

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI ETIL ASETAT EKSTRAK
ETANOL DAUN PEPAYA GUNUNG (*Carica pubescens* Lenne & K. Koch)
TERHADAP BAKTERI *Salmonella typhi* SECARA
IN SILICO DAN IN VITRO**

SKRIPSI

Oleh :
IDA ALFIAH
NIM 12620034



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
2016**

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI ETIL ASETAT EKSTRAK
ETANOL DAUN PEPAYA GUNUNG (*Carica pubescens* Lenne & K. Koch)
TERHADAP BAKTERI *Salmonella typhi* SECARA
IN SILICO DAN IN VITRO**

SKRIPSI

**Diajukan Kepada:
Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)**

**Oleh :
IDA ALFIAH
NIM 12620034**

**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
2016**

HALAMAN PERSETUJUAN

AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI ETIL ASETAT EKSTRAK ETANOL DAUN PEPAYA GUNUNG (*Carica pubescens* Lenne & K. Koch) TERHADAP BAKTERI *Salmonella typhi* SECARA IN SILICO DAN IN VITRO

SKRIPSI

Oleh :

Ida Alfiah

NIM 12620034

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji oleh:

Tanggal 08 September 2016

Dosen Pembimbing I



Dr. Hj. Retno Susilowati, M. Si
NIP. 19671113 199402 2 001

Dosen Pembimbing II



Umayyatus Svarifah, M.A.
NIP. 19820925 200901 2 005

Mengetahui,

Ketua Jurusan Biologi



Dr. Evika Sandi Savitri, M.P
19741018 200312 2 002

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI FRAKSI ETIL ASETAT EKSTRAK
ETANOL DAUN PEPAYA GUNUNG (*Carica pubescens* Lenne & K. Koch)
TERHADAP BAKTERI *Salmonella typhi* SECARA
IN SILICO DAN IN VITRO**

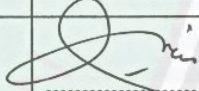
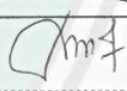
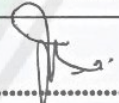
SKRIPSI

Oleh:

Ida Alfiah

NIM 12620034

Telah Dipertahankan Di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal 19 September 2016

Penguji utama	Dr. Hj. Ulfa Utami, M.Si NIP. 19650509 199903 2 002	
Ketua penguji	Dr. Nur Laili Susanti, M. Biomed NIP. 19831024 201101 2 007	
Sekretaris penguji	Dr. Hj. Retno Susilowati, M.Si NIP. 19671113 199402 2 001	
Anggota penguji	Umayyatus Syarifah, M.A NIP. 19820925 200901 2 005	

Mengesahkan,
Ketua Jurusan Biologi



Dr. Evika Sandi Savitri, M.P.
NIP. 19741018 200312 2 002

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ida Alfiah

NIM : 12620034

Jurusan : Biologi

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Skripsi : Aktivitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Daun Pepaya Gunung (*Carica pubescens* Lenne & K. Koch) terhadap Bakteri *Salmonella typhi* secara *In Silico* dan *In Vitro*

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa tugas akhir/skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambil alihan 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 tugas akhir/skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang 05 September 2016

Yang Membuat Pernyataan



Ida Alfiah

12620034

MOTTO

“Setiap aku mendapat pelajaran dari masa, setiap itu pula aku tahu segala kekurangan akalku. Setiap ilmuku bertambah, setiap itu pula bertambah pengetahuanku akan kebodohanku” (Al-Imam As-Syafi’i)



LEMBAR PERSEMBAHAN

Syukur Alhamdulillah saya haturkan kepada Allah SWT yang telah memberikan segala kekuatan, kesabaran, dan pertolongan sehingga dapat menyelesaikan karya tulis ilmiah ini.

Shalawat serta salam semoga tetap tercurahkan kepada nabi besar Muhammad SAW yang telah menuntun kita dari jalan kedholiman menuju jalan kebenaran yakni *dinul islam*.

Karya ini saya persembahkan kepada kedua orang tua saya H. Nawawi dan Hj. Supada (almh) yang selalu melimpahkan doa dan memberikan dukungan moral serta material kepada saya. Kakak dan adik saya Nur Halimah dan Nailul Izzah beserta keluarga yang selalu mendoakan, memberi motivasi dan dukungan untuk selalu semangat dalam menjalankan studi.

Tak lupa teman-teman Biologi 2012 dan kepada guru-guru saya yang telah membimbing dan mendidik saya hingga bisa menyelesaikan tugas akhir ini.

KATA PENGANTAR



Syukur Alhamdulillah penulis haturkan kehadiran Allah SWT atas segenap limpahan rahmat, taufik, serta hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan tugas akhir ini dengan judul “Aktivitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Daun Pepaya Gunung (*Carica pubescens* Lenne & K. Koch) terhadap Bakteri *Salmonella typhi* secara *In Silico* dan *In Vitro*”. Shalawat serta salam semoga senantiasa tercurahkan kepada Nabi Muhammad SAW beserta keluarga dan sahabatnya. Karena beliauulah yang menuntun umat manusia dari jaman jahiliyah menuju jaman yang penuh dengan ilmu pengetahuan.

Penulis menyadari bahwa dalam menyelesaikan skripsi ini telah mendapatkan banyak bantuan dan motivasi dari berbagai pihak. Oleh karena itu, dengan segala kerendahan, ketulusan hati, seta iringan doa penulis ingin mengucapkan terimakasih sebesar-besarnya kepada:

1. Prof. Dr. H. Mudjia Raharjo, M.Si selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Dr. drh. Hj. Bayyinatul Muctaromah, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi
3. Dr. Evika Sandi Savitri, M.P. selaku Ketua Jurusan Biologi
4. Dr. Hj. Retno Susilowati, M.Si. selaku Dosen Pembimbing yang telah sabar memberikan bimbingan, arahan dan meluangkan waktu untuk membimbing penulis sehingga skripsi ini terselesaikan dengan baik.

5. Umaiatus Syarifah, M.A. selaku Dosen Pembimbing Agama yang telah memberikan bimbingan, pengarahan, dan pelajaran sains dalam pandangan islam.
6. Bapak Ibu dosen Biologi khususnya ibu Fitriyah, M.Si dan ibu ainun Nikmati Laily, M.Si yang telah mengajarkan banyak hal dan memberikan pengetahuan yang luas kepada penulis selama masa studi.
7. Kedua orang tua penulis Bapak Nawawi dan Ibu Supada (alm) serta kakak dan adik penulis (Nur Halimah dan Nailul Izzah) yang selalu selalu memberi dukungan moral, material serta motivasi sehingga bisa menyelesaikan tugas akhir ini.
8. Teman-teman Biologi angkatan 2012 khususnya Siti Zumaroh, Wahyu Safitri, Julia Afni Sitorus, Titis Nuzul Utami, Angga, Nadia Anisa dan teman-teman di laboratorium Mikrobiologi yang memberikan semangat dan dukungan bagi penulis sehingga skripsi ini selesai dengan baik.
9. Serta semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu, yang memberikan doa, semangat, dukungan, saran dan pemikiran sehingga penulisan menjadi lebih baik dan terselesaikan.

Semoga Allah SWT memberikan balasan atas bantuan dan pemikirannya. Akhir kata, penulis berharap skripsi ini bisa memberikan manfaat bagi penulis khususnya dan bagi pembaca pada umumnya serta menambah khasanah ilmu pengetahuan. *Amin Ya Rabbal Alamin.*

Malang, 05 Oktober 2016

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGAJUAN	ii
HALAMAN PERSETUJUAN	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	v
MOTTO	vi
HALAMAN PERSEMBAHAN	vii
KATA PENGANTAR.....	viii
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
ABSTRAK	xvi
ABSTRATC	xvii
الملخص.....	xviii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	9
1.3 Tujuan Penelitian	9
1.4 Hipotesis Penelitian.....	9
1.5 Manfaat Penelitian	10
1.6 Batasan masalah.....	10
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	11
2.1 <i>Carica pubescens</i> Lenne & K. Koch.....	11
2.1.1 Klasifikasi <i>Carica pubescens</i> Lenne & K. Koch	11
2.1.2 Karakteristik dan Morfologi <i>Carica pubescens</i> Lenne & K. Koch .	13
2.1.3 Kandungan Kimia <i>Carica pubescens</i> Lenne & K. Koch.....	15

2.1.4 Manfaat <i>Carica pubescens</i> Lenne & K. Koch	17
2.2 <i>Salmonella typhi</i>	18
2.2.1 Klasifikasi <i>Salmonella typhi</i>	18
2.2.2 Morfologi dan Fisiologi <i>Salmonella typhi</i>	18
2.2.3 Patogenesis Demam Tifoid	20
2.2.4 Terapi Antibiotik untuk Demam Tifoid	23
2.3 Metode <i>In Silico</i>	25
2.3.1 Analisis Aktivitas Biologi PASS prediction online.....	25
2.3.2 Lipinski Role of Five.....	26
2.3.3 Penambatan molekul (<i>Molecular docking</i>).....	27
2.4 Ekstraksi.....	28
2.5 Uji Antibakteri	33
BAB III METODE PENELITIAN	36
3.1 Rancangan Penelitian	36
3.2 Waktu dan Tempat	36
3.3 Alat dan Bahan.....	37
3.3.1 Alat.....	37
3.3.2 Bahan	37
3.4 Prosedur Penelitian.....	38
3.4.1 Uji <i>In Silico</i>	38
3.4.1.1 Prediksi Aktivitas Antibakteri PASS Prediction.....	38
3.4.1.2 Lipinski Role of Five	38
3.4.1.3 Penambatan Molekul (<i>Molecular Docking</i>)	39
3.4.2 Pembuatan Ekstrak Pepaya Gunung (<i>Carica pubescens</i>).....	41
3.4.2.1 Penyiapan Serbuk Daun Pepaya Gunung	41
3.4.2.2 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Pepaya Gunung.....	41
3.4.3 Fraksinasi Ekstrak	42
3.4.4 Uji Aktivitas Antibakteri.....	42
3.4.4.1 Sterilisasi Alat	42
3.4.4.2 Pembuatan Media Pertumbuhan Bakteri	43

3.4.4.3 Peremajaan Bakteri.....	44
3.4.4.4 Pewarnaan Bakteri.....	44
3.4.4.5 Pembuatan Inokulum Bakteri	45
3.4.4.6 Uji Pendahuluan	45
3.4.4.7 Uji Aktivitas Antibakteri	45
3.5 Analisis Data	46
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	47
4.1 Pembuatan Ekstrak Daun Pepaya Gunung (<i>Caricca pubescens</i>).....	47
4.2 Konfirmasi Bakteri <i>Salmonella typhi</i>	51
4.3 Uji Aktivitas Antibakteri secara <i>In vitro</i> dan <i>In Silico</i>	54
BAB V PENUTUP.....	70
5.1 Kesimpulan	70
5.2 Saran.....	70
DAFTAR PUSTAKA.....	71
LAMPIRAN.....	80

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Morfologi <i>Carica pubescens</i> Lenne & K. Koch	14
Gambar 2.2 Mekanisme Patogenesis <i>S. typhi</i>	22
Gambar 4.1 Hasil Identifikasi Bakteri <i>S. typhi</i>	53
Gambar 4.2 Diameter Daerah Hambat Ekstrak Etanol Daun Pepaya Gunung (<i>C. pubescens</i>) Konsentrasi 100% terhadap Bakteri <i>S. typhi</i>	61
Gambar 4.3 Grafik Diameter Daerah Hambat Fraksi Etil Asetat Daun Pepaya Gunung (<i>C. pubescens</i>) terhadap bakteri <i>S. typhi</i>	63
Gambar 4.4 Diameter Daerah Hambat Fraksi Etil Asetat Daun Pepaya Gunung (<i>C. pubescens</i>) Konsentrasi 100% terhadap Bakteri <i>S. typhi</i>	65
Gambar 4.5 Hasil Analisis Aktivitas Antibakteri Senyawa-senyawa pada Daun Pepaya Gunung (<i>C. pubescens</i>).....	67

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Jenis-jenis Pelarut untuk Melarutkan Senyawa aktif	31
Tabel 4.1 Hasil <i>Role of Five</i> (Ro5) senyawa-senyawa ligan	56
Tabel 4.2 Analisis hasil docking senyawa-senyawa pada daun pepaya gunung (<i>C. pubescens</i>) terhadap DNA gyrase	58



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Rancangan Penelitian	80
Lampiran 2 Flow Chart Langkah Kerja	81
Lampiran 3 Cara Kerja Uji <i>In Silico</i>	88
Lampiran 4 Perhitungan	101
Lampiran 5 Data hasil diameter daerah hambat fraksi Etil Asetat.....	103
Lampiran 6 Analisis Statistik	103
Lampiran 7 Struktur 2D Senyawa-Senyawa Ligan.....	105
Lampiran 8 Nilai Binding Affiniti Ligan dengan Reseptor	107
Lampiran 9 Hasil Visualisasi Interaksi Ligan Dan Reseptor	109
Lampiran 10 Dokumentasi Penelitian.....	112

ABSTRAK

Alfiah, Ida. 2016. **Aktivitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Daun Pepaya Gunung (*Carica pubescens* Lenne & K. Koch) terhadap Bakteri *Salmonella typhi* secara *In Silico* dan *In Vitro***. Skripsi. Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing (I): Dr. Hj. Retno Susilowati, M.Si (II) Umayyatus Syarifah, M.A.

Kata kunci: Antibakteri, fraksi etil asetat, Pepaya gunung (*C. pubescens*), *Salmonella typhi*, *In silico*, *In vitro*

Demam tifoid merupakan penyakit infeksi saluran pencernaan yang disebabkan oleh bakteri *S. typhi*. Daun pepaya gunung (*C. pubescens*) memiliki potensi sebagai antibakteri untuk pengobatan demam tifoid. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui potensi aktivitas antibakteri hasil fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun pepaya gunung secara *in vitro* dan potensi senyawa aktif pada daun pepaya gunung dalam menghambat aktivitas DNA gyrase.

Penelitian ini bersifat eksperimental. Proses ekstraksi menggunakan metode maserasi dan fraksinasi menggunakan metode ekstraksi cair-cair. Uji antibakteri fraksi etil asetat daun pepaya gunung dilakukan pada konsentrasi 10%, 25%, 50%, 75%, dan 100% dengan empat kali pengulangan. Metode pengujian menggunakan difusi sumur agar. Kontrol positif menggunakan antibiotik ciprofloxacin dan kontrol negatif menggunakan pelarut ekstrak DMSO. Analisis data diameter daerah hambat menggunakan one way ANOVA. Uji *in silico* dilakukan dengan menggunakan senyawa carpaine, chlorogenic acid, kaempferol, mirycetin, caffeic acid, dan ferulic acid sebagai ligan dan DNA gyrase subunit B sebagai reseptor. Uji *in silico* dilakukan dengan tiga tahapan yakni prediksi aktivitas antibakteri, lipinski *rule of five*, dan penambatan molekul (*molecular docking*) melalui software pyrx.

Konsentrasi terbaik uji *in vitro* adalah 100% dengan daya hambat 18,72 mm ($P < 0,05$). Senyawa pada daun pepaya gunung dapat bekerja aktif secara oral karena memenuhi semua aturan Ro5. Hasil docking myriceti dan kaemferol memiliki nilai energi ikatan terbaik dibandingkan dengan antibiotik ciprofloxacin, yaitu -15,4 kkal/mol. Sehingga senyawa pada daun pepaya gunung berpotensi sebagai antibiotik.

ABSTRACT

Alfiah, Ida. 2016. **Antibacterial Activity Ethyl Acetate Fraction of Mountain Papaya (*Carica pubescens* Lenne & K. Koch) Leaf Ethanolic Extract Against *Salmonella typhi* In Silico and In Vitro**. Thesis. Biology Department, Faculty of Science and Technology Maulana Malik Ibrahim (UIN) State Islamic University Malang. Supervisors (I): Dr. Hj. Retno Susilowati, M.Si (II) Umaiatus Syarifah, M.A.

Keywords: Antibacterial, ethyl acetate fraction, mountain papaya (*C. pubescens*), *Salmonella typhi*, In silico, In vitro

Typhoid fever is a disease of the gastrointestinal tract infections caused by *S. typhi* bacteria. Mountain papaya leaves (*C. pubescens*) has potential as an antibacterial for the treatment of typhoid fever. This research was conducted to understand the potential of antibacterial activity from ethyl acetate fraction of mountain papaya leaf ethanolic extract *in vitro* and potency of active compounds in the mountain papaya leaf in inhibiting the activity of DNA gyrase.

This research has quality is experimental. The process of extraction uses maceration and fractionation method using liquid-liquid extraction methods. Antibacterial Test ethyl acetate fraction of mountain papaya leaf conducted at a concentration of 10%, 25%, 50%, 75%, and 100% with four repetitions. The agar well diffusion method is used for antibacterial activity test. Positive controls using the antibiotic ciprofloxacin and negative controls using the solvent DMSO extract. Inhibition area diameter data analysis using one-way ANOVA. Test *in silico* did used carpaine compound, chlorogenic acid, kaempferol, myricetin, caffeic acid and ferulic acid as ligands and DNA gyrase subunit B as a receptor. *In silico* did this test with three phases namely antibacterial activity prediction, Lipinski rule of five, and belay molecule (molecular docking) through software PyRx.

The best concentration *in vitro* test was 100% with the inhibition of 18.72 mm ($P < 0.05$). Compounds in mountain papaya leaves can work orally active because it full fill all the rules Ro5. Results of docking myricetin and kaempferol have the best bond energy score compared to the antibiotic ciprofloxacin, which is -15.4 kcal/mol. That's why the compound on the mountain papaya leaf potentially as antibiotics.

الملخص

الفية، ايدا. 2016. انشطار لمناهض البكتيريا فصيل الأثيل اسيتات مقتطف الكحولي ورقة البابايا الجبال
Salmonella typhi في السيليكو و في الفطرو. البحث الجامعي. قسم علم الحياة في كلية العلومية و
 تيكنولوجية جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج. المشرف: (I): الدكتور الحاجة
 ريتنو سوسيلو واتي الماحيستير و(II) امية الشريفة الماحيستير.

الكلمات الرئيسية: انشطار لمناهض البكتيريا، جزء خلاص الإثيل، ورقة البابايا الجبال (*C. pubescens*)،
Salmonella typhi، في السيليكو، في الفطرو

حمى التيفوئيد هو مرض من أمراض الجهاز الهضمي التي تسببها البكتيريا *S. typhi* أوراق البابايا
 الجبل (*C. pubescens*) لديه المحتملة باعتبارها مضادة للجراثيم لعلاج حمى التيفوئيد. وقد أجريت هذه
 الدراسة لتحديد النتائج المحتملة للنشاط مضاد للجراثيم من فصيل الأثيل اسيتات مقتطف الكحولي ورقة البابايا
 الجبال في الفطرو وفعالية من المركبات النشطة في ورقة البابايا الجبال في تثبيط نشاط DNA gyrase.
 وتعد هذه الدراسة التجريبية. تستخدم عملية استخراج النقع وتجزئة طريقة استخدام أساليب
 الاستخراج بين السوائل. مضاد للجراثيم من فصيل الأثيل اسيتات مقتطف الكحولي ورقة البابايا الجبال التي
 أجريت في تركيز 10٪، 25٪، 50٪، 75٪، و 100٪ مع أربعة التكرار. طريقة الاختبار باستخدام الآبار
 نشر في النظام. الضوابط الإيجابية باستخدام سيروفلوكساسين المضادات الحيوية وضوابط السلبية باستخدام
 مستخلص DMSO المذيبات. تحليل البيانات قطر منطقة تثبيط استخدام في اتجاه واحد أنوفا. اختبار في
 سيليكو وذلك باستخدام مركب carpine, chlorogenic acid, kaemferol, miryctin, caffeic acid و ferulic acid
 كما بروابط والحمض النووي DNA gyrase فرعية B بمثابة مستقبلات. في سيليكو وقام الاختبار على ثلاث مراحل وهي التنبؤ نشاط مضاد للجراثيم، ليفينسكي
 Role of Five، وحزء ثبت (*molecukar docking*) من خلال البرمجيات PyRx.
 وكان أفضل التركيز في اختبار المختبر بنسبة 100٪ مع تثبيط 18.72 ملم ($P > 0.05$).
 مركبات في أوراق شجرة البابايا يمكن أن تعمل بنشاط شفويا لأنها تلي جميع القواعد Ro5. النتائج الالتحام
 myriceti و kaemferol لديها قيمة أفضل للطاقة الترابط مقارنة سيروفلوكساسين للمضادات الحيوية،
 والتي هي -15.4 كيلو كالوري / مول ذلك أن المركب على شجرة البابايا إمكانات ورقة المضادات الحيوية.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Salmonella enterica subspecies *enterica* serovar *typhi* atau lebih dikenal *Salmonella typhi* (*S. typhi*) merupakan bakteri gram negatif berbentuk batang yang tergolong bakteri anaerob fakultatif. *S. typhi* termasuk famili *Enterobacteriaceae* (Zhang dkk, 2008). Diantara lebih dari 2.300 serovar *Salmonella*, hanya *S. typhi* and *S. paratyphi* yang menyebabkan infeksi sistemik dan demam tifoid pada manusia (Zang dkk, 2008).

Demam tifoid menjadi salah satu masalah kesehatan yang banyak terjadi di negara berkembang dan tropis (Rohman, 2010). Setiap tahun diperkirakan terjadi 12,6 juta kasus dan sekitar 600.000 kematian yang diakibatkan oleh demam tifoid di seluruh dunia. Hampir 80% kasus ini terjadi di Asia (Abro dkk, 2009). Pada tahun 2007, CDC (*Communicable Disease Centre*) dari Indonesia melaporkan bahwa prevalensi untuk demam tifoid adalah 358-810 per 100.000 penduduk dengan 64 % terjadi pada anak usia 3-9 tahun (Moehario, 2009). Berdasarkan profil kesehatan Indonesia tahun 2010, penderita demam tifoid dan paratifoid yang dirawat inap di rumah sakit sebanyak 41.081 kasus dan 279 diantaranya meninggal dunia (Depkes RI, 2010 dalam Seran, 2015).

Demam tifoid merupakan penyakit menular. Umumnya, penularan terjadi melalui makanan dan minuman yang telah terkontaminasi oleh feses atau urin dari penderita demam tifoid atau *carrier*. Manifestasi demam tifoid terjadi seminggu atau lebih setelah mengonsumsi makanan yang terkontaminasi *S. typhi*

(Maskalyk, 2003). Bakteri *S. typhi* masuk ke dalam tubuh melalui mulut menuju saluran pencernaan. Bakteri ini dapat mati jika berada di dalam lambung karena adanya asam lambung, namun bakteri yang bisa bertahan dan jumlahnya cukup banyak akan berhasil mencapai usus halus dan berusaha masuk ke dalam tubuh (Darmawati, 2009). Di dalam tubuh, bakteri *S. typhi* akan melepaskan endotoksin ke dalam darah. Kehadiran endotoksin dapat merangsang produksi sitokin. Produksi sitokin inilah yang dapat menyebabkan gejala-gejala sistemik antara lain demam, muntah, sakit kepala, diare, dan konstipasi (Arifin, 2009).

Allah SWT berfirman dalam surat ‘Abasa (80): 24.

فَلْيَنْظُرِ الْإِنْسَانُ إِلَى طَعَامِهِ ۚ

Artinya: “Maka hendaklah manusia itu memperhatikan makanannya” (Q.S. ‘Abasa (80): 24).

Quthb (2001) menafsirkan bahwa makanan merupakan sesuatu yang paling lekat dan selalu dekat pada manusia. Makanan yang telah masuk ke dalam tubuh akan mengalami beberapa perubahan, kemudian diserap oleh sel-sel dan menjadi bagian dari tubuh. Menurut Faqih (2006), makna dari lafadz "ينظر" bukan hanya melihat secara sederhana, tetapi bermakna memperhatikan secara mendalam dan merenungkan masalah-masalah terpenting dari susunan makanan, serta hubungannya dengan terjaganya tubuh dari kerusakan. Makanan yang tidak sehat, khususnya yang telah terkontaminasi oleh mikroorganisme seperti *S. typhi* perlu diwaspadai karena dapat berakibat buruk bagi kesehatan. Sebagian mufasir menjelaskan bahwa ayat tersebut memerintahkan manusia agar melihat bagaimana makanan itu dipersiapkan, berbahaya bagi kesehatan atau aman dimakan, dan

makanan itu halal atau haram. Dengan demikian, manusia harus mempertimbangkan aspek kesehatan dan syariat dalam mengonsumsi makanan agar terhindar dari berbagai penyakit baik jasmani dan rohani.

Pengobatan yang umum digunakan dalam mengobati demam tifoid adalah antibiotik. Antibiotik pilihan pertama dalam pengobatan demam tifoid adalah kloramfenikol sebesar 53,55% (Alam, 2011; Cita, 2011). Sedangkan menurut Maskalyk (2003), perlakuan demam tifoid biasanya menggunakan kloramfenikol, fluroquinolon, ampicilin, amoxilin, contrimoxazole atau trimethoprim. Golongan fluroquinolones yakni ciprofloxacin, ofloxacin, dan perfloxacin secara luas digunakan sebagai agen antimikroba untuk *S. typhi* dan dapat digunakan untuk terapi demam tifoid yang efektif (Ugboko, 2014).

Resistensi *S. typhi* terhadap kloramfenikol pertama dilaporkan pada tahun 1950 di Inggris, meskipun belum menjadi masalah yang besar (Ugboko, 2014). Menjelang akhir tahun 1980-an, *S. typhi* menunjukkan resistensi pada beberapa antibiotik yang digunakan sebagai obat lini pertama seperti kloramfenikol, kotrimoksazol, tetrasiklin, dan ampicilin. Resistensi pada antibiotik lini pertama ini disebut sebagai *multidrug resistance Salmonella typhi* (MDR-ST) (Yenni dan Elly, 2007). Terjadinya MDR-ST ini dilaporkan dari negara-negara di Asia yakni India, Pakistan, Banglades, Vietnam, dan Korea (Lee K, 2004). MDR- ST juga dilaporkan dari berbagai negara di Afrika seperti Kenya (Kariuki, 2004) dan Nigeria (Akinyemi, 2005).

Di Indonesia, berdasarkan hasil penelitian Alam (2011) di RSUP dr. Hasan Sadikin Bandung, sejak tahun 2006-2010 tidak terjadi peningkatan resistensi antibiotik dari *S. typhi* terhadap kloramfenikol, ampisilin, dan trimetoprim-sulfametoksazol. Namun, tidak menutup kemungkinan di daerah lain dapat ditemukan galur *S. typhi* yang resisten dikarenakan mudahnya memperoleh antibiotik. Pemakaian antibiotik menjadi hal yang umum dilakukan oleh masyarakat, sehingga sangat mungkin penggunaan antibiotik menjadi tidak tepat indikasi, dosis, waktu, dan juga jenis (Alam, 2011). Hal inilah yang dikhawatirkan dapat meningkatkan terjadinya resistensi pada *S. typhi*. Selain itu, penggunaan antibiotik sintetis memiliki banyak efek samping seperti alergi dan gangguan pencernaan, sehingga penggunaan obat-obatan berbahan baku herbal lebih disarankan. Oleh karena, itu dibutuhkan pengembangan antibiotik baru dari bahan baku herbal yang lebih efektif terhadap *S. typhi*.

Indonesia merupakan salah satu negara dengan keanekaragaman hayati yang tinggi. Kesuburan tanah dan kondisi iklim tropis, memungkinkan berbagai tumbuhan mampu hidup dan berkembangbiak di wilayah Indonesia. Allah SWT menciptakan berbagai macam tumbuhan di dunia agar dapat dimanfaatkan oleh makhluk hidup khususnya bagi manusia. Allah SWT berfirman dalam surat Asy-Syu'ara (26): 7.

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿٧﴾

Artinya: “Dan Apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam (tumbuh-tumbuhan) yang baik?” (QS. Asy-Syu'ara ayat 7).

Shihab (2002) menafsirkan bahwa ayat tersebut mengundang manusia untuk mengarahkan pandangan hingga batas kemampuannya memandang sampai mencakup seantero bumi, dengan aneka tanah dan tumbuhannya dan aneka keajaiban yang terdapat pada tumbuh-tumbuhannya. Dalam ayat tersebut dijelaskan bahwa Allah SWT menumbuhkan segala tumbuhan di bumi ini dengan berbagai manfaat. Sehingga penelitian terkait bahan alam penting untuk dilakukan agar dapat mengeksplor manfaat-manfaat yang terdapat pada tumbuhan.

Dewasa ini, penggunaan bahan alam sebagai obat mengalami peningkatan, masyarakat cenderung menerapkan gaya hidup *back to nature* (kembali ke alam). Hal ini dikarenakan efek samping dari bahan alam yang relatif sedikit dibandingkan obat sintetis (Djauhari dan Hermani, 2004). Masalah resistensi bakteri *S. typhi* ini mendorong agar ditemukan sumber antibakteri dari alam yang dapat digunakan sebagai antibiotik untuk demam tifoid. Salah satu tanaman yang dapat berpotensi sebagai antibakteri adalah *Carica pubescens*.

Carica pubescens Lenne & K. Koch merupakan tanaman asli Amerika selatan yang termasuk dalam famili Caricaceae. Pepaya gunung (*C. pubescens*) memiliki kelompok genus yang sama dengan pepaya (*Carica papaya*) dan nampak memiliki kemiripan yang tinggi secara morfologi namun memiliki karakteristik yang berbeda (Minarno, 2015). Daun pepaya gunung (*C. pubescens*) dapat digunakan sebagai obat tradisional untuk menyembuhkan malaria, beri-beri, sariawan, sembelit, dan disentri amuba (Hidayat, 2000).

Berdasarkan penelitian sebelumnya, telah dilaporkan oleh Novalina dkk (2013) bahwa fraksi etil asetat ekstrak daun pepaya gunung (*C. pubescens*) secara signifikan memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Shigella flexneri* dan *Bacillus cereus* dengan terbentuknya zona hambat sebesar 29 cm dan 21 cm. Fraksi etil asetat daun *C. pubescens* memiliki kandungan flavonoid, alkaloid, tanin dan fenol. Yogiraj (2015) menyatakan, pada daun genus *Carica* terdapat kandungan senyawa alkaloid (carpaine, pseudocarpaine, dehydrocarpaine I dan II), flavonoid (kaempferol, myricetin), dan fenol (ferulic acid, caffeic acid, chlorogenic acid). Hasil penelitian Anggrahini dkk (2012) menyebutkan bahwa ekstrak daun pepaya pada konsentrasi 10% mampu menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* dan *S. typhi* dengan diameter hambat 8 mm.

Mekanisme alkaloid sebagai antibakteri bekerja dengan cara mengganggu komponen dinding sel yakni peptidoglikan (Darsana, 2012). Selain itu, alkaloid juga dapat menghambat enzim topoisomerase yang mempunyai peran penting dalam proses replikasi, transkripsi, dan rekombinasi DNA (Taufiq dkk, 2015). Sedangkan senyawa metabolit yang lain seperti flavonoid, tanin, dan fenol juga dapat merusak komponen penyusun peptidoglikan, menonaktifkan enzim-enzim esensial, perampasan mineral bakteri, dan mengganggu kerja membran sitoplasma (Novalina dkk, 2013). Hal ini menyebabkan terganggunya proses metabolisme bakteri yang akhirnya mengakibatkan kematian bakteri.

