٍ مَّوْزُونٍ (الحجر: ١٩)
وَجَعَلْنَا لَكُمْ فِيهَا مَعِيشَ وَمَنْ لَسْتُمْ لَهُ بِرَازِقِينَ (الحجر: ٢٠)

Artinya : “Dan Kami telah menghamparkan bumi dan menjadikan padanya gunung-gunung dan Kami tumbuhkan padanya segala sesuatu menurut ukuran. Dan Kami telah menjadikan untuk kamu di sana sarana kehidupan, dan yang kamu sekali-kali terhadapnya bukanlah pemberi rezeki.” (QS. Al-Hijr :19-20) (Kementrian Agama RI, 2011)

Menurut Shihab (2002) dalam tafsir Al-Misbah, menerangkan dalam firman Allah swt. : *“dan Kami tumbuhkan padanya segala sesuatu menurut ukuran”* yang berarti bahwa Allah Swt. menumbuhkan bumi ini dengan tumbuhan untuk membantu kelangsungan hidup makhluk hidup dan menetapkan bagi setiap tumbuhan memiliki masa pertumbuhan dan penuaian tertentu yang sesuai dengan kebutuhan agar bisa dimanfaatkan oleh makhluk hidup. Penciptaan langit dan alam semesta ini semuanya adalah untuk kehidupan manusia yang seharusnya dimanfaatkan dan dijaga kelestariannya demi kemaslahatan dan kesejahteraan manusia itu sendiri.

Allah Swt. telah menciptakan segala sesuatu memiliki tujuan yang bermanfaat karena Allah menciptakan sesuatu beserta manfaatnya bagi manusia yang berfikir. Salah satu ciptaan Allah Swt. adalah tumbuhan. Tumbuhan berfungsi sebagai penyongkong kehidupan, penghasil pangan bagi makhluk hidup dan dapat menyerap karbondioksida. Tidak hanya itu, manusia mampu mencari tau manfaat tumbuhan dengan ilmu sains, sehingga banyak peneliti yang membuktikan bahwa tumbuhan memiliki manfaat sebagai obat untuk mencegah atau menyembuhkan penyakit (Majelis Ulama Indonesia, 2017).

Oleh karena itu, manusia diharapkan mampu mengkaji ciptaan Allah (tumbuhan) yang diciptakan dengan berbagai macam manfaat. Oleh sebab itu pada penelitian ini berhasil untuk mengetahui manfaat daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) sebagai antibakteri yang dibuktikan dengan terdapat aktivitas menghambat dan membunuh pada pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* bahkan pada konsentrasi terendah yang digunakan pada penelitian ini karena metabolit sekunder yang berada didalam tanaman tersebut.

Penelitian ini diharapkan bisa memberi manfaat karena penelitian ini memberikan sumbangsih terhadap keilmuan seperti menambah kepustakaan tentang wawasan tanaman obat yang semakin banyak dan juga memberikan sumbangan pemikiran bagi perkembangan ilmu pengetahuan sains dan diharapkan dapat dijadikan sebagai bahan untuk penelitian bagi yang tertarik meneliti tentang tumbuhan. Penelitian ini tidak hanya semata memfasilitasi para penelitan saja melainkan juga sekaligus untuk memberikan sumbangsih bagi dunia. Dunia merupakan laboratorium yang memiliki banyak aspek yang harus diteliti agar bisa terus-menerus mengalami perkembangan karena corak keberagaman yang sangat variatif dan terintegrasi dengan islam hal tersebut sesuai dengan kebiasaan Rasulullah Saw. yang mana sejak zaman tersebut, dimana Rasulullah Saw. selalu menggunakan tanaman untuk menyembuhkan penyakit. Selain itu efek samping yang dihasilkan juga memiliki toksisitas yang minimal.

BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan pada hasil penelitian yang telah dilakukan dapat ditarik beberapa kesimpulan sebagai berikut :

1. Ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) memiliki aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae*.
2. Ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) pada konsentrasi 30% memiliki zona hambat paling besar dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae*.
3. Kadar Hambat Minimal (KHM) pada penelitian ini yaitu pada ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) pada konsentrasi 5% yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae*.
4. Kadar Bunuh Minimal (KBM) pada penelitian ini yaitu pada ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) pada konsentrasi 20% yang mampu membunuh pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae*.

6.2 Saran

1. Pada penelitian ini tidak dilakukan penyortiran terhadap usia daun jeruk purut (*Citrus hystrix*), maka dari itu perlu melakukan penentuan standar terhadap usia tumbuhan dan penyortiran daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) yang akan digunakan sebagai sampel dalam penelitian.

2. Pada penelitian tidak melakukan pengujian fitokimia melainkan hanya merujuk pada penelitian terdahulu saja, maka dari itu penting melakukan pengujian fitokimia pada ekstrak daun jeruk purut untuk mengetahui kandungan senyawa antibakteri yang terdapat di dalamnya agar lebih akurat karena biasanya faktor tempat tanaman yang berbeda dapat menghasilkan hasil yang berbeda juga.
3. Pada penelitian ini tidak bisa ditentukan KHM dengan menggunakan dilusi tabung karena ekstrak yang dihasilkan pekat dan keruh sehingga sulit dibedakan dengan pertumbuhan bakteri, maka dari itu perlu dicoba menggunakan ekstrak daun jeruk purut (*Citrus hystrix*) dalam bentuk yang lain misalnya serbuk atau penggantian metode ekstraksi yang lain misalnya metode esktraksi dekokta atau penggantian metode pengujian antibakteri yang lain yaitu metode mikrodilusi.
4. Karena pada penelitian ini konsentrasi terkecil memiliki aktivitas antibakteri, maka perlu untuk melanjutkan penelitian dengan menggunakan konsentrasi lebih kecil lagi agar penentuan nilai KHM dan KBM dapat lebih spesifik.

DAFTAR PUSTAKA

- Ad- Dimasyqi, A. 2000. *Tafsir Ibnu Kasir*. Bandung: Penerbit Sinar Baru Agesindo Bandung.
- Agustina, P., & Musbita, E. 2017. *Petunjuk Praktik Pengembangan Praktikum Biologi Sekolah*. Surakarta: Laboratorium Biologi Program Studi Pendidikan Biologi Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Aini, Fitratul. 2018. *Isolasi Dan Identifikasi Shigella sp. Penyebab Diare Pada Balita*. Vol 4, nomer 01. Hal: 1-40. Jambi: Universitas Jambi.
- Al-Mahally, Imam Jalaluddin dan Imam Jalaluddin As-suyutti, *Tafsir Jalalain Berikut Asbab An-nujulnya*, Jilid I Bandung,: Sinar Baru, 1990
- Al-Bukhari, Abu Abdullah Muhammad bin Ismail. 2011. *Ensiklopedia Hadits: Shahih al-Bukhari 1, Terj. Masyhar dan Muhammad Suhadi*. Jakarta: Almahira.
- Al-Qur'an Surat Al- Hijr (15) ayat 19-20. *Al-Qur'an dan Terjemahan*. Cetakan ke 7: Al-Mizan Publishing House.
- Al-Qur'an Surat Al-Imran (3) ayat 190-191. *Al-Qur'an dan Terjemahan*. Cetakan ke 7: Al-Mizan Publishing House.
- Al-Qur'an Surat An-Nahl (16) ayat 11. *Al-Qur'an dan Terjemahan*. Cetakan ke 7: Al-Mizan Publishing House.
- Al-Qur'an Surat Thaha (20) ayat 20. *Al-Qur'an dan Terjemahan*. Cetakan ke 7: Al-Mizan Publishing House.

