

KK
KKA
TKD. 53/11
Sho
P

TESIS

PENELAAHAN AKTIFITAS ANTIMIKROBA EKSTRAK ETANOL BUAH DAN DAUN MAHKOTA DEWA (*PHALERIA MACROCARPA*) TERHADAP BAKTERI *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* MENGGUNAKAN CARA DILUSI AGAR DAN MIKROSKOPI ELEKTRON



MUHAMMAD ALI SHODIKIN

MILIK
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2009**

**PENELAAHAN AKTIFITAS ANTIMIKROBA
EKSTRAK ETANOL BUAH DAN DAUN MAHKOTA DEWA
(*PHALERIA MACROCARPA*) TERHADAP BAKTERI
PSEUDOMONAS AERUGINOSA MENGGUNAKAN CARA
DILUSI AGAR DAN MIKROSKOPI ELEKTRON**

TESIS

Untuk Memperoleh Gelar Magister
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar
pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga

Oleh:

**MUHAMMAD ALI SHODIKIN
NIM. 090710417 M**

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2009**

PENETAPAN PANITIA PENGUJI TESIS

Tesis telah diuji dan dinilai oleh panitia penguji pada
Program Pasca Sarjana Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya

Pada tanggal: 9 Juli 2009

Panitia Penguji Tesis:

Ketua : Lindawati Alimsardjono, dr, MKes, SpMK.

Anggota :

1. Kartuti Debora, dr, MS, SpMK.
2. Setio Harsono, dr, MS, SpMK.
3. Dr I Ketut Sudiana, Drs, MSi.
4. Dr Aty Widyawaruyanti, MSi, Apt.
5. Budiono, dr, MKes.

UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillahirobbil-'aalamiin, segala puji syukur bagi Allah SWT, atas nikmat serta karunia-Nya maka penelitian dan penyusunan tesis dapat diselesaikan dengan baik. Penulis dalam proses penelitian dan penyusunan tesis bekerjasama dan mendapatkan bantuan dari berbagai pihak, baik langsung maupun tidak langsung sehingga dapat menyelesaikan tesis ini. Penulis menyampaikan terima kasih, kepada Yth:

Prof Dr Fasichul Lisan, Apt., selaku Rektor Universitas Airlangga Surabaya, **Prof Dr Muhammad Amin, dr, SpP(K).**, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya, **Prof Dr Harjanto JM, dr, AIF.**, selaku Ketua Tim Koordinasi Program Studi Magister (TKPSM) Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya, **Prof Retno Handajani, dr, MS, PhD.**, selaku Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar (IKD) Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya, **Setyo Harsono, dr, MS, SpMK.**, selaku Ketua Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya, **Dr H Eddy Bagus Wasito, dr, MS, SpMK.**, selaku Ketua Minat Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya beserta semua dosen dan staf di Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Kartuti Debora, dr, MS, SpMK., selaku Pembimbing I dan **Setio Harsono, dr, MS, SpMK.**, selaku Pembimbing II yang telah dengan sabar meluangkan waktu dengan penuh perhatian membimbing, mengarahkan penelitian dan penyusunan tesis ini, semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan berkah dan karunia kepada beliau serta memberikan balasan dengan sebaik-baik balasan.

Tim penguji: **Lindawati Alimsardjono, dr, MKes, SpMK.**, **Dr I Ketut Suidiana, Drs, MSi.**, **Dr Aty Widyawaruyanti, MSi, Apt.**, dan **Budiono, dr, MKes.**, yang telah dengan teliti memberikan saran dan kritik yang membangun sehingga tesis ini menjadi baik.

Lilis Amd, di Laboratorium Mikrobiologi FK Universitas Jember, **Widi Amd**, di Laboratorium Biologi Fakultas Farmasi Universitas Jember, **Umiyah, Dra, MSc.agr.**, di Herbarium Jemberiense Jurusan Biologi FMIPA Universitas Jember, **Arnold Gitarisianto**, di Instalasi Mikrobiologi Klinik RS dr Soetomo / FK Unair Surabaya, dan **Endah Sujani, SSi.**, di UPT Mikroskop Elektron FK Unair Surabaya, yang telah banyak memberi bantuan teknis dalam pelaksanaan penelitian.