Satu diantara target dari senyawa antibakteri adalah enzim topoisomerase. Enzim ini berperan dalam proses biosintesis DNA yakni pada proses replikasi. Jenis topoisomerase pada bakteri gram negatif adalah topoisomerase II atau lebih

dikenal DNA gyrase (Kohanski dkk, 2010). DNA gyrase merupakan enzim yang berfungsi untuk mengkatalis supercoiling negatif pada DNA (Ruiz, 2003). DNA gyrase memiliki dua subunit, subunit A berperan dalam interaksi protein-DNA dan subunit B berperan dalam hidrolisis ATP. Apabila DNA gyrase terikat oleh molekul obat, maka biosintesis DNA tidak akan terselesaikan sehingga sel bakteri akan mengalami kematian (Yang dkk, 2013).

Uji aktivitas antibakteri secara *in silico* dilakukan dengan menggunakan metode *molecular docking*. Senyawa carpaine, chlorogenic acid, kaempferol, myricetin, caffeic acid, dan ferulic acid digunakan sebagai ligan sedangkan reseptornya adalah DNA gyrase subunit B *S. typhi*. Tujuan dari *molecular docking* adalah untuk pemodelan struktur dan memprediksi aktivitasnya, selain itu juga untuk meniru peristiwa interaksi suatu molekul ligan dengan protein yang menjadi target aksinya pada uji secara *in vitro* (Kitchen, 2004). Sehingga diharapkan dari proses docking ini diketahui seberapa besar potensi senyawa yang terdapat pada daun pepaya gunung (*C. pubescens*) dalam menghambat aktivitas DNA gyrase *S. typhi*.

Pada penelitian ini dilakukan ekstraksi daun *C. pubescens* dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% p.a. Penggunaan etanol sebagai pelarut karena etanol memiliki rumus molekul C_2H_5OH yang bersifat non polar dan gugus OH yang bersifat polar, sehingga dapat menarik senyawa polar dan non polar (Mahatrinny dkk, 2014). Fraksinasi juga dilakukan dengan metode cair-cair menggunakan pelarut etil asetat. Etil asetat bersifat semi polar yang dapat menarik senyawa dengan rentang antara polar dan non polar (Putri dkk, 2013). Hasil

penelitian Novalina dkk (2013) menunjukkan bahwa fraksi etil asetat memiliki potensi sebagai antibakteri. Handayani dkk (2013) juga menyatakan bahwa fraksi etil asetat pacar kuku (*Lausonia inermis*) merupakan fraksi yang paling aktif sebagai antibakteri terhadap *E. coli* dan *S. aureus*.

Uji aktivitas antibakteri secara *in vitro* dilakukan untuk mengetahui daerah hambat dari masing-masing fraksi. Metode yang digunakan adalah metode difusi dengan cara lubang atau sumuran (*agar well method*). Kelebihan metode ini adalah ekstrak akan berdifusi langsung ke dalam agar, sehingga senyawa antibakteri dapat bekerja tanpa hambatan dengan konsentrasi dan jumlah yang telah ditentukan (Anggrahini dkk, 2012). Daerah hambat yang terbentuk dikategorikan menjadi lemah (>5 mm), sedang (6-10 mm), kuat (11-20 mm), dan sangat kuat (<21 mm) untuk mengetahui potensi aktivitas antibakteri daun *C. pubescens* dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. typhi* (Davis dan Stout, 1971). Berdasarkan uraian diatas, maka perlu dilakukan penelitian terhadap aktivitas antibakteri fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun pepaya gunung (*C. pubescens*) terhadap bakteri *S. typhi* secara *in silico* dan *in vitro*.

1.2 Rumusan masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Apakah senyawa aktif pada daun pepaya gunung (*C. pubescens*) berpotensi dalam menghambat aktivitas DNA gyrase *S. typhi* secara *in silico*?
2. Apakah senyawa aktif pada fraksi etil asetat ekstrak etanol daun pepaya gunung (*C. pubescens*) berpotensi dalam menghambat pertumbuhan *S. typhi* secara *in vitro*?

1.3 Tujuan

Tujuan pada penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Mengetahui potensi senyawa aktif pada daun pepaya gunung (*C. pubescens*) dalam menghambat aktivitas DNA Gyrase *S. typhi* secara *in silico*.
2. Mengetahui potensi senyawa aktif pada fraksi etil asetat ekstrak etanol daun pepaya gunung (*C. pubescens*) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. typhi* secara *in vitro*.

1.4 Hipotesis

Hipotesis pada penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Senyawa aktif pada daun pepaya gunung (*C. pubescens*) berpotensi dalam menghambat aktivitas DNA gyrase *S. typhi* secara *in silico*.
2. Senyawa aktif pada fraksi etil asetat ekstrak etanol daun pepaya gunung (*C. pubescens*) aktif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. typhi* secara *in vitro*.

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat pada penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Dapat digunakan sebagai landasan ilmiah untuk penelitian selanjutnya
2. Memberikan informasi untuk pengembangan obat baru dari daun pepaya gunung (*C. pubescens*) terhadap infeksi *S. typhi*

1.6 Batasan Masalah

Batasan masalah pada penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Parameter yang digunakan untuk mengamati aktivitas antibakteri secara *in vitro* adalah diameter daerah hambat. Sedangkan parameter untuk *in silico* adalah nilai energi ikatan (*binding affinity*) dan daerah ikatan (*binding site*) antara ligan dan reseptor.
2. Bakteri *S. typhi* diperoleh dari laboratorium mikrobiologi universitas Brawijaya Malang.
3. Sampel daun pepaya gunung diperoleh dari daerah Bromo Jawa Timur.
4. Bagian daun yang digunakan adalah helai daun.
5. Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi adalah etanol p.a 96%.
6. Pelarut yang digunakan untuk fraksinasi adalah etil asetat p.a.
7. Senyawa yang digunakan untuk uji *in silico* (*molecular docking*) diperoleh dari hasil studi pustaka, diantaranya adalah senyawa carpaine, chlorogenic acid, kaempferol, myricetin, ferulic acid, dan caffeic acid.
8. Antibiotik yang digunakan sebagai kontrol positif adalah ciprofloxacin.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Carica pubescens* Lenne & K. Koch

2.1.1 Klasifikasi *Carica pubescens* Lenne & K. Koch

Tumbuhan merupakan satu diantara bukti kebesaran dan kekuasaan Allah SWT. Allah SWT telah menciptakan berbagai macam tumbuhan di dunia ini agar dapat dimanfaatkan oleh manusia. Setiap tumbuhan yang ada di bumi memiliki berbagai manfaat, baik sebagai sumber makanan, sandang, papan, dan sebagai sumber obat hayati. Allah SWT berfirman dalam surat Asy-Syu'araa (26): 7-8.

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿٧﴾ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً
وَمَا كَانَ أَكْثَرُهُمْ مُؤْمِنِينَ ﴿٨﴾

Artinya: “dan Apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu pelbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik?. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat suatu tanda kekuasaan Allah. dan kebanyakan mereka tidak beriman”. (Q.S. Asy-Syu'araa (26): 7-8)

Dalam ayat tersebut, Allah SWT memperingatkan akan keagungan dan kekuasaan-Nya. Apabila manusia melihat dengan mata dan hati mereka, maka mereka akan mengetahui bahwa Allah SWT adalah tuhan yang berhak untuk disembah. Allah SWT maha kuasa atas segala sesuatu diantaranya adalah menumbuhkan berbagai tumbuhan yang baik (Al-Qurthubi, 2009).

Lafadz كرام artinya baik dan mulia. Adapun asal kata الكرام dalam bahasa arab adalah الفضل (keutamaan) (Al-Qurthubi, 2009). Al-Quthb (2004) menafsirkan bahwa tumbuhan-tumbuhan yang diciptakan Allah SWT memiliki kemuliaan di dalamnya, yang berasal dari kemuliaan Allah SWT. Ungkapan ini mengisyaratkan kepada manusia untuk menerima dan merespon ciptaan Allah SWT dengan sikap yang memuliakan, memperhatikan, dan memperhitungkannya, bukan menghina, melalaikan dan meremehkannya.

Satu diantara tumbuhan yang baik dan memiliki kemuliaan dari Allah SWT adalah *Carica pubescens* Lenne & K. Koch. *C. pubescens* merupakan tanaman asli dari Amerika selatan dan telah tersebar luar secara geografis hingga Andas. Tanaman ini memiliki beberapa sinonim yakni *Vasconcellea pubescens*, *Vasconcellea cundinamarcensis*, dan *Carica candamarcensis* (Moya-Leon dkk, 2004). Di Indonesia, khususnya di daerah Dieng Jawa Tengah tanaman ini biasa disebut “Karika” (Novalina, 2013). Sedangkan di daerah Jawa Timur umumnya *C. pubescens* dikenal dengan nama “pepaya gunung” (*mountain papaya*) karena tumbuhan ini tumbuh di tempat dengan ketinggian 1.400-2400 dpl, temperatur rendah, dan curah hujan tinggi (Minarno, 2015).

Klasifikasi *C. pubescens* berdasarkan Cronquist tahun 1981 (Dasuki, 1991) adalah sebagai berikut.

Kingdom : Plantae

Divisi : Magnoliophyta

Kelas : Magnoliopsida

Subkelas : Dilleniidae

Ordo : Violales

Familia : Caricaceae

Genus : *Carica*

Spesies : *Carica pubescens* Lenne & K. Koch

2.1.2 Karakteristik dan Morfologi *Carica pubescens* Lenne & K. Koch

C. pubescens memiliki kelompok genus yang sama dengan pepaya (*Carica papaya*) dan nampak memiliki kemiripan yang tinggi secara morfologi. Berbeda dengan pepaya, tanaman ini tumbuh di tempat dengan ketinggian 1.400-2400 meter di atas permukaan laut (dpl), temperatur rendah, dan curah hujan tinggi sehingga penduduk setempat sering menyebut pula dengan sebutan pepaya gunung (Minarno, 2015).

Kata *pubescens* berarti rambut yang menunjukkan ciri khas tanaman ini dibandingkan dengan *C. papaya*. Berdasarkan observasi yang dilakukan oleh Laily (2012) pada tanaman karika yang tumbuh di daerah Dieng Jawa Tengah, ditemukan adanya bulu pada beberapa organ diantaranya pada permukaan bawah daun (abaksial), tangkai daun, dan permukaan luar bunga jantan dan betina. *C. pubescens* memiliki lebih banyak bulu daripada anggota genus *Carica* lainnya.

Berbeda dengan *C. papaya* yang merupakan tanaman tropis Amerika yang dapat tumbuh pada semua daerah tropis, *C. pubescens* tumbuh pada iklim yang lebih dingin. Buah *C. pubescens* lebih kecil dibanding buah pepaya, kulit pada saat mentah berwarna hijau dan berubah kuning selama pemasakan, daging buah berwarna kuning, dan biji berada dalam rongga pada buah. Buah *C. pubescens*

memiliki aroma dan karakteristik yang kuat. Karakteristik tersebut yakni tingginya kandungan papain, karena itu buah dimakan saat sudah matang. Buah *C. pubescens* tergolong buah klimakterik (Moya-Leon, 2004).

Buah *C. pubescens* memiliki beberapa perbedaan ciri dibanding dengan *C. papaya* yaitu buah beraroma khas, ukuran lebih kecil, daging buah lebih tipis dengan warna kuning sedikit jingga dan rasanya masam. Keunikan lain dari *C. pubescens* adalah bijinya terbungkus (bersalut) lapisan berlendir, berserat dan berair dengan aroma yang lebih kuat dibanding daging buahnya. Saat ini, olahan buah *C. pubescens* dalam bentuk koktail dan manisan menjadi salah satu oleh-oleh khas daerah Wonosobo (Laily, 2012).



Gambar 2.1 Morfologi *Carica pubescens* Lenne & K. Koch
(Sumber: dokumentasi pribadi)

2.1.3 Kandungan Kimia *Carica pubescens* Lenne & K. Koch

Daun *C. pubescens* memiliki khasiat sebagai antibakteri yang dapat digunakan untuk terapi penyakit diare. Senyawa fitokimia yang terkandung di dalam daunnya adalah flavonoid, alkaloid, tanin, dan fenol (Novalina dkk, 2013). Buah *C. pubescens* terbukti mengandung vitamin C dan memiliki aktivitas antioksidan karena mengandung flavonoid (Fatchurrozak dkk, 2013; Laily, 2012). Selain itu, buahnya juga mengandung karbohidrat total sebesar 5,58%, serat kasar 0,3%, dan gula reduksi 0,74%. Kandungan karbohidrat, serat kasar dan juga gula reduksi ini dapat berbeda dikarenakan perbedaan tingkat kematangan buah dan juga ketinggian tempat tumbuh (Fitrianiingrum, 2013).

Diantara kandungan metabolit sekunder pada daun *C. pubescens* yang berpotensi sebagai antibakteri adalah sebagai berikut.

1. Alkaloid

Alkaloid merupakan senyawa nitrogen heterosiklik, diketahui memiliki aktivitas antimikrobia. Senyawa alkaloid dapat menghambat aktivitas bakteri gram positif dan negatif secara in vivo, namun mekanismenya masih belum jelas (Novalina dkk, 2013). Menurut Wink dkk (1998), senyawa-senyawa golongan alkaloid dapat menghambat DNA polimerase dan juga mampu menghambat biosintesis protein pada proses translasi. Sedangkan menurut Robinson (1995), alkaloid dapat mengganggu terbentuknya komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian pada bakteri.

Pada tanaman pepaya ditemukan alkaloid carpaine. Carpaine merupakan alkaloid bercincin laktonat dengan 7 kelompok rantai metilen sehingga ampuh untuk menghambat kinerja mikroorganisme (Mulyono, 2013). Hasil penelitian Khotimah (2015) juga menunjukkan bahwa daun *C. pubescens* mengandung alkaloid carpaine dengan berat molekul 479 dalton. Alkaloid carpaine dapat ditemukan pada berbagai bagian tanaman pepaya. Bukhori dkk (2014), telah mengekstrak carpaine dari daun, tangkai daun, dan kulit buah dari *C. papaya* yang tumbuh di ladang dan dari kultur sel daun, tangkai daun, suspensi sel dan suspensi cair. Yogiraj (2014) menyebutkan pada daun pepaya terkandung alkaloid diantaranya carpaine, pseudocarpaine, dehydrocarpaine I dan II.

2. Flavonoid

Senyawa-senyawa flavonoid pada daun pepaya diantaranya kaemferol dan myricetin (Yogiraj, 2014). Flavonoid berfungsi sebagai antimikroba dengan cara membentuk kompleks dengan protein ekstraseluler yang terdapat pada dinding sel bakteri, dimungkinkan hal tersebut menyebabkan rigiditas dari dinding sel mengalami penurunan, sehingga mengakibatkan flavonoid mampu menerobos dinding sel. Selain itu, flavonoid yang bersifat lipofilik dapat menerobos membran sel bakteri, mengurangi fluiditas dari membran sel, kemudian mendenaturasi protein yang menyebabkan aktivitas metabolisme bakteri terhenti (Novalina dkk, 2013).

3. Fenol

Senyawa fenolik merupakan senyawa yang penting karena merupakan kelas besar diantara senyawa-senyawa penyusun tanaman. Mekanisme

antimikroba senyawa fenolik secara *in vivo* adalah dengan mengganggu kerja membran sitoplasma bakteri, termasuk diantaranya mengganggu transpor aktif dan kekuatan proton (Harborne, 1987). Senyawa fenol yang ada pada daun pepaya diantaranya ferulic acid, caffeic acid, dan chlorogenic acid (Yogiraj, 2014).

2.1.4 Manfaat *Carica pubescens* Lenne & K. Koch

Daun *C. pubescens* dapat menyembuhkan penyakit akibat cacing kremi, menyembuhkan demam malaria, beri-beri, mengobati sariawan, sembelit, dan disentri amuba (Hidayat, 2000). Hasil penelitian Novalina dkk (2013) juga menyebutkan bahwa daun *C. pubescens* memiliki khasiat sebagai antibakteri terhadap bakteri-bakteri penyebab diare.

Buah *C. pubescens* dapat mempercepat pencernaan karbohidrat dan lemak, menurunkan tekanan darah tinggi, memperlancarkan buang air besar, menyembuhkan radang sendi, epilepsi dan kencing manis yang muncul karena proses pencernaan makanan yang tidak sempurna (Hidayat, 2000).

Biji dapat dimanfaatkan untuk mengobati penyakit akibat cacing gelang, mengatasi gangguan pencernaan, menyebabkan *abortivum*, dan mengobati penyakit kulit. Getahnya dimanfaatkan sebagai obat luka bakar, jerawat, kutil, dan eksem. Akarnya dimanfaatkan sebagai obat cacing kremi, obat batu ginjal, obat sakit kandung kemih, obat encok, dan luka akibat gigitan ular berbisa (Hidayat, 2000).

2.2 *Salmonella typhi*

2.2.1 Klasifikasi *Salmonella typhi*

Salmonella memiliki taksonomi yang cukup rumit sehingga terdapat beberapa tata nama yang berbeda. Kauffman-White menggolongkan *Salmonella* berdasarkan kekhasan antigenik, sedangkan Ewing menyatakan bahwa terdapat tiga spesies *Salmonella*, yaitu *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella enteridis*, dan *Salmonella typhi*. Melalui pemetaan genetika, *Salmonella* disimpulkan termasuk dalam genus *Arizona* berdasarkan persamaan struktur geneti, filogenik, dan petunjuk evolusinya (Radji, 2009).

Klasifikasi *Salmonella typhi* adalah sebagai berikut (Ugboko, 2014):

Domain : Bacteria
 Filum : Proteobacteria
 Kelas : Gammaproteobacteria
 Ordo : Enterobacteriales
 Famili : Enterobacteriaceae
 Genus : *Salmonella*
 Spesies : *Salmonella enterica*
 Subspesies : *Salmonella enterica enterica*
 Serovar : *Salmonella enterica serovar Typhi*

2.2.2 Morfologi dan Fisiologi *Salmonella typhi*

Salmonella merupakan bakteri gram negatif, tidak berspora, tidak mempunyai simpai, tanpa fimbria, dan mempunyai flagel peritrik, kecuali

Salmonella pullorum dan *Salmonella gallinarum*. Ukuran 1-3,5 μm x 0,5-0,8 μm . Besar koloni dalam media perbenihan rata-rata 2-4 mm (Radji, 2009).

Salmonella tumbuh pada suasana aerob atau anaerob fakultatif, pada suhu 15-41⁰C. suhu pertumbuhan optimum 37,5⁰C dengan pH media 6-8. *Salmonella* mempunyai gerak positif, dapat tumbuh dengan cepat pada perbenihan biasa, tidak meragi laktosa, sukrosa, membentuk asam, dan biasanya membentuk gas dari glukosa, maltosa, manitol, dan dekstrin. Sebagian besar isolat *Salmonella* dari spesimen klinik membentuk H₂S bervariasi. Hanya 50% *Salmonella enteridis* serotipe A yang membentuk H₂S. Dalam perbenihan agar *Salmonella* Shigella, agar Endo, dan agar MacConkey, koloni *Salmonella* berbentuk bulat, kecil, dan tidak berwarna. Pada media *Wilson-Blain agar*, koloni *Salmonella* berwarna hitam (Radji, 2009).

Salmonella mati pada suhu 56⁰C dan pada keadaan kering. Dalam air, *Salmonella* dapat bertahan selama 4 minggu. Bakteri ini hidup subur dalam media yang mengandung garam empedu berkonsentrasi tinggi dan tahan terhadap *brilliant green*, natrium tetrasetat, dan natrium deoksikolat. Senyawa-senyawa ini menghambat pertumbuhan bakteri *coliform* sehingga dapat digunakan untuk mengisolasi bakteri *Salmonella* dari tinja dalam media (Radji, 2009).

Salmonella typhi mempunyai antigen permukaan yang cukup kompleks dan mempunyai peran penting dalam proses patogenitas, selain itu juga berperan dalam proses terjadinya respon imun pada individu yang terinfeksi. Antigen permukaan tersebut terdiri dari antigen flagel (antigen H), antigen ini terdiri dari suatu protein yang dikode oleh gen *flg* yang berada pada lokus *fliC*. Antigen

somatik (antigen O) atau antigen dinding sel. Antigen O tersusun dari LPS (Lipo Polisakarida) yang berfungsi pula sebagai endotoksin. Dan antigen kapsul atau antigen K (antigen Vi) yaitu antigen yang terdiri dari polimer polisakarida dan bersifat asam. Antigen Vi yang dimiliki oleh bakteri berfungsi sebagai antiopsonik dan antipagositik, ekspresi antigen tersebut dikode oleh gen *tvfA* yang berada di dalam lokus *via B*, tidak semua strain *S. typhi* mengekspresikan antigen Vi ini (Darmawati, 2009).

2.2.3 Patogenesis Demam Tifoid

Islam mengajarkan umatnya agar memperhatikan kebersihan sebagai salah satu cara untuk menjaga kesehatan. Islam memandang kebersihan sebagai ibadah dan sekaligus cara untuk mendekatkan diri kepada Allah SWT bahkan Islam mengkatagorikan kebersihan sebagai salah satu kewajiban bagi setiap muslim (Al-Qardhawy, 1999). Rasulullah SAW bersabda.

قَالَ رَسُولُ اللَّهِ صَلَّى اللَّهُ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ الْإِسْلَامُ نَظِيفٌ فَتَنْظَّفُوا فَإِنَّهُ لَا يَدْخُلُ الْجَنَّةَ إِلَّا نَظِيفٌ (رواه البيهقي)

Artinya: Rasulullah saw bersabda: “agama Islam itu (agama) yang bersih maka hendaklah kamu menjaga kebersihan, karena sesungguhnya tidak akan masuk surga kecuali orang-orang yang bersih” (H.R Baihaqy).

Hadits tersebut menjelaskan bahwa Islam merupakan agama yang bersih. Oleh karena itu umat Islam harus menjaga kebersihan baik kebersihan jasmani ataupun rohani. Seseorang yang selalu menjaga kebersihan akan mendapatkan

tempat yang tinggi di akhirat yakni surga. Selain itu, dengan menjaga kebersihan jasmani, maka seseorang akan terhindar dari berbagai penyakit khususnya yang disebabkan oleh infeksi bakteri. Secara khusus Rasulullah saw juga memerintahkan umatnya untuk menjaga kebersihan dalam lima hal, sebagaimana sabdanya.

عَنْ أَبِي هُرَيْرَةَ قَالَ رَسُولُ اللَّهِ صَلَّى اللَّهُ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ الْفِطْرَةُ خَمْسٌ الْحِتَانُ وَالْإِسْتِحْدَادُ وَقَصُّ الشَّارِبِ وَتَقْلِيمُ الْأَظْفَارِ وَتَنْفُ الْأَبَاطِ (روه بخارى ومسلم)

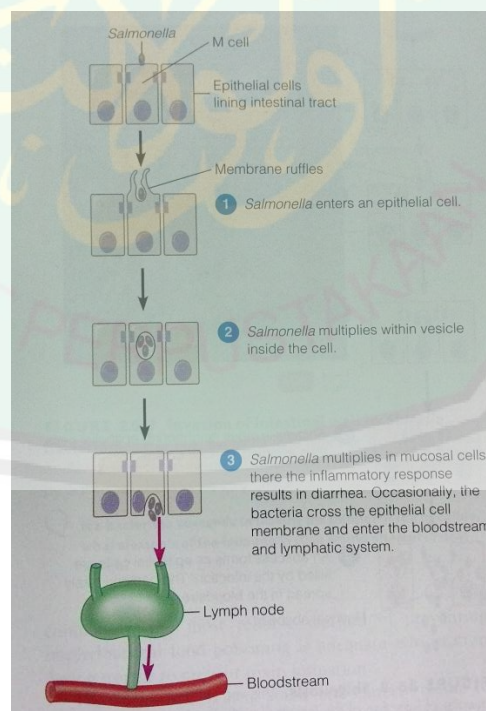
Artinya: Dari Abu hurairah Rasulullah saw bersabda “Ada lima macam fitrah, yaitu khitan, mencukur bulu kemaluan, memotong kumis, memotong kuku, dan mencabut bulu ketiak” (HR. Bukhori no. 5891 dan Muslim no. 258).

Dalam hadis tersebut disebutkan beberapa sunah fitrah yang telah dilakukan orang terdahulu diantaranya berkhitan, mencukur bulu kemaluan, memotong kumis, memotong kuku, dan mencabut bulu ketiak. Memotong kuku, sebagai salah satu sunah fitrah penting untuk dilakukan, karena kuku yang melebihi ujung jari dapat menyimpan kotoran. Kotoran yang terdapat pada kuku dapat menjadi sumber penyakit karena berbagai jenis bakteri patogen umumnya hidup pada bagian-bagian tubuh yang kotor.

Demam tifoid (demam enterik) merupakan penyakit infeksi akut pada saluran pencernaan yang disebabkan *S. typhi*. Penyakit ini erat kaitannya dengan *higiene* pribadi dan sanitasi lingkungan, seperti *higiene* perorangan, *higiene* makanan, lingkungan yang kumuh, kebersihan tempat-tempat umum yang kurang serta perilaku masyarakat yang tidak mendukung untuk hidup sehat. (Seran,

2015). Penyakit ini ditularkan melalui makanan dan minuman yang telah terkontaminasi oleh feses atau urin dari penderita demam tifoid atau *carrier* (Darmawati, 2009).

Salmonella typhi akan menembus mukosa epitel usus, berkembang biak di lamina propria kemudian masuk ke dalam kelenjar getah bening mesenterium. Setelah itu memasuki peredaran darah sehingga terjadi bakteremia pertama yang asimtomatis, lalu kuman masuk ke organ-organ terutama hepar dan sumsum tulang yang dilanjutkan dengan pelepasan kuman dan endotoksin ke peredaran darah sehingga menyebabkan bakteremia kedua. Kuman yang berada di hepar akan masuk kembali ke dalam usus kecil, sehingga terjadi infeksi seperti semula dan sebagian kuman dikeluarkan bersama tinja (Cita, 2011).



Gambar 2.2 Mekanisme Patogenesis *S. typhi* (Tortora dkk, 2007)

Masa inkubasi demam tifoid sekitar 10-14 hari. Penderita akan mengalami demam (40°C), rasa tidak enak badan, sakit kepala, konstipasi, *bradycardia*, dan myalgia terjadi. Demam meningkat ke masa stabil, limpa dan ginjal membesar. *Ros spots* biasanya ada di atas kulit perut atau dada, kelihatan jelas dalam beberapa kasus. Jumlah sel darah putih normal atau rendah. Pada masa preantibiotik, komplikasi utama dari demam enterik adalah pendarahan dan perforasi, dan angka kematian rata-rata 10-15%. Pengobatan dengan antibiotik telah menurunkan angka kematian rata-rata hingga kurang dari 1% (Jawetz dkk, 2005).

Virulensi *Salmonella* disebabkan oleh kemampuan menginvasi sel-sel epitel inang, mempunyai antigen permukaan yang terdiri atas simpai lipopolisakarida, kemampuan melakukan replikasi interseluler, menghasilkan beberapa toksin spesifik, kemampuan berkolonisasi pada ileum dan kolon, dan kemampuan menginvasi lapisan epitel intestin dan berkembang di dalam sel-sel limfoid (Radji, 2009).

2.2.4 Terapi Antibiotik untuk Demam Tifoid

Terapi antibiotik dibutuhkan dalam proses penyembuhan demam tifoid dan komplikasi yang berhubungan dengannya. Kloramfenikol merupakan obat pilihan pertama untuk demam tifoid, namun pada tahun 1950 dilaporkan telah resisten. Menjelang akhir tahun 1980 *S. typhi* juga dilaporkan telah resisten pada beberapa antibiotik lini pertama seperti kontrimoksazol, tetrasiklin, dan ampisilin (Yenni dan Elly, 2007). Menurut Ugboko (2014), flurokuinolon memiliki aktivitas

in vitro yang baik dalam infeksi salmonellosis. Diantara antibiotik golongan floroquinolon adalah siprofloxasin, ofloxasin, dan perfloxasin yang secara luas digunakan untuk antimikroba demam tifoid.

Ciprofloxacin adalah suatu antibiotik sintetik golongan fluoroquinolon. Antibiotik ini memiliki spektrum luas pada bakteri gram positif dan negatif yang dapat mengobati infeksi bakteri patogen yang sensitif pada ciprofloxacin seperti infeksi saluran kemih, infeksi saluran pencernaan, termasuk demam tifoid dan paratifoid, uretritis dan serviktis gonore, infeksi saluran nafas, serta infeksi kulit dan jaringan lunak (Fauzia dkk, 2005).

Ciprofloxacin bekerja dengan menghambat topoisomerase II atau dikenal sebagai DNA gyrase pada bakteri gram negatif, dan topoisomerase IV pada bakteri gram positif (Ruiz, 2003). DNA gyrase merupakan enzim yang dibutuhkan untuk sintesis DNA bakteri. DNA bakteri umumnya dalam keseimbangan antara untai konformasi DNA sirkuler tertutup ganda dan struktur superkoil negatif. Peran DNA gyrase adalah untuk mengontrol topologi DNA bakteri dan fungsi kromosom dengan mempertahankan supercoiling DNA negatif. Selain penting untuk replikasi DNA dan juga bertanggung jawab untuk menghilangkan supercoiling negatif, DNA gyrase membantu dalam membengkokkan (*bending*), melipat (*folding*) DNA dan menghapus knot. Antibiotik ciprofloxasin akan berikatan dengan DNA gyrase sehingga proses sintesis dari DNA bakteri akan terganggu (Hernandes dkk, 2002).

2.3 Metode *In Silico*

Bioinformatika muncul atas desakan kebutuhan untuk mengumpulkan, menyimpan dan menganalisa data-data biologis dari database DNA, RNA, dan protein. Keberadaan database adalah syarat utama dalam analisis bioinformatika. Database protein dapat ditemukan di Swiss-Prot (Swiss), Uniprot, untuk sekuen asam aminonya dan di *Protein Data Bank* (PDB) untuk struktur 3D-nya (Sussman dkk., 1998).

2.3.1 Analisis Aktivitas Biologi PASS *Prediction online*

PASS (*Prediction of Activity Spectra for Substances*) merupakan suatu program komputer yang digunakan untuk memprediksi berbagai aktivitas biologi dari suatu senyawa (Jamkhande dkk, 2014). Program PASS secara luas digunakan dalam teknik *in silico*. Analisis PASS didasarkan pada SAR (*Structure Activity Relationship*) atau hubungan struktur aktivitas dari sekumpulan percobaan yang terdiri lebih dari 205.000 senyawa yang menunjukkan lebih dari 3.750 macam aktivitas biologi (Pramely, 2012). PASS telah digunakan sebagai software yang potensial untuk memprediksi spektrum aktivitas biologi dari senyawa sintesis untuk pencarian obat baru. Pada penelitian ini digunakan PASS *prediction* untuk memprediksi kemungkinan aktivitas antibakteri senyawa-senyawa yang terdapat pada daun pepaya gunung (*C. pubescens*).

Hasil prediksi dari PASS akan menunjukkan sejumlah aktivitas biologi sebagai kemungkinan aktif (P_a = *probable activity*) dan kemungkinan tidak aktif (P_i = *probable inactivity*). Nilai P_a dan P_i bermacam-macam dari 0,000 hingga

1,000 dan secara umum $Pa+Pi \neq 1$. Interpretasi dari hasil prediksi PASS adalah, (i) hanya senyawa dengan nilai $Pa > Pi$ yang memiliki kemungkinan sebagai senyawa yang baik, (ii) jika nilai $Pa > 0,7$ maka kemungkinan untuk menemukan aktivitas secara eksperimental tinggi, (iii) jika nilai $0,5 < Pa < 0,7$ maka kemungkinan menemukan aktivitas secara eksperimental rendah, tapi senyawa mungkin tidak sama dengan obat farmasi yang telah dikenal, dan (iv) jika $Pa < 0,5$ maka senyawa tidak menunjukkan aktivitas secara eksperimental (Pramely, 2012).