- Amaliah, S., Sri, W., & Eka, K.U. 2018. *Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi n-heksan Kulit Buah Naga Merah (Hylocereus polyrhizus Britton & Rose) Terhadap Bakteri Staphylococcus aureus ATCC 25923*. Jurnal Fitofarmaka Indonseia. Vol 1 No. 2.
- Andries, J.R., Gunawan, P.N., A. Supit. 2014. *Uji Efek Antibakteri Ekstrak Bunga Cengkeh terhadap Bakteri Streptococcus mutans secara In Vitro*. Jurnal eGigi, 2 (2)
- Anuchapreeda, Songyot. 2020. *Isolation and biological activity of agrostophillinol from kaffir lime (Citrus hystrix) leaves*. Vol 30, issue 14. Department of Materials and Life Sciences, Faculty of Science and Technology, Sophia University, Tokyo, Japan.
- Ardianti, Anik. 2014. *Ekstraksi Anibakteri dari Daun Berenuk (Cresentia cujete Linn.) Menggunakan metode Ultasonik*. Jurnal Pangan dan Agroindustri Vol. 2 No. 2 p. 28-35. Malang: Universitas Brawijaya.
- Arfania, Maya. 2017. *Telaah Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Jeruk Purut (Citrix hystrix DC) di Kabupaten Karawang*. Vol. 2 No. 2. Karawang: Program Studi Farmasi Universitas Buana Perjuangan Karawang.
- Ariyani, Herda., Nazemi, Muhammad., Hamidah. 2018. *Uji Efektivitas Antibakteri Ekstrak Daun Jeruk Purut (Citrus hystrix DC) Terhadap Beberapa Bakteri*. Vol.2 No. 1. Banjarmasin: Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Banjarmasin.
- Arta, Maria Jessica. 2016. *Identifikasi Bakteri Patogen dan Kualitas Mikrobiologi Nasi Kuning Berbahan Beras Organik dan Non Organik dengan Metode*

Pemasakan Tradisional dan Modern. Skripsi. Semarang: Universita Katolik Soegijapranata.

Aryadi MN, Kurnadi BA, Joni, Harlia Erllin. 2015. *Evaluasi Pertumbuhan Isolat Bakteri Asal Feses Sapi Potong dan Produksi Gas Metana Pada Batubara Lignit*. Vol 19, No 40. Universitas Padjajaran.

Baker KS, Dallman TJ, Field N, et., 2018. *Horizontal antimicrobial resistance transfer drives epidemics of multiple Shigella species*. Volume 13, Number 9 p.1462. Nat Commun

Balouiri, M., Sadiki, M., Ibsouda, S.K., 2016. *Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review*. J. Pharm. Anal. 6, 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>.

Bangkele, Elli. 2015. *Efek Antibakteri dari Ekstrak Lengkuas Putih (Alpinia galangal swartz) terhadap Shigell dysenteriae*. Volume 01, Nomor 02. Universitas Tadulako: Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan.

Bhatt S, Pandey A, Pandey RD, Tripathi P, Gupta PP, Haider J, , Singh AV. 2009. *Moringaoleifera Lam. (Sahijan) – a plant with a plethora of diverse therapeutic benefits: an update retrospection*. Medicinal and Aromatic Plants 1(1) :2-8

Brooks, G.F., J.S Butel, dan S.A. Morse. 2013. Edisi: 25. *Mikrobiologi Kedokteran*. Salemba: EGC Medika. Jakarta.

Cappuccino, JG.& Sherman,N. 2019. *Microbiology: A Laboratory Manual*. The Benjamin/ Cummings Publishing Company,Inc. California.

Carrel et al. 2017. *Diarrheal disease risk in rural bangladesh decreases as tubewell density increases: a zero-infltaed and geographically weighted analysis*.

- Cepeda, Gino Nemesio. 2019. *Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Kulit Kayu Akway (Drimys piperita Hook. f.) pada Beberapa Tingkat Konsentrasi, Keasaman (pH) dan Kandungan Garam*. Volume 8, nomor 4. Manokwari: Universitas Papua.
- Chandra, 2016. *Flavonoids of a class of natural therapeutic drugs*. Vol 5, e47, PG 1 OF 15. Journal of Nutritional Science. India: Department of Bio-Engineering, Birla Institute of Technology.
- CLSI. 2016. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 26th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Cozzolino, R., P. Bernardo, C. Maria, M. Antonella, S. Matteo, F. Florinda, N. Filomena, and G. C. Beatrice. 2016. *Assessment of volatile profile as a potential marker of chilling injury of basil leaves during postharvest storage*. Food Chem. 213: 361-368.
- Dinas Kesehatan. 2016. *Diare: Buletin Jendela Data Informasi Kemenkes RI*. Available on: www.depkes.go.id.
- Dwicaahyani, Tiara. 2018. *Uji Bioaktivitas Ekstrak Teripang Keling Holothuria Atra Sebagai Antibakteri Staphylococcus Aureus Dan Escherichia Coli*. Vol. 7 No. 1. Universitas Diponegoro.
- Dwicheyani, Tiara. 2018. *Uji Bioaktivitas Ekstrak Teripang Keling Holothuria Atra Sebagai Antibakteri Staphylococcus aureus dan Escherichia coli*. Vol 7 No 1. Universitas Diponegoro.
- Ergina, Nuryanti., Puspitasari, I.D., 2014. *Uji Kualitatif Senyawa Metabolit Sekunder pada Daun Palado (Agave angustifolia) yang Diekstrak dengan*

- Pelarut Air dan Etanol* . Vol 3, No.3 , P. 165-170. Jurnal Akademi Kimia Universitas Tadulako Palu.
- Febrianasari, Florensia. 2018. *Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Kirinyu (Chromolaena odorata) terhadap Staphylococcus aureus*. Skripsi. Yogyakarta: Universitas Sanata Dharma.
- Foong CP, Hamid RA. *Evaluation of antiinflammatory activities of ethanolic extracts of annona muricata leaves*. Rev Bras Farmacogn Braz J Pharmacogn. 2015; 22(6): 1301 – 1307.
- Helmiyati, A.F., and Nurrahman. 2016. *Pengaruh Konsentrasi Tawas Terhadap Pertumbuhan Bakteri Gram Positif dan Negatif*. Jurnal Pangan dan Gizi. Vol 01, No. 01.
- Huda, Misbahul. 2016. *Resistensi Bakteri Gram Negatif Terhadap Antibiotik Di UPTD Balai Laboratorium Kesehatan Lampung Tahun 2012-2014*. Volume 5, No. 1. Bandar Lampung: Politeknik Kesehatan Tanjungkarang.
- Hussen, S., Mulatu, G. & Yohannes Kassa, Z. 2019. *Prevalence of Shigella species and its drug resistance pattern in Ethiopia: a systematic review and meta-analysis*. Ann Clin Microbiol Antimicrob , Volume 18, Issue 22. Elsevier.
- Iwatsuki, Keiji. 2015. Antibacterial action of several tannins against *Staphylococcus aureus*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 48, Issue 4, , Pages 487–49. Japan: Okayama University Graduate School of Medicine and Denistry.
- Jamaluddin, Nasrullah., Pulungan, Maimunah., Warsito. 2017. *Uji Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Jeruk Purut (Citrus hystrix DC) terdapat Klebsiella pneumonie ATCC*. Vol 6 No. 2. Malang: Universitas Brawijaya.