Maharini, dr., **Rahma Hanifa** dan **M. Aulia Hanif** yang selalu memberikan kesejukan, semangat, cinta dan doa dari rumah. Rekan-rekan seperjuangan yang menempuh pendidikan di minat Mikrobiologi Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar Program Magister Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, angkatan tahun 2007/2008: **Cherry Siregar, dr.**, (Medan), **Kuswiyanto, SSi** (Pontianak), **Sulistiastutik, Dra.**, (Malang), **Narwati, SSi.**, (Surabaya), **Ratna Wahyuni, SSi.**, (Surabaya) dan **Agrijanti, SPd.**, (Mataram), semoga segala bantuan dan kerjasamanya dibalas oleh Allah SWT, diberkahi kesuksesan dan kebahagiaan bersama keluarga yang telah setia menunggu. Amin.

Dan semua pihak yang telah membantu dan bekerjasama selama penelitian berlangsung, sehingga penyusunan tesis ini dapat selesai tepat waktu.

RINGKASAN

**PENELAAHAN AKTIFITAS ANTIMIKROBA
EKSTRAK ETANOL BUAH DAN DAUN MAHKOTA DEWA (*PHALERIA
MACROCARPA*) TERHADAP BAKTERI *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*
MENGUNAKAN CARA DILUSI AGAR DAN
MIKROSKOPI ELEKTRON**

Muhammad Ali Shodikin

Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri patogen oportunistik, menyebabkan penyakit pada manusia terutama jika sistem pertahanan tubuh menurun (Hill et al., 2007; Todar, 2008a). Bakteri ini merupakan salah satu bakteri penting penyebab infeksi nosokomial (Brooks et al., 2007) dan penyebab infeksi di berbagai organ tubuh manusia (Hill et al., 2007). *P.aeruginosa* mampu mengembangkan beberapa pola resistensi terhadap banyak antimikroba, terapi menjadi sulit dan sering gagal (Brooks et al., 2007) sehingga biaya untuk diagnosis dan terapi menjadi mahal. Obat antimikroba poten yang baru selain mahal juga memiliki beberapa efek samping, misalnya reaksi alergi (Forbes et al., 2002; Brooks et al., 2007), nefrotoksik dan neurotoksik (Hachem et al., 2007). Penelitian untuk mencari bahan antimikroba baru yang efektif, murah dan aman perlu dilakukan.

Tanaman mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*), merupakan tanaman asli Indonesia dari Papua, saat ini sudah bisa ditemukan di daerah lainnya. Buah dan daun mahkota dewa secara tradisional telah digunakan oleh masyarakat untuk terapi penyakit kulit, hati, kanker, kencing manis dan darah tinggi (Winarto, 2007). Penelitian penapisan fitokimia daging buah dan daun mahkota dewa menunjukkan adanya senyawa flavonoid, polifenol, saponin, tanin (Lisdawati, 2002; Purwantini, 2002; Guwito, 2003; Juita, 2004) yang diketahui memiliki aktifitas antimikroba (Joklik et al., 1988; Harborne et al., 1999; Arima et al., 2002; Geidam et al., 2007). Informasi tentang konsentrasi hambat minimal (KHM) suatu bahan alam terhadap bakteri penting untuk diketahui sebagai acuan dalam pengembangannya sebagai agen antimikroba. Belum ada penelitian aktifitas antimikroba buah dan daun mahkota dewa secara kuantitatif yang menentukan KHM terhadap bakteri *P.aeruginosa*. Sifat aktifitas antimikroba ekstrak etanol buah dan daun mahkota dewa terhadap sel bakteri *P.aeruginosa* juga belum diketahui apakah bakteristatik atau bakterisidal.

Tujuan penelitian adalah membuktikan adanya aktifitas antimikroba, menentukan KHM, mengetahui sifat aktifitas antimikroba dan membandingkan potensi antimikroba antara ekstrak etanol buah mahkota dewa dan ekstrak etanol daun mahkota dewa terhadap bakteri *P.aeruginosa*. Dilakukan tiga tahapan penelitian eksperimental laboratoris, yaitu: (1). Ekstraksi buah dan daun mahkota dewa secara maserasi menggunakan pelarut etanol 96%, (2). Uji antimikroba terhadap bakteri *P.aeruginosa* ATCC 27853 secara dilusi-agar untuk menentukan nilai KHM. Ekstrak etanol buah dan ekstrak etanol daun mahkota dewa dicampurkan ke dalam media Muller Hinton Agar, konsentrasi 5×10^4 µg/ml, 4×10^4 µg/ml, 3×10^4 µg/ml, 2×10^4 µg/ml, 1×10^4 µg/ml, dan 0 µg/ml. (3). Pengamatan menggunakan Mikroskop Elektron Skening (MES) untuk menentukan sifat aktifitas antimikroba apakah bakteristatik atau bakterisidal.