2.3.2 Lipinski Role of Five

Lipinski *role of five* (Ro5) berasal dari analisis 2.245 molekul dari *Derwent World Drug Index* (DWDI) yang dipercaya untuk tes klinis fase II. Aturan-aturan ini diliputi oleh Ro5 yang secara luas diterapkan oleh industri dan secara umum disediakan sebagai ukuran kesalahan dari senyawa yang serupa obat (*drug-likeness*). Hal-hal yang berkaitan dengan *drug-likeness* oral meliputi kemampuan bioavaililiti, potensi minimal untuk berinteraksi dengan sebuah target terapeutik, kelarutan dalam air, permeabilitas, kemampuan farmakokinetik, dan permeabilitas terhadap barier/sawar otak (untuk obat sistem saraf pusat) (Jadhav dkk, 2015).

Pada tahun 2007, Lipinski mengusulkan “*Role of Five*” yang terkenal dengan penyaring senyawa yang serupa obat, menyediakan empat aturan untuk menjelaskan apakah sebuah molekul dapat diserap dengan baik secara oral atau tidak. Aturan-aturan dalam Ro5 adalah berat molekul (*Molecular weight/ MW*) ≤ 500 , koefisien partisi air (*ClogP*) ≤ 5 , jumlah ikatan hidrogen donor (HBD) ≤ 5 ,

dan jumlah dari ikatan hidrogen aseptor (HBA) ≤ 10 . Jika sebuah komponen tidak mengikuti dua aturan atau lebih maka komponen tersebut mungkin tidak aktif secara oral (Jadhav dkk, 2015). Senyawa yang memenuhi kriteria Ro5 diprediksikan memiliki kemampuan bioavibilitas yang tinggi dalam tubuh. Bioavilitas merupakan suatu kemampuan obat dapat diserap dan beredar didalam tubuh (Arwansyah dkk, 2014).

2.3.3 Penambatan Molekul (*Molecular docking*)

Docking merupakan salah satu cakupan dari bioinformatika, terutama untuk tujuan penemuan obat (Utama, 2003). *Molecular docking* (penambatan molekul) adalah teknik yang digunakan untuk mempelajari interaksi yang terjadi dari suatu kompleks molekul antara biomolekul dengan molekul kecil atau ligan untuk mencapai suatu kestabilan. Penambatan molekul sangat berguna dalam proses desain obat, seperti untuk memprediksi afinitas pengikatan dari inhibitor yang didesain terhadap enzim tertentu yang ingin dihambat aktivitasnya. Fungsi dari penambatan molekul adalah meniru peristiwa interaksi antara ligan dengan protein yang menjadi targetnya pada proses in vitro (Putra, 2014).

Penambatan molekul (*Molecular docking*) dapat dianggap sebagai masalah gembok dan kunci (*lock and key*), protein dapat dianggap sebagai gembok dan ligan dapat dianggap sebagai kunci. Penambatan molekul dapat didefinisikan sebagai masalah optimasi yang akan menggambarkan orientasi ikatan terbaik dari ligan yang mengikat protein tertentu (Mukesh dan Kumar, 2011). Ligan adalah molekul kecil yang berinteraksi dengan daerah ikatan (*binding site*) pada protein.

Beberapa kemungkinan konformasi dalam ikatan antara ligan dan protein mungkin terjadi, yang disebut mode ikatan (Onkara dkk, 2013).

Dalam desain obat moderen, *molecular docking* secara rutin digunakan untuk memahami interaksi obat dengan reseptor dan seringkali digunakan untuk memprediksi orientasi ikatan dari kandidat obat pada protein target. Interaksi yang terjadi pada molekul obat dan protein target akan menghasilkan energi ikatan (*binding affinity*) dan aktivitas dari molekul obat tersebut (Onkara dkk, 2013). Energi ikatan hasil doking merupakan parameter utama untuk mengetahui kesetabilan antara ligan dan protein. Interaksi antara ligan dan reseptor akan cenderung berada pada kondisi energi yang paling rendah. Energi yang paling rendah menunjukkan bahwa molekul berada pada kondisi yang stabil, sehingga semakin rendah nilai binding afiniti maka interaksi ligan reseptor semakin stabil (Arwansyah dkk, 2014). Pada penelitian ini dilakukan doking dengan menggunakan senyawa-senyawa pada daun pepaya gunung (*C. pubescens*) dengan reseptor pada bakteri *S. typhi* yakni DNA gyrase untuk memahami dan menggambarkan mekanisme aksi dari senyawa tersebut sebagai antibakteri.

2.4 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan suatu proses pemisahan bahan aktif dalam sel atau jaringan tanaman yang bersifat inaktif atau inert dengan menggunakan pelarut yang sesuai dengan polaritasnya (Tiwari dkk, 2011). Bahan aktif dalam tumbuhan tersebut terdiri dari terpenoid, alkaloid, steroid, flavonoid, atsiri, dan sebagainya (Robinson, 1995). Sebelum dilakukan ekstraksi, sampel segar sebaiknya segera

dimasukkan ke dalam alkohol mendidih. Akan tetapi jika tidak memungkinkan, maka sampel disimpan dalam keadaan kering dengan tujuan bahan kimia dalam sampel tidak terlalu banyak yang berubah. Disamping itu, sebelum proses pengeringan maka sampel sebaiknya dibersihkan terlebih dahulu agar tidak terkontaminasi oleh jamur yang akan tumbuh pada sampel kering (Harborne, 1987).

Adapun parameter kualitas dari ekstraksi tergantung oleh berbagai hal seperti jenis bahan yang digunakan, jenis pelarut, dan prosedur ekstraksi. Sementara hasil bahan aktif yang diekstraksi dipengaruhi oleh beberapa faktor yakni ukuran bahan, tipe ekstraksi, waktu ekstraksi, temperatur, jenis pelarut, pH, konsentrasi pelarut, dan polaritas (Tiwari dkk, 2011).

Faktor ukuran bahan juga mempengaruhi hasil ekstraksi. Pengecilan ukuran suatu bahan yang akan diekstraksi bertujuan untuk memperluas bidang permukaan bahan sehingga akan mempercepat penetrasi pelarut ke dalam bahan yang akan diekstrak dan mempercepat waktu ekstraksi. Namun ukuran bahan yang terlalu kecil juga menyebabkan banyak minyak volatile yang menguap selama penghancuran (Tiwari dkk, 2011). Kemudian salah satu faktor yang mempengaruhi hasil ekstraksi adalah suhu. Ekstraksi akan lebih cepat dilakukan pada suhu tinggi. Namun penggunaan suhu yang terlalu tinggi juga dapat menyebabkan kerusakan senyawa yang akan diekstrak.

Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi berpengaruh terhadap senyawa yang akan diekstrak. Berdasarkan sifat dan kepolaran pelarut, maka dapat diketahui bahan aktif yang dilarutkan (Tabel 2). Beberapa pelarut yang dapat digunakan dalam proses ekstraksi adalah:

1. n-Heksan

n-Heksana ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$) adalah pelarut petroleum yang mudah menguap. Ikatan pada heksana bersifat tunggal dan kovalen sehingga menyebabkan n-heksana tidak reaktif sehingga sering digunakan sebagai pelarut inert pada reaksi senyawa organik. Heksana mempunyai karakteristik sangat tidak polar dan mudah menguap. Berat molekul heksana adalah 86,17 gram/mol dengan titik leleh $-94,3$ sampai $-95,3^\circ\text{C}$ (Daintith, 1994). n-heksan memiliki tetapan dielektrik pada suhu 20°C sebesar 1,890 (Stahl, 1985).

2. Kloroform

Kloroform (CHCl_3) merupakan salah satu senyawa haloform yang mudah menguap, tidak berwarna; titik leleh $-63,5^\circ\text{C}$; titik didih 61°C . Senyawa ini diproduksi melalui proses klorinasi metana atau melalui reaksi haloform. Kloroform digunakan sebagai pelarut dan bahan dasar untuk membuat senyawa lainnya (Daintith, 1994). Kloroform memiliki tetapan dielektrik pada suhu 20°C sebesar 4,806 (Stahl, 1985).

3. Etil asetat

Etil asetat ($\text{C}_2\text{H}_5\text{COOH}$) merupakan senyawa turunan steroid yang memiliki berat molekul 72,08 g/mol. Pelarut ini bersifat semi-polar (Daintith, 1994). Etil asetat merupakan pelarut yang baik digunakan untuk ekstraksi karena

dapat dengan mudah diuapkan, tidak higroskopis, dan memiliki toksisitas rendah. Etil asetat memiliki tetapan dielektrik pada suhu 20°C sebesar 6,02 (Stahl, 1985).

4. Etanol

Etanol atau alkohol (C_2H_5OH) merupakan cairan tidak berwarna yang larut dalam air, densitas 0,6 (0°C) titik leleh -169°C, titik didih -102°C. Memiliki gugus hidroksil (OH) pada alkohol yang menyebabkan bersifat polar, sedangkan gugus alkil (R) merupakan gugus non polar. Proporsi dari kedua gugus tersebut merupakan faktor yang menentukan sifat alkohol (Daintith, 1994). Etanol memiliki tetapan dielektrik pada suhu 20°C sebesar 20,7 (Stahl, 1985).

5. Metanol

Metanol (CH_3OH) adalah cairan yang tidak berwarna, densitas 0,79 gram/mL; titik leleh -98°C, titik didih 64°C. Senyawa ini dibuat melalui oksidasi katalitik dari metana dan digunakan sebagai pelarut serta sebagai bahan baku untuk industri kimia (Daintith, 1994).

Tabel 2.1 Jenis-jenis Pelarut untuk Melarutkan Senyawa Aktif

Air	Etanol	Metanol	Kloroform	Eter	Aseton
Antosianin	Tannin	Terpenoid	Terpenoid	Alkaloid	Fenol
Tannin	Sterol	Saponin	Flavonoid	Terpenoid	Flavonol
Saponin	Polifenol	Tannin		Asam-lemak	
Terpenoid	Flavonol	Flavon			
Lektin	Terpenoid	Polifenol			
Poli-peptida	Alkaloid	Xantolin			

(Sumber: Tiwari dkk, 2011)

Berdasarkan bentuk campuran yang diekstraksi, dapat dibedakan dua macam ekstraksi yaitu (Kristanti dkk, 2008):

1. Ekstraksi padat cair, jika substansi yang diekstraksi terdapat di dalam campurannya yang berbentuk padat. Proses ini paling banyak ditemui di

dalam usaha untuk mengisolasi suatu substansi yang terkandung di dalam suatu bahan alam.

2. Ekstraksi cair-cair, jika substansi yang diekstraksi terdapat di dalam campurannya yang berbentuk cair.

Maserasi adalah salah satu contoh metode ekstraksi padat-cair. Maserasi merupakan suatu metode ekstraksi menggunakan lemak panas. Akan tetapi penggunaan lemak panas ini telah digantikan oleh pelarut-pelarut organik yang volatil. Penekanan utama pada maserasi adalah tersedianya waktu kontak yang cukup antara pelarut dan jaringan yang diekstraksi. Maserasi merupakan cara ekstraksi yang sederhana dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam pelarut. Pelarut akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif sehingga zat aktif akan larut. Karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif sehingga zat aktif di dalam sel, maka larutan yang terpekat didesak keluar. Pelarut yang digunakan dapat berupa air, etanol, air-etanol, atau pelarut lain. Keuntungan cara ekstraksi ini adalah cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah diusahakan. Sedangkan kerugiannya adalah waktu pengerjaannya lama dan waktu ekstraksi kurang sempurna (Guether, 1987).

Fraksinasi dengan metode ekstraksi cair-cair atau *solvent extraction* merupakan proses pemisahan yang didasarkan atas perbedaan distribusi komponen yang dipisahkan antara dua fase cair (Febriyanti dkk, 2004). Proses pemisahan tersebut dilakukan di dalam dua macam pelarut yang tidak saling bercampur. Hal tersebut memungkinkan karena adanya sifat senyawa yang dapat

terlarut dalam air maupun senyawa yang dapat larut dalam pelarut organik. Fraksinasi dilakukan secara berkesinambungan dimulai dengan pelarut non polar, dilanjutkan dengan pelarut semi polar dan diakhiri dengan menggunakan pelarut polar. Akhir dari proses fraksinasi akan didapatkan fraksifikasi yang mengandung senyawa yang secara berurutan dari senyawa non polar, semi polar dan polar (Purwanto, 2015).

2.5 Uji Antibakteri Secara *In vitro*

Penentuan kepekaan bakteri patogen terhadap antimikrobia dapat dilakukan dengan menggunakan salah satu dari dua metode yakni difusi atau difusi.

1. Metode Difusi

Pada metode difusi termasuk di dalamnya metode *disk diffusion* (tes Kirby & Bauer), *ditch-plate technique*, *cup-plate technique*.

a. Metode *disk diffusion* (tes Kirby & Bauer).

Metode difusi cakram merupakan cara yang paling sering digunakan untuk menentukan kepekaan antibakteri terhadap suatu antibiotik. Pada cara ini digunakan suatu cakram kertas saring (*paper disk*) yang berfungsi sebagai tempat menampung zat antimikroba. Kertas saring tersebut kemudian diletakkan pada lempeng agar yang telah diinokulasi mikroba uji, kemudian diinkubasi pada waktu tertentu dan suhu tertentu, sesuai dengan kondisi optimum dari mikroba uji. Pada umumnya, hasil yang di dapat bisa diamati setelah inkubasi selama 18-24 jam dengan suhu 37°C. Hasil pengamatan yang diperoleh berupa ada atau

tidaknya daerah bening yang terbentuk di sekeliling kertas cakram yang menunjukkan zona hambat pada pertumbuhan bakteri (Pelczar & Chan, 1988).

b. Metode *ditch-plate technique*

Pada metode ini sampel uji berupa agen antimikroba yang diletakkan pada parit yang dibuat dengan cara memotong media agar dalam cawan petri pada bagian tengah secara membujur dan mikroba uji (maksimum 6 macam) digoreskan ke arah parit yang berisi agen antimikroba (Pratiwi, 2008).

c. Metode *cup-plate technique*

Metode ini serupa dengan metode *disk diffusion*, dimana dibuat sumur pada media agar yang telah ditanami dengan mikroorganisme dan pada sumur tersebut diberi agen antimikroba yang akan diuji (Pratiwi, 2008). Kelebihan metode ini adalah senyawa antibakteri berdifusi langsung ke agar tanpa ada perantara. Hal inilah yang membuat senyawa aktif dapat langsung bekerja melawan bakteri tanpa hambatan (Anggraini dkk, 2012).

d. Metode *E-test*

Metode *E-test* atau biasa disebut dengan tes epsilometer adalah metode tes dimana huruf “E” dalam nama E-test menunjukkan simbol epsilon (ϵ). E-test merupakan metode kuantitatif untuk uji antimikroba. Metode ini gabungan antara metode dilusi dan metode difusi antibakteri ke dalam media. Metode ini dilakukan dengan menggunakan strip plastik yang sudah mengandung agen antibakteri dengan konsentrasi terendah sampai tertinggi yang diletakkan pada media agar yang telah ditanami mikroorganisme. Hambatan pertumbuhan mikroorganisme bisa diamati dengan adanya area jernih di sekitar strip tersebut (Pratiwi, 2008).

2. Metode Dilusi

Pada metode dilusi termasuk di dalamnya metode dilusi cair dan dilusi padat (Pratiwi, 2008):

a. Metode dilusi cair/*broth dilution test (serial dilution test)*.

Metode ini mengukur MIC (*minimum inhibitory concentration* atau kadar hambat minimum (KHM) dan MBC (*minimum bactericidal concentrtrion* atau kadar bunuh minimum (KBM). Pengujian dilakukan dengan menggunakan sederetan tabung reaksi yang diisi dengan inokulum kuman dan larutan antibakteri dalam berbagai konsentrasi. Zat yang akan diuji aktivitas bakterinya diencerkan sesuai serial dalam media cair, kemudian diinokulasikan dengan kuman dan diinkubasi pada waktu dan suhu yang sesuai dengan mikroba uji.

b. Metode dilusi padat/ *solid dilution test*

Metode ini serupa dengan metode dilusi cair namun menggunakan media padat (solid). Keuntungan metode ini adalah satu konsentrasi agen antimikroba yang diuji dapat digunakan untuk menguji beberapa mikroba uji.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratorium. Daun pepaya gunung (*C. pubescens*) diekstraksi dengan etanol p.a 96% menggunakan metode maserasi. Hasil ekstraksi difraksinasi menggunakan etil asetat p.a. Fraksi yang dihasilkan digunakan untuk uji aktivitas antibakteri terhadap *S. typhi* dengan variasi konsentrasi. Pengujian antibakteri fraksi etil asetat daun pepaya gunung menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan (10%, 25%, 50%, 75%, 100%) dan 4 ulangan. Metode yang digunakan dalam pengujian antibakteri adalah metode difusi sumur agar. Uji secara *in silico* menggunakan PASS prediction untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari senyawa carpaine, chlorogenic acid, kaempferol, myricetin, ferulic acid, dan caffeic acid. Molecular docking dilakukan untuk mengetahui energi ikatan (*binding affinity*) dan daerah ikatan (*binding site*) senyawa-senyawa tersebut sebagai ligan terhadap DNA gyrase dan membandingkan skor doking senyawa-senyawa tersebut dengan antibiotik ciprofloxacin. Ciprofloxacin digunakan sebagai kontrol positif untuk uji *in silico* dan *in vitro*.

3.2 Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan pada bulan April-Agustus 2016 di laboratorium Mikrobiologi, laboratorium Fisiologi tumbuhan Jurusan Biologi, laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam

Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang dan laboratorium Biokomputasi Jurusan Biologi Universitas Brawijaya Malang.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat

Alat yang digunakan antara lain, oven, blender, corong buchner, kertas saring, corong pisah, rotary evaporator, seperangkat alat gelas, autoklaf, laminar air flow, jarum ose, bunsen, hot plate-stirer, mikropipet, tip, vortex, lemari es, inkubator, neraca analitik, alumunium foil, plastic wrap, kapas, kertas tisu, jangka sorong, seperangkat komputer dan software untuk uji docking diantaranya Pyrx, Discovery studio 2016, dan Pymol.

3.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan antara lain, daun pepaya gunung (*C. pubescens*), bakteri *S. typhi*, antibiotik ciprofloxacin, etanol 96% p.a, etil asetat p.a, aquadest, pelarut DMSO, Muellen Hinton Agar, Salmonella Sigella Agar, Nutrient broth agar, NaCl fisiologis 0,9%, etanol 70%, struktur 3D ligan (carpaine, chlorogenic acid, kaempferol, myricetin, ferulic acid, caffeic acid dan antibiotik ciprofloxacin) yang diunduh dari <http://pubChem.ncbi.nlm.nih.gov> dengan format .sdf. Struktur 3D DNA gyrase yang diunduh dari uniprot (<http://uniprot.org/>) dan Struktur protein reference diunduh dari PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/home>) dengan kode 5bs8.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Uji *In Silico*

3.4.1.1 Aktivitas Antibakteri PASS Prediction

Aktivitas antibakteri (*biological activity*) dilakukan untuk mengetahui kemungkinan aktifnya senyawa-senyawa pada daun pepaya gunung sebagai antibakteri. Analisis ini menggunakan software PASS *prediction online* melalui <http://www.pharmaexpert.ru/passonline>. Senyawa pada daun pepaya gunung dicari *smile*-nya melalui pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/. Selanjutnya dibuka software PASS dan melakukan registrasi agar bisa melakukan analisis. Prediksi dilakukan dengan cara memasukkan *smile* senyawa ligan kemudian dilakukan analisis (*Get prediction*).

3.4.1.2 Lipinski Rule of Five

Analisis *rule of five* (Ro5) dilakukan untuk mengetahui apakah suatu senyawa yang akan dijadikan obat dapat bekerja aktif secara oral. Analisis ini dilakukan dengan cara mencari senyawa-senyawa pada daun pepaya gunung dalam bentuk 3D melalui pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/u (format SDF). Selanjutnya format SDF dirubah menjadi PDB file dengan cara membukanya pada software Pymol dan disimpan dalam format PDB. Selanjutnya masuk ke website <http://www.scfbio-iitd.res.in/software/drugdesign/lipinski.jsp>. Senyawa 3D yang telah dirubah formatnya dimasukkan (*input PDB file*) kemudian dipilih submit.

3.4.1.3 Penambatan Molekul (*Molecular docking*)

1. Preparasi Protein Target/ Reseptor

Sebelum dilakukan preparasi protein target, dicari protein acuan (*reference*) yakni molekul DNA gyrase yang telah berikatan dengan ligan di Protein Data Bank (PDB) melalui <http://www.rcsb.org> dengan kode 5L3J. Kemudian dicari sequen DNA gyrase subunit B *S. typhi*, diunduh dari uniprot melalui <http://uniprot.org/>. Sequen protein dicopi dan dipaste pada notepad. Sequen DNA gyrase subunit B *S. typhi* dimodelkan/ dihomologi dengan menggunakan protein *reference* sebagai cetakan (*template*) melalui <http://swissmodel.expasy.org/> dan disimpan dalam format PDB (*.pdb).

Protein yang telah dimodelkan, dibuka dan dipreparasi menggunakan software Pymol. Protein hasil modelling di-*align* dengan protein *reference* untuk mengetahui sisi aktifnya. Kemudian ligan atau molekul yang tidak digunakan dihapus. Selanjutnya protein hasil modelling disimpan beserta ligan dari protein *reference* menjadi satu file dalam format PDB (*.pdb) (Fikry, 2014).

2. Preparasi Ligan

Ligan yang digunakan dalam uji ini adalah senyawa carpaine, chlorogenic acid, kaempferol, myricetin, ferulic acid, caffeic acid dan juga kontrol positif ciprofloxacin. Data ligan diunduh melalui PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) dipilih dalam bentuk 3D dan di simpan dalam format SDF (*.sdf) (Dallakyan dan Arthur, 2015).

3. Penambatan Molekul (*Molekular docking*)

Penambatan molekul dilakukan dengan menggunakan software PyRx. Reseptor yang telah dipreparasi dibuka dalam software PyRx dan diubah formatnya menjadi PDBQT. Selanjutnya ligan juga dimasukkan pada open bable. Ligan dilihat energi *minimize* dan diubah format ligan menjadi PDBQT. Setelah reseptor dan ligan siap, di klik vina wizard dan start docking pada toolbar kanan bawah. Klik molekul reseptor dan semua ligan yang akan didocking. Selanjutnya klik forward pada toolbar kanan bawah. Kemudian diatur posisi grid box dengan menggunakan ligan *reference* sebagai acuan untuk menentukan *active site* pada reseptor. Setelah grid box sudah berada pada ligan *reference*, diklik forward dan ditunggu hingga *running* semua ligan selesai. Setelah proses docking selesai, disimpan energi ikatan (*binding affinity*) dan ligan hasil docking untuk danalisis daerah ikatannya (*binding site*) (Dallakyan dan Arthur, 2015).

5. Visualisasi hasil docking

Ligan hasil docking dan reseptor dibuka menggunakan software Pymol dan disimpan dalam satu file. Visualisasi hasil docking dilakukan dengan menggunakan software Discovery studio 2016. Komplek antara protein dan ligan hasil docking dibuka pada software Discovery Studio dan dipilih *Receptor-ligan interaction* pada toolbar. Selanjutnya dipilih ligan *interaction* disebelah kiri dan show 2D diagram. Hasil interaksi ditampilkan dalam bentuk 2D dan disimpan sebagai gambar (JPG/PNG). Sedangkan visualisasi interaksi dalam bentuk 3D dilakukan dengan menggunakan software Pymol.

3.4.2 Pembuatan Ekstrak Daun Pepaya Gunung (*Carica pubescens*)

3.4.2.1 Penyiapan Serbuk Daun

Sampel daun pepaya gunung (*C. pubescens*) diperoleh dari kawasan Bromo Jawa timur. Sebanyak 5 kg sampel daun dicuci bersih dengan air mengalir dan dipotong. Selanjutnya dikeringkan dengan cara diangin-anginkan selama 5 hari. Simplisia daun pepaya gunung (*C. pubescens*) dibuat serbuk dengan cara diblender kemudian diayak menggunakan ayakan 90 mesh dan ditimbang berat serbuk.

3.4.2.2 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Pepaya Gunung

Serbuk daun diekstraksi dengan menggunakan metode maserasi. Simplisia serbuk 100 g dimasukkan dalam toples kaca ditambahkan cairan penyari etanol p.a 96% sebanyak 400 ml (1:4 b/v) didiamkan selama 24 jam dan sesering mungkin diaduk. Setelah 24 jam rendaman simplisia disaring menggunakan corong buchner dan kertas saring. Hasil penyaringan disebut sebagai maserat I. Ampas diremaserasi kembali dengan etanol 96% sebanyak 300 ml (1:3 b/v) selama 24 jam dan disaring kembali sehingga didapatkan maserat II. Proses ekstraksi dilakukan dengan tiga kali replikasi. Maserat dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40⁰C sampai diperoleh ekstrak kental. Ekstrak dimasukkan dalam botol dan ditimbang (Mahatrinny dkk, 2014).

3.4.3 Fraksinasi ekstrak

Fraksinasi dilakukan dengan metode ekstraksi cair-cair dengan menggunakan pelarut etil asetat p.a. Proses fraksinasi dilakukan dengan melarutkan 5 gr ekstrak kasar dengan etanol 40% sebanyak 50 ml diaduk hingga homogen. Selanjutnya ditambahkan pelarut etil asetat p.a sebanyak 50 ml (1:1 v/v). Kemudian larutan dimasukkan ke dalam corong pisah dikocok hingga terpisah menjadi dua lapisan. Lapisan atas merupakan fase etil asetat dan lapisan bawah merupakan fase air. Fraksi etil asetat dipisahkan hingga tersisa fase air. Fase air ditambahkan etil asetat dan dilakukan proses ekstraksi kembali. Proses ekstraksi dilakukan berulang hingga pelarut etil asetat bening. Hasil penyarian dikumpulkan dan dipekatkan dengan *rotary evaporator*.

3.4.4 Uji Aktivitas Antibakteri

3.4.4.1 Sterilisasi alat

Sterilisasi dilakukan pada alat-alat yang akan digunakan untuk membuat media dan uji aktivitas antibakteri. Sterilisasi alat dan bahan dengan cara membungkus alat-alat dengan aluminium foil atau kertas dan dimasukkan ke dalam plastik. Alat-alat yang telah dibungkus dimasukkan ke dalam autoklaf. Autoklaf dinyalakan hingga mencapai suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.

3.4.4.2 Pembuatan media pertumbuhan bakteri

1. Media Salmonella Sigella Agar

Media Salmonella Sigella Agar merupakan media selektif untuk pertumbuhan *Salmonella* sp. Pembuatan media Salmonella Sigella Agar dilakukan dengan cara melarutkan 30 gr medium ke dalam 500 ml akuades. Larutan diaduk hingga homogen lalu dipanaskan sampai mendidih agar tercampur dengan sempurna selama 1 menit. Medium dimasukkan ke dalam tabung atau botol untuk disterilisasi di dalam autoklaf selama 15 menit, pada suhu 121°C tekanan 1 atm. Medium ditunggu hingga agak dingin sekitar suhu 45°C kemudian dituang ke cawan petri atau tabung reaksi (Safitri dan Sinta, 2010).

2. Media Mueller Hinton Agar

Pembuatan media Mueller Hinton agar dilakukan dengan cara melarutkan 37 gr medium ke dalam 1 L akuades. Medium dipanaskan sampai mendidih agar tercampur dengan sempurna selama 1 menit. Medium dimasukkan ke dalam tabung atau botol untuk disterilisasi di dalam autoklaf selama 15 menit, pada suhu 121°C tekanan 1 atm. Medium ditunggu hingga agak dingin sekitar suhu $40-45^{\circ}\text{C}$ kemudian dituang ke cawan petri atau tabung reaksi (Safitri dan Sinta, 2010).

3. Media Nutrient Broth

Pembuatan media Mueller Hinton agar dilakukan dengan cara melarutkan 1,3 gr medium ke dalam 100 ml akuades. Medium dipanaskan sampai mendidih agar tercampur dengan sempurna selama 1 menit. Medium dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 10 ml lalu ditutup dengan kapas dan plastik wrap. Disterilisasi di dalam autoklaf selama 15 menit, pada suhu 121°C tekanan 1 atm.

3.4.4.3 Peremajaan Bakteri

Peremajaan bakteri ini dilakukan untuk memperbanyak bakteri dengan cara, diambil biakan murni *S. typhi* sebanyak 1 ose ditumbuhkan pada media Salmonella-Sigella kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰ C dalam inkubator. Diamati koloni *S. typhi* yang terbentuk pada media Salmonella-Sigella.

3.4.4.4 Pewarnaan Bakteri

Diambil 1 ose isolat bakteri *S. typhi* dan digoreskan pada permukaan gelas objek steril. Kemudian difikisasi dengan cara memanaskan bagian belakang gelas objek menggunakan api spiritus. Ditetaskan larutan kertas violet sebanyak 1 tetes ke permukaan preparat yang terdapat bakteri dan didiamkan selama 1 menit. Setelah 1 menit, preparat dibilas dan air sampai zat warna luntur. Preparat dikeringkan dengan api bunsen. Setelah kering, larutan iod sebanyak 1 tetes ditambahkan ke permukaan preparat dan didiamkan selama 1 menit. Setelah 1 menit, preparat dibilas dengan air. Preparat dibilas dengan alkohol 96% sampai semua zat warna luntur kemudian dicuci dengan air. Preparat dikeringkan di atas api spiritus. Setelah kering, safranin sebanyak 1 tetes ditambahkan ke permukaan preparat dan didiamkan selama 45 detik. Preparat dicuci dengan air dan dikeringkan. Preparat diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x (Pratita dan Putro, 2012).

3.4.4.5 Pembuatan Inokulum Bakteri

Pembuatan inokulum dilakukan dengan mengambil 1 ose koloni bakteri dari media Salmonella-Sigella kemudian ditumbuhkan pada media cair NB selama 24 jam pada suhu 37⁰ C. Biakan bakteri dihomogenkan menggunakan vortex. Diambil 1 ml dan diencerkan dengan NaCL 0,9% steril sebanyak 0,9 ml. Kekeruhan suspensi disamakan dengan kekeruhan Mc.Farland (10⁷-10⁸ CFU/ml).

3.4.4.6 Uji Pendahuluan

Uji pendahuluan dilakukan untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol daun pepaya gunung pada konsentrasi 100%. Metode yang digunakan adalah *agar well method*. Suspensi bakteri yang telah dibuat, diambil sebanyak 200 µL dan dimasukkan ke dalam cawan petri. Kemudian ditambahkan media MHA sebanyak 15 ml dan diratakan dengan cara diputar. Setelah media memadat, selanjutnya dibuat sumuran dengan diameter 6 mm. Sumuran diisi ekstrak sebanyak 40 µL dengan konsentrasi 100%. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam dan diamati diameter daerah hambat yang terbentuk.