- Jannah, Izzatul. 2019. *Efek Antibakteri Ekstrak Daun Jeruk Purut (Citrus hystrix) terhadap pertumbuhan Lactobacillus Acidophilus*. Banda Aceh: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Syiah Kuala.
- Jawetz, E., Melnick. 2013. *Mikrobiologi Kedokteran*. Diterjemahkan oleh Mudihardi, E., Kuntaman, Wasito, E. B., Mertaniasih, N. M., Harsono, S., Alimsardjono, L., Edisi 25. Penerbit Salemba Medika, Jakarta
- Jawetz, melnick, & adelberg's medical microbiology. 25th Edition. Terjemahan Penerbit Buku Kedokteran EGC, 2013. Mikrobiologi kedokteran jawetz, melnick, & adelberg. Edisi 25. Jakarta: Penerbit Kedokteran EGC.
- Jawetz, melnick, & adelberg's medical microbiology. 27th Edition. Terjemahan Penerbit Buku Kedokteran EGC, 2016. Mikrobiologi kedokteran jawetz, melnick, & adelberg. Edisi 27. Jakarta: Penerbit Kedokteran EGC.
- Jawetz, Melnick. 2016. *Mikrobiologi Kedokteran*. Edisi 27. Penerbit Salemba Medika, Jakarta.
- Julianti. E., Kasturi K. R., Irda. F. 2017. *Antibacterial Activity Of Ethanolic Extract Of Cinnamon Bark, Honey and Their Combination Effects Against Acne-Causing Bacteria*. Journal Sci.Pharm. 85 (19) : -.
- Kachlicki, Piotr., Piaseca, Anna., Stobiecki, Maciej., 2016. *Structural Characterization of Flavonoid Glycoconjugates and Their Derivatives with Mass Spectrometric Techniques*. Vol. 21, Issue 11. Institute of Plant Genetics, Polish Academy of Sciences, Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań, Poland.
- Kementerian Agama, RI. 2012. *Al Qur'an dan Terjemahannya*. Jakarta Timur: CV Darus Sunnah.

Kementerian Agama, RI. 2011. *Al Qur'an dan Terjemahannya*. Jakarta Timur: CV Darus Sunnah.

Kementrian Kesehatan RI. 2017. *Data dan Informasi Profil Kesehatan Indonesia*. Jakarta.

Kementrian Kesehatan RI. 2018. *Data dan Informasi Profil Kesehatan Indonesia*. Jakarta.

Kim M, Or D. 2016. *Individual-Based Model of Microbial Life on Hydrated Rough Soil Surfaces*. Volume 11, Issue 1. China: East China Normal University.

Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder WC et al. 2018. *Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries*. 382(9888), p. 209–222. London.

Kotloff KL, Riddle MS, Platts-Mills JA, Pavlinac P, Zaidi AKM. 2018. *Shigellosis*. Number 391, Issue 10122, p:801-812. USA: University of Maryland School of Medicine.

Kroser, Joyan. 2018. *Shigellosis*. Available in: <https://emedicine.medscape.com/article/182767-overview>.

Kurhekar, Jaya. 2016. *Tannins – Antimicrobial Chemical Components*. Vol 9, Issue 3. India: Associate Professor, Department of Microbiology.

Liu J, Platts-Mills JA, Juma J, Kabir F, Nkeze J, Okoi C, Operario DJ, Uddin J, Ahmed S, Alonso PL, Antonio M, et al.. 2016. *Use of quantitative molecular diagnostic methods to identify causes of diarrhoea in children: a reanalysis of the GEMS case-control study*. Volume , Issue 388(10051), p. 1291-301. Japan.

- Maisetta, Giuseppantonio. 2019. *Tannin profile, antioxidant properties, and antimicrobial activity of extracts from two Mediterranean species of parasitic plant Cytinus*.
- Majelis Ulama Indonesia, 2017. *Pelestarian Satwa Langka Untuk Keseimbangan Ekosistem*. Jakarta: Lembaga Pemuliaan Lingkungan Hidup dan Sumber Daya Alam Majelis Ulama Indonesia.
- Mani, Sachin; Wierzba, Thomas; Walker, Richard I. 2018. *Status of vaccine research and development Shigella*. *Vaccine*. Volume 34, issue 26.p 2887–2894. Elsevier.
- Mazumder RN, Salam MA, Ali M, Bhattacharya MK. 2016. *Reactive arthritis associated with Shigella dysenteriae type 1 infection*. *External J Diarrhoeal Dis Res*.
- Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C., 2000. *The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer*. *Pharmacol. Rev.* 52, 673–751.
- Miftahendarwati, 2014. *Efek Antibakteri Ekstrak Daun Jeruk Purut (Citrus hystrix) Terhadap Bakteri Streptococcus mutans (in vitro)*. Skripsi. Makassar: Fakultas Kedokteran Gigi. Universitas Hasanudin.
- Mukhriani, 2014, *Ekstraksi, Pemisahan Senyawa, dan Identifikasi Senyawa Aktif*, *Jurnal Kesehatan*, 7(2): 361-367. Makassar: UIN Alaudin Makassar.
- Nomer, Ni Made Gress., Duniaji, Agus S., Nocianitri, Komang A.. 2019. *Kandungan Senyawa Flavonoid dan Antiosianin Ekstrak Kayu Sceang (Caesalpinia sappan L.) serta Aktivitas Antibakteri Terhadap Vibrio cholerae*. Vol 8, No. 2. Bali: Universitas Udayana.

- Normande, Bob. 2014. *Bakteri Enteropatogen pada Penderita Diare dan Kondisi Higiene Sanitasi Lingkungan Inang di Kecamatan Cigudeg Kabupaten Bogor*. Skripsi. Bogor: Departemen Biologi, IPB.
- Nurhayati. 2016. *Kesehatan Dan Perobatan Dalam Tradisi Islam: Kajian Kitab Shahih Al-Bukhârî*. Vol 16, Nomer 02. Hal. 223. Medan: UIN Sumatera Utara.
- Nurhidayanti, Sri., Faturrahman. 2015. *Deteksi Bakteri Patogen yang Berasosiasi dengan Kappaphycus alvarezii (Doty) Bergejala Penyakit Ice-Ice*. Vol.1, No. 2. Mataram.
- Parwata, I Made. 2016. *Kimia Organik Bahan Alam: Flavonoid*. Denpasar: Fakultas Udayana.
- Phobe, Williams. 2018. *Guidelines for the treatment of dysentery (shigellosis): a systematic review of the evidence. Paediatrics and International Child Health*. Vol. 38, No. S1, S50–S65. the University of Oxford, Oxford
- Pratiwi, Rina Hidyanti. 2017. *Mekanisme Pertahanan Bakteri Patogen Terhadap Antibiotik*. Vol 4, No. 03. Jakarta: Universitas Indrapastra.
- Putri, Meganada H., Sukini, Yodong. 2017. *Bahan Ajar Keperawatan Gigi*. Pusat Pendidikan Sumber Daya Manusia Kesehatan, Badan Pengembangan dan Pemeberdayaan Sumber Daya Manusia. Jakarta: Kementian Kesehatan Republik Indonesia.
- Putri, R.W.A. 2016. *Identifikasi Bakteri Eschericia coli dan Salmonella sp pada Jajanan Batagor di Sekolah Dasar Negeri di Kelurahan Pisangan, Cirendeu, dan Cempaka Putih Kecamatan Ciputat Timur*. Skripsi. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Uin Syarif Hidayatullah Jakarta.