Ekstraksi mendapatkan hasil ekstrak etanol buah dan ekstrak etanol daun mahkota dewa pekat dengan rendemen 21,5 % dan 20,6 %. Uji antimikroba terhadap bakteri *P.aeruginosa* secara dilusi-agar mendapatkan ekstrak etanol buah mahkota dewa sampai konsentrasi 5×10^4 $\mu\text{g/ml}$ tidak memiliki aktifitas antimikroba, sehingga KHM-nya $> 5 \times 10^4$ $\mu\text{g/ml}$, sedangkan ekstrak etanol daun mahkota dewa memiliki aktifitas antimikroba dengan nilai KHM 4×10^4 $\mu\text{g/ml}$. Pemeriksaan mikroskop elektron skening menunjukkan aktifitas antimikroba ekstrak etanol daun mahkota dewa bersifat bakteristatik pada konsentrasi 4×10^4 $\mu\text{g/ml}$ dan bersifat bakterisidal pada konsentrasi mahkota dewa 8×10^4 $\mu\text{g/ml}$. Potensi antimikroba ekstrak etanol daun mahkota dewa lebih kuat daripada ekstrak etanol buah mahkota dewa terhadap bakteri *P.aeruginosa*. Meskipun demikian potensi antimikroba ekstrak etanol daun mahkota dewa sangat lemah terhadap bakteri *P.aeruginosa* sehingga tidak layak digunakan untuk terapi infeksi bakteri *P.aeruginosa*.

Meskipun aktifitas antimikroba ekstrak etanol daun mahkota dewa terhadap bakteri *P.aeruginosa* sangat lemah, perlu juga diteliti aktifitas antimikrobanya terhadap bakteri yang lain, serta perlu dilakukan penelitian lanjutan di bidang farmasi untuk pemurnian, identifikasi dan kuantifikasi senyawa aktif yang punya aktifitas antimikroba di dalam daun mahkota dewa serta mengetahui bagaimana mekanisme kerjanya.

SUMMARY

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ETHANOL EXTRACT OF MAHKOTA DEWA (*PHALERIA MACROCARPA*) FRUITS AND LEAVES AGAINST *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* BY AGAR DILUTION AND SCANNING ELECTRON MICROSCOPY

Muhammad Ali Shodikin

Pseudomonas aeruginosa is one of the important opportunistic pathogens that causing disease especially in immunocompromised human (Hill et al., 2007; Todar, 2008a). It is also one of the important bacterium that causing nosocomial infection (Brooks et al., 2007) and causing infection in various organs of human being (Hill et al., 2007). *Pseudomonas aeruginosa* able to develop some resistance pattern to some antimicrobial agents, hence therapy become difficult and often fail (Brooks et al., 2007) so that the cost of diagnosis and therapy become expensive. The new potent antimicrobials not only expensive but also own some side effects, for example allergic reaction (Forbes et al., 2002; Brooks et al., 2007), nephrotoxic and neurotoxic (Hachem et al., 2007). The research must be conducted to found new antimicrobial substance from natural product which cheap, effective and safe.

The *Phaleria Macrocarpa* is a plant that originally from Papua, Indonesia. The fruits and leaves of *Phaleria macrocarpa* traditionally had been used by Indonesian society for therapy of cancer, high blood pressure, diabetes mellitus, liver and skin diseases. Phytochemical screening of *Phaleria macrocarpa* fruits and leaves shown the existence of flavonoid, polyphenol, saponin, tannin compounds that known had antimicrobial activity. Minimum inhibitory concentration (MIC) of natural product substance was important to be known as reference in its development as antimicrobial agent. The nature of antimicrobial activity of extract ethanol of *Phaleria macrocarpa* fruits and leaves against *P.aeruginosa* yet been known whether bacteriostatic or bactericide.