3.4.4.7 Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan menggunakan fraksi etil asetat ekstrak etanol daun pepaya gunung (*C. pubescens*) dengan metode yang sama seperti pada uji pendahuluan. Konsentrasi fraksi yang digunakan pada uji aktivitas antibakteri ini adalah 10%, 25%, 50%, 75%, dan 100% dengan empat kali ulangan (Anggrahini dkk, 2012). Kontrol positif yang digunakan adalah antibiotik

ciprofloxacin 10 mg/ml sedangkan kontrol negatifnya adalah pelarut ekstrak (DMSO). Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator. Daerah bening disekitar sumuran yang berisi larutan uji diukur diameternya menggunakan jangka sorong. Diameter tersebut mengindikasikan bahwa ekstrak daun pepaya gunung (*C. pubescens*) memiliki daya hambat terhadap bakteri yang diuji (Novalina dkk, 2012).

3.5 Analisis data

Analisis hasil docking dilakukan dengan melihat nilai energi ikatan (*binding affinity*) dan interaksi daerah ikatan (*binding site*) antara senyawa carpaine, chlorogenic acid, kaempferol, myricetin, caffeic acid, dan ferulic acid terhadap DNA gyrase. Nilai energi ikatan (*binding affinity*) dan interaksi daerah ikatan (*binding site*) dibandingkan dengan hasil docking antibiotik pembanding (ciprofloxacin). Nilai energi ikatan (*binding affinity*) yang paling rendah merupakan nilai terbaik dan menunjukkan interaksi yang paling stabil.

Data hasil uji aktivitas antibakteri *in vitro* berupa diameter zona hambat diuji distribusi normalnya dengan *Kolmogrov Smirnov* dan dilanjutkan dengan uji homogenitas. Jika data terdistribusi normal dan homogen maka dianalisis dengan *one way ANOVA* untuk mengetahui pengaruh variasi konsentrasi fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun pepaya gunung (*C. pubescens*) terhadap bakteri *S. typhi*. Apabila ada pengaruh maka dilanjutkan dengan uji *Duncan* untuk mengetahui signifikansi antar perlakuan.

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pembuatan Ekstrak Daun Pepaya Gunung (*C. pubescens* Lenne & K. Koch)

Pepaya gunung (*C. pubescens*) merupakan tanaman asli Amerika yang tumbuh subur di Indonesia, diantaranya di dataran tinggi Dieng (Laily, 2012), Bromo, dan Cangar Jawa Timur (Minarno, 2015). Pepaya gunung (*C. pubescens*) memiliki kemiripan yang tinggi secara morfologi dengan *C. papaya*. Papaya gunung (*C. pubescens*) telah dilaporkan memiliki potensi sebagai antioksidan dan juga antibakteri (Indranila dan Ulfa, 2015). Allah SWT berfirman dalam surat Al-an'am (06): 99.

وَهُوَ الَّذِي أَنْزَلَ مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَخْرَجْنَا بِهِ نَبَاتَ كُلِّ شَيْءٍ فَأَخْرَجْنَا مِنْهُ خَضِرًا نُخْرُجُ مِنْهُ حَبًّا مُتَرَاكِبًا وَمِنَ النَّخْلِ مِنَ طَلْعِهَا قِنْوَانٌ دَانِيَةٌ وَجَنَّاتٍ مِّنْ أَعْنَابٍ وَالزَّيْتُونَ وَالرُّمَّانَ مُشْتَبِهًا وَغَيْرَ مُتَشَبِهٍ ۚ انْظُرُوا إِلَى ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَيَنْعِهِ ۚ إِنَّ فِي ذَٰلِكُمْ لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ يُؤْمِنُونَ ﴿٩٩﴾

Artinya: “dan Dialah yang menurunkan air hujan dari langit, lalu Kami tumbuhkan dengan air itu segala macam tumbuh-tumbuhan Maka Kami keluarkan dari tumbuh-tumbuhan itu tanaman yang menghijau. Kami keluarkan dari tanaman yang menghijau itu butir yang banyak; dan dari mayang korma mengurai tangkai-tangkai yang menjulai, dan kebun-kebun anggur, dan (kami keluarkan pula) zaitun dan delima yang serupa dan yang tidak serupa. Perhatikanlah buahnya di waktu pohonnya berbuah dan (perhatikan pulalah) kematangannya. Sesungguhnya pada yang demikian itu ada tanda-tanda (kekuasaan Allah) bagi orang-orang yang beriman” (Q.S Al-an'am (06): 99).

Lafadz وَجَعَلْنَا مِنَ الْمَاءِ نَبَاتَ كُلِّ شَيْءٍ memiliki makna yang serupa dengan كَلَّ شَيْءٍ حَيٍّ (Al-Anbiya': 30). Allah SWT menjelaskan bahwa air merupakan sebab bagi tumbuhnya segala macam tumbuhan yang beraneka ragam, bentuk, jenis, dan rasa supaya manusia mengetahui betapa kuasanya Allah SWT (Katsir, 2001). Pada ayat tersebut para mufassir menjelaskan bahwa tumbuhan, tumbuh melalui beberapa fase hingga buah tersebut matang. Pada saat fase kematangan, buah ataupun bagian tanaman yang lain akan mengandung berbagai macam metabolit primer (karbohidrat, minyak, dan protein) dan sekunder (alkaloid, flavonoid, fenol, tanin, dan saponin) yang dibutuhkan oleh makhluk hidup. Semua itu terbentuk atas bantuan cahaya matahari yang masuk melalui klorofil (Shihab, 2002). Metabolit sekunder inilah yang dijadikan sebagai sumber obat alami oleh manusia.

Pepaya gunung (*C. pubescens*) memiliki kemiripan yang tinggi secara morfologi dengan *C. papaya*. Dalam ayat tersebut Allah SWT berfirman “اَنْظُرُوا إِلَى ثَمَرِهِ إِذَا أَثْمَرَ وَيَنْعِهِ”. Ayat tersebut tidak memerintahkan untuk memakan buahnya ketika sudah berbuah, namun memerintahkan untuk memperhatikan buahnya. Sayyid Quthb menafsirkan bahwa konteks pembicaraan dalam ayat ini adalah keindahan dan kenikmatan. Allah SWT telah menciptakan berbagai macam tumbuhan yang serupa tapi setelah dipelajari lebih dalam ternyata memiliki perbedaan yang signifikan salah satunya adalah pada buahnya. Sayyid Quthb menambahkan, dalam ayat ini manusia hendaklah *mentadabburi* tanda-tanda kekuasaan Allah SWT dan keagungan ciptaanya. Karena Allah SWT telah

menciptakan tumbuh-tumbuhan yang beraneka ragam dan memiliki berbagai manfaat untuk kehidupan manusia (Quthb, 2002).

Daun pepaya gunung (*C. pebescen*) yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari daerah penanjakan gunung Bromo yakni di desa Tosari Pasuruan pada ketinggian 1800 m dpl. Pelarut yang digunakan dalam pembuatan ekstrak adalah etanol 96% p.a. Menurut Mahatriny dkk (2014), penggunaan etanol sebagai pelarut dikarenakan etanol memiliki gugus OH yang mampu menarik senyawa-senyawa yang bersifat polar juga memiliki gugus CH yang mampu menarik senyawa-senyawa non polar. Sehingga etanol merupakan pelarut yang tepat untuk mengestraksi semua jenis senyawa yang terkandung dalam bahan alam. Selain itu etanol lebih aman daripada pelarut metanol (Mahatriny dkk, 2014).

Pembuatan ekstrak dilakukan dengan menggunakan metode maserasi. Proses maserasi dilakukan dengan merendam simplisia akan menyebabkan pecahnya dinding dan membran sel akibat perbedaan konsentrasi sehingga menyebabkan metabolit sekunder akan tertarik oleh pelarut (Tanaya dkk, 2015). Simplisia yang digunakan memiliki ukuran 90 mesh sehingga tidak terlalu kasar ataupun terlalu halus. Serbuk yang terlalu kasar memiliki luas area yang lebih sempit, sehingga kontak antara simplisia dan pelarut juga kecil dan akan menghambat proses penarikan senyawa (Christalina dkk, 2013). Sedangkan apabila serbuk simplisia terlalu halus akan memberikan kesulitan pada proses penyarian, karena butir-butir halus partikel akan membentuk suspensi yang sulit dipisahkan dengan hasil penyarian. Selain itu, menurut Triwari dkk (2011)

penghancuran simplia yang terlalu halus dapat menyebabkan banyaknya penguapan minyak volatil.

Proses maserasi dilakukan dengan merendam simplisia 100 gr menggunakan etanol p.a 96% 1000 ml selama 3x24 jam. Pada proses ini dilakukan pengadukan yang bertujuan untuk mempercepat kontak antara pelarut dan simplia. Proses remaserasi dilakukan tiga kali agar senyawa yang terkandung dalam simplisia dapat terekstraksi secara maksimal. Dari ekstrak proses maserasi ini didapatkan ekstrak etanol sebesar 6 gr sehingga rendemen ekstrak yang didapatkan adalah 6%. Kelebihan ekstraksi maserasi adalah penggunaan metode dan alat-alat yang sederhana, juga tidak menggunakan panas sehingga menghindari rusaknya senyawa akibat pemanasan (Purwanto, 2015). Namun proses ekstraksi dengan maserasi membutuhkan waktu yang lama.

Proses fraksinasi dilakukan dengan menggunakan pelarut etil asetat p.a. Metode yang digunakan adalah ekstraksi cair-cair. Fraksinasi ini bertujuan untuk memisahkan senyawa-senyawa berdasarkan sifat kepolarannya (Tanaya dkk, 2015). Proses fraksinasi dilakukan dengan melarutkan 5 gr ekstrak kasar etanol dengan etanol 40% sebanyak 50 ml. Selanjutnya ditambahkan etil asetat 50 ml, sehingga perbandingan pelarut 1:1. Larutan dikocok dan didiamkan hingga terbentuk dua lapisan. Lapisan atas merupakan pelarut organik yakni etil asetat sedangkan lapisan bawah merupakan pelarut air. Senyawa-senyawa yang bersifat semi polar akan berada pada lapisan atas sedangkan lapisan bawah terdapat senyawa yang bersifat polar. Hasil fraksinasi ini didapatkan ekstrak sebesar 3,45 gr sehingga rendemennya adalah 69%.

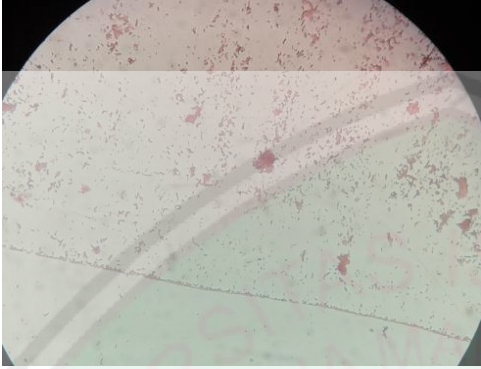
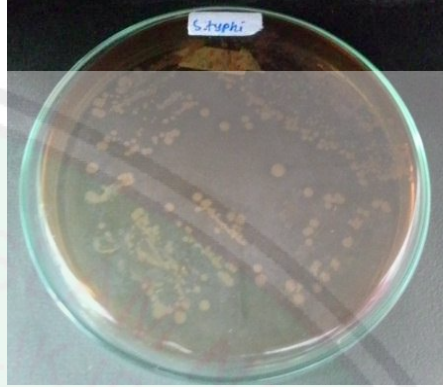
Etil asetat merupakan pelarut yang bersifat semipolar, sehingga diharapkan senyawa yang terekstrak adalah senyawa-senyawa dengan tingkat kepolaran antara polar dan non polar (Putri dkk, 2013). Selain itu etil asetat memiliki tingkat toksisitas yang rendah, tidak higroskopis, dan mudah diuapkan (Wardhani dan Sulistyani, 2012). Diantara senyawa-senyawa yang dapat terekstraksi dengan menggunakan pelarut etil asetat adalah flavonoid, tanin (Tanaya dkk, 2013), dan alkaloid (Purba, 2001). Berdasarkan hasil penelitian Novalina dkk (2013) senyawa yang terkandung dalam fraksi etil asetat daun pepaya gunung (*C. pubescens*) adalah alkaloid, flavonoid, tanin, dan fenol.

4.2 Konfirmasi Bakteri *S. typhi*

Konfirmasi bakteri dilakukan dengan menggunakan metode pengecatan gram. Konfirmasi ini bertujuan untuk menggolongkan bakteri *S. typhi* berdasarkan susunan dinding selnya. Berdasarkan hasil pengamatan dengan menggunakan mikroskop perbesaran 400x, isolat *S. typhi* memiliki warna merah dengan bentuk basil. Hal ini menunjukkan bahwa *S. typhi* merupakan kelompok bakteri gram negatif. Bakteri gram negatif merupakan bakteri yang dinding selnya tersusun atas lipid yang tinggi (11-22%), peptidoglikan ada di dalam lapisan lipid, jumlah peptidoglikan sedikit hanya sekitar 10% berat kering sel, dan juga tidak ada asam teikoat. Selama proses pewarnaan, perlakuan dengan alkohol menyebabkan lipid terekstraksi sehingga kompleks ungu kristal yodium dalam sel keluar. Keluarnya kompleks ungu kristal yodium menyebabkan sel tidak berwarna,

sehingga dengan pemberian warna safranin menyebabkan sel berwarna merah (Pelczar dan Chan, 2010).

Proses konfirmasi selanjutnya dengan menggunakan media spesifik untuk *S. typhi* yakni Salmonella-Shigella agar (SSA). Isolat murni *S. typhi* yang didapatkan dari laboratorium Mikrobiologi Kedokteran Universitas Brawijawa dikultur pada media SSA dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰ C. Berdasarkan hasil pengamatan, bakteri memiliki koloni bulat-bulat kecil hingga besar, warna bening keputihan, dan permukaan halus. Menurut Amarantini dkk (2009), koloni Salmonella tidak menghasilkan enzim β -galactosidase sehingga tidak memiliki warna dan transparan. Media SSA mengandung brilliant green, ox bile, dan thiosulfat dan sitrat dalam konsentrasi yang tinggi sehingga mampu menghambat flora mikrobial. Sebagian Salmonella mampu menghasilkan H₂S sehingga akan terlihat titik hitam di tengah koloni. Sedangkan *S. typhi* termasuk bakteri yang lemah dalam menghasilkan H₂S sehingga koloni typical Salmonella juga akan terlihat jernih dalam media SSA. Hasil identifikasi bakteri *S. typhi* dapat dilihat pada gambar 4.1

Pewarnaan gram	Koloni <i>S. typhi</i> pada media SSA
	

Gambar 4.1 Hasil konfirmasi bakteri *S. typhi*

Allah SWT telah menjelaskan dalam Al-Quran tentang sesuatu yang kecil atau mikro dalam surat Yunus (10): 61.

وَمَا تَكُونُ فِي شَأْنٍ وَمَا تَتْلُوا مِنْهُ مِنْ قُرْآنٍ وَلَا تَعْمَلُونَ مِنْ عَمَلٍ إِلَّا كُنَّا عَلَيْكُمْ شُهُودًا إِذْ تُفِيضُونَ فِيهِ ۚ وَمَا يَعْزُبُ عَنْ رَبِّكَ مِنْ مِثْقَالِ ذَرَّةٍ فِي الْأَرْضِ وَلَا فِي السَّمَاءِ وَلَا أَصْغَرَ مِنْ ذَلِكَ وَلَا أَكْبَرَ إِلَّا فِي كِتَابٍ مُبِينٍ ﴿٦١﴾

Artinya: “kamu tidak berada dalam suatu Keadaan dan tidak membaca suatu ayat dari Al-Quran dan kamu tidak mengerjakan suatu pekerjaan, melainkan Kami menjadi saksi atasmu di waktu kamu melakukannya, tidak luput dari pengetahuan Tuhanmu biarpun sebesar zarrah (atom) di bumi ataupun di langit, tidak ada yang lebih kecil dan tidak (pula) yang lebih besar dari itu, melainkan (semua tercatat) dalam kitab yang nyata (Lauh Mahfuzh)”. (Q.S Yunus (10): 61).

Zarrah dalam ayat tersebut merupakan benda kecil yang tidak dapat dibagi lagi. Prof. Hamka menyatakan ayat ini dapat ditafsiri secara jelas dan dapat diterima akal manusia setelah Pasteur dan ilmuan-ilmuan lain memperjelas adanya bakteri (mikroorganisme) pada abad 19 M (Subandi, 2010). Bakteri

ataupun mikroorganisme lainnya meskipun berukuran sangat kecil dan tidak dapat dilihat dengan mata secara langsung, termasuk makhluk Allah SWT dan tidak luput dari perhatian Allah SWT. Bakteri dan mikroorganisme lainnya akan terasa pengaruhnya ketika berinteraksi dengan manusia, baik pengaruh negatif maupun pengaruh positif. Oleh karena itu, mikroorganisme diantaranya bakteri seyogyanya dipelajari oleh muslim sebagai seorang ulul albab.

4.3 Uji Aktivitas Antibakteri secara *In Silico* dan *In vitro*

Pada penelitian ini metode *in silico* yang digunakan adalah penambatan molekul (*molecular docking*). *Molecular docking* adalah suatu metode komputasi yang digunakan untuk memprediksi energi ikatan terbaik antara ligan yang berikatan pada protein target serta memprediksi kemungkinan jalur biokimia yang terjadi di dalam sel (Yang dkk, 2013). *Molekular dokcing* ini penting dalam proses desain obat, karena dapat menggambarkan peristiwa interaksi antara ligan dengan protein yang menjadi targetnya pada proses *in vitro* maupun *in vivo* (Putra, 2014).

Pada penelitian ini senyawa-senyawa yang terdapat pada daun pepaya gunung (*C. pubescens*) digunakan sebagai ligan. Diantara senyawa-senyawa yang digunakan adalah carpaine dari jenis alkaloid (Khotimah, 2016), chlorogenic acid, ferulic acid, dan caffeic acid dari jenis komponen fenol (Senthivel dkk, 2013), kaempferol dan myricetin dari jenis flavonoids (Yogiraj dkk, 2014). Digunakan protein target/ reseptor pada bakteri *S. typhi* yaitu DNA gyrase subunit B (Fabrega dkk, 2009). Program yang digunakan untuk proses docking adalah autodock vina

dalam software PyRx. Sajin dkk (2015) menyatakan autodock merupakan software yang efektif, cepat dan akurat dalam memprediksi ikatan konformasi dan energi ikatan dari ligan dengan molekul target.

Sebelum dilakukan penambatan molekul (*molecular docking*), senyawa-senyawa yang digunakan sebagai ligan dianalisis molekulnya melalui <http://www.scfbio-iitd.res.in/software/drugdesign/lipinski.jsp> untuk mengetahui *Rule of Five* dari senyawa-senyawa tersebut. *Rule of Five* (Ro5) digunakan sebagai penyaring terhadap senyawa-senyawa yang memiliki permeabilitas yang baik, dapat masuk ke dalam sel, dan dapat diserap oleh tubuh. Parameter dalam Ro5 adalah donor ikatan hidrogen ≤ 5 , penerima ikatan hidrogen ≤ 5 , berat molekul ≤ 500 Da, dan *lipophilicity* (logaritma dari n-octanol/ koefisiensi partisi air) yakni 5 ($clogP \leq 5$) (Lipinski, 2004). Jadhav dkk (2015) menyatakan jika dua komponen atau lebih tidak memenuhi parameter yang telah ditetapkan, maka senyawa tersebut mungkin tidak aktif secara oral. Hasil *Role of Five* (Ro5) senyawa-senyawa ligan disajikan pada tabel 4.1 sebagai berikut:

Tabel 4.1 Hasil *Role of Five* (Ro5) senyawa-senyawa ligan

No	Ligan	Berat molekul	H-donor	H-akseptor	LogP
1	Carpaine	480,000000	4	4	3,513599
2	Caffeic acid	179,000000	2	4	-0,139100
3	Ferulic acid	193,000000	1	4	0,163900
4	Kaemferol	480,000000	4	4	3,513599
5	Myricetin	318,000000	6	8	1,716501
6	Chlorogenic acid	353,000000	5	9	-1,980601
7	Ciprofloxacin	331,000000	2	5	-0,992000

Keterangan: Berat molekul ≤ 500 Da, H-donor ≤ 5 , H-akseptor ≤ 10 , clogP ≤ 5 (Lipinski, 2004)

Dalam proses pencarian obat baru, Ro5 diperlukan untuk mengetahui farmakokinetik dari senyawa yang akan digunakan. Farmakokinetik meliputi kemampuan absorpsi, distribusi, metabolise, dan ekskresi (ADME). Jika suatu senyawa tidak bisa mencapai targetnya, maka interaksi dengan reseptor juga tidak akan terjadi (Fikry, 2014). Hasil dari Ro5 menunjukkan bahwa senyawa-senyawa yang digunakan sebagai ligan memiliki potensi bioavailabilitas (kemampuan suatu obat dapat diserap dan beredar dalam tubuh) yang tinggi bagi tubuh karena memenuhi semua parameter dari Ro5. Sehingga senyawa-senyawa yang dijadikan sebagai ligan dapat berinteraksi dengan DNA gyrase yang berada di dalam sel dan bekerja seperti halnya antibiotik pembeding yakni ciprofloxacin.

Berdasarkan hasil penambatan molekul, didapatkan nilai energi ikatan (*binding affinity*) antara senyawa pada daun pepaya gunung dengan DNA gyrase.

Dari masing-masing senyawa didapatkan 9 model interaksi ligan-molekul yang diperingkatkan berdasarkan nilai *binding affinity* (Lampiran 8). Dari 9 model tersebut dipilih nilai terendah yang merupakan nilai energi ikatan terbaik (Tabel 4.2). Hasil penambatan menunjukkan, kaemferol dan myricetin memiliki energi ikatan terbaik yaitu -15,4 kkal/mol. Nilai ini lebih rendah daripada ciprofloxacin yaitu -14,1 kkal/mol. Chlorogenic acid juga memiliki nilai energi ikatan lebih rendah dari ciprofloxacin yakni -14,6 kkal/mol. Sedangkan senyawa carpaine, caffeic acid, dan ferulic acid memiliki nilai energi ikatan diatas kontrol. Arwansyah dkk (2014) menyatakan, semakin rendah nilai energi ikatan, maka interaksi antara ligan dan reseptor semakin stabil dan memiliki kecocokan untuk berinteraksi. Sehingga senyawa pada daun pepaya gunung memiliki potensi yang baik untuk berinteraksi dengan DNA gyrase sub unit B *S. typhi*.

Interaksi antara senyawa-senyawa pada daun pepaya gunung dengan DNA gyrase divisualisasikan menggunakan software Discovery studio 2016 untuk melihat daerah ikatan (*binding site*) dari reseptor-ligan. *Binding site* protein merupakan area dari pengikatan protein terhadap ligan yang akan mempengaruhi konformasi maupun fungsi dari protein. Area *binding site* melibatkan asam amino yang berperan penting pada pengikatan dengan ligan. Interaksi antara ligan dan reseptor akan membentuk ikatan hidrogen dan ikatan hidrofobik (Arwansyah dkk, 2014). Ikatan hidrogen merupakan interaksi yang melibatkan atom hidrogen yang terikat secara kovalen dengan atom elektronegatif seperti oksigen (O), nitrogen (N), dan flour (F). Sedangkan ikatan hidrofobik adalah interaksi yang bersifat menghindari lingkungan cair dan cenderung berkelompok disebelah dalam

globular protein (Lins dan Brasseur, 1995). Analisis hasil docking senyawa-senyawa pada daun pepaya gunung (*C. pubescens*) terhadap DNA gyrase disajikan pada tabel 4.2.

Tabel 4.2 Analisis hasil docking senyawa-senyawa pada daun pepaya gunung (*C. pubescens*) terhadap DNA gyrase

No	Senyawa	Ikatan Hidrogen	Ikatan Hidrofobik	Binding afiniti (kcal/mol)
1	Ligan reference	Asp A:73, Gly A:77, Glu A:50	Ile A:78, Val A:43, Val A:167, Val A:43, Thr A:165, Pro A:79, Arg A:76	-14
2	Ciprofloxacin (kontrol positif)	Thr A:165, Asp A:73, Glu A:50, Ala A:47, Asn A:46	Ile A:94, Ile A:78, Pro A:79	-14,1
3	Myricetin	Asp A:73, Gly A:77	Ile A:78, Val A:167, Ala A:47, Glu A:50	-15,4
4	Kaemferol	Asp A: 73	Ile A:94, Ile A:78, Asn A:46, Val A:167, Val A:120	-15,4
5	Chlorogenic acid	Asp A:73, Asn A:46	Ile A:78	-14,6
6	Carpaine	-	Ile A:78, Ile A:94	-12,9
7	Caffeic acid	Thr A:165, Glu A:50	Ile A:78, Asn A:46, Ala A:47, Val A:120	-12,5
8	Ferulic acid	Glu A:50, Asp A:73, Thr A:165, Val A:71	Val A:120, Ile A:78, Asn A:46	-12,3

Keterangan: warna merah: memiliki ikatan hidrogen yang sama dengan kontrol;
warna biru: memiliki ikatan hidrofobik yang sama dengan kontrol

Berdasarkan hasil visualisasi *binding site*, terdapat beberapa kesamaan ikatan asam amino antara senyawa-senyawa pada daun pepaya gunung (*C. pubescens*) dengan antibiotik ciprofloxacin (Tabel 4.2). Ciprofloxacin adalah obat antibiotik yang secara komersil digunakan untuk pengobatan bakteri gram negatif (Zahid dan Isnindar, 2012). Ciprofloxacin bekerja dengan cara menghambat DNA gyrase. Sehingga diasumsikan senyawa-senyawa pada daun pepaya gunung (*C. pubescens*) yang memiliki interaksi dengan asam amino yang sama pada ciprofloxacin, juga memiliki potensi sebagai zat antibakteri. Mekanisme senyawa pada daun pepaya gunung (*C. pubescens*) sebagai antibakteri juga sama dengan ciprofloxacin dalam menghambat DNA gyrase. Hasil visualisasi interaksi ligan dan protein dapat dilihat pada Lampiran 9.

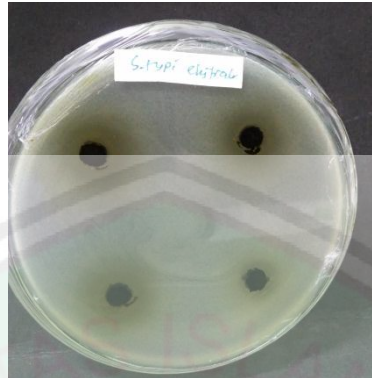
Mekanisme ciprofloxacin sebagai antibakteri adalah dengan menghambat kerja DNA gyrase. DNA gyrase merupakan target antibakteri yang baik untuk antibiotik golongan fluroquinolon (ciprofloxacin) karena enzim ini hanya ada pada sel prokariotik dan penting bagi pertumbuhan bakteri (Fabrega dkk, 2009). DNA gyrase berperan dalam mengatur topologi DNA di dalam sel. Enzim ini membutuhkan energi dari hidrolisis ATP untuk mengkatalis negatif supercoiling. Hidrolisis ATP merupakan tugas dari DNA gyrase subunit B (Mohammed dkk, 2013). Sehingga apabila DNA gyrase terikat oleh antibiotik maka sintesis DNA akan terganggu dan akhirnya menyebabkan kematian sel.

Berdasarkan hasil analisis menggunakan *molecular docking*, diketahui bahwa senyawa pada daun pepaya gunung (*C. pubescens*) memiliki potensi yang baik untuk berinteraksi dengan DNA gyrase subunit B daripada ciprofloxacin.

Selain itu dapat diprediksi bahwa mekanisme yang terjadi antara senyawa pada daun pepaya gunung (*C. pubescens*) dengan DNA gyrase subunit B sama dengan ciprofloxacin. Sehingga hasil uji *in silico* ini dapat dijadikan sebagai dasar molekuler bahwa senyawa-senyawa pada daun pepaya gunung (*C. pubescens*) memiliki aktivitas sebagai senyawa antibakteri.

Potensi daun pepaya gunung (*C. pubescens*) sebagai antibakteri selanjutnya dikonfirmasi dengan uji *in vitro* untuk mengetahui pengaruh daun pepaya gunung (*C. pubescens*) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. typhi*. Pada uji pendahuluan menggunakan ekstrak etanol daun pepaya gunung dengan konsentrasi 100%, didapatkan rata-rata diameter daerah hambat sebesar 6 mm dengan kategori sedang (Davis dan Stout, 1971). Sehingga pada penelitian ini dilakukan fraksinasi untuk mendapatkan senyawa yang lebih murni dan dapat menghasilkan daerah hambat yang lebih besar.

Nirosha dan Mangalanayaki (2013) menyatakan, kelarutan senyawa aktif dalam pelarut dapat mempengaruhi aktivitas antibakteri suatu bahan alam. Berdasarkan penelitian Indranila dan Ulfa (2015), ekstrak etanol daun pepaya gunung (*C. pubescens*) memiliki kandungan alkaloid, fenol, dan flavonoid. Senyawa-senyawa tersebut memiliki potensi sebagai antibakteri baik pada bakteri gram negatif maupun gram positif. Diameter daerah hambat yang dihasilkan oleh ekstrak kasar daun pepaya gunung (*C. pubescens*) pengamatan 1x24 jam dapat dilihat pada gambar 4.2



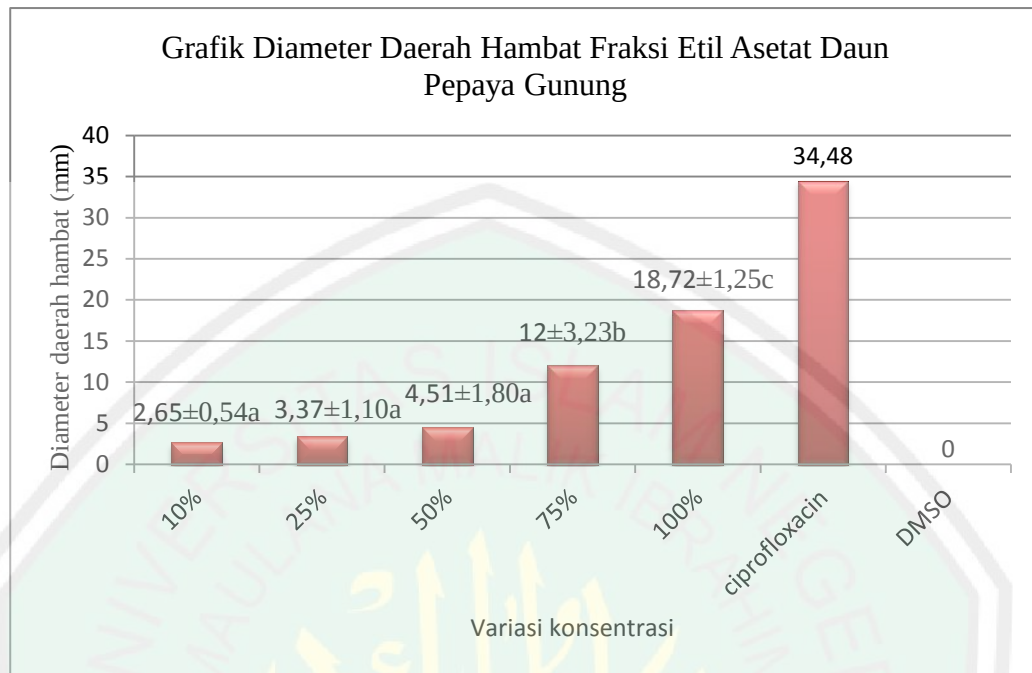
Gambar 4.2 Diameter daerah hambat ekstrak etanol daun pepaya gunung (*C. pubescens*) konsentrasi 100% terhadap bakteri *S. typhi*

Uji aktivitas antibakteri dilakukan untuk mengetahui pengaruh fraksi etil asetat daun pepaya gunung (*C. pubescens*) terhadap pertumbuhan bakteri *S. typhi*. Metode yang digunakan adalah sumur agar. Berdasarkan penelitian Anggrahini dkk (2012), aktivitas antibakteri ekstrak daun pepaya terhadap *E. coli* dan *S. typhi* lebih efektif menggunakan metode sumur agar daripada menggunakan kertas diks. Kelebihan dari metode ini adalah volume ekstrak yang dimasukkan dapat terukur dan ekstrak akan berdifusi langsung ke dalam agar. Pelarut yang digunakan untuk mengencerkan ekstrak adalah pelarut ekstrak DMSO dan konsentrasi bakteri yang digunakan adalah sesuai kekeruhan Mcfarland (1×10^6) (Novalina dkk, 2013).