- Rachmawaty, F. J. et al., 2016. *Manfaat Sirih Merah (Piper crocatum) sebagai Agen Anti Bakterial Bakteri Gram Positif dan Gram Negatif*. Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia 1:1-10. Bali: Unibersitas Udayana.
- Ragil, Dyah. 2017. *Hubungan antara Pengetahuan dan Kebiasaan Mencuci Tangan Pengasuh dengan Kejadian Diare pada Anak*. Jurnal of Health Education: Vol 02, No. 01. Semarang: Universitas Negeri Semarang.
- Rahayu, Susi Afrianti. 2017. *Uji Cemaran Air Minum Masyarakat Sekitarr Margahayu Raya Bandung dengan Identifikasi Bakteri E. Coli*. Vol.4, No. 2. Bandung.
- Rahman, Friska Ani. 2016. *Skrining fitokimia dan aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun sirsak (Annona muricata L.) pada Streptococcus mutans ATCC 35668*. Vol 3 No. 1. Yogyakarta: Universitas Gajah Mada.
- Rahmat Budiarto, Roedhy Poerwanto, Edi Santosa, Darda Efendi, Andria Augusta. 2019. *Agronomical and physiological characters of kaffir lime (Citrus hystrix DC) seedling under artificial shading and pruning*. : Vol 3. Number 1. Bogor Agricultural University, Bogor.
- Raksakantong, P., S. Siriamornpun, and N. Meeso. 2016. *Effect of drying methods on volatile compounds, fatty acids and antioxidant property of Thai kaffir lime (Citrus hystrix D.C.)*. Int. J. Food Sci. Technol. 47: 603-612.
- Ranjbar, Reza. 2016. *Virulotyping Of Shigella Spp. Isolated From Pediatric Patients In Tehran, Iran*. Vol 64, No. 1. P 71-89. Iran: Baqiyatallah University of Medical Sciences.
- Salim, M., Yahya, Sitorus, H., Marini, T.N., 2016. *Hubungan Kandungan Hara Tanah dengan Produksi Senyawa Metabolit Sekunder pada Tanaman Duku*

- (*L. Anisum domesticum* Corr var *Duku*) dan Potensinya sebagai Larvasida. Jurnal Vektor Penyakit Badan Litbang Kesehatan : Vol 10, No. 1, p. 11-18. Sumatra Selatan: Kementerian Kesehatan, RI.
- Sapara, Thresia U., 2016. *Efektivitas Antibakteri Ekstrak Daun Pacar Air (Impatiens balsamina L.) Terhadap Pertumbuhan Porphyromonas gingivalis*. Vol 5, No. 4. Manado: Universtas Sam Ratulangi.
- Savitri, N.P.I. 2014. *Efektivitas Antibakteri Ekstrak Daun Belimbing Wuluh (Averrhoa bilimbi L) Terhadap Bakteri Mix Saluran Akar Gigi*. Skripsi. Fakultas Kedokteran Gigi. Universitas Mahasaraswati Denpasar. Denpasar.
- Shihab, Quraish. 2002. *Tafsir Kontemporer 3*. Bogor: Pustaka Imam Asy-Syafi'ie.
- Shihab, Quraish. 2009. *Tafsir Al Mishbah, Pesan, Kesan, dan Keserasian AlQur'an*. Lentera Hati. Ciputat. Cetakan I, Muharram 1430. Hal 604- 606.
- Sholihah, Mar'atus. 2017. *Aplikasi Gelombang Ultrasonik untuk Meningkatkan Rendemen Ekstraksi dan Efektivitas Antioksi dan Kulit Manggis*. Vol 5, No 2, P 161-168. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Singh, Bhoj. 2013. *Evaluation of Antibacterial Activity of Sage (Salvia officinalis) Oil on Veterinary Clinical Isolates of Bacteria*. Vol 11, issue 28. India: Indian Veterinary Research Institute Izatnagar Bareilly Uttar Pradesh.
- Suratmo, Warsito, Noorhamdani, Sukardi, 2017. *Aktivitas Antioksidan Dan Antimikroba Minyak Jeruk Purut (Citrus Hystrix Dc.) dan Komponen Utamanya*. Vol. 04 No. 01. Malang: Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya.

- Sureshabu, Madduluri. 2018. *In Vitro Evaluation of Antibacterial Activity of Five Indigenous Plants Extract Against Five Bacterial Pathogens of Human*. Vol 5. No. 4. Departement of Biochemistry, University Acharya Nagarjuna.
- Suryani, Nyoman Citra. 2016. *Pengaruh Jenis Pelarut Terhadap Kandungan Total Flavonoid Dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Matoa (Pometia Pinnata)*. Vol 09, No. 21, p:18-24. Bali: Universitas Udayana.
- Taleb-Contini SH, Salvador MJ, Watanabe E, Ito IY, Oliveira DCR. *Antimicrobial activity of flavonoids and steroids isolated from two chromolaena species*. Braz J Pharm Sci. 2015; 39(4): 403 – 408.
- Tambun, Sabrina Handayani. 2015. *Uji Ativitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Petai (Parkia speciosa Hassk.) Terhadap Staphylococcus aureus ATCC 25923 dan Eschericia Coli ATCC 25922*. Skripsi. Yogyakarta: Universitas Sanata Dharma.
- Ulfa, Atiqa., Suarsini, Endang., 2016. *Isolation and Mercury Sensitivity Test of Bacterias Isolated from Waste Disposal in Gold Mining Area in West Sekotong of West Lombok Region: Preliminary Study*. Vol 13, No.1. Malang.
- Vasavi H.S., Arun A.B. dan Rekha P.D. 2016. *Anti-quorum sensing activity of Psidium guajava L. flavonoids against Chromobacterium violaceum and Pseudomonas aeruginosa PAO1*. *Microbiology and Immunology*, 58(5): 286-293.
- Venkatachalam, K., C. Techakanon, and S. Thitithanakul. 2018. *Impact of the ripening stage of wax apples on chemical profiles of juice and cider*. *ACS Omega*. 3: 6710-6718.

- Venkatachalam, Karthikeyan. 2019. *Changes in Phytochemicals and Antioxidant Properties of Kaffir Lime Leaves under Chilling Storage*. Khon Kaen Agr. J. 47 Suppl.1 . Thailand: Department of Food Technology, Faculty of Science and Industrial Technology.
- Wahyuni, Astri. 2016. *Aktivitas Antibakteri Sari Temulawak terhadap Pertumbuhan Eschericia Coli yang Diisolasi Dari Feses Broiler*. Skripsi. Makassar: UIN Alauddin Makassar.
- Wei, Yahan. 2016. *Shigella Iron Acquisition Systems and their Regulation*. Vol 6, No 18. USA: Department of Biological Sciences, Ohio University.
- WHO. 2016. *Dysenterie (Shigellosis)*. Diakses Selasa, 6 Juni 2017.
- Williams, Phoebe. 2016. *Dysentery (Shigellosis): Current WHO Guidelines and the WHO Essential Medicine List for Children*. World Health Organization.
- World Health Organization. 2017. *Diarrhoeal disease*. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>.
- Wulandari, P., Suswati, E., Misnawi., and A. Rianul. 2017. *Antibacterial Effect Of Ethanol Extract Cocoa Beans (Theobroma Cacao) On Growth In Vitro By Shigella Dysentriae*. Jurnal Medika Planta Vol. 01, No. 5, p. 67-75. Jember: Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Jember
- Wulandari, W., Y , Darmadji, P ., and Kurniawati, L. 2017. *Antioxidant Properties of Kaffir Lime Oil as Affected by Hydrodistillation Process*. Vol 1, Number 1. Departement of Food Technology, Gadjah Mada University.
- Xie, Yixi., Yang Weijie, Tang Feng. 2016. *Antibacterial Activities of Flavonoids: Structure-Activity Relationship and Mechanism*. Vol 22, No. 1, p. 13-149.

College of Chemistry and Chemical Engineering, Central South University, Changsha, China.

Yusnawan, Eriyanto., Setyorini, Sulisty Dwi., 2016. *Peningkatan Kandungan Metabolit Sekunder Tanaman Aneka Kacang sebagai Respon Cekaman Biotik*. Vol. 11. No. 2. Malang: Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi.

Zhang, Hongxia. 2017. *Phytochemical Constituents, Health Benefits, and Industrial Applications of Grape Seeds*. Vol 6, Issue 3. China: Department of Public Health, Xi'an Jiaotong-Liverpool University, Suzhou.

Zhang, X., Wang, G., Gurley, E. C., & Zhou, H. 2015. *Flavonoid apigenin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response through multiple mechanisms in macrophages*. *PloS one*, 9(9). China.