The aims of this experimental laboratory research were determine the antimicrobial activity, the minimum inhibitory concentration (MIC), the nature of antimicrobial activity and also the antimicrobial potency comparison of ethanol extract of *Phaleria macrocarpa* fruits and leaves against *P.aeruginosa*. Three steps research had been conducted: (1). Ethanol extraction of *Phaleria macrocarpa* fruits and leaves by maceration, (2). Agar dilution antimicrobial testing against *P.aeruginosa* ATCC 27853. The Muller Hinton Agar contain extract by concentration: 5×10^4 $\mu\text{g/ml}$, 4×10^4 $\mu\text{g/ml}$, 3×10^4 $\mu\text{g/ml}$, 2×10^4 $\mu\text{g/ml}$, 1×10^4 $\mu\text{g/ml}$, and 0 $\mu\text{g/ml}$, (3). Scanning Electron Microscopy (SEM) observation.

The condensed ethanol extract was resulted from extraction of *Phaleria macrocarpa* fruits and leaves. In this work, we found the MIC of ethanol extract of *Phaleria macrocarpa* fruits and the MIC of ethanol extract of *Phaleria macrocarpa* leaves against *P.aeruginosa* were $> 5 \times 10^4$ $\mu\text{g/ml}$ and 4×10^4 $\mu\text{g/ml}$ respectively. SEM observation demonstrated the antimicrobial activity of ethanol extract of *Phaleria macrocarpa* leaves was bacteriostatic at 4×10^4 $\mu\text{g/ml}$ but bactericide at 8×10^4 $\mu\text{g/ml}$. The conclusion of this research is ethanol extract of *Phaleria macrocarpa* leaves has stronger antimicrobial activity against *P.aeruginosa* than ethanol extract of *Phaleria macrocarpa* fruits. However, ethanol extract of *Phaleria macrocarpa* leaves had low

antimicrobial activity against *P.aeruginosa*, so that improper to use it as therapeutic agent against *P.aeruginosa*.

Although the ethanol extract of *Phaleria macrocarpa* leaves had low antimicrobial activity against *P.aeruginosa*, further research is needed to explore its antimicrobial activity against another bacterium. On the other hands it is also require research in pharmacy area for purification, identification and quantification of compounds that have antimicrobial activity in *Phaleria macrocarpa* leaves and determine how its work mechanism.

ABSTRACT

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ETANOL EXTRACT OF MAHKOTA DEWA (*Phaleria macrocarpa*) FRUITS AND LEAVES AGAINST *Pseudomonas aeruginosa* BY AGAR DILUTION AND SCANNING ELECTRON MICROSCOPY**Muhammad Ali Shodikin**

Pseudomonas aeruginosa can develop some resistance patterns to some antimicrobial agents. The new potent antimicrobials not only expensive but also own some side effects. The research must be conducted to found new antimicrobial substance from natural product which cheap, effective and safe. Phytochemical screening of *Phaleria macrocarpa* fruits and leaves shown the existence of flavonoid, polyphenol, saponin, tannin compounds that known had antimicrobial activity. The aims of this experimental laboratory research were determine the antimicrobial activity, the minimum inhibitory concentration (MIC), the nature of antimicrobial activity, and also the antimicrobial potency comparison of ethanol extract of *Phaleria macrocarpa* fruits and leaves against *P.aeruginosa*. Three steps research were conducted: (1). Ethanol extraction of *Phaleria macrocarpa* fruits and leaves by maceration, (2). Agar dilution antimicrobial testing against *P.aeruginosa* ATCC 27853. The Muller Hinton Agar contain extract by concentration: 5×10^4 $\mu\text{g/ml}$, 4×10^4 $\mu\text{g/ml}$, 3×10^4 $\mu\text{g/ml}$, 2×10^4 $\mu\text{g/ml}$, 1×10^4 $\mu\text{g/ml}$, and 0 $\mu\text{g/ml}$, (3). Scanning Electron Microscopy (SEM) observation. The condensed ethanol extract was resulted from extraction of *Phaleria macrocarpa* fruits and leaves. In this work, we found the MIC of ethanol extract of *Phaleria macrocarpa* fruits and the MIC of ethanol extract of *Phaleria macrocarpa* leaves against *P.aeruginosa* were $> 5 \times 10^4$ $\mu\text{g/ml}$ and 4×10^4 $\mu\text{g/ml}$, respectively. SEM observation demonstrated the antimicrobial activity of ethanol extract of *Phaleria macrocarpa* leaves is bacteriostatic at 4×10^4 $\mu\text{g/ml}$ but bactericide at 8×10^4 $\mu\text{g/ml}$. The conclusion of this research is ethanol extract of *Phaleria macrocarpa* leaves has stronger antimicrobial activity against *P.aeruginosa* than ethanol extract of *Phaleria macrocarpa* fruits. However, ethanol extract of *Phaleria macrocarpa* leaves had low antimicrobial activity against *P.aeruginosa*, so that improper to use it as therapeutic agent against *P.aeruginosa*.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, *Phaleria macrocarpa*, Antimicrobial activity, MIC, SEM.