Data berupa diameter daerah hambat dianalisis menggunakan SPSS. Data yang didapatkan diuji homogenitasnya dan didapatkan nilai $0,074 > (P) 0,05$ (Lampiran 6). Kemudian analisis normalitas data menggunakan *Kolmogorov-smirnov test* didapatkan nilai 0,246 yang berarti data berdistribusi normal (Lampiran 6). Selanjutnya data dianalisis menggunakan *one way ANOVA* didapatkan nilai signifikansi $0,00 < (P) 0,05$ (Lampiran 6). Hasil ini menunjukkan

ada pengaruh pemberian fraksi etil asetat daun pepaya gunung (*C. pubescens*) terhadap pertumbuhan bakteri *S. typhi*. Karena ada pengaruh maka uji dilanjutkan dengan uji Duncan untuk mengetahui perbedaan nyata antar lima perlakuan.

Berdasarkan hasil uji Duncan (Lampiran 6), terdapat perbedaan yang nyata antara lima perlakuan yang digunakan. Perlakuan 10%, 25%, dan 50% ditunjukkan dengan notasi a yang berarti perlakuan 10% , 25%, dan 50% tidak berbeda nyata. Selanjutnya perlakuan 75% ditunjukkan dengan notasi b yang berarti perlakuan 75% berbeda nyata dengan perlakuan 10%, 25%, dan 50%. Sedangkan konsentrasi 100% ditunjukkan dengan notasi c yang berarti konsentrasi 100% berbeda nyata dengan konsentrasi 10%, 25%, 50% karena ditunjukkan dengan notasi a dan konsentrasi 75% yang ditunjukkan dengan notasi b. Dengan demikian konsentrasi terbaik fraksi etil asetat daun pepaya gunung (*C. pubescens*) adalah pada konsentrasi 100%. Diameter daerah hambat yang terbentuk disajikan pada gambar 4.3 sebagai berikut:



Keterangan: lemah (>5 mm), sedang (6-10 mm), kuat (11-20 mm), dan sangat kuat (<21 mm) (Davis dan Stout, 1971)

Gambar 4.3 Grafik diameter daerah hambatan fraksi etil asetat daun pepaya gunung (*C. pubescens*) terhadap pertumbuhan *S. typhi*

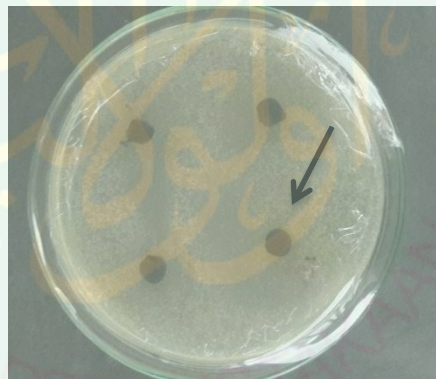
Berdasarkan pengamatan, terbukti bahwa fraksi etil asetat daun pepaya gunung memiliki potensi dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. typhi* dengan menghasilkan daerah hambatan pada konsentrasi 10%, 25%, 50%, 75%, dan 100%. Berdasarkan tabel 4.2 konsentrasi terbaik adalah 100% dengan daerah hambatan terbesar yaitu 18,72 mm yang termasuk kategori kuat (Davis dan Stout, 1971). Pelczar dan Chan (2010) menyatakan, bahwa semakin besar konsentrasi suatu bahan antibakteri maka aktivitas antibakterinya semakin kuat pula. Berdasarkan hal tersebut, dapat dikatakan bahwa diameter zona hambatan dan konsentrasi ekstrak berbanding lurus. Namun nilai tersebut masih rendah jika dibandingkan dengan kontrol positif ciprofloxacin yaitu 34,48 mm, karena memang obat ini merupakan

obat sintetis yang secara luas digunakan sebagai pengobatan infeksi baik gram negatif maupun gram positif (Fauziah dkk, 2005).

Anggrahini dkk (2012) juga melakukan pengujian antibakteri terhadap *S. typhi* menggunakan ekstrak daun pepaya, hasil pengujian menunjukkan pada konsentrasi 100% didapatkan diameter daerah hambat 15 mm. Pada penelitian Doughari dan Okafor (2008), menunjukkan daerah hambat fraksi etil asetat daun *Senna siamea* 20 mg/ml terhadap *S. typhi* sebesar 15 mm yang masih lebih rendah daripada kontrol positif ciprofloxacin yaitu 26 mm. Sedangkan Nuria dkk (2009) melaporkan, bahwa daun jarak pagar tidak memiliki potensi antibakteri pada *S. typhi* dan *E. coli* (bakteri gram negatif). Hal ini dapat dikarenakan struktur sel bakteri gram negatif lebih kompleks jika dibandingkan dengan gram positif. Pada dinding sel bakteri *S. typhi* terdapat antigen O yang tersusun dari kompleks lipopolisakarida. Antigen ini berfungsi sebagai endotoksin, kekebalan spesifik, resisten terhadap pemanasan 100°C, alkohol dan asam (Darmawati, 2009). Sehingga pada penelitian ini, fraksi etil asetat daun pepaya gunung lebih berpotensi dalam menghambat pertumbuhan *S. typhi* daripada penelitian sebelumnya dengan bakteri yang sama.

Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Novalina dkk (2013), menunjukkan fraksi etil asetat dari ekstrak daun pepaya gunung (*C. pubescens*) pada konsentrasi 12,5% telah mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella flexneri* (gram negatif) dengan luas daerah hambat 22 mm, dan pada konsentrasi 50% menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* (gram positif) sebesar 21 mm yang termasuk kategori sangat kuat. Perbedaan nilai ini dapat

dikarenakan sampel yang digunakan diperoleh dari tempat yang berbeda sehingga dapat mempengaruhi kandungan senyawa yang terdapat dalam fraksi etil asetat daun pepaya gunung (*C. pubescens*). Menurut Laily (2012), faktor lingkungan seperti suhu, tipe tanah, kondisi tanah, dan ketinggian dapat mempengaruhi morfologi dan genetika tumbuhan. Kondisi lingkungan tumbuhan akan menentukan bagaimana tumbuhan tersebut melakukan aktivitas fisiologisnya, sehingga akan mempengaruhi kandungan metabolit sekunder. Diameter daerah hambat terbaik yang dihasilkan oleh fraksi etil asetat daun pepaya gunung (*C. pubescens*) pengamatan 1x24 jam dapat dilihat pada gambar 4.4



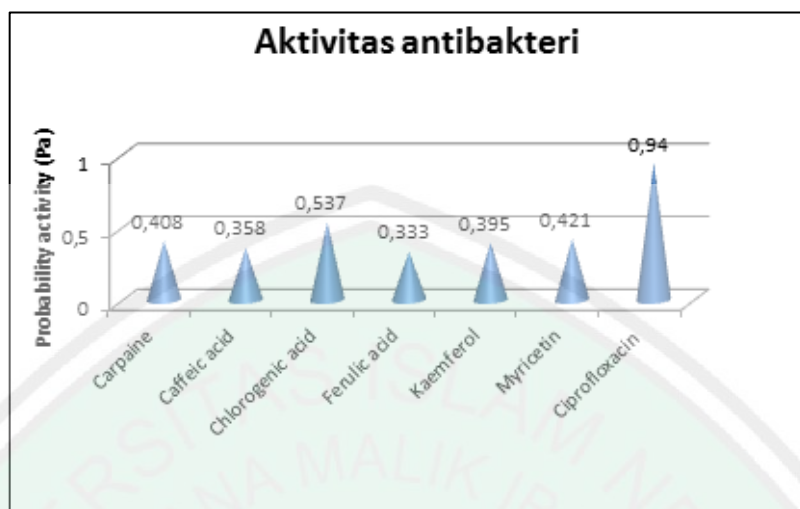
Keterangan (tanda panah): zona irradikal

Gambar 4.4 Diameter daerah hambat fraksi etil asetat daun pepaya gunung (*C. pubescens*) konsentrasi 100% terhadap bakteri *S. typhi*

Berdasarkan pengamatan pada daerah hambat yang terbentuk, terdapat zona irradikal pada daerah sekitar sumuran (ditunjuk panah). Zona irradikal merupakan daerah disekitar sumuran dimana pertumbuhan bakteri dihambat oleh zat antibakteri tetapi tidak dimatikan (Jewetz dkk, 1986). Pada daerah sekitar

sumuran terdapat pertumbuhan bakteri yang kurang subur dibandingkan dengan daerah yang tidak terpengaruh oleh zat antibakteri. Hal ini menunjukkan bahwa fraksi etil asetat dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. typhi* namun tidak mematikan bakteri secara 100%.

Hasil uji aktivitas antibakteri secara *in vitro* didukung dengan hasil analisis *antibacterial activity* menggunakan program PASS *prediction online*. Hasil analisis menunjukkan bahwa nilai Pa (*probable activity*) tertinggi adalah ciprofloxacin yaitu 0,940. Nilai Pa > 0,7 menunjukkan bahwa suatu senyawa memiliki aktivitas yang tinggi secara eksperimental dan secara *in silico*. Nilai Pa ini menunjukkan potensi suatu senyawa terhadap berbagai aktivitas biologis berdasarkan struktur hubungan aktivitas (*Structure Activity Relationship*) antara senyawa-senyawa alami dengan obat sintetik (Pramely, 2012). Sedangkan senyawa-senyawa pada daun pepaya gunung (*C. pubescens*) memiliki nilai Pa < 0,5, kecuali chlorogenic acid (0,537). Hal ini berarti secara analisis *in silico* senyawa-senyawa pada daun pepaya gunung memiliki potensi sebagai antibakteri namun secara ekperimental rendah. Hasil analisis aktivitas antibakteri senyawa pada daun pepaya gunung disajikan pada gambar 4.5 sebagai berikut:



Keterangan: $Pa > 0,7$ = Aktivitas biologi tinggi secara komputasi dan eksperimental;
 $0,5 < Pa < 0,7$ = Aktivitas biologi tinggi secara komputasi, redah secara eksperimental;
 $Pa < 0,5$ = Aktivitas biologis rendah (Pramely, 2012)

Gambar 4.5 Hasil analisis aktivitas antibakteri senyawa-senyawa pada daun pepaya gunung (*C. pubescens*)

Telah dilaporkan oleh Khotimah (2016), ekstrak daun pepaya gunung (*C. pubescens*) mengandung alkaloid, flavonoid, saponin, terpenoid, dan tanin. Novalina dkk (2013) juga menyebutkan fraksi etil asetat daun pepaya gunung (*C. pubescens*) mengandung flavonoid, alkaloid, tanin, dan fenol. Senyawa tersebut merupakan senyawa yang memiliki potensi sebagai antibakteri (Ainurrochmah dkk, 2013). Mekanisme alkaloid sebagai antibakteri dengan cara mengganggu komponen penyusun dinding sel bakteri yaitu peptidoglikan dan dapat menghambat kerja enzim topoisomerase (Taufiq dkk, 2015). Tanin dapat mengikat dinding sel bakteri, dan memiliki aktivitas protease. Saponin memiliki molekul yang dapat menarik lemak dan molekul yang dapat menarik air sehingga

dapat menurunkan tegangan permukaan sel bakteri (Christalina dkk, 2013). Flavonoid bekerja dengan cara mengganggu sintesis asam nukleat, mengganggu fungsi membran sitoplasma, dan metabolisme energi (Hendra dkk, 2011). Selain itu, flavonoid juga dikatakan berperan dalam menghambat kerja DNA gyrase pada bakteri. Cincin B pada flavonoid dapat membentuk ikatan hidrogen dengan asam-asam nukleat pada DNA gyrase sehingga dapat menghambat aksi sintesis DNA dan RNA (Chusnie, 2005).

Dengan demikian, daun pepaya gunung (*C. pubescens*) memiliki potensi sebagai antibakteri terhadap bakteri *S. typhi* baik secara *in silico* maupun secara *in vitro*. Hal ini dibuktikan dengan adanya daerah hambat yang terbentuk dari fraksi etil asetat daun pepaya gunung, nilai energi ikatan (*binding affinity*) senyawa pada daun pepaya gunung yang lebih baik daripada antibiotik ciprofloxacin, dan interaksi asam amino yang sama dengan ciprofloxacin. Sehingga dengan mengetahui potensi daun pepaya gunung (*C. pubescens*) sebagai antibakteri, maka secara tidak langsung juga akan meningkatkan konservasi dan nilai ekonomi dari tanaman ini.

Allah SWT dan Rasulullah SAW telah mengajarkan umat manusia untuk menggunakan bahan alam sebagai sumber nutrisi dan obat. Penggunaan obat sintetis dapat mengakibatkan efek negatif bagi tubuh. Misalnya penggunaan antibiotik kloramfenikol dalam waktu yang lama dan dosis yang cukup besar dapat menimbulkan kelainan pada pematangan sel darah merah, peningkatan kadar besi dalam serum dan anemia, dan menimbulkan *shock* sirkulasi yang parah (Cahyono, 2013). Selain itu penggunaan antibiotik yang berlebihan dapat

menyebabkan masalah resistensi bakteri (Ainurrochmah dkk, 2013). Rasulullah SAW bersabda.

عَنْ جَابِرِ رَضِيَ اللَّهُ عَنْهُ عَنْ رَسُولِ اللَّهِ صَلَّى اللَّهُ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ أَنَّهُ قَالَ لِكُلِّ دَاءٍ دَوَاءٌ فَإِذَا أُصِيبَ دَوَاءٌ دَاءٍ بَرَأَ بِإِذْنِ اللَّهِ عَزَّوَجَلَّ

Artinya: “Setiap penyakit ada obatnya, dan bila telah ditemukan dengan tepat obat suatu penyakit, niscaya akan sembuh dengan izin Allah Azza wa Jalla.” (HR. Muslim no. 1475)

Dengan demikian Allah SWT menciptakan segala jenis penyakit juga menciptakan obatnya kecuali kematian yang tidak ada obatnya. Apabila manusia diberikan obat yang sesuai dengan penyakitnya, maka dengan izin Allah SWT orang yang sakit tersebut akan sembuh. Sehingga sebagai manusia hendaklah selalu berusaha untuk mencari obat dari penyakit yang diderita, sabar dan tawakkal kepada Allah SWT. Sesungguhnya kesehatan adalah salah satu nikmat terbesar yang harus selalu disyukuri.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan sebagai berikut.

1. Senyawa aktif pada daun pepaya gunung (*C. pubescens*) memiliki potensi dalam berinteraksi dengan DNA Gyrase subunit B *S. typhi*. Energi terbaik adalah pada senyawa kaemferol dan myricetin sebesar -15,4 kkal/mol.
2. Fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun pepaya gunung (*C. pubescens*) memiliki aktivitas dalam menghambat pertumbuhan bakteri *S. typhi*, ditandai dengan adanya daerah hambat dengan konsentrasi terbaik yakni 100% sebesar 18,72 mm.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut yakni,

1. Perlu dilakukan uji komputasi lanjutan yakni molekuler dinamik (molecular dynamics/ DM) untuk memberikan pengetahuan tentang interaksi antara molekul-molekul (reseptor-ligan) selama periode waktu tertentu.
2. Perlu dilakukan uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri gram positif dan juga uji antijamur untuk mengetahui potensi daun pepaya gunung (*C. pubescens*) lebih luas.

DAFTAR PUSTAKA

- Abro AH, Abdou AMS, Gangwani JL, Younis NJ, and aHussaini HS, 2009. Hematological and Biochemical Changes in Typhoid Fever. *Pak J Med Sci*, 25(2): 166-171.
- Ainurrochmah, Anis dkk. 2013. Efektivitas Ekstrak Daun Binahong (*Anredera cordifolia*) terhadap Penghambatan Pertumbuhan Bakteri *Shigella flexneri* dengan Metode Sumuran. *Lenterabio*, 2 (3): 233-238.
- Akinyemi KO, Smith SI, Oyefolu AO, and Coker AO. 2005. Multidrug Resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhi Isolated from Patients with Typhoid Fever Complication in Lagos, Nigeria. *Public Health*, 119: 321-7.
- Alam, Anggraini. 2011. Pola Resistensi *Salmonella Enterica Serotipe typhi*, Departemen Ilmu Kesehatan Anak RSHS, Tahun 2006–2010. *Sari Pediatri*, 12 (5): 296-301.
- Alves, Maria José dkk. 2014. Docking Studies in Target Proteins Involved in Antibacterial Action Mechanisms: Extending the Knowledge on Standard Antibiotics to Antimicrobial Mushroom Compounds. *Molecules*, 19, 1672-1684.
- Amarantini, Charis dkk. 2009. *Seleksi Bakteri Salmonella typhi dari Kultur Darah Penderita Demam Tifoid*. Prosiding Seminar Nasional Penelitian, Pendidikan dan Penerapan MIPA, Universitas Negeri Yogyakarta.
- Anggrahini, Dian, Rodesia M., dan Fatmawati. 2012. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Pepaya (*Carica papaya* L.) terhadap *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi*. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Riau.
- Arifin, Syamsul, Edi Hartoyo, dan Dwi Srihandayani. 2009. *Hubungan Tingkat Demam dengan Hasil Pemeriksaan Hematologi pada Penderita Demam Tifoid*. Banjarmasin: Departement Medical Faculty Lambung Mangkurat University.
- Arwansyah dkk. 2014. Simulasi *Docking* Senyawa Kurkumin dan Analognya Sebagai Inhibitor Reseptor Androgen pada Kanker Prostat. *Current. Biochem.* 1 (1): 11-19.
- Cahyono, Wulan. 2013. Aktivitas Antibakteri Kombinasi Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz and Pav) dan Kloramfenikol terhadap Bakteri *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, dan *Staphylococcus aureus*

beserta Bioautografinya. Surakarta: Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah.

Christalina, Ivonne dkk. 2013. Aktivitas Antioksidan dan Antibakteri Alami Ekstrak Fenolik Biji Pepaya. Jurusan Teknik Kimia, Universitas Katolik Widya Mandala, Surabaya.

Chusnie, Andrew J. Lamb. 2005. Antimicrobial Activity Of Flavonoids. *International Journal Of Antimicrobial Agents* 26 (2005) 343–356.

Cita, Yatnita Parama. 2011. Bakteri *Salmonella typhi* dan Demam Tifoid. *Jurnal Kesehatan Masyarakat*, 6 (1): 42-47.

Daintith, J.1994. *Kamus Lengkap Kimia*. Jakarta: Erlangga.

Dallakyan, Sargis dan Arthur J. Olson. 2015. *Small Molecule Library Screening by Docking With Pyrx*. Department of Integrative Structural and Computational Biology

Darmawati, S. 2009. Keanekaragaman Genetik *Salmonella typhi*. *Jurnal kesehatan*, 2 (1): 27-33.

Darsana dkk, 2012. Potensi Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Tenore) Steenis) dalam Menghambat Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli* secara In Vitro. *Indonesia Medicus Veterinus*, 1(3) : 337 – 351.

Dasuki, Undang Ahmad. 1991. *Sistematik Tumbuhan Tinggi*. Bandung: Pusat Antar Universitas Bidang ilmu Hayati Institut Teknologi Bandung.

Davis, W. W. dan T. R. Stout. 1971. Disc Plate Methode of Microbiological Antibiotic Assay. *Microbiol.* 22: 659-665

Djauhariya, E. dan Hermani. 2004. *Gulma Berkhasiat Obat*. Jakarta: Penerbit Penebar Swadaya.

Doughari dan Okafor. 2008. Antibacterial activity of *Senna siamae* leaf extracts on *Salmonella typhi*. *African Journal of Microbiology Research*. Vol.(2): 042-046.

Efunwole, O.O dkk. 2014. Antibacterial effect of Carica Papaya Against *Salmonella typhi*, Causative Agent of Typhoid Fever. *Journal of Environmental Science, Toxicology And Food Technology*, 8 (1): 92-95.

Fabrega, Anna dkk. 2009. Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microbial Biotechnology*, 2(1): 40–61.

- Faqih, Kamal Alamah. 2006. *Tafsir Nurul Qur'an*. Jakarta: Al-Huda.
- Fatchurrozak, Suranto dan Sugiyarto. 2013. Pengaruh Ketinggian Tempat terhadap Kandungan Vitamin C dan Zat Antioksidan pada Buah *Carica pubescens* di Dataran Tinggi Dieng. *El-Vivo*, 1(1) : 15-22.
- Fauziah, Wiryanto, dan Sofyan Lubis. 2005. Pemeriksaan Potensi Tablet Ciprofloxacin yang Beredar di Apotek Kota Medan dengan Metode Pengenceran. *Majalah Kedokteran Nusantara*, 38 (4): 302-304.
- Febriyanti, T., Andayani, D.R., and Jos, B. 2004. *Peningkatan Mutu Light Cycle Oil (LCO) Dengan Cara Ekstraksi Cair-cair Menggunakan Solvent Dimethylformamide (DMF)*. Laporan Penelitian. Semarang: Fakultas Teknik Universitas Diponegoro.
- Fikry, M. Awaluddin. 2014. *Studi Penambatan Molekul Senyawa-senyawa Flavonoid dari Buah Mengkudu (Morinda citrifolia L.) pada Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma (Ppar γ)*. Skripsi. Jakarta: Program Studi Farmasi UIN Syarif Hidayatullah.
- Fitriiningrum, Rahayu Sugiyarto, dan Ari Susilowati. 2013. Analisis Kandungan Karbohidrat pada Berbagai Tingkat Kematangan Buah Karika (*Carica Pubescens*) Di Kejajar Dan Sembungan, Dataran Tinggi Dieng, Jawa Tengah. *Bioteknologi*, 10 (1): 6-14.
- Harborne JB. 1978. *Metode Fitokimia: penuntun cara modern menganalisis tumbuhan*. Ed II. Diterjemahkan oleh Padmawinata K, Sudiro I. Bandung: Institut Teknologi Bandung.
- Hendra, Rudi dkk. 2011. Flavonoid Analyses and Antimicrobial Activity of Various Parts of *Phaleria Macrocarpa* (Scheff.) Boerl Fruit. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 3422-3431.
- Hernandez-Arteseros JA, Barbosa J, Compano R, & Prat MD. 2002. Analysis of Quinolone Residues in Edible Animal Products. *Journal Of Chromatography*, 945, 1-24.
- Hidayat, S. 2000. *Prospek Pepaya Gunung (Carica pubescens Lenne & K. Koch) dari Sikunang, Pegunungan Dieng, Wonosobo*. Bogor: UPT Balai Pengembangan Kebun Raya-LIPI.
- Indranila dan Maria Ulfa. 2015. *Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Karika (Carica pubescens) dengan Metode DPPH beserta Identifikasi Senyawa Alkaloid, Fenol dan Flavonoid*. Prosiding Seminar Nasional Peluang Herbal Sebagai Alternatif Medicine. Semarang: Fakultas Farmasi Universitas Wahid Hasyim.

- Jadhav, Prerana B dkk. 2015. Concept of Drug Likeness in Pharmaceutical Research. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 6(4): (P) 142 – 154.
- Jamkhande, Prasad G. 2014. Antioxidant, antimicrobial activity and in silico PASS prediction of *Annona reticulata* Linn. Root. Extract. *Journal of basic and applied sciences* 3: 140- 148.
- Jawetz, Melnick, dan Adelbergs. 2005. *Mikrobiologi Kedokteran buku terjemahan Medical Microbiology penerjemah bagian mikrobiologi fakultas kedokteran universitas Airlangga*. Jakarta: Salemba Medika.
- Kariuki S, Revathi G, Kiru J, Holt KE, Kingsley RA, Dougan G. 2010. Typhoid in Kenya is Associated with a Dominant Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serovar *typhi* Haplotype That is Also Widespread in Southeast Asia. *J Clin Microb*, 48: 2171-6.
- Kasir Ad-Dimasyqi, Ibnu. 2001. *Tafsir Ibnu Kasir Juz 7*. Penj. Bahrin Abu Bakar. Bandung: Sinar Baru Algensindo.
- Khotimah, Khusnul. 2016. *Skrining Fitokimia dan Identifikasi Metabolit Sekunder Senyawa Karpain pada Ekstrak Metanol Daun Carica Pubescens Lenn & K. Koch dengan LCMS (Liquid Chromatograph-tandem Mass Spectrometry)*. Skripsi Tidak Diterbitkan. Malang: Program sarjana UIN Maliki Malang.
- Kidgell, Claire dkk. 2002. *Salmonella typhi*, the Causative Agent of Typhoid Fever, is Approximately 50,000 Years Old. *Infection, Genetics and Evolution* 2, 39–45.
- Kitchen, Douglas., B, Helene Decornez, Jhon R. Furr dan Jurgen Bajorath. 2004. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: Methods and application. *Nature Reviews. Drug Discovery* vol 3.
- Kristanti, Alfinda Novi dkk. 2008. *Buku Ajar Fitokimia*. Surabaya: Airlangga University Press.
- Laily, Ainun Nikmati, Suranto, dan Sugiyarto. 2012. Characterization of *Carica Pubescens* in Dieng Plateau, Central Java based on Morphological Characters, Antioxidant Capacity, and Protein Banding Pattern. *Bioscience*, 4 (1): 16-21.
- Lee K, Yong D, Yum JH. Lim YS, Kim HD, Lee BK, and Chong Y. 2004. Emergence of Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* serovar *Typhi* in Korea. *Antimicroba Agents Chemother*, 48: 4130-5.

- Legunin, Alexey dkk. 2000. PASS: Prediction of Activity Spectra for Biologically Active Substances. *Bioinformatics Applications Note*, 16 (8): 747-748.
- Lins L & Brasseur R. 1995. The Hydrophobic Effect in Protein Folding. *Faseb J.* 9: 535-540.
- Lipinski, Christopher A. 2004. Lead- and Drug-Like Compounds: The Rule-of-Five Revolution. *Drug Discovery Today: Technologies*, 1 (4): 337-341.
- Mahatriny dkk, 2014. *Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol Daun Pepaya (Carica papaya L.) yang Diperoleh dari Daerah Ubud, Kabupaten Gianyar, Bali*. Bali: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Udayana.
- Maskalyk, james. 2003. Typhoid Fever. *JAMC*, 169 (2): 132.
- Minarno, Eko Budi. 2015. Skrining Fitokimia dan Kandungan Total Flavanoid pada Buah *Carica pubescens* Lenne & K. Koch di Kawasan Bromo, Cangar, dan Dataran Tinggi Dieng. *El-Hayah Vol. 5* (2) : 73-83.
- Moehario, Lucky H. 2009. The Molecular Epidemiology of *Salmonella typhi* Across Indonesia Reveals Bacterial Migration. *J Infect Dev Ctries*, 3(8):579-584.
- Mohamed, Mona A dkk. Biological Evaluation and Molecular Docking of Substituted Quinazolinones as Antimicrobial Agents. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 7(2): 263-274.
- Moya-Leon, Maria Alejandra, Mario Moya, dan Raul Herrera. 2004. Ripening of Mountain Papaya (*Vasconcellea pubescens*) and Ethylene Dependence of Some Ripening Events. *Postharvest Biology and Technology*, 34: 211–218.
- Mukesh, Bachwani dan Kumar Rakhes. 2011. Molecular Docking: a Review. *International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy*, 2 (6): 1746-1751.
- Mulyono, Lienny Meriuki. 2013. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Biji Buah Pepaya (*Carica papaya* L.) terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Universitas surabaya*, 2(2): 1-9.
- Najib. 2009. Pengembangan Molekul Obat dengan Metode Homologi Modeling (Sebuah Tinjauan Aplikatif Kimia Komputasi) <https://nadjeeb.files.wordpress.com>. Diakses pada 03 Maret 2016.

- Nirosha dan Mangalanayaki. 2013. Antibacterial Activity Leaf and Steam Extract of *Carica Papaya* L. *International Journal of Advances in Pharmacy, Biologi, and Chemistry*, 2 (3):474-478.
- Novalina, Dhiah, Sugiyarto, dan Ari Susilowati. 2013. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun *Carica pubescens* dari Dataran Tinggi Dieng terhadap Bakteri Penyebab Penyakit Diare. *El-Vivo*, 1 (1): 1 – 12.
- Nuria dkk. 2009. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* Atcc 25923, *Escherichia coli* Atcc 25922, Dan *Salmonella typhi* Atcc 1408. *Jurnal Ilmu-Ilmu Pertanian*, 5 (2):26-37.
- Onkara Dkk. 2013. Molecular Docking Studies, Synthesis and Anti-Bacterial Properties of New Mannich Bases. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 4(2): 263 – 270.
- Pelczar, M. J. Chan. 2010. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Penerjemah: R.S. Hadioetomo, T. Imas S.S. Tjitrosomo. Jakarta: UI Press.
- Peter, Jyotsna Kiran, Yashab Kumar, Priyanka Pandey dan Harison Masih. 2014. Antibacterial Activity of Seed and Leaf Extract of *Carica Papaya* var. Pusa dwarf Linn. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 9 (2): 29-37.
- Pramely R, T Leon Stephan Raj. 2012. Prediction of Biological Activity Spectra of a Few Phytoconstituents of *Azadirachta indica* A. Juss. *Journal Biochem Tech*, 3(4): 375-379.
- Pranowo, Harno Dwi. 2009. *Peran Kimia Komputasi dalam Desain Molekul Obat*. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.
- Pratiwi, Sylvia T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta: Erlangga.
- Purba, R.D. 2001. *Analisis Komposisi Alkaloid Daun Handeuleum (Graptophyllum pictum (Linn), Griff) yang Dibudidayakan dengan Taraf Nitrogen yang Berbeda*. Skripsi tidak diterbitkan. Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Purwanto, Sigit. 2015. Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Aktif Ekstrak Daun Senggani (*Melastoma malabathricum* L) terhadap *Escherichia coli*. *Jurnal Keperawatan Sriwijaya*, 2 (2).
- Putra, Andrianopsyah Mas Jaya. 2014. *Penambatan molekul (molecular docking) dengan metode komputasi*. Blog LIPI komput@si.htm. Diakses pada Selasa, 8 Maret 2016.