LAMPIRAN

Lampiran 1 (Determinasi Tanaman)



PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR
DINAS KESEHATAN
UPT LABORATORIUM HERBAL MATERIA MEDICA BATU
Jalan Lahor No.87 Telp. (0341) 593396
KOTA BATU 65313

Nomor : 074/ 074A / 102.7 /2020
Sifat : Biasa
Perihal : Determinasi Tanaman Jeruk Purut

Memosuhi permohonan saudara :

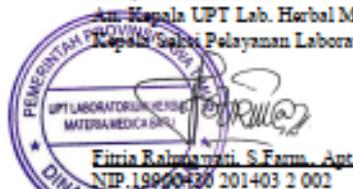
Nama : IRA RESMI MELANI
NIM : 16910045
Fakultas : FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN
UIN MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG

1. Perihal determinasi tanaman jeruk purut
Kingdom : Plantae (Tumbuhan)
Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
Super Divisi : Spermatophyta (Menghasilkan biji)
Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
Kelas : Dicotyledonae
Bangsa : Rutales
Suku : Rutaceae
Marga : Citrus
Jenis : *Citrus hystrix* DC
Sinonim : *C. pseudo* Miq.
Nama Daerah : Unte mukur, u. pangir (Batak); lemasu purut, l. sarakan (Lampung); lemaso puruk (Minangkabau); dema kafalo (Nias); limsu purut, jeruk wangi, jeruk purut (Sunda, Jawa); jeruk linglang, jeruk purut (Bali); mude matang busur, mude nalu (Flores); alusi lepea (Seram); lemo puru (Bragis); munde kereng (Arafuru); usi ela (Amboi); lemo jobatai, wama falseala (Haluhara).
Kunci Determinasi : 1b-2b-3b-4b-6b-7b-9b-10b-11b-12b-13b-14b-15b-197ba-208b-219b 220b-224b-225b-227b-229a-1a.
2. Morfologi : Habitus: Pohon, tinggi 5-7,5 m. Batang: Tegak, bulat, percabangan simpodial, berbulu, hijau kotor. Daun: Tunggal, berseling, lonjong, tepi beriringgit, ujung meruncing, pangkal membulat, panjang 4-5,5 cm, lebar 2-2,5 cm, tangkai bersayap, panjang 2-5 cm, hijau, pertulangan menyirip, permukaan berbintik, hijau. Bunga: Majemuk, bentuk tandan, di ketiak daun, tangkai silindris, panjang 2 cm, hijau, kelopak bentuk bintang, hijau kekuningan, benang sari silindris, panjang 3-6 mm, putih, tangkai putik silindris, panjang 3-5 mm, kepala putik bulat, kuning, mahkota lima helai, bentuk bintang, putih. Buah: Bulat, diameter 4-5 cm, permukaan berkerut, hijau. Biji: Bulat telur, putih. Akar: Tunggai, putih kekuningan.
3. Bagian yang digunakan : Daun.
4. Penggunaan : Penelitian (Skripsi).
5. Daftar Pustaka
 - Syamsulhidayat, Sri Sugati dan Hutapea, Johnny Ria. 1991. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia I*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia: Badan Penelitian Dan Pengembangan Kesehatan.
 - Van Steenis, CGGJ. 2008. *FLORA: untuk Sekolah di Indonesia*. Pradnya Paramita, Jakarta.

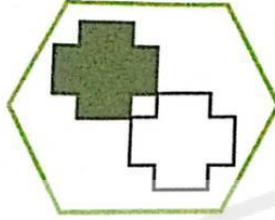
Demikian surat keterangan determinasi ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batu, 15 Januari 2020

An. Kepala UPT Lab. Herbal Materia Medica Batu
Kepala Seksi Pelayanan Laboratorium Herbal,



Lampiran 2 (Identifikasi Bakteri)



CV WIYASA MANDIRI

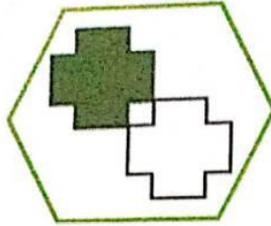
Mitra Sejati Laboratorium Pendidikan & Kesehatan
Perum Bumi Mondoroko Raya blok AJ 97 Singosari
Email : wiyasamandiri@gmail.com Telp. 08125274511

SURAT KETERANGAN ASAL MIKROORGANISME
No. 008/SK.CV.WM/12/2019

Domain : Bakteri
Phylum : Proteobacteria
Class : Gammaproteobacteria
Ordo : Enterobacterales
Family : Enterobacteriaceae
Genus : Shigella
Spesies : *Shigella dysenteriae*
Asal : CV. Wiyasa Mandiri
Jumlah : 1 (satu) strain isolat murni
Penerima : Ira Resmi Melani
Dusun Ngimbangan RT29 RW08, Kecamatan
Mojosari, Kabupaten Mojokerto

Malang, 20 Desember 2019
Direktur

Dyah Rokhmayanti, S.Si



CV WIYASA MANDIRI

Mitra Sejati Laboratorium Pendidikan & Kesehatan
Perum Bumi Mondoroko Raya blok AJ 97 Singosari
Email : wiyasamandiri@gmail.com Telp. 08125274511

LAPORAN HASIL UJI

No:012/IB /Lab.Wiyasa Mandiri /2020

KODE SAMPEL : 012/ IB
NAMA/JENIS SAMPEL : Isolat Bakteri
NAMA PELANGGAN : Rozi
ALAMAT : Mahasiswa FK UIN
TANGGAL PENERIMAAN : 10/012/2020
TANGGAL ANALISA : 10/012/2020
PARAMETER ANALISA : Uji Fenotip
SPESIFIKASI METODE : Mikroskopis, Makroskopis, dan IMViC
HASIL ANALISA :

IV. MIKROSKOPIS

Bentuk : Basil
Warna : Merah
Sifat Gram : Negatif

V. MAKROSKOPIS

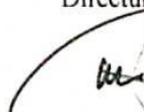
Bentuk Koloni : Bulat
Warna Koloni : Pucat
Tepi Koloni : Tidak Rata
Elevansi Koloni : Cembung
Konsistensi : Non Mucoïd
Koloni

VI. UJI BIOKIMIA

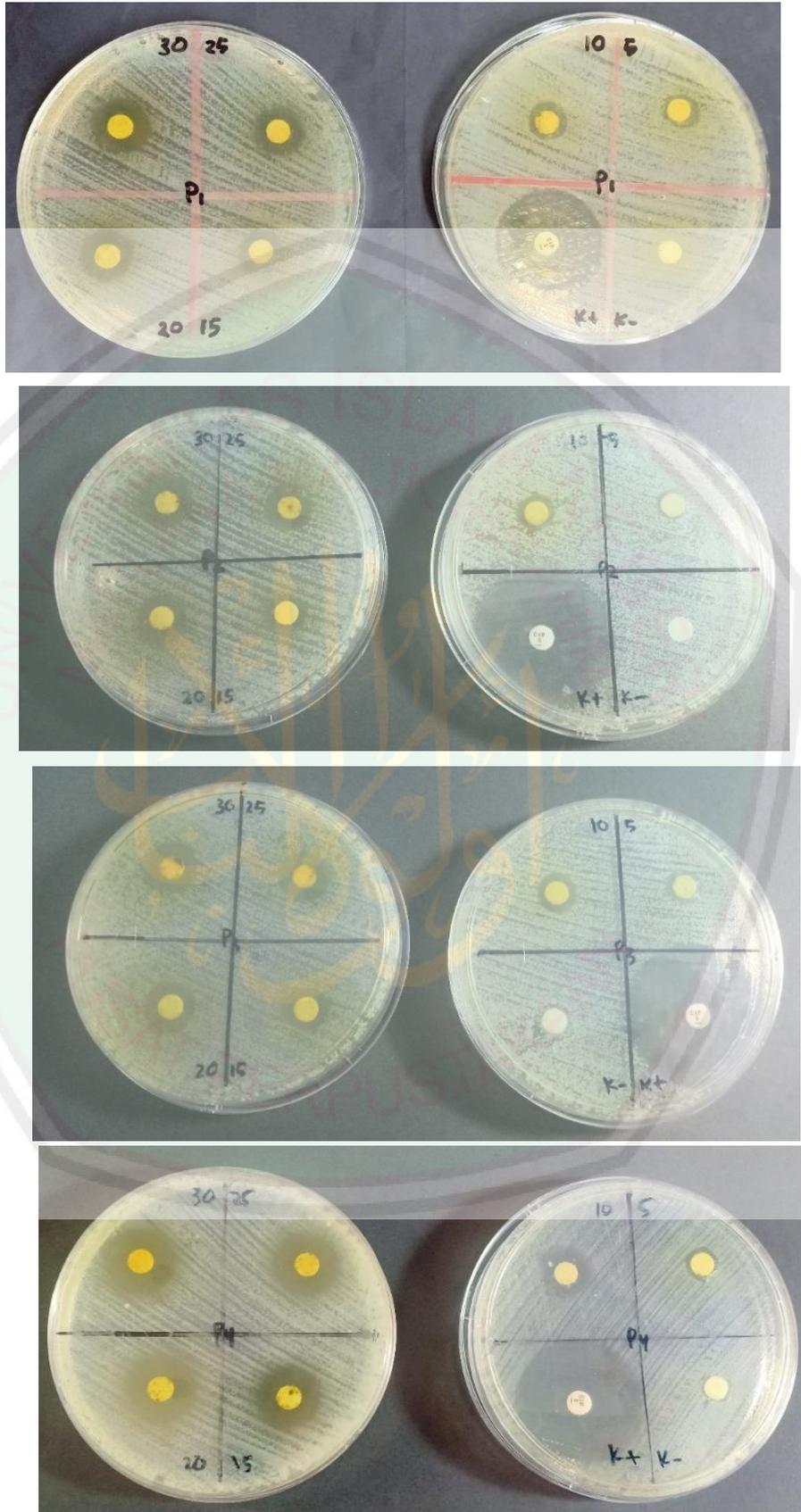
TSI : Alk/As, H₂S(-), G(-)
Indol : Positif
MR : Positif
VP : Negatif
Citrat : Negatif
Urease : Negatif