DAFTAR ISI

Sampul depan	i
Sampul dalam.....	ii
Prasyarat gelar.....	iii
Persetujuan.....	iv
Penetapan panitia penguji tesis	v
Ucapan terima kasih	vi
Ringkasan.....	vii
Summary.....	ix
Abstract.....	xi
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
DAFTAR SINGKATAN.....	xviii
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang Masalah.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.4 Manfaat Penelitian.....	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Mahkota Dewa.....	7
2.1.1 Taksonomi mahkota dewa.....	7
2.1.2 Lokasi geografi mahkota dewa.....	7
2.1.3 Morfologi mahkota dewa.....	8
2.1.4 Kandungan senyawa kimia mahkota dewa.....	9
2.1.5 Mekanisme kerja bahan antimikroba.....	14
2.2 Bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
2.2.1 Klasifikasi <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
2.2.2 Morfologi <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
2.2.3 Pertumbuhan <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
2.2.4 Penentu patogenesis <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20
2.2.5 Patogenesis penyakit infeksi <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
2.2.6 Manifestasi klinis infeksi <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24
2.2.7 Diagnosis laboratorium <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
2.2.8 Epidemiologi <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
2.2.9 Pencegahan infeksi <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	28
2.2.10 Terapi infeksi <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	29
2.2.11 Resistensi <i>Pseudomonas aeruginosa</i> terhadap antimikroba.....	30
BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	
3.1 Kerangka Konseptual.....	34
3.2 Hipotesis Penelitian.....	36
BAB 4 MATERI DAN METODE PENELITIAN	
4.1 Rancangan Penelitian.....	37
4.2 Sampel.....	38
4.3 Besar Pengulangan	38
4.4 Variabel Penelitian.....	38
4.4.1 Variabel bebas.....	38
4.4.2 Variabel tergantung.....	38

4.4.3 Variabel kendali.....	39
4.5 Definisi Operasional	39
4.6 Bahan Penelitian	39
4.6.1 Buah dan daun mahkota dewa.....	39
4.6.2 Bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40
4.6.3 Media perbenihan.....	40
4.6.4 Bahan pemeriksaan mikroskop elektron skening.....	40
4.7 Instrumen Penelitian.....	40
4.7.1 Instrumen ekstraksi buah dan daun mahkota dewa.....	40
4.7.2 Instrumen uji antimikroba	41
4.7.3 Instrumen pemeriksaan mikroskop elektron skening.....	41
4.8 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	41
4.8.1 Lokasi penelitian.....	41
4.8.2 Waktu penelitian.....	41
4.9 Prosedur Pengumpulan Data.....	41
4.9.1 Prosedur ekstraksi buah dan daun mahkota dewa	42
4.9.2 Prosedur uji antimikroba.....	44
4.9.3 Prosedur pemeriksaan mikroskop elektron skening.....	49
4.10 Analisis Data.....	53
BAB 5. HASIL DAN ANALISIS PENELITIAN	
5.1 Hasil Penelitian	54
5.1.1 Hasil ekstraksi buah dan daun mahkota dewa.....	54
5.1.2 Hasil uji antimikroba.....	54
5.1.3 Hasil pemeriksaan mikroskop elektron skening.....	59
5.2 Analisis Hasil Penelitian	64
5.2.1 Perbedaan potensi antimikroba ekstrak etanol buah mahkota dewa dan ekstrak etanol daun mahkota dewa terhadap bakteri <i>P.aeruginosa</i>	64
5.2.2 Perbedaan sifat aktifitas antimikroba ekstrak etanol buah mahkota dewa dan ekstrak etanol daun mahkota dewa terhadap bakteri <i>P.aeruginosa</i>	64
BAB 6 PEMBAHASAN.....	66
BAB 7 PENUTUP	
7.1 Kesimpulan	78
7.2 Saran.....	78
DAFTAR PUSTAKA.....	79