- Putri, W. S., Warditiani, N. K., Larasanty, L. P. F. 2013. Skrining Fitokimia Ekstrak Etil Asetat Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* L.). jurusan Farmasi Universitas Udayana.
- al-Qardhawy, Yusuf. 1998. *As-sunnah sebagai Sumber IPTEK dan Peradaban*. Jakarta: Pustaka Al-kautsar.
- Quthb, Sayyid. 2002. *Tafsir Fi Zhilalil Qur'an*. Penj. As'ad Yasin dkk. Jakarta: Gema Insani.
- Radji, Maksum. 2009. *Buku Ajar Mikrobiologi Panduan Mahasiswa Farmasi dan Kedokteran*. Jakarta: ECG.
- Rahmah, Rizki Amalia. 2015. *Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Polar, Semipolar dan Nonpolar Ekstrak Etanolik Bawang Putih (Allium sativum L.) terhadap Bakteri Escherichia coli secara In Vitro dan In Silico*. Karya Tulis Ilmiah. Yogyakarta: Program Sarjana Studi Farmasi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.
- Robinson T, 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*, diterjemahkan oleh Prof. Dr. Kosasih Padmawinata. Bandung: ITB.
- Rohman. 2010. Distribusi Penderita Demam Tifoid menurut Umur dan Gejala (Studi Kasus di RSI. Roemani). *Prosiding seminar nasional UNIMUS*.
- Ruiz, Joaquim. 2003. Mechanisms of Resistance to Quinolones: Target Alterations, Decreased Accumulation and DNA Gyrase Protection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51, 1109–1117.
- Safitri, Ratu dan Sinta Sasika Novel. 2010. *Medium analisis mikroorganisme (isolasi dan kultur)*. Jakarta: CV. Trans Info Media.
- Senthilvel, Padmanaban dkk. 2013. Flavonoid from *Carica papaya* inhibits NS2B-NS3 protease and prevents Dengue 2 viral assembly. *Bioinformation* 9 (18): 889-895.
- Seran, Eunike Risani. 2013. Hubungan Personal Hygiene dengan Kejadian Demam Tifoid di Wilayah Kerja Puskesmas Tumaratas . *E-journal Keperawatan (e-Kp)*, 3 (2): 1-8.
- Shihab, Q. 2002. *Tafsir Al-Misbah Pesan, Kesan, dan Keserasian Al-Qur'an Volume II*. Jakarta: Lentera Hati.
- Simanjuntak, Megawati. 2008. *Estraksi dan Fraksinasi Komponen Ekstrak Tumbuhan Senduduk (Melastoma malabathricum L.) serta Pengujian Efek*

Sediaan Krim terhadap Penyembuhan Luka Bakar. Skripsi. Medan: Fakultas Farmasi Universitas Sumatra Utara.

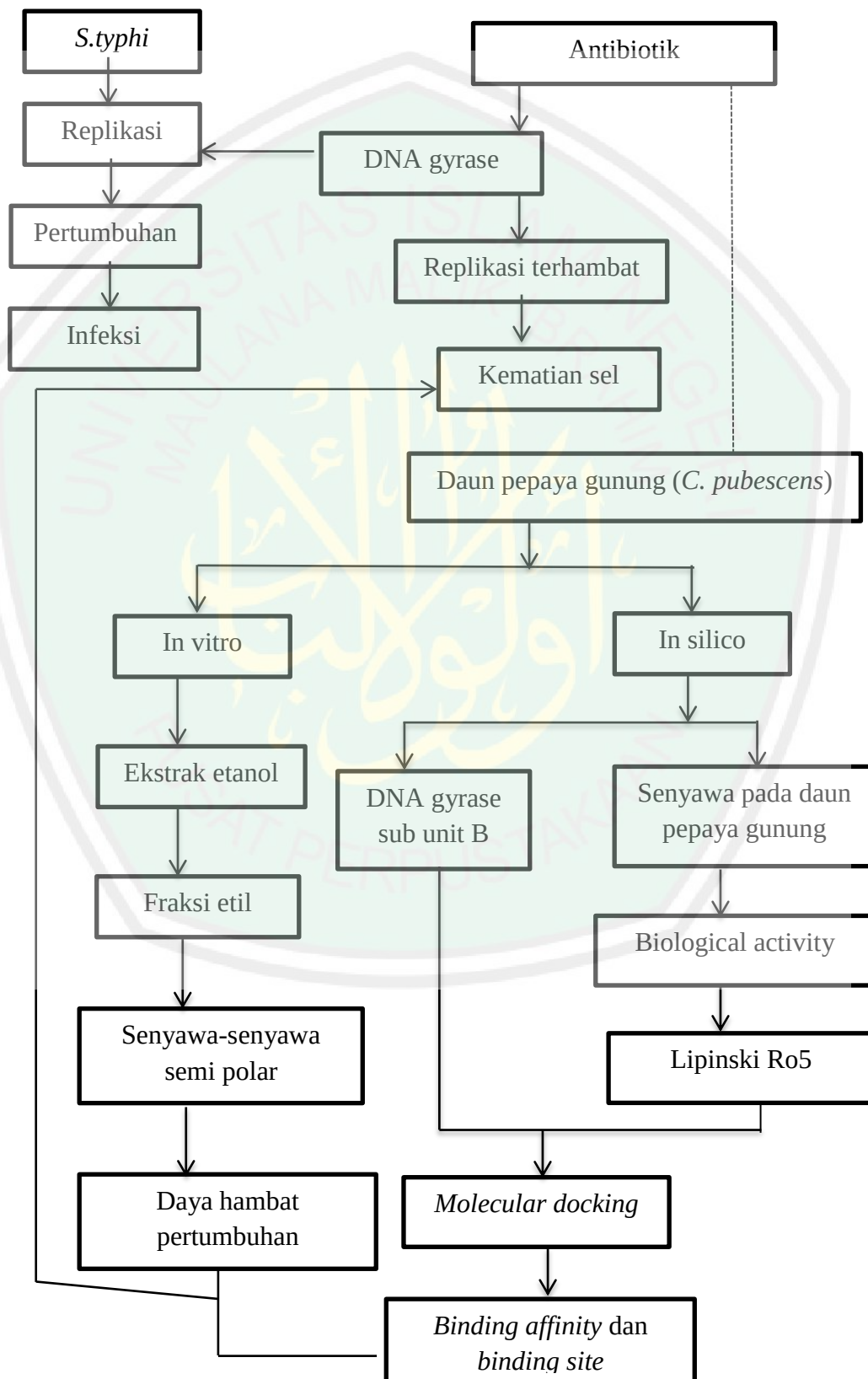
- Stahl, E., 1985, *Analisis Obat Secara kromatografi dan Mikroskopi, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro*. Bandung: ITB.
- Subandi. 2010. *Mikrobiologi Perkembangan, Kajian, dan Pengamatan dalam Prespektif Islam*. Bandung: PT. Remaja Rosdakarya.
- Susanto, D. Sudrajat dan R. Ruga. 2012. Studi Kandungan Bahan Aktif Tumbuhan Meranti Merah (*Shorea Leprosula* Miq) sebagai Sumber Senyawa Antibakteri. *Mulawarmnan Scientifie*, 11 (2): 181-190.
- Sussman, J.L. *et al.* (1998). Protein Data Bank (PDB): Database of Three-dimensional Structural Information of Biological Macromolecules, *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 54, 1078-1084.
- Tanaya, Vivi, Rurini Retnowati, dan Suratmo. 2015. Fraksi Semi Polar dari Daun Mangga Kasturi. *Kimia Student Journal*, 1 (1): 778-784.
- Taufiq, Sarah dkk. 2015. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Biji Buah Pepaya (*Carica papaya* L.) terhadap *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi*. *Prosiding penelitian SpeSIA Unisba*.
- Tiwari, Prashant dkk. 2011. Phytochemical screening and Extraction: A Review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1 (1): 98-106.
- Tjay, T. H., dan Rahardja, K. 2007. *Obat-Obat Penting Khasiat, Penggunaan, dan Efek-efek Sampingnya Edisi ke VI*. Jakarta: PT Elex Media Komputindo.
- Ugboko, Harriet dan Nandita De. 2014. Mechanisms of Antibiotic Resistance in *Salmonella typhi*. *International Journal of Current Microbiology and Aplied Sciences*, 3 (12): 461-476.
- Utama, A. (2003). *Peranan Bioinformatika dalam Dunia Kedokteran*, IlmuKomputer.com. Diakses pada 03 Maret 2016.
- Waluyo, Lud. 2010. *Teknik Metode Dasar Mikrobiologi*. Malang: Universitas Muhammadiyah.
- Widodo. 2015. *Analisis penghambatan aktivitas mortalitas dengan senyawa herbal Indonesia untuk skrening anti kanker melalui in silico*. Seminar Nasional Konservasi Dan Pemanfaatan Sumber Daya Alam. Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya.

- Wink, M., T. Schmeller and B. Latz-Bruning. 1998. Modes of Action of Allelochemical Alkaloids: Interaction with Neuroreceptors, DNA and Other Molecular Targets. *Jour. Chem. Ecol.* 24 (11): 1881-1936.
- Yang, Xiang, Xue Zhang, Shui-Ping Yang and Xiao-Dong Yu. 2013. Preliminary Antibacterial Evaluation of the Chemical Compositions in *Herba pogostemonis* Oil. *J. Pharm. Sci.* 26 (6): 1173-1179.
- Yenni dan Elly Herwana. 2007. Resistensi dari Bakteri Enterik: Aspek Global terhadap Antimikroba. *Universa Medicina*, 26 (1): 46-56.
- Yogiraj, Vijay, Pradeep Kumar Goyal, Chetan Singh Chauhan, Anju Goyal, dan Bhupendra Vyas. 2015. *Carica papaya* Linn: An Overview. *International Journal of Herbal Medicine*, 2 (5): 01-08.
- Zahid, Muhammad dan Isnindar. *Penggunaan Antibiotik Fluorokuinolon sebagai Obat Hewan*. Ulasan Ilmiah/Review Article. Bogor: Balai Besar Pengujian Mutu dan Sertifikasi Obat Hewan.
- Zhang, Xiao-Lian, Victor Tunje Jeza, and Qin Pan. 2008. *Salmonella typhi*: from a Human Pathogen to a Vaccine Vector. *Cellular & Molecular Immunology*, 5 (2): 91-97.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Rancangan penelitian



Lampiran 2. Flow Chart Langkah Kerja

2.1 Pembuatan ekstrak dan fraksi daun pepaya gunung (*C. pubescens*)

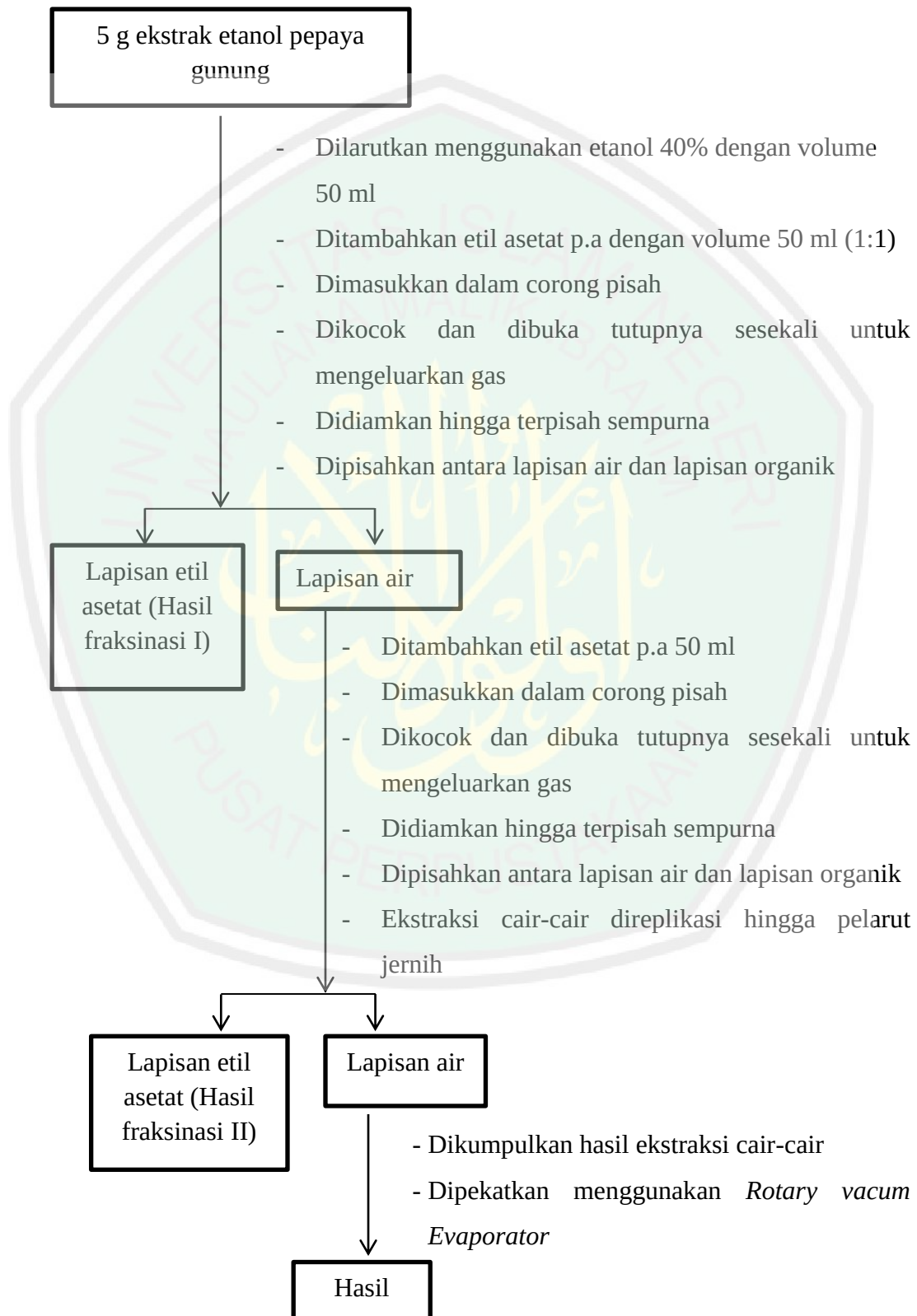
a. Pembuatan serbuk daun pepaya gunung (*C. pubescens*)



b. Pembuatan ekstrak etanol daun pepaya gunung (*C. pubescens*)

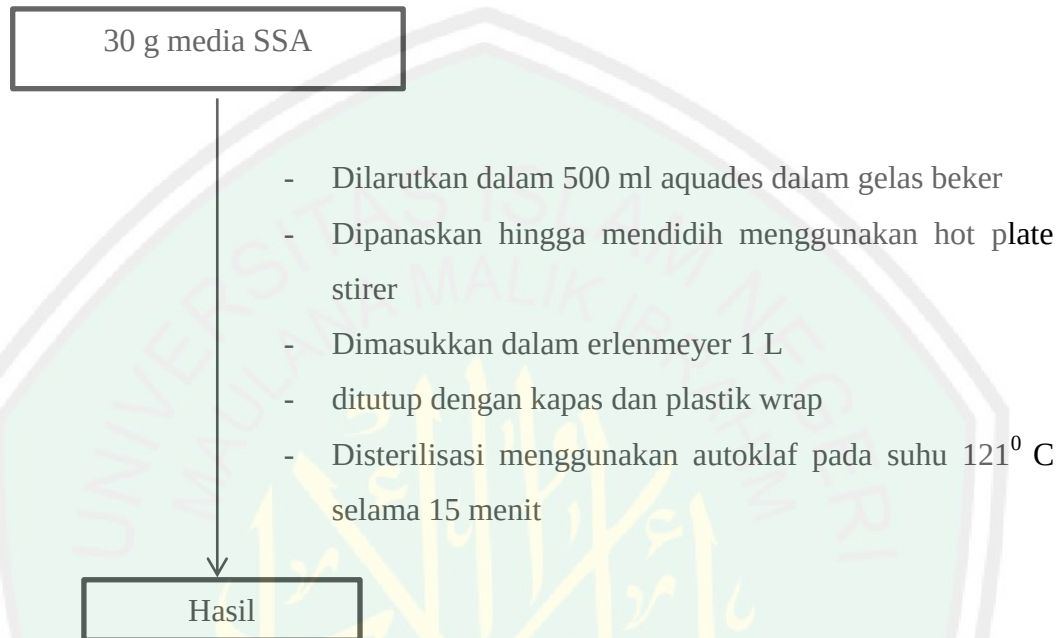


c. Pembuatan fraksi etil asetat daun pepaya gunung (*C. pubescens*)

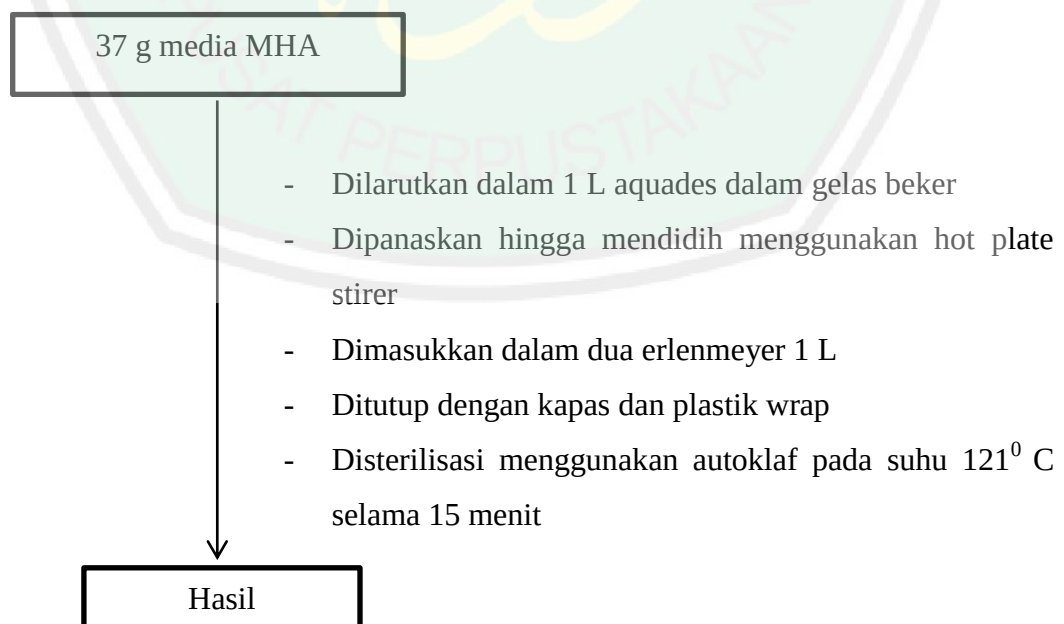


2.2 Uji Aktivitas Antibakteri secara In Vitro

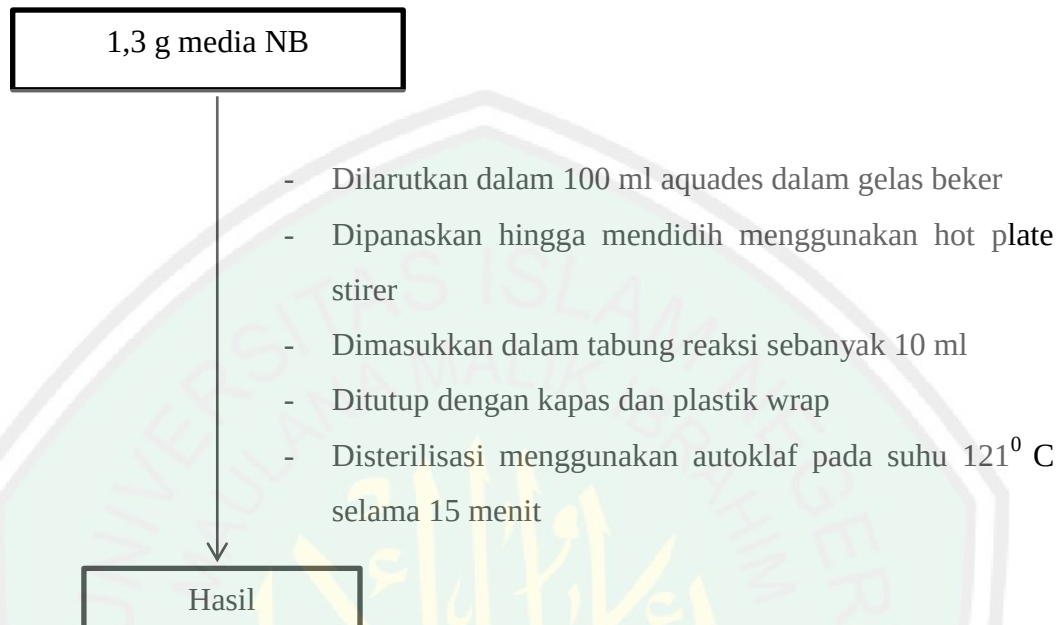
a. Pembuatan Media Salmonella-Shigella Agar



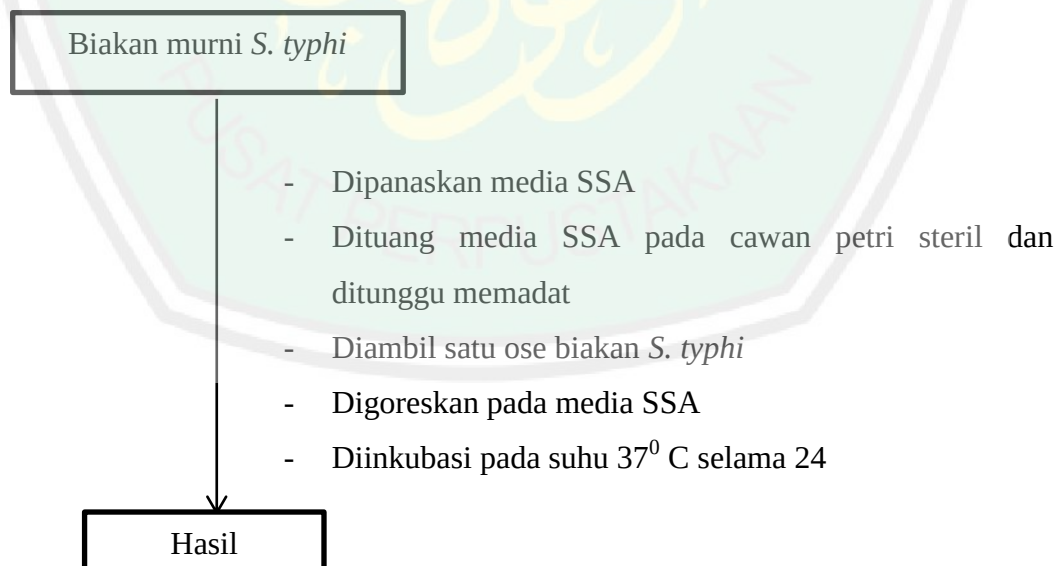
b. Pembuatan Media Muler Hinton Agar



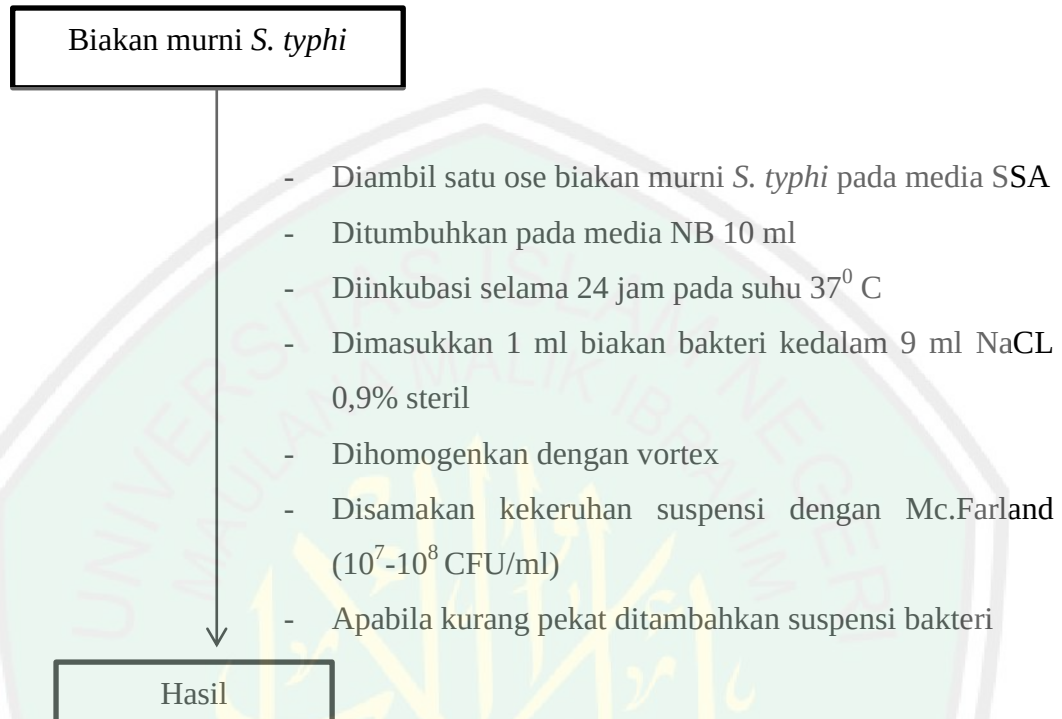
c. Pembuatan Media Nutrient Broth



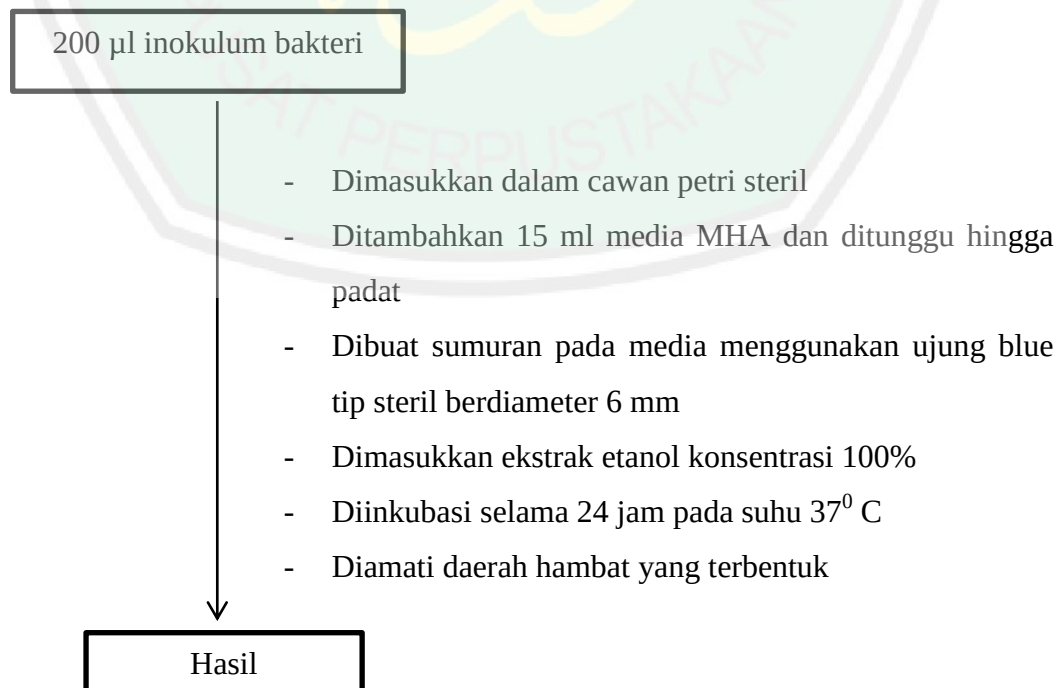
d. Peremajaan Bakteri



e. Pembuatan Inokulum



f. Uji Pendahuluan



g. Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat Daun Pepaya Gunung (*C. pubescens*)

200 µl inokulum bakteri

- Dimasukkan dalam cawan petri steril
- Ditambahkan 15 ml media MHA dan ditunggu hingga padat
- Dibuat sumuran pada media menggunakan ujung blue tip steril berdiameter 6 mm
- Dimasukkan fraksi etil asetat dengan variasi konsentrasi (10%, 25%, 50%, 75%, 100%)
- Diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰ C
- Diamati daerah hambat yang terbentuk

Hasil

Lampiran 3. Prosedur Kerja In Silico

3.1 PASS server online

1. Mengunduh file smile senyawa-senyawa di <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>



3.1.1 IUPAC Name
3,5,7-trihydroxy-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)chromen-4-one
from PubChem

3.1.2 InChI
InChI=1S/C15H10O8/c16-6-3-7(17)11-10(4-6)23-15(14(22)13(11)21)5-1-8(18)12(20)9(19)2-5/h1-4,16-20,22H
from PubChem

3.1.3 InChI Key
IKMDFBPHZNJCSN-UHFFFAOYSA-N
from PubChem

3.1.4 Canonical SMILES
C1=C(C=C(C(=C1O)O)O)C2=C(C(=O)C3=C(C=C(C(=C3O2)O)O)O
from PubChem

2. Masuk website PASS <http://www.pharmaexpert.ru/Projects>



Way2Drug PREDICTIVE SERVICES
Understanding Chemical-Biological Interactions

Home | Definition | Products | Services | FAQ | Contacts

PASS online
Better solutions for your research and development
It is easy to use
GO for prediction

Get more information
about **biological potential** of your compounds.

PASS Online predicts over 4000 kinds of biological activity, including pharmacological effects, mechanisms of action, toxic and adverse effects, interaction with metabolic enzymes and transporters, influence on gene expression, etc.

To obtain the predicted biological activity profile for your compound, only structural formula is necessary; thus, prediction is possible even for virtual structure designed in computer but not synthesized yet.

Accessing to PASS Online service requires a prior **Registration**, which

News

26 SEP Meet with the members of Way2Drug Team at the XIX Mendeleev Congress on General and Applied Chemistry, which is held in Ekaterinburg, Russia on September 26-30, 2016. [\(Download\)](#) | [More...](#)

4 SEP Meet with the members of Way2Drug Team at the 21st European Symposium on Quantitative Structure-Activity Relationship, which is held in Verona, Italy on September 4-8, 2016. [\(Download\)](#) | [More...](#)

The screenshot shows the top navigation bar of the PASS website with links: Home, Definition, Products, Services, FAQ, and Contacts. Below this is a main content area with several buttons: Predict new compound, View old results, View/change profile, SMILES, MOL file, and Marvin JS. A large text box labeled "Insert your SMILES here" contains the placeholder text "O)C3=C(C=C(C=C3O2)O)O)(". A "Get prediction" button is located below the text box.

Pilih prediction molecule → Pilih smile → Paste smile pada kolom yang tersedia → Tekan Get prediction

3. Hasil analisis PASS

This screenshot is identical to the one above, showing the PASS online tool interface. The SMILES string entered in the input field is "O)C3=C(C=C(C=C3O2)O)O)(".

Predict new compound View old results View/change profile

[SMILES](#) [MOL file](#) [MainvJS](#)

O=C3C(C(=C(C(=C3O2)O)O)O)(C

Get prediction

☒ All
 ☐ Pa>Pi
 ☐ Pa>0,3
 ☐ Pa>0,7
 ok

Pa	Pi	Activity
0,983	0,001	Chlordecone reductase inhibitor
0,974	0,002	Membrane integrity agonist
0,969	0,002	HIF1A expression inhibitor

Pa	Pi	Activity
0,983	0,001	Chlordecone reductase inhibitor
0,974	0,002	Membrane integrity agonist
0,969	0,003	HIF1A expression inhibitor

3.2 Lipinski Rule of Five

1. Mengunduh file 3D senyawa-senyawa yang digunakan sebagai ligan melalui <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>



2. Masuk ke website <http://www.scfbio-iitd.res.in/software/drugdesign/lipinski.jsp>

Lipinski Rule of Five

Lipinski rule of 5 helps in distinguishing between drug like and non drug like molecules. It predicts high probability of success or failure due to drug likeness for molecules complying with 2 or more of the following rules

- Molecular mass less than 500 Dalton
- High lipophilicity (expressed as LogP less than 5)
- Less than 5 hydrogen bond donors
- Less than 10 hydrogen bond acceptors
- Molar refractivity should be between 40-130

These filters help in early preclinical development and could help avoid costly late-stage preclinical and clinical failures. To draw a chemical structure [Click Here](#) and follow the instructions given.