KESIMPULAN : Berdasarkan Hasil Identifikasi secara fenotip, sampel Isolat
Bakteri tersebut adalah bergenus Shigella
CATATAN : Hasil uji ini berlaku untuk sampel yang diuji

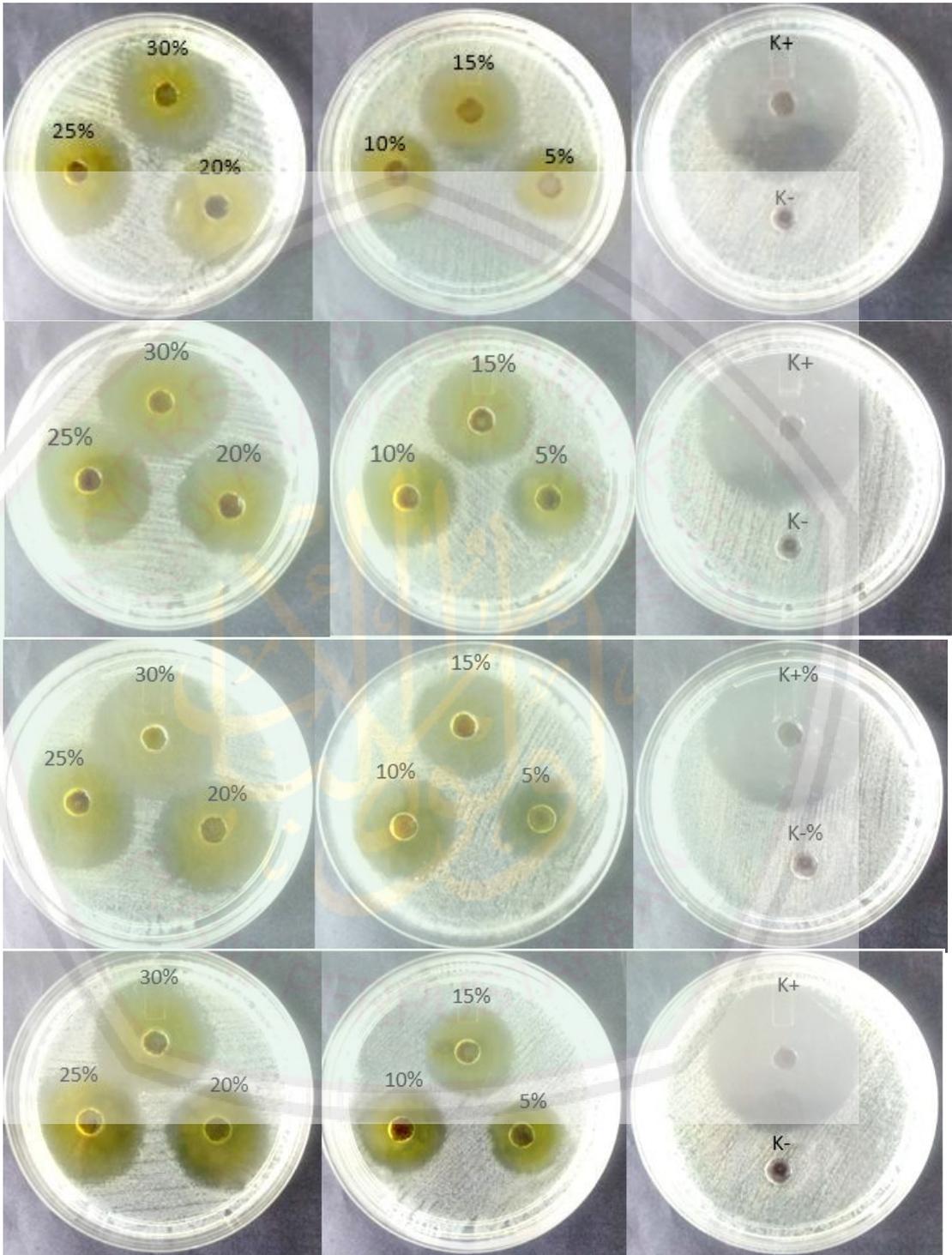
Malang, 20 Januari 2020
Directur


CV WIYASA MANDIRI
Dyah Rokhmayanti, S. Si

Lampiran 3 (Hasil Penelitian Difusi Cakram – Diameter Zona Hambat)