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	: Klasifikasi senyawa terpenoid.....	13
Tabel 2.2	: Sifat biokimia dan fisiologi bakteri spesies <i>Pseudomonas</i>	27
Tabel 5.1	: Bahan dan hasil ekstraksi.....	54
Tabel 5.2	: Hasil uji pendahuluan 1. Pertumbuhan <i>P.aeruginosa</i> (1×10^2 CFU) pada media MHA yang mengandung ekstrak etanol buah dan daun mahkota dewa	55
Tabel 5.3	: Hasil uji pendahuluan 2. Pertumbuhan <i>P.aeruginosa</i> (1×10^4 CFU) pada media MHA yang mengandung ekstrak etanol buah dan daun mahkota dewa.....	55
Tabel 5.4	: Kadar keasaman (pH) media MHA yang mengandung ekstrak etanol buah dan ekstrak etanol daun mahkota dewa berbagai konsentrasi.....	56
Tabel 5.5	: Pertumbuhan koloni bakteri <i>P.aeruginosa</i> pada media MHA yang mengandung ekstrak etanol buah mahkota dewa	57
Tabel 5.6	: Pertumbuhan koloni bakteri <i>P.aeruginosa</i> pada media MHA yang mengandung ekstrak etanol daun mahkota dewa	58
Tabel 5.7	: Konsentrasi hambat minimal (KHM) ekstrak etanol buah dan ekstrak etanol daun mahkota dewa terhadap bakteri <i>P.aeruginosa</i>	59

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	: Tanaman mahkota dewa.....	9
Gambar 2.2	: Struktur kimia phalerin	10
Gambar 2.3	: Struktur kimia senyawa saponin.....	10
Gambar 2.4	: Struktur kimia senyawa turunan flavonoid.....	12
Gambar 2.5	: Struktur kimia senyawa tanin.....	12
Gambar 2.6	: Struktur kimia senyawa triterpenoid.....	13
Gambar 2.7	: Bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
Gambar 2.8	: Hubungan antara kecepatan pembelahan (<i>doubling time</i>) dengan jumlah biomasa atau populasi bakteri.....	20
Gambar 2.9	: Struktur anatomi dan penentu patogenitas <i>P.aeruginosa</i>	21
Gambar 2.10	: Koloni bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
Gambar 2.11	: Struktur dinding sel bakteri Gram positif.....	31
Gambar 2.12	: Struktur dinding sel bakteri Gram negatif.....	31
Gambar 2.13	: Skema struktur dan fungsi pompa efluks bakteri <i>P.aeruginosa</i>	32
Gambar 3.1	: Skema kerangka konseptual.....	35
Gambar 4.1	: Skema rancangan penelitian.....	37
Gambar 4.2	: Buah mahkota dewa yang sudah tua berwarna merah (kiri) dan daun mahkota dewa berwarna hijau tua (kanan).....	40
Gambar 4.3	: Tahapan pengumpulan data penelitian.....	42
Gambar 4.4	: Alur prosedur ekstraksi buah dan daun mahkota dewa.....	43
Gambar 4.5	: Skema pengenceran konsentrasi ekstrak etanol buah mahkota dewa dalam media MHA hangat.....	45
Gambar 4.6	: Skema pengenceran konsentrasi ekstrak etanol daun mahkota dewa dalam media MHA hangat.....	46
Gambar 4.7	: Alur prosedur uji antimikroba ekstrak etanol buah dan daun mahkota dewa terhadap bakteri <i>P.aeruginosa</i>	48
Gambar 4.8	: Alur prosedur pemeriksaan mikroskop elektron skening (MES).....	52
Gambar 5.1	: Grafik kadar keasaman (pH) media MHA yang mengandung ekstrak etanol buah dan ekstrak etanol daun mahkota dewa	56
Gambar 5.2	: Hasil uji antimikroba ekstrak etanol buah mahkota dewa terhadap bakteri <i>P.aeruginosa</i>	57
Gambar 5.3	: Hasil uji antimikroba ekstrak etanol daun mahkota dewa terhadap bakteri <i>P.aeruginosa</i>	58
Gambar 5.4	: Hasil uji sterilitas media MHC dari tabung A, B, C dan D pada media agar darah.....	60
Gambar 5.5	: Hasil inkubasi tabung A, B dan C keruh, tabung D tidak keruh.....	60
Gambar 5.6	: Mikrograf elektron skening bakteri <i>P.aeruginosa</i> yang tidak dipapar dengan ekstrak etanol daun mahkota dewa / konsentrasi 0 µg/ml (kontrol).....	62
Gambar 5.7	: Mikrograf elektron skening bakteri <i>P.aeruginosa</i> yang dipapar dengan ekstrak etanol daun mahkota dewa konsentrasi 2×10^4 µg/ml, (1/2 x KHM).....	62
Gambar 5.8	: Mikrograf elektronik skening bakteri <i>P.aeruginosa</i> yang	