Step 1: Input Drug File.

Input PDB file No file selected.

Step 2 : Input pH Value

pH Value [Value ranges from 0.0 to 14.0]

3. Memasukan senyawa 3D dengan format .pdb kemudian dipilih submit

Lipinski rule of 5 helps in distinguishing between drug like and non drug like molecules. It predicts high probability of success or failure due to drug likeness for molecules complying with 2 or more of the following rules

- Molecular mass less than 500 Dalton
- High lipophilicity (expressed as LogP less than 5)
- Less than 5 hydrogen bond donors
- Less than 10 hydrogen bond acceptors
- Molar refractivity should be between 40-130

These filters help in early preclinical development and could help avoid costly late-stage preclinical and clinical failures .To draw a chemical structure [Click Here](#) and follow the instructions given.

Step 1: Input Drug File.

Input PDB file caffeic_acidpdb.pdb

Step 2 : Input pH Value

pH Value [Value ranges from 0.0 to 14.0]

Step 3: Click on 'Submit' to submit your job

4. Hasil analisis Role of Five

Step 1: Input Drug File.

Input PDB file caffeic_acidpdb.pdb

Step 2 : Input pH Value

pH Value [Value ranges from 0.0 to 14.0]

Step 3: Click on 'Submit' to submit your job

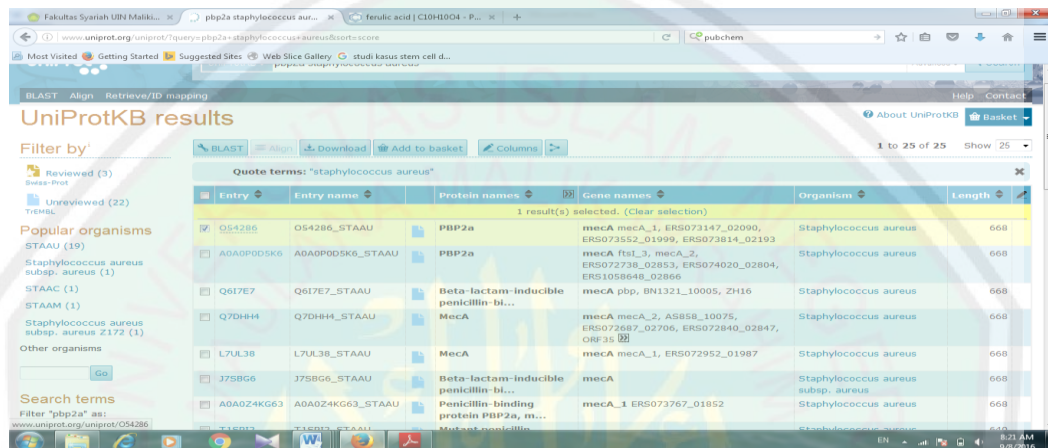
Result

```

mass: 179.000000
hydrogen bond donor: 2
hydrogen bond acceptors: 4
LOGP: -0.139100
Molar Refractivity: 43.812599
  
```

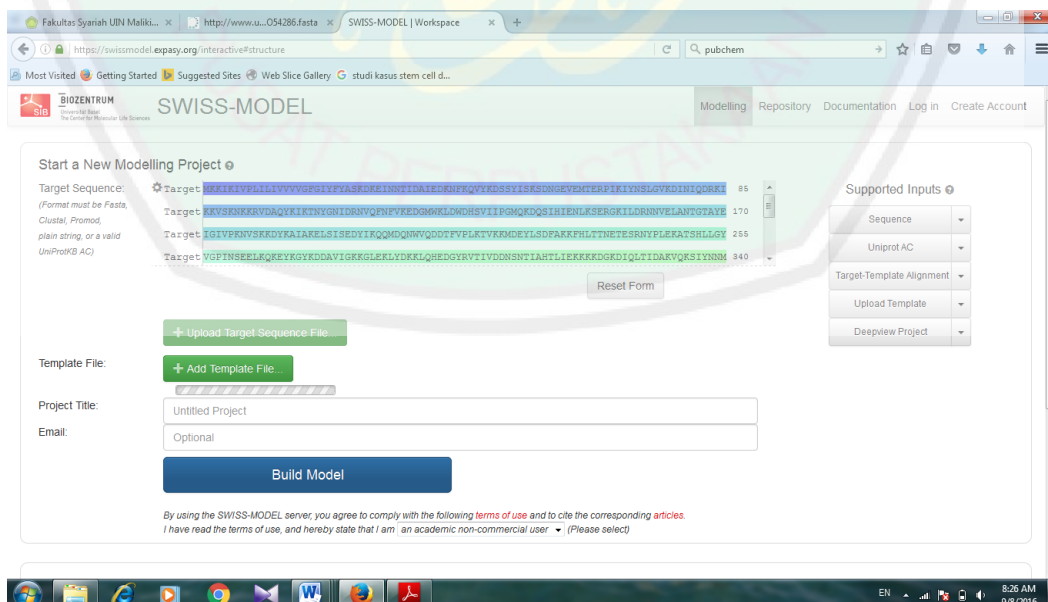
3.2 Persiapan reseptor dan ligan

1. Mencari protein refren dari PDB dengan Id 5L3J
2. Pengunduhan sequence DNA gyrase dalam bentuk FASTA dari Uniprot (<http://uniprot.org/>) untuk pemodelan



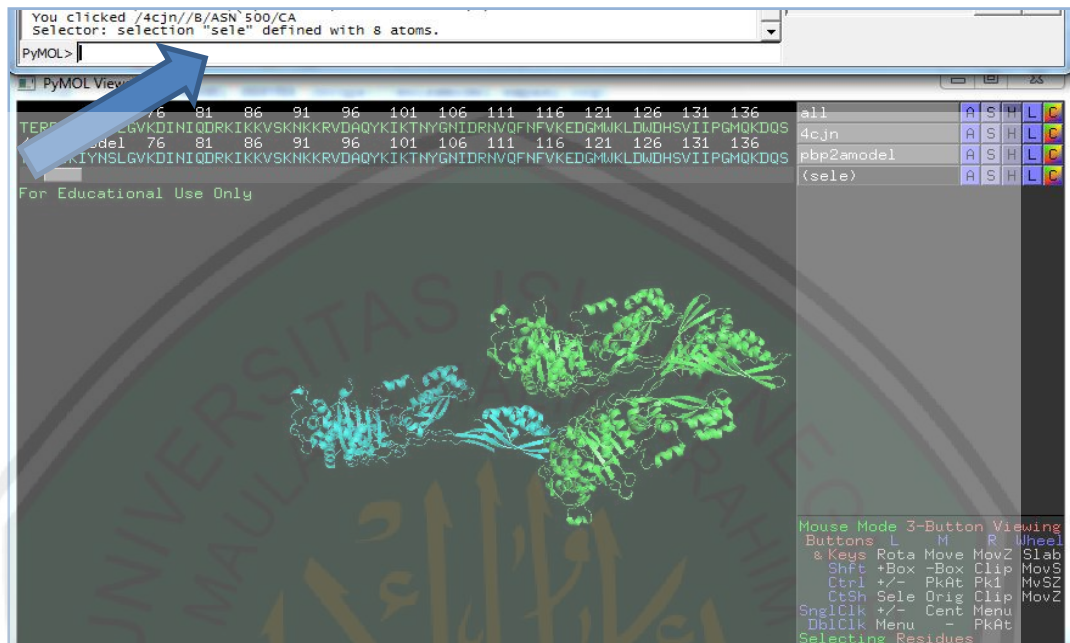
Pilih protei yang akan digunakan → pilih Fasta

3. Pemodelan di swiss model <http://swissmodel.expasy.org/> dengan menggunakan template_4L3J



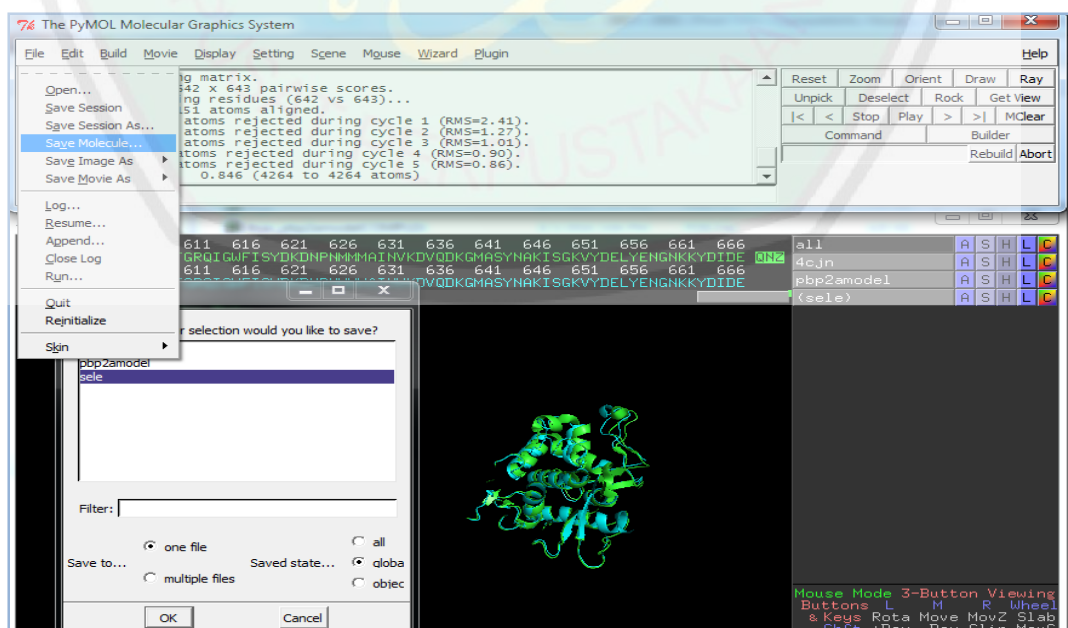
Pilih build model → Pilih model dengan GMQE tertinggi → save model (PDB file)

4. Pengaturan reseptor *reference* (4L3J) dan hasil modeling dengan PymOL



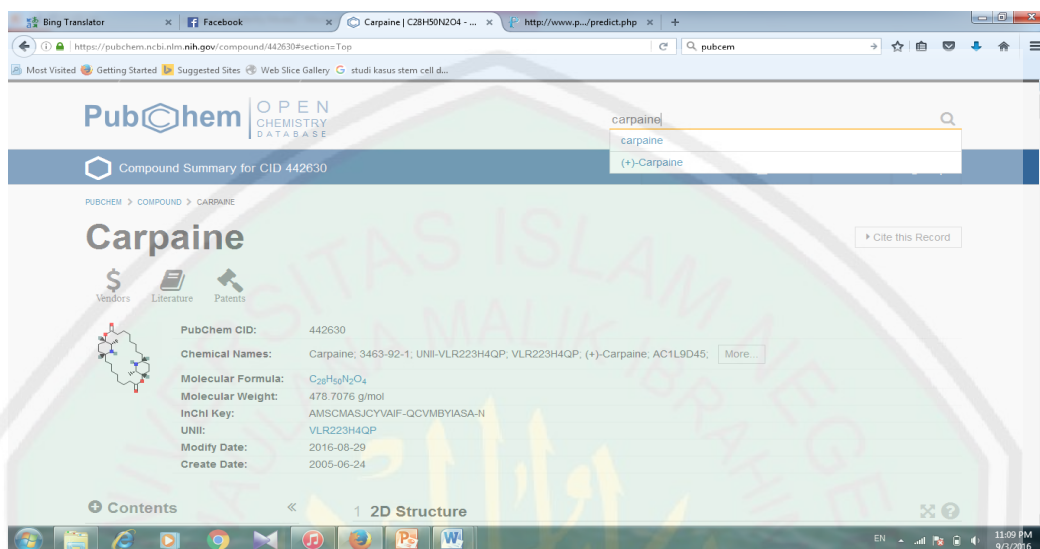
Pilih file → Open dan ketik “align 4L3J, DNA gyrase model” pada kolom (tanda panah)

5. Pembersihan molekul-molekul yang tidak diperlukan



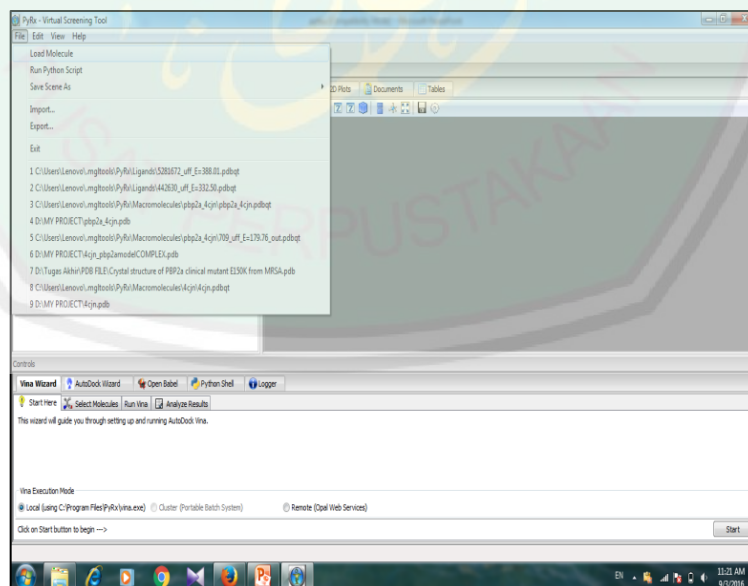
Pilih file → save molecule

6. Ligan yang akan digunakan diunduh dari pubchem.ncbi.nlm.nih.gov dalam bentuk 3D dan disimpan dalam format SDF



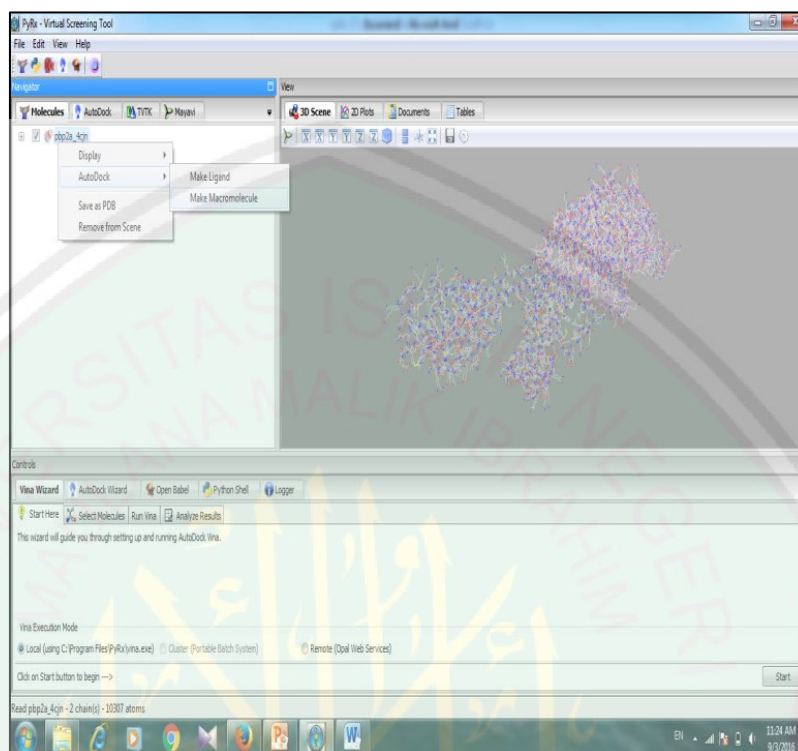
3.3 Penambatan Molekul (*Molecular docking*) dengan Autodock Vina

1. Memasukkan reseptor yang telah dipreparasi sebelumnya



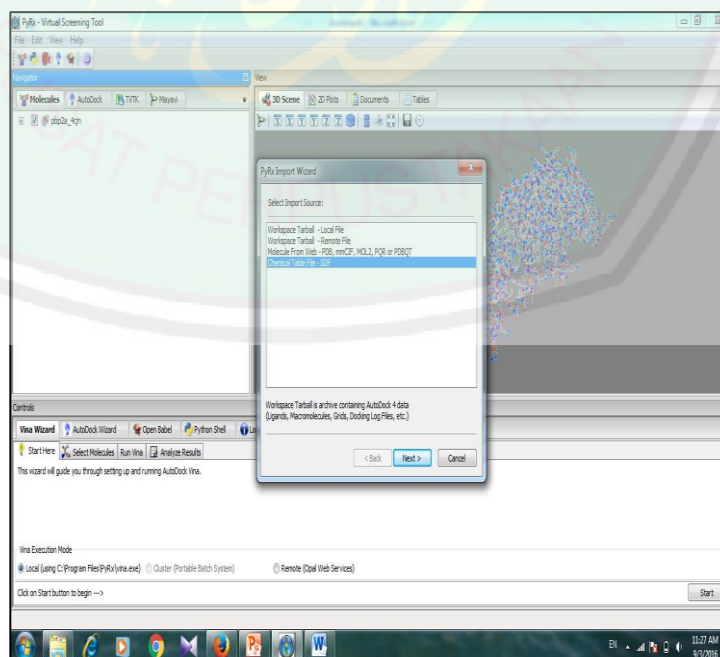
Buka software Pyrx → File → Load molecule

2. Preparasi molekul menjadi format .pdbqt



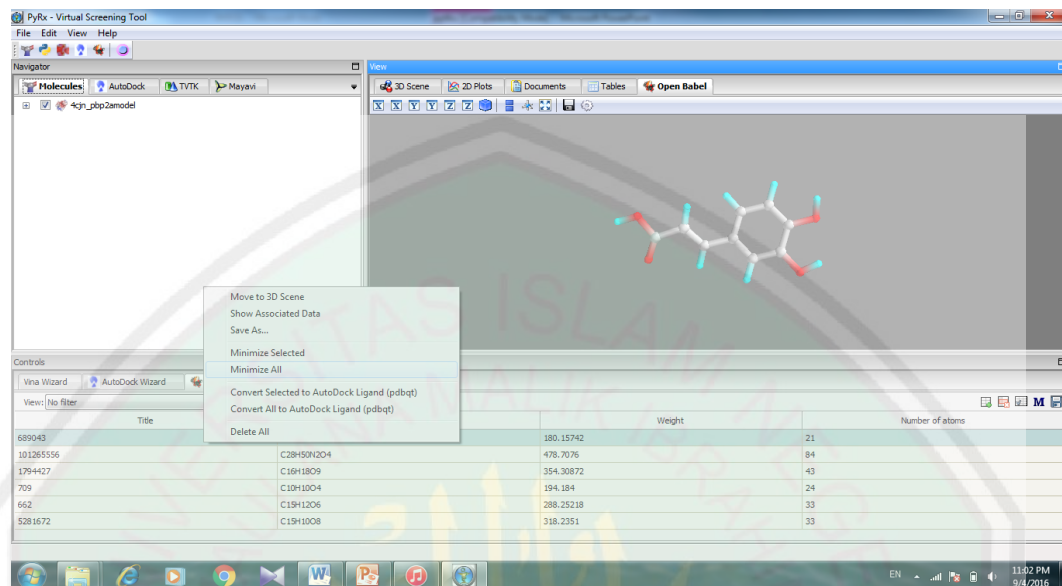
file → autodock → make macromolekul

3. Memasukkan ligan



File → import → Chemical table SDF → open

4. Preparasi ligan menjadi format .pdbqt



Klik kanan nama ligan pada open babel → minimize all → klik kanan nama ligan → convert all to pdbqt

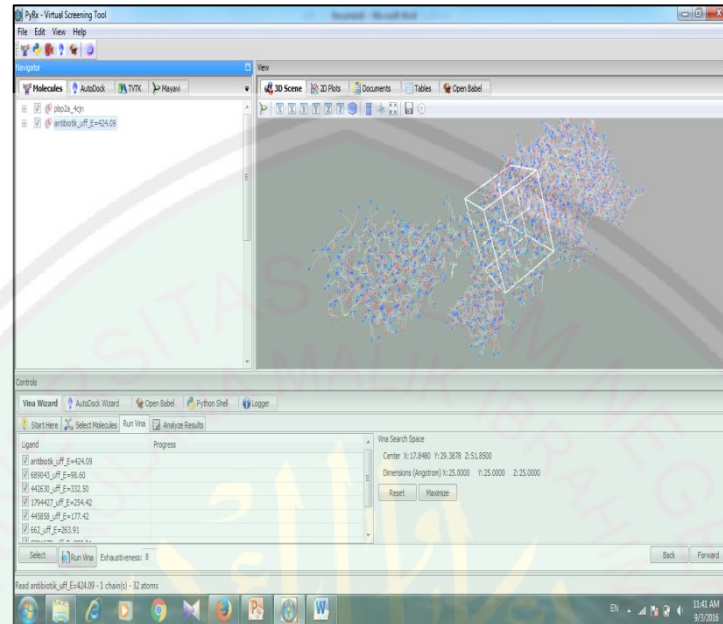
5. Docking menggunakan vina autodock

The screenshot shows the PyRx - Virtual Screening Tool interface with the AutoDock Wizard active. The 'Ligands' panel on the left lists several ligands. The 'Docking Results' panel on the right shows a table of docking results for the selected ligands.

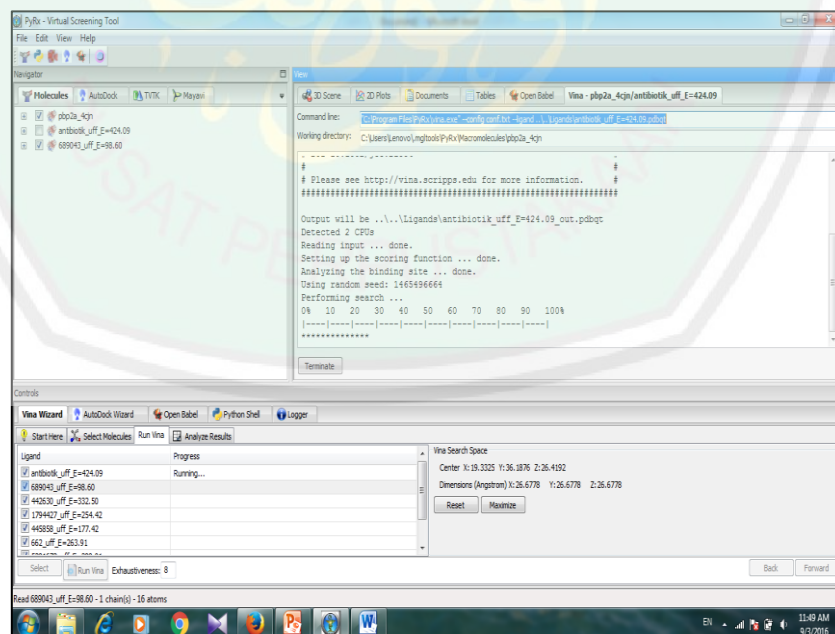
Name	Size	Date Created	Torsional DOF	AutoDock Elements
1794427_ufl_E=254.42	31	2016.09.03 11.3...	11	A C HD OA
2058126_ufl_E=282.97	33	2016.09.03 11.3...	14	C SA HD OA N
442630_ufl_E=332.50	36	2016.09.03 11.3...	9	C HD OA N
443838_ufl_E=177.42	16	2016.09.03 11.3...	5	A C HD OA
5281672_ufl_E=388.01	29	2016.09.03 11.3...	7	A HD OA
662_ufl_E=263.01	25	2016.09.03 11.3...	5	A C HD OA
689043_ufl_E=68.60	16	2016.09.03 11.3...	5	A C HD OA
ambioch_ufl_E=424.09	32	2016.09.03 11.3...	6	A C NA OA N HD

Vina wizard → start → pilih molekul dan ligan yang akan didocking → forward

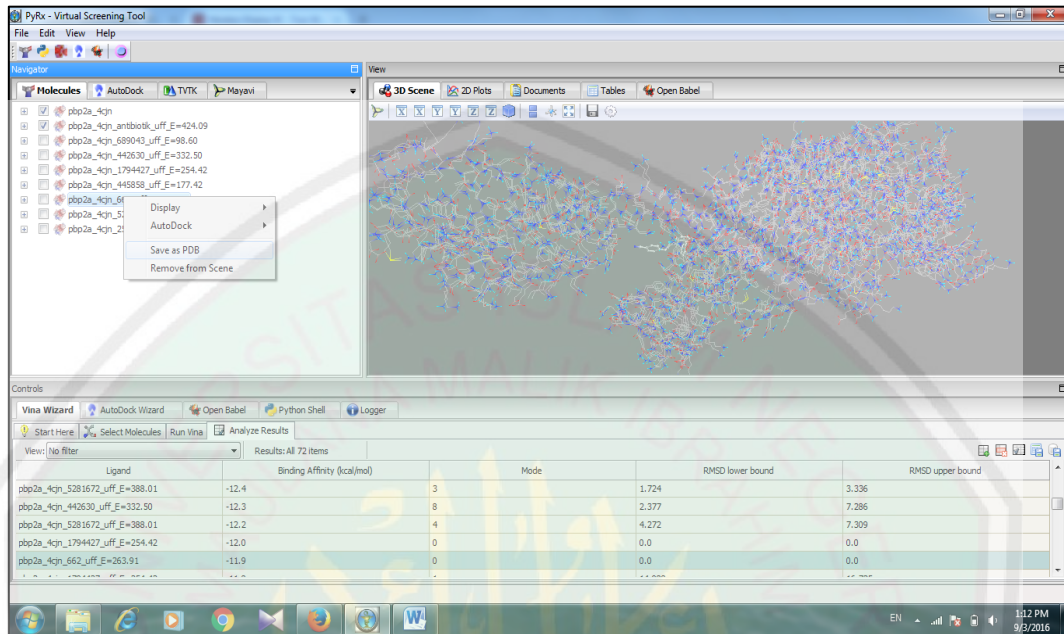
6. Menentukan sisi aktif dengan ligan *reference*



7. Running autodock vina

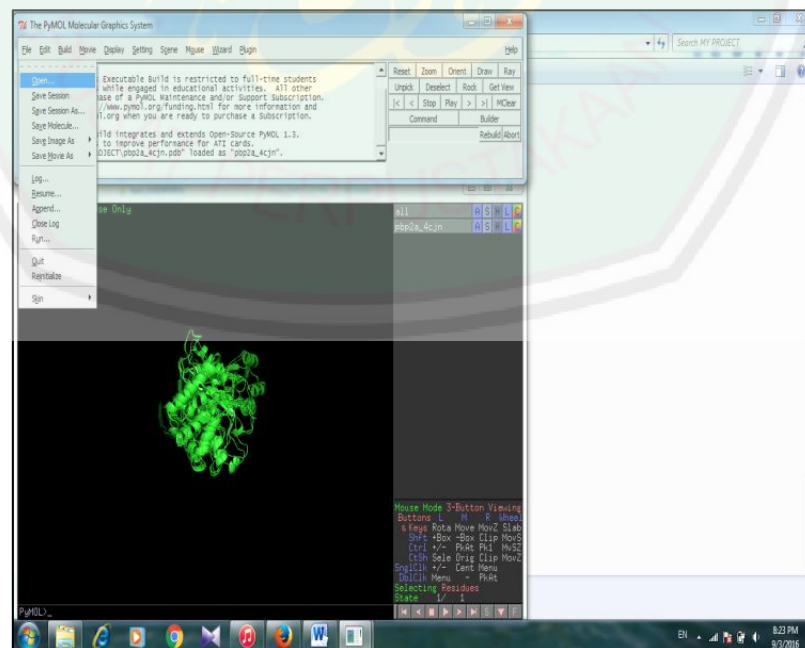


8. Hasil docking disimpan dalam format .pdb



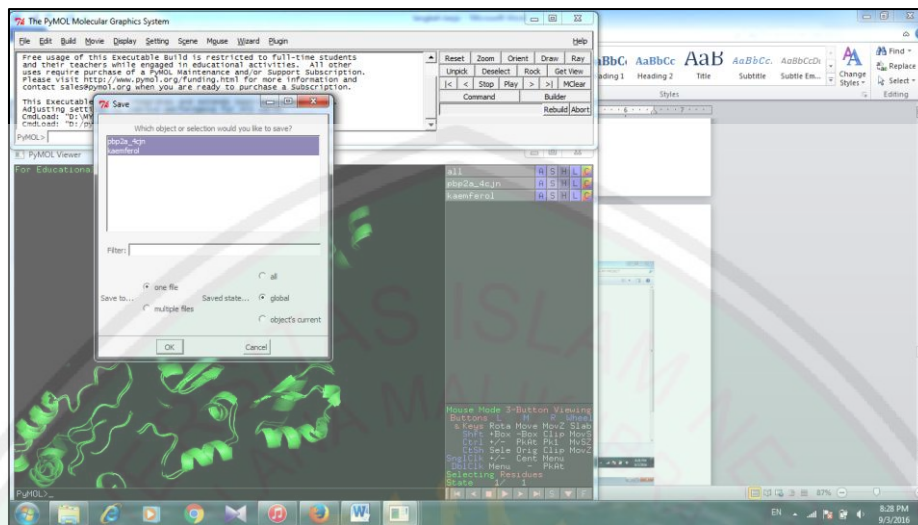
Klik salah satu ligand (dipilih paling rendah) → save as PDB

9 Membuat kompleks ligan-reseptor dengan aplikasi Pymol



Buka file reseptor → buka file ligan hasil docking

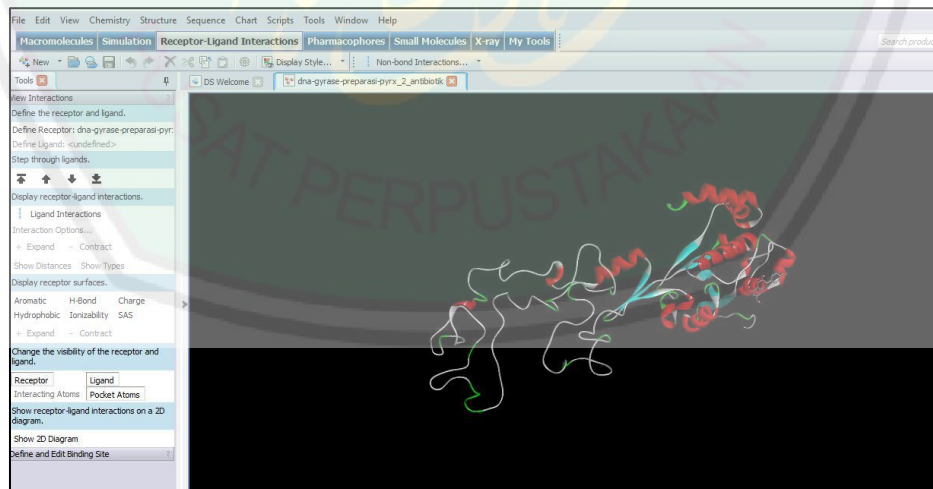
10. Simpan molekul dalam satu file .pdb



File → save molecule → pilih nama reseptor dan ligan → pilih save to one file → Ok

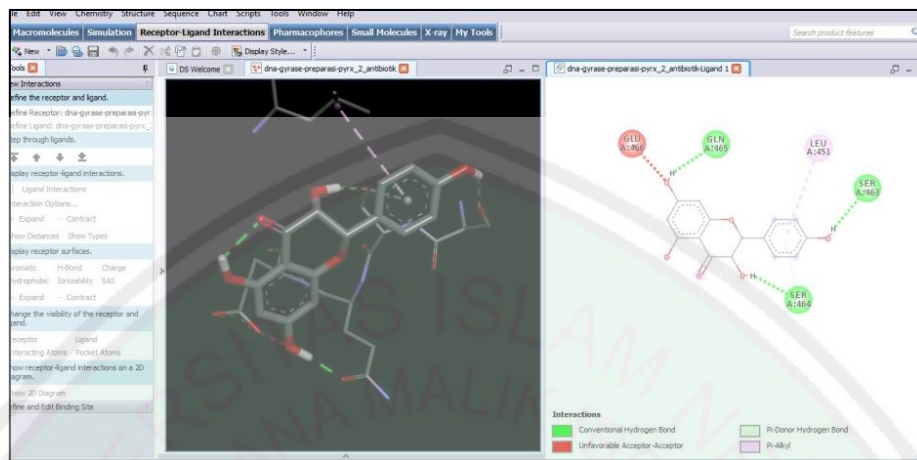
3.4 Visualisasi hasil docking menggunakan Discoveri studio dan Pymol

1. Dibuka aplikasi Discovery studio
2. Dimasukkan molekul yang akan divisualisasi



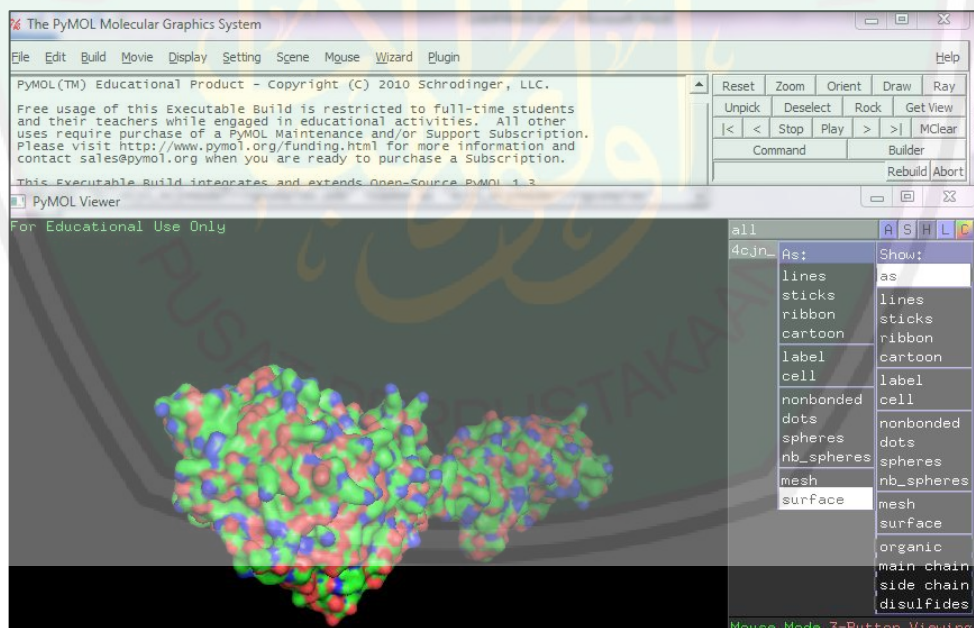
File → open → pilih makromolekul

3. Analisis interaksi ligan



Pilih Receptor-Ligand Interaction pada toolbar → pilih ligan interaction
disebelah kiri → show 2D diagram

4. Dibuka aplikasi Pymol dan dibuka molekul kompleks (reseptor-ligan)



file → open pilih molekul → klik tombol S pada toolbar kanan atas → pilih
as → pilih surface

Lampiran 4. Perhitungan

3.1 Pembuatan Larutan Etanol 40 %

$$M1 \times V1 = M2 \times V2$$

$$96 \% \times V1 = 40 \% \times 50 \text{ mL}$$

$$V1 = 21 \text{ mL}$$

Jadi diambil larutan etanol 96 % sebanyak 21 mL kemudian diencerkan dengan aquades hingga volume 10 mL.