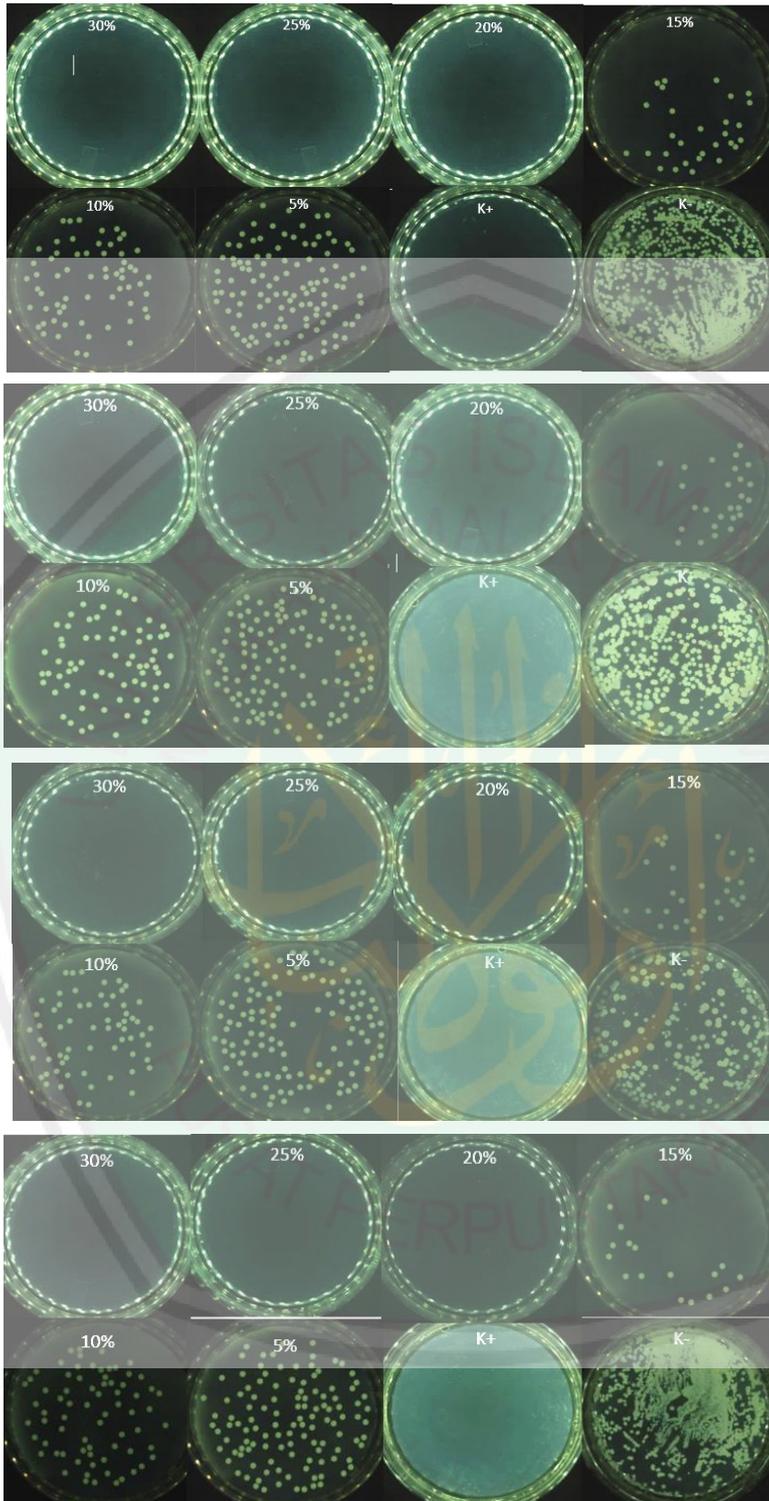
Lampiran 4 (Hasil Difusi Sumuran/ KHM)



Lampiran 5 (Hasil Dilusi Tabung - KHM)



Lampiran 7 (Hasil dilusi tabung – KBM)



Lampiran 8 (Surat Etik)

| | |
|---|---|
|  | <p>FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN Gedung Klinik UMMI It 2 Jalan Gajayana No. 50, Dinoyo, Kec. Lowokwaru, Kota Malang E-mail: kepk.fkik@uin-malang.ac.id - Website : http://www.kepk.fkik.uin-malang.ac.id</p> |
| | <p>KETERANGAN KELAIKAN ETIK (ETHICAL CLEARANCE) No. 002/EC/KEPK-FKIK/2020</p> |

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN (KEPK) FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN UIN MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG TELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN :

| | |
|-------------------|---|
| Judul | Potensi Antibakteri ekstrak Daun Jeruk Purut (<i>Citrus hystrix</i>) terhadap Pertumbuhan Bakteri <i>Shigella dysenteriae</i> secara in vitro |
| Sub Judul | Potensi Antibakteri ekstrak Daun Jeruk Purut (<i>Citrus hystrix</i>) terhadap Pertumbuhan Bakteri <i>Shigella dysenteriae</i> secara in vitro |
| Peneliti | Ira Resmi Melani |
| Unit / Lembaga | Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang |
| Tempat Penelitian | Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Maulana Malik Ibrahim Malang |

DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN TERSEBUT TELAH MEMENUHI SYARAT ATAU LAIK ETIK.

Mengetahui,
Dekan FKIK-UIN Maulana Malik Ibrahim Malang

Malang, 13 JAN 2020
Ketua


Prof. Dr. Bambang Panjianto, SpB, SpBP-RE(K)
NIPT. 20161201 1 515


dr. Avin Ainur F, M. Biomed
NIP. 19800203 200912 2 002

Keterangan :

- Keterangan Laik Etik ini berlaku 1 (satu) tahun sejak tanggal dikeluarkan.
- Pada akhir penelitian, laporan Pelaksanaan Penelitian harus diserahkan kepada KEPK-FKIK dalam bentuk *soft copy*.
- Apabila ada perubahan protokol dan/atau Perpanjangan penelitian, harus mengajukan kembali permohonan Kajian Etik Penelitian (Amandemen Protokol).

Lampiran 9 (Hasil analisis statistika)

Diameter Zona Hambat

Descriptive Statistics

Dependent Variable: Zona Hambat

| Perlakuan | Mean | Std. Deviation | N |
|-----------|---------|----------------|----|
| K+ | 28.5000 | 2.51661 | 4 |
| 30% | 9.7500 | .95743 | 4 |
| 25% | 8.7500 | .95743 | 4 |
| 20% | 7.5000 | 1.73205 | 4 |
| 15% | 6.5000 | 1.73205 | 4 |
| 10% | 4.7500 | .95743 | 4 |
| 5% | 2.7500 | .95743 | 4 |
| K- | .0000 | .00000 | 4 |
| Total | 8.5625 | 8.33159 | 32 |

Asumsi Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

| | | Residual for Y |
|----------------------------------|----------------|-------------------|
| N | | 32 |
| Normal Parameters ^{a,b} | Mean | .0000 |
| | Std. Deviation | 1.24434 |
| Most Extreme Differences | Absolute | .180 |
| | Positive | .139 |
| | Negative | -.180 |
| Test Statistic | | .180 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | | .010 ^c |

- a. Test distribution is Normal.
- b. Calculated from data.
- c. Lilliefors Significance Correction.

Asumsi Homogenitas

Levene's Test of Equality of Error Variances^a

Dependent Variable: Zona Hambat

| F | df1 | df2 | Sig. |
|---|-----|-----|------|
|---|-----|-----|------|

| | | | |
|-------|---|----|------|
| 1.797 | 7 | 24 | .134 |
|-------|---|----|------|

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + X

Uji Kruskal Wallis

Ranks

| | Perlakuan | N | Mean Rank |
|-------------|-----------|----|-----------|
| Zona Hambat | K+ | 4 | 30.50 |
| | 30% | 4 | 24.75 |
| | 25% | 4 | 21.88 |
| | 20% | 4 | 18.88 |
| | 15% | 4 | 15.75 |
| | 10% | 4 | 11.00 |
| | 5% | 4 | 6.75 |
| | K- | 4 | 2.50 |
| | Total | 32 | |

Test Statistics^{a,b}

| | Zona Hambat |
|-------------|-------------|
| Chi-Square | 28.427 |
| df | 7 |
| Asymp. Sig. | .000 |

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:
Perlakuan

Post Hoc Mann Whitney

| Perlakuan | Rata-Rata | Probabilitas | Notasi | | | | | | | |
|-----------|-----------|--------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----|
| | | K+ | 30% | 25% | 20% | 15% | 10% | 5% | K- | |
| K+ | 28.50 | | 0.019 | 0.019 | 0.019 | 0.019 | 0.019 | 0.019 | 0.013 | a |
| 30% | 9.75 | 0.019 | | 0.178 | 0.106 | 0.037 | 0.019 | 0.019 | 0.013 | b |
| 25% | 8.75 | 0.019 | 0.178 | | 0.186 | 0.106 | 0.019 | 0.019 | 0.013 | bc |

| | | | | | | | | | | |
|-----|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----|
| 20% | 7.50 | 0.019 | 0.106 | 0.186 | | 0.234 | 0.027 | 0.019 | 0.013 | bc |
| 15% | 6.50 | 0.019 | 0.037 | 0.106 | 0.234 | | 0.099 | 0.019 | 0.013 | cd |
| 10% | 4.75 | 0.019 | 0.019 | 0.019 | 0.027 | 0.099 | | 0.037 | 0.013 | d |
| 5% | 2.75 | 0.019 | 0.019 | 0.019 | 0.019 | 0.019 | 0.037 | | 0.013 | e |
| K- | 0.00 | 0.013 | 0.013 | 0.013 | 0.013 | 0.013 | 0.013 | 0.013 | | f |

Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)

Descriptive Statistics

Dependent Variable: KHM

| Perlakuan | Mean | Std. Deviation | N |
|-----------|---------|----------------|----|
| K+ | 45.2500 | .95743 | 4 |
| 30% | 25.2500 | .95743 | 4 |
| 25% | 23.0000 | .81650 | 4 |
| 20% | 20.2500 | .95743 | 4 |
| 15% | 18.2500 | .95743 | 4 |
| 10% | 15.7500 | .95743 | 4 |
| 5% | 13.2500 | .95743 | 4 |
| K- | .0000 | .00000 | 4 |
| Total | 20.1250 | 12.15690 | 32 |

Asumsi Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

| | | Residual for Y |
|----------------------------------|----------------|-------------------|
| N | | 32 |
| Normal Parameters ^{a,b} | Mean | .0000 |
| | Std. Deviation | .77251 |
| Most Extreme Differences | Absolute | .209 |
| | Positive | .103 |
| | Negative | -.209 |
| Test Statistic | | .209 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | | .001 ^c |

- a. Test distribution is Normal.
- b. Calculated from data.
- c. Lilliefors Significance Correction.

Asumsi Homogenitas

Levene's Test of Equality of Error

Variances^a

Dependent Variable: KHM

| F | df1 | df2 | Sig. |
|-------|-----|-----|------|
| 1.714 | 7 | 24 | .153 |

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

a. Design: Intercept + Perlakuan

Uji Kruskal Wallis

Ranks

| | Perlakuan | N | Mean Rank |
|-----|-----------|---|-----------|
| KHM | K+ | 4 | 30.50 |
| | 30% | 4 | 26.38 |
| | 25% | 4 | 22.63 |
| | 20% | 4 | 18.25 |
| | 15% | 4 | 14.63 |
| | 10% | 4 | 10.63 |
| | 5% | 4 | 6.50 |
| | K- | 4 | 2.50 |
| | Total | | 32 |

Test Statistics^{a,b}

| | KHM |
|-------------|--------|
| Chi-Square | 30.492 |
| df | 7 |
| Asymp. Sig. | .000 |

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:

Perlakuan

Post Hoc Mann Whitney

| Perlakuan | Rata-Rata | Probabilitas | | | | | | | | Notasi |
|-----------|-----------|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| | | K+ | 30% | 25% | 20% | 15% | 10% | 5% | K- | |
| K+ | 45.25 | | 0.019 | 0.019 | 0.019 | 0.019 | 0.019 | 0.019 | 0.013 | a |
| 30% | 25.25 | 0.019 | | 0.027 | 0.019 | 0.019 | 0.019 | 0.019 | 0.013 | b |
| 25% | 23.00 | 0.019 | 0.027 | | 0.019 | 0.019 | 0.019 | 0.019 | 0.013 | c |
| 20% | 20.25 | 0.019 | 0.019 | 0.019 | | 0.037 | 0.019 | 0.019 | 0.013 | d |
| 15% | 18.25 | 0.019 | 0.019 | 0.019 | 0.037 | | 0.027 | 0.019 | 0.013 | e |
| 10% | 15.75 | 0.019 | 0.019 | 0.019 | 0.019 | 0.027 | | 0.019 | 0.013 | f |
| 5% | 13.25 | 0.019 | 0.019 | 0.019 | 0.019 | 0.019 | 0.019 | | 0.013 | g |
| K- | 0.00 | 0.013 | 0.013 | 0.013 | 0.013 | 0.013 | 0.013 | 0.013 | | h |

Konsentrasi Bunuh Minimum

Descriptive Statistics

Dependent Variable: KBM

| Perlakuan | Mean | Std. Deviation | N |
|-----------|----------|----------------|----|
| K+ | .0000 | .00000 | 4 |
| 30% | .0000 | .00000 | 4 |
| 25% | .0000 | .00000 | 4 |
| 20% | .0000 | .00000 | 4 |
| 15% | 24.0000 | 4.69042 | 4 |
| 10% | 66.0000 | 6.32456 | 4 |
| 5% | 114.7500 | 5.56028 | 4 |
| K- | 378.7500 | 53.46260 | 4 |
| Total | 72.9375 | 125.05765 | 32 |

Asumsi Normalitas

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

| | | Residual for Y |
|----------------------------------|----------------|----------------|
| N | | 32 |
| Normal Parameters ^{a,b} | Mean | .0000 |
| | Std. Deviation | 16.89961 |
| Most Extreme Differences | Absolute | .330 |
| | Positive | .330 |

| | | |
|------------------------|----------|-------------------|
| | Negative | -.265 |
| Test Statistic | | .330 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | | .000 ^c |

- Test distribution is Normal.
- Calculated from data.
- Lilliefors Significance Correction.

Asumsi Homogenitas

Levene's Test of Equality of Error

Variances^a

Dependent Variable: KBM

| F | df1 | df2 | Sig. |
|-------|-----|-----|------|
| 4.574 | 7 | 24 | .002 |

Tests the null hypothesis that the error variance of the dependent variable is equal across groups.

- Design: Intercept + Perlakuan

Uji Kruskal Wallis

Ranks

| | Perlakuan | N | Mean Rank |
|-------|-----------|----|-----------|
| KBM | K+ | 4 | 8.50 |
| | 30% | 4 | 8.50 |
| | 25% | 4 | 8.50 |
| | 20% | 4 | 8.50 |
| | 15% | 4 | 18.50 |
| | 10% | 4 | 22.50 |
| | 5% | 4 | 26.50 |
| | K- | 4 | 30.50 |
| Total | | 32 | |

Test Statistics^{a,b}

| | KBM |
|-------------|--------|
| Chi-Square | 30.740 |
| df | 7 |
| Asymp. Sig. | .000 |

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:

Perlakuan

Post hoc (Mann Whitney)

| Perlakuan | Rata-Rata | Probabilitas | | | | | | | | Nota si |
|-----------|-----------|--------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|---------|
| | | K+ | 30% | 25% | 20% | 15% | 10% | 5% | K- | |
| K+ | 0.00 | | 1.00 0 | 1.00 0 | 1.00 0 | 0.01 4 | 0.01 4 | 0.01 4 | 0.01 4 | a |
| 30% | 0.00 | 1.00 0 | | 1.00 0 | 1.00 0 | 0.01 4 | 0.01 4 | 0.01 4 | 0.01 4 | a |
| 25% | 0.00 | 1.00 0 | 1.00 0 | | 1.00 0 | 0.01 4 | 0.01 4 | 0.01 4 | 0.01 4 | a |
| 20% | 0.00 | 1.00 0 | 1.00 0 | 1.00 0 | | 0.01 4 | 0.01 4 | 0.01 4 | 0.01 4 | a |
| 15% | 24.00 | 0.01 4 | 0.01 4 | 0.01 4 | 0.01 4 | | 0.02 1 | 0.02 1 | 0.02 1 | b |
| 10% | 66.00 | 0.01 4 | 0.01 4 | 0.01 4 | 0.01 4 | 0.02 1 | | 0.02 1 | 0.02 1 | c |
| 5% | 114.75 | 0.01 4 | 0.01 4 | 0.01 4 | 0.01 4 | 0.02 1 | 0.02 1 | | 0.02 1 | d |
| K- | 378.75 | 0.01 4 | 0.01 4 | 0.01 4 | 0.01 4 | 0.02 1 | 0.02 1 | 0.02 1 | | e |

Lampiran 10 (Foto ekstraksi daun jeruk purut)



Lampiran 11 (Kultur murni bakteri uji)