	dipapar dengan ekstrak etanol daun mahkota dewa konsentrasi 4×10^4 $\mu\text{g/ml}$, (KHM).....	63
Gambar 5.9	: Mikrograf elektron skening bakteri <i>P.aeruginosa</i> yang dipapar dengan ekstrak etanol daun mahkota dewa konsentrasi 8×10^4 $\mu\text{g/ml}$, (2 x KHM).....	63

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	: Jadwal kegiatan penelitian.....	84
Lampiran 2	: Rincian biaya penelitian.....	85
Lampiran 3	: Hasil uji biokimia bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	86
Lampiran 4	: Surat keterangan identifikasi tanaman mahkota dewa.....	87
Lampiran 5	: Bahan dan alat penelitian.....	88

DAFTAR SINGKATAN

ATCC	: American Type Culture Colection
CFU	: Colony Forming Unit
IV	: Intra Vena
KHM	: Konsentrasi Hambat Minimal
MD	: Mahkota Dewa
MDR	: Multiple Drug Resistant
MES	: Mikroskop Elektron Skening
MET	: Mikroskop Elektron Transmisi
MHA	: Muller Hinton Agar
MHC	: Muller Hinton Cair
<i>P.aeruginosa</i>	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
w/v	: weight/volume

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeruginosa*) merupakan bakteri patogen, bersifat oportunistik, menyebabkan penyakit pada manusia terutama jika sistem pertahanan tubuh menurun (*immunocompromised*), misalnya pada penderita kanker dan penderita luka bakar (Hill et al., 2007; Todar, 2008a). Bakteri ini merupakan patogen utama di saluran pernapasan penderita *cystic fibrosis* (Merlo et al., 2007) dan pasien di unit perawatan intensif dengan alat bantu napas mekanik (*respirator*). Selain itu bakteri *P.aeruginosa* dapat menyebabkan infeksi saluran kemih, otitis, keratitis, pneumonia, osteomyelitis, endokarditis, meningitis dan bakteremia (Hill et al., 2007).

Bakteri *P.aeruginosa* juga merupakan salah satu bakteri penting penyebab infeksi yang terjadi di rumah sakit / infeksi nosokomial (Brooks et al., 2007). Sekitar 10-20% infeksi nosokomial disebabkan oleh *P.aeruginosa* (Joklik et al., 1988). Pada penelitian di RS dr. Soetomo Surabaya, bakteri *P.aeruginosa* adalah penyebab pneumonia terbanyak (48,78%) pada pasien HIV/AIDS yang dirawat di unit perawatan intensif (Palilingan, 2007). Sedangkan penelitian di unit luka bakar RS dr. Cipto Mangunkusumo Jakarta, dari 49 pasien luka bakar pada hari ke 1, 5 dan 10 perawatan, berturut-turut teridentifikasi bakteri *P.aeruginosa* pada 10,2%, 32,7%, dan 28,6% pasien, merupakan bakteri peringkat ketiga penyebab infeksi nosokomial pada pasien luka bakar yang menyebabkan kematian pasien (Sudarmono et al., 2007).

Infeksi bakteri *P.aeruginosa* secara klinis dapat meningkatkan morbiditas dan mortalitas karena bersifat invasif dan toksigenik (Todar, 2008a). Bakteri ini mampu mengembangkan beberapa pola resistensi terhadap banyak antimikroba (*Multiple*

Drug Resistant / MDR). Resistensi bakteri *P.aeruginosa* terhadap banyak antimikroba selain menyebabkan terapi menjadi sulit dan sering gagal (Brooks et al., 2007), juga menyebabkan biaya untuk diagnosis dan terapi menjadi mahal. Obat antimikroba poten yang baru selain mahal juga memiliki beberapa efek samping, misalnya reaksi alergi (Forbes et al., 2002; Brooks et al., 2007), nefrotoksik dan neurotoksik (Hachem et al., 2007). Penelitian terhadap bahan antimikroba baru yang efektif, murah dan aman perlu dilakukan.