3.2 Pembuatan Konsentrasi Ekstrak

Larutan Stok

$$100 \% = 100 \text{ g} / 100 \text{ mL} = x / 3 \text{ mL} \quad \text{jadi, } x = 3 \text{ gram}$$

Jadi 3 gram ekstrak dilarutkan dengan DMSO 3 mL

1. Konsentrasi 100 %

$$\text{Diketahui: } M1 = 100 \% \quad V2 = 1 \text{ mL} \quad M2 = 100 \%$$

Ditanya: $V2$?

$$\text{Jawab: } M1 V1 = M2 V2$$

$$100 V1 = 100 \times 1$$

$$V1 = 100/100 = 1 \text{ mL}$$

Jadi 1 mL larutan stok 100 % dilarutkan dengan DMSO 1 mL

2. Konsentrasi 75%

$$\text{Diketahui: } M1 = 100 \% \quad V2 = 1 \text{ mL} \quad M2 = 75 \%$$

Ditanya: $V2$?

$$\text{Jawab: } M1 V1 = M2 V2$$

$$100 V1 = 75 \times 1$$

$$V1 = 75/100 = 0.75 \text{ mL}$$

Jadi 0.75 mL larutan 100 % dilarutkan dengan DMSO 1 mL

3. Konsentrasi 50 %

$$\text{Diketahui: } M1 = 100 \%, \quad V2 = 1 \text{ mL} \quad M2 = 50 \%$$

Ditanya: V_2?

Jawab: $M_1 V_1 = M_2 V_2$

$$100 V_1 = 50 \times 1$$

$$V_1 = 50/100 = 0.5 \text{ mL}$$

Jadi 0.5 mL larutan 100 % dilarutkan dengan DMSO 1 mL

4. Konsentrasi 25 %

Diketahui: $M_1 = 100 \%$ $V_2 = 1 \text{ mL}$ $M_2 = 25 \%$

Ditanya: V_2?

Jawab: $M_1 V_1 = M_2 V_2$

$$100 V_1 = 25 \times 1$$

$$V_1 = 25/1000 = 0.25 \text{ mL}$$

Jadi 0.25 mL larutan 100 % dilarutkan dengan DMSO 1 mL

5. Konsentrasi 10 %

Diketahui: $M_1 = 100 \%$ $V_2 = 1 \text{ mL}$ $M_2 = 10 \%$

Ditanya: V_2?

Jawab: $M_1 V_1 = M_2 V_2$

$$100 V_1 = 10 \times 1$$

$$V_1 = 10/1000 = 0.01 \text{ mL}$$

Jadi 0.01 mL larutan 100 % dilarutkan dengan DMSO 1 mL

Lampiran 5. Data Hasil Diameter Daerah Hambat Fraksi Etil Asetat Daun Pepaya Gunung (*C. pubescens*) terhadap *S. typhi*

Konsentrasi (%)	Ulangan (mm)				Jumlah	Rata-rata (mm)
	I	II	III	IV		
10	2	2,8	3,3	2,5	10,6	2,67
25	4	3	4,5	2	13,5	3,37
50	2,6	3,35	6	6,1	18,05	4,51
75	12,9	13	14,9	7,4	48,2	12,05
100	20	17	19	18,9	74,9	18,72
Kontrol + (Ciprofloxacin)	35,41	33,7	35,45	33,37	137,93	34,48
Kontrol – (DMSO)	0	0	0	0	0	0

Lampiran 6. Analisis Statistik

4.1 Hasil Analilis Uji Normalitas Menggunakan *Kolmogorov-Smirnov Test*

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test			
		perlakuan	data
N		20	20
Normal Parameters ^a	Mean	3.0000	8.2625
	Std. Deviation	1.45095	6.58321
Most Extreme Differences	Absolute	.155	.229
	Positive	.155	.229
	Negative	-.155	-.171
Kolmogorov-Smirnov Z		.692	1.023
Asymp. Sig. (2-tailed)		.725	.246
a. Test distribution is Normal.			

4.2 Uji Homogenitas Data

Data								
Descriptives								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	4	2.6500	.54467	.27234	1.7833	3.5167	2.00	3.30
2	4	3.3750	1.10868	.55434	1.6108	5.1392	2.00	4.50
3	4	4.5125	1.80202	.90101	1.6451	7.3799	2.60	6.10
4	4	12.0500	3.23368	1.61684	6.9045	17.1955	7.40	14.90
5	4	18.7250	1.25266	.62633	16.7317	20.7183	17.00	20.00
Total	20	8.2625	6.58321	1.47205	5.1815	11.3435	2.00	20.00

Data			
Test of Homogeneity of Variances			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.657	4	15	.074

4.3 Uji One Way Anova

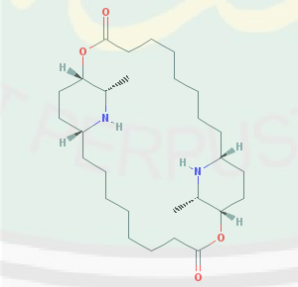
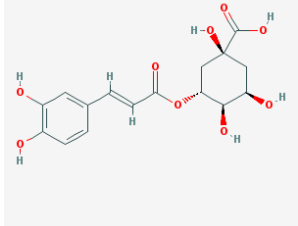
Data					
ANOVA					
	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	773.038	4	193.259	57.521	.000
Within Groups	50.397	15	3.360		
Total	823.434	19			

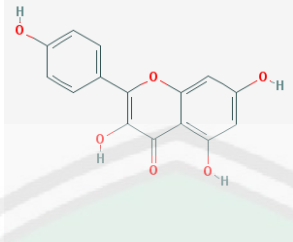
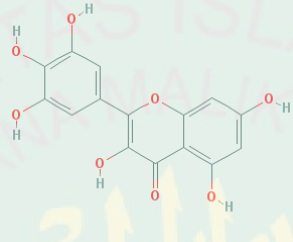
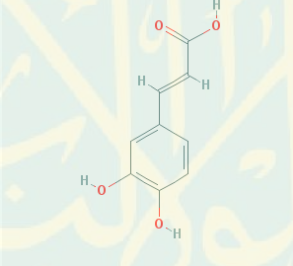
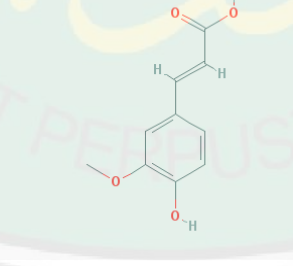
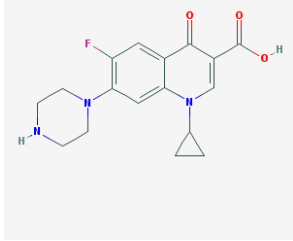
4.4 Uji Duncan

Duncan				
data				
perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
1	4	2.6500		
2	4	3.3750		
3	4	4.5125		
4	4		12.0500	
5	4			18.7250
Sig.		.192	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Lampiran 7. Struktur 2D Senyawa-Senyawa Ligan

No	Senyawa	Struktur 2D	Smile
1	Carpaine		<chem>CC1C2CCC(N1)CCCCCCCCC(=O)OC3CCC(CCCCCCCC(=O)O2)NC3C</chem>
2	Chlorogenic acid		<chem>C1C(C(C(CC1(C(=O)O)O)OC(=O)C=CC2=CC(=C(C=C2)O)O)O)O</chem>

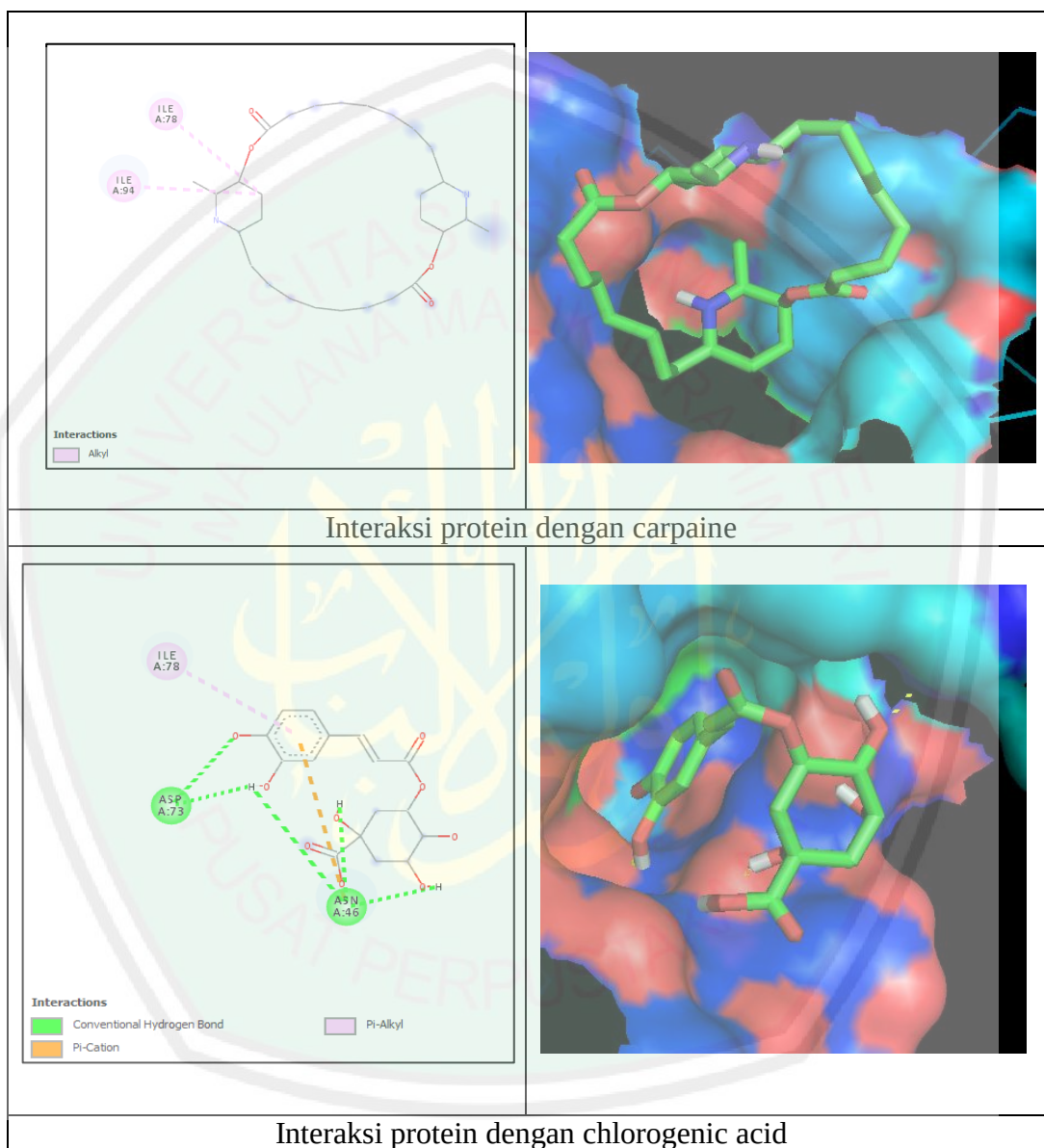
3	Kaemferol		<chem>O=C1C(=C(C=C1C2=C(C(=O)C3=C(C(=C(C=C3O2)O)O)O)O)O)O</chem>
4	Myricetin		<chem>O=C1C(=C(C(=C1O)O)O)C2=C(C(=O)C3=C(C(=C(C=C3O2)O)O)O)O</chem>
5	Caffeic acid		<chem>O=C(O)C=CC1=CC(=C(C=C1)O)O</chem>
6	Ferulic acid		<chem>O=C(O)C=CC1=CC(=C(C=C1)C(=O)O)O</chem>
7	Ciprofloxacin		<chem>O=C1C(=C(C(=O)C3=CC(=C(C=C3)N4CCNCC4)F)C(=O)O)N1</chem>

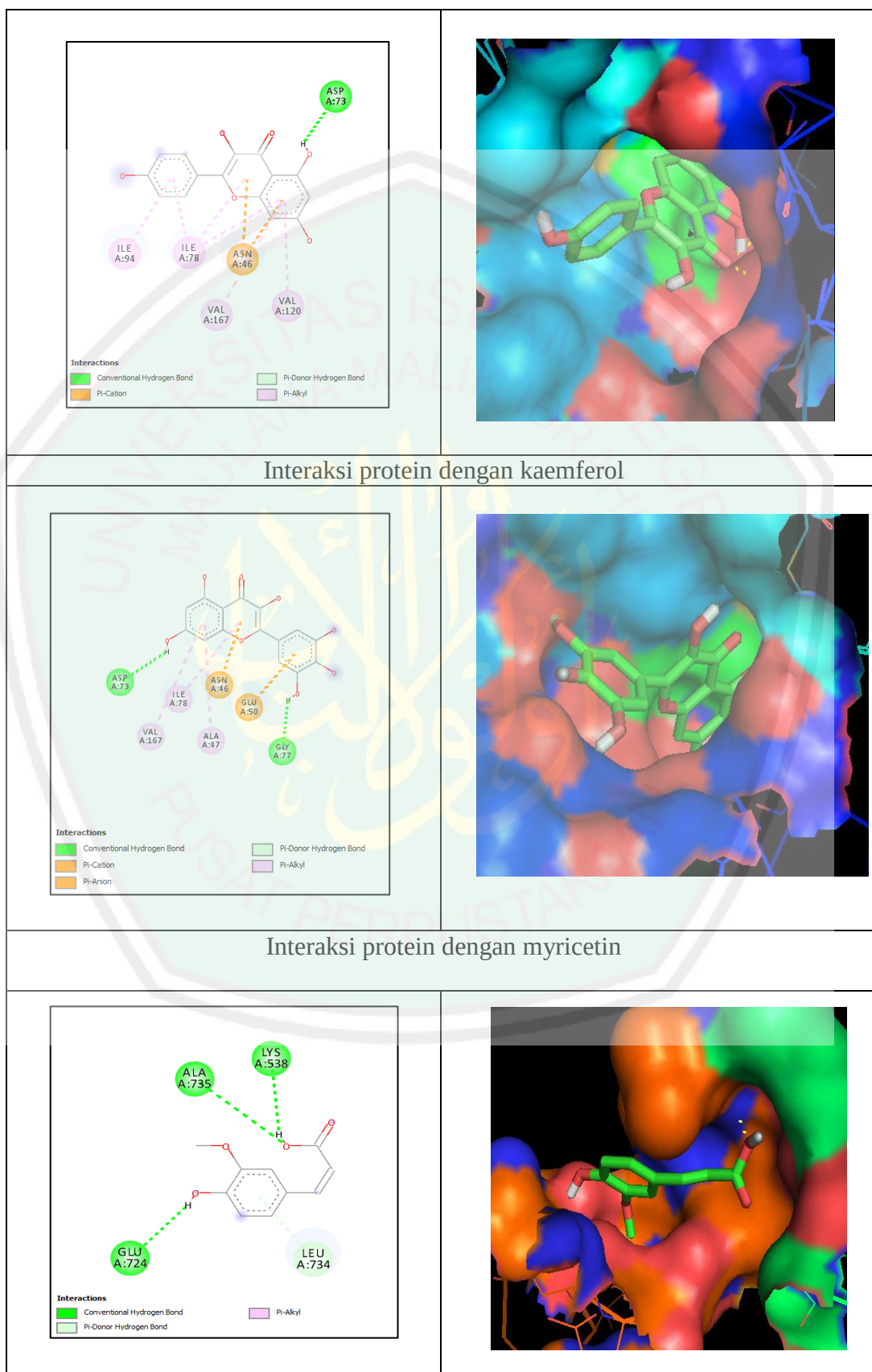
Lampiran 8. Nilai Binding Afiniti Ligan dengan Reseptor DNA Gyrase

Ligan	Model	Binding afiniti
Kaemferol	Model 1	-15,4
	Model 2	-15,2
	Model 3	-14,6
	Model 4	-14,6
	Model 5	-14,5
	Model 6	-14,3
	Model 7	-13,8
	Model 8	-13,6
	Model 9	-13,4
Myricetin	Model 1	-15,4
	Model 2	-15,3
	Model 3	-14,8
	Model 4	-14,7
	Model 5	-14,6
	Model 6	-14,2
	Model 7	-14,2
	Model 8	-14
	Model 9	-13,9
Chlorogenic acid	Model 1	-14,6
	Model 2	-14,5
	Model 3	-14
	Model 4	-13,9
	Model 5	-13,8
	Model 6	-13,8
	Model 7	-13,7
	Model 8	-13,4
	Model 9	-13,3
Carpaine	Model 1	-12,9
	Model 2	-12,9
	Model 3	-12,7
	Model 4	-11,8
	Model 5	-11,4
	Model 6	-11,1
	Model 7	-11
	Model 8	-10,8
	Model 9	-10,6
Caffeic acid	Model 1	-12,5
	Model 2	-12,3
	Model 3	-11,9
	Model 4	-11,8
	Model 5	-11,8

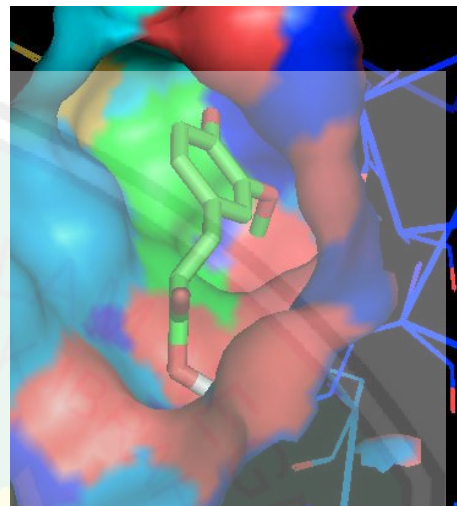
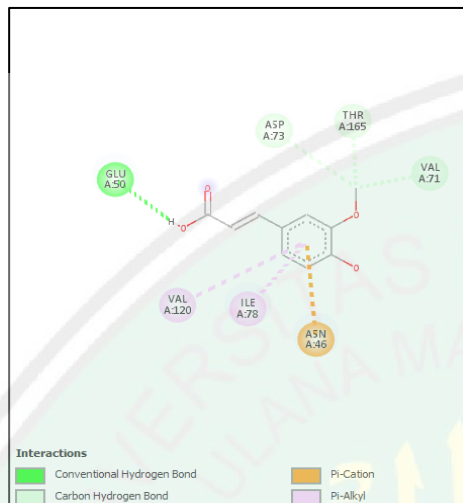
	Model 6	-11,3
	Model 7	-11,3
	Model 8	-10,9
	Model 9	-10,7
Ferulic acid	Model 1	-12,3
	Model 2	-12,3
	Model 3	-12,2
	Model 4	-11,9
	Model 5	-11,7
	Model 6	-11,1
	Model 7	-11
	Model 8	-10,5
	Model 9	-10,4
Ciprofloxacin	Model 1	-14,1
	Model 2	-13,7
	Model 3	-13,2
	Model 4	-12,9
	Model 5	-12,7
	Model 6	-12
	Model 7	-11,8
	Model 8	-11,7
	Model 9	-11,6
Ligan reference	Model 1	-14
	Model 2	-13,9
	Model 3	-13,6
	Model 4	-13,5
	Model 5	-13,5
	Model 6	-13,1
	Model 7	-13
	Model 8	-13
	Model 9	-13

Lampiran 9. Hasil Visualisasi Interaksi Ligan dan Protein Menggunakan Software Discovery Studio dan Pyrx

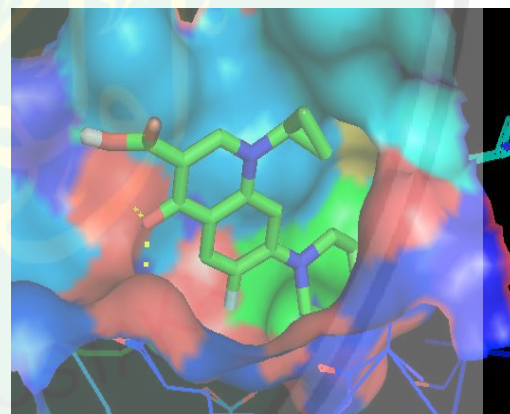
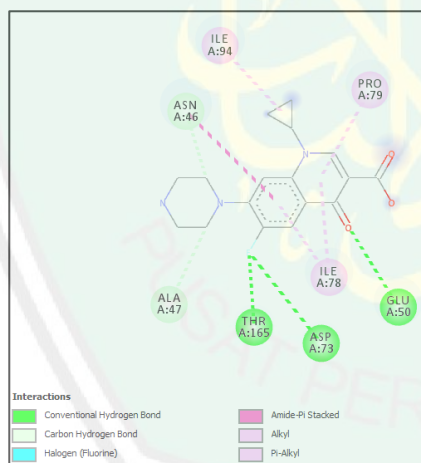




Interaksi protein dengan caffeic acid



Interaksi protein dengan ferulic acid



Interaksi protein dengan ciprofloxacin

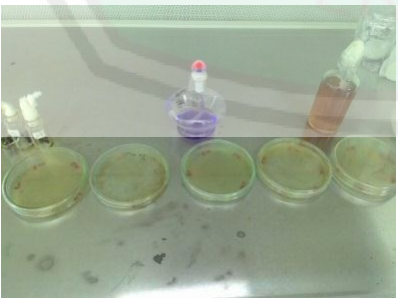
Lampiran 10. Dokumentasi Penelitian

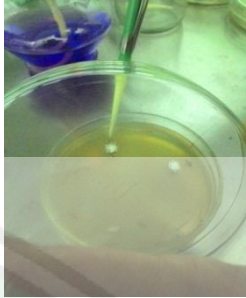
a. Proses Ekstraksi dan Fraksinasi

 Simplisia daun pepaya gunung	 Proses maserasi senyawa aktif daun pepaya gunung
 Penyaringan hasil maserasi	 Proses pemekatan ekstrak
 Ekstrak kasar etanol daun pepaya gunung	 Pencarian ekstrak kasar etanol dengan etanol 40% dan etil asetat

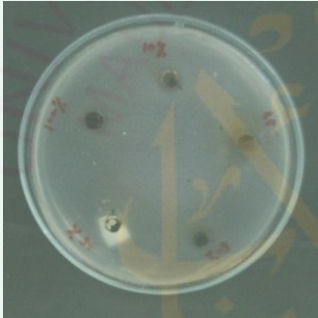
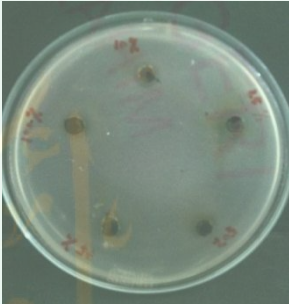
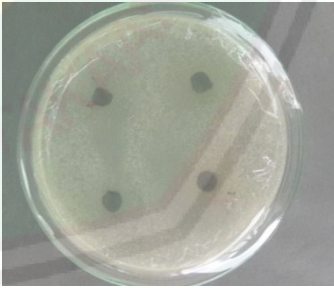
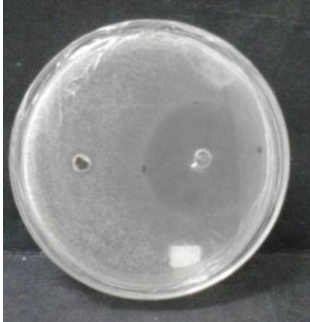
 Hasil pemisahan fase organik dan fase air	 Fraksi etil asetat ekstrak etanolik daun pepaya gunung
--	--

c. Uji Aktivitas Antibakteri secara In Vitro

 Pembuatan variasi konsentrasi fraksi etil asetat daun pepaya gunung	 Kontrol positif (ciprofloxacin 10µg/ml) dan kontrol negatif (DMSO)
 Media MHA dalam cawan steril	 Pembuatan sumuran pada media agar

 Proses memasukkan ekstrak ke dalam sumur	 Proses memasukkan antibiotik ke dalam sumur
---	---

d. Hasil Daerah Hambat Fraksi Etil Asetat Daun Pepaya Gunung terhadap *S. typhi*

 Konsentrasi 10%, 25%, dan 50% replikasi I	 Konsentrasi 10%, 25%, dan 50% replikasi II
 Konsentrasi 75%	 Konsentrasi 100%
 Kontrol negatif (DMSO) dan positif (ciprofloxacin)	



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
JURUSAN BIOLOGI
Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp./ Faks. (0341) 558933
Website: <http://biologi.uin-malang.ac.id> Email: biologi@uin-malang.ac.id

BUKTI KONSULTASI SKRIPSI

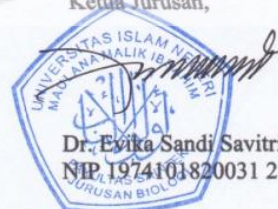
Nama : Ida Alfiah
NIM : 12620039
Program Studi : Biologi
Semester : IX TA.
Pembimbing : Dr. Retno Susilowati, M.Si
Judul Skripsi : Aktivitas Antibakteri Fraksi Ekstak Ekstrak Etanolik Daun Pepaya (*Carica pubescens*) terhadap Bakteri *Salmonella typhi*

No	Tanggal	Uraian Materi Konsultasi	Ttd. Pembimbing
1.	2 Januari 2016	Konsultasi Judul	✓
2.	11 Januari 2016	Latar Belakang	✓
3.	20 Januari 2016	Bab I	✓
4.	8 Februari 2016	Bab I dan II	✓
5.	16 Februari 2016	Bab III (Metode In Vitro & In Silico)	✓
6.	20 Februari 2016	Bab III Langkah kerja	✓
7.	27 Maret 2016	Bab I, II, III → Acc proposal	✓
8.	17 April 2016	Konsultasi hasil uraian proposal	✓
9.	29 Agustus 2016	Hasil uji In Vitro dan In Silico	✓
10.	1 September 2016	Bab IV	✓
11.	9 September 2016	Bab I, II, III, IV, V Abstrak	✓
12.	26 Oktober 2016	Revisi hasil uraian	✓
13.	04 Oktober 2016	Acc skripsi	✓

Pembimbing Skripsi,

Dr. Retno Susilowati, M.Si
NIP. 19671113 199402 2 001

Malang, 08 September 2016
Ketua Jurusan,



Dr. Evika Sandi Savitri, MP
NIP. 1974101820031 2 2002



Certificate No. IC08/1219

Keteladanan Spiritual, Keagamaan, Akhlak, Keluasan Ilmu, Komitmen Profesional



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
JURUSAN BIOLOGI
Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp./ Faks. (0341) 558933
Website: <http://biologi.uin-malang.ac.id> Email: biologi@uin-malang.ac.id

BUKTI KONSULTASI SKRIPSI

Nama : Ida Alfiah
NIM : 12620034
Program Studi : Biologi
Semester : IX TA.
Pembimbing : Umayyatus Syarifah, M.A.
Judul Skripsi : Aktivitas Antibakteri fraksi Ekst Asetat Ekstrak Etanolik Daun Pepaya gunung (*Carica pubescens*) terhadap Bakteri *Salmonella typhi*

No	Tanggal	Uraian Materi Konsultasi	Ttd. Pembimbing
	16 Januari 2016	Latar Belakang	/
	26 Januari 2016	Revisi Latar Belakang	/
	6 Februari 2016	Revisi Latar Belakang + BAB II	/
	10 Februari 2016	Revisi BAB II	/
	27 Maret 2016	Acc proposal	/
	30 Agustus '16	BAB IV	/
	9 September '16	Revisi BAB IV	/
	14 September '16	BAB I, II, IV	/
	15 September 2016	Acc skripsi sidang	/
	09 Oktober 2016	Revisi skripsi	/

Pembimbing Skripsi,

Umayyatus Syarifah, M.A.
NIP. 19820925 2005 01 2 005

Malang 20..

Ketua Jurusan,



Dr. Evika Sandi Savitri, MP
NIP. 1974101820031 2 2002



Certificate No. IC05/1218

Kedalaman Spiritual, Keagungan Akhlak, Keluasan Ilmu, Kematangan Profesional