Tanaman mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) yang berupa tanaman perdu, merupakan tanaman asli Indonesia berasal dari Papua, namun saat ini sudah bisa ditemukan di beberapa daerah lainnya. Buah dan daun mahkota dewa secara tradisional telah digunakan oleh masyarakat untuk terapi penyakit kulit, hati, kanker, kencing manis dan darah tinggi (Winarto, 2007).

Beberapa penelitian terhadap buah dan daun mahkota dewa telah dilakukan. Uji toksisitas akut rebusan daging buah mahkota dewa secara oral pada tikus putih menghasilkan harga letal dose (LD_{50}) lebih besar dari 44,226 g / kg BB (Reneti, 2001). Sementara itu uji toksisitas akut pada mencit menunjukkan harga LD_{50} infus buah mahkota dewa adalah 67,32 mg / 10 g BB mencit dan LD_{50} ekstrak etanol 70% buah mahkota dewa adalah 38,14 mg / 10 g BB mencit, kedua nilai tersebut menurut batasan dari Gleason masih dalam kategori *Practically Non Toxic*, yang berarti buah mahkota dewa bersifat tidak toksik dan masih aman digunakan (Widowati, 2005).

Penelitian penapisan fitokimia daging buah mahkota dewa menunjukkan adanya senyawa flavonoid, polifenol, saponin, tanin, alkaloid, steroid, terpenoid (Lisdawati, 2002; Purwantini, 2002; Guwito, 2003). Penelitian Oshimi mendapatkan phalerin, mangiferin dan icariside C3 pada buah mahkota dewa (Oshimi et al., 2008). Hasil

penapisan fitokimia daun mahkota dewa menunjukkan adanya senyawa flavonoid, polifenol, saponin, tanin, steroid (Juita, 2004).

Saponin memiliki aktifitas antimikroba dan antifungal (Harborne et al., 1999) serta antiprotozoa melalui interaksi dengan kolesterol membran sel sehingga terjadi lisis sel (Cheeke, 1999). Polifenol yang terdapat dalam tanaman merupakan suatu golongan senyawa kimia yang dapat diidentifikasi dengan adanya lebih dari satu gugusan fenol. Senyawa fenol diketahui mempunyai aktifitas antimikroba dengan cara merusak membran sitoplasma bakteri (Joklik et al., 1988), menonaktifkan enzim dan mendenaturasikan protein (Tortora et al., 1995), sehingga menimbulkan kebocoran dan lisis sel bakteri.

Beberapa senyawa flavonoid secara farmakologi bermanfaat sebagai antimikroba, antiinflamasi dan antihepatotoksik (Harborne et al., 1999) serta sebagai antioksidan (Arung et al., 2009). Aktifitas antimikroba beberapa senyawa flavonoid mekanismenya adalah menghambat sintesis DNA bakteri (Arima et al., 2002). Sedangkan senyawa tanin mampu menghambat proliferasi sel bakteri dengan cara menghambat enzim kunci metabolisme sel bakteri (Geidam et al., 2007).

Berdasarkan kandungan senyawa kimia di atas diduga buah dan daun mahkota dewa punya aktifitas antimikroba. Beberapa penelitian telah dilakukan untuk membuktikan adanya aktifitas antimikroba mahkota dewa terhadap beberapa spesies bakteri. Perasan daun mahkota dewa terbukti *in vitro* secara difusi memiliki aktifitas antimikroba terhadap bakteri *Streptococcus mutans* (Wahyuni, 2007). Hasil pengujian aktivitas antimikroba ekstrak metanol daun mahkota dewa menunjukkan adanya aktivitas antibakteri terhadap bakteri *P.aeruginosa* (Juita, 2004). Sedangkan aktifitas antimikroba ekstrak etanol buah dan ekstrak etanol daun mahkota dewa terhadap bakteri *P.aeruginosa* belum diketahui.

Adanya aktifitas antimikroba terhadap bakteri tertentu secara kuantitatif dinyatakan sebagai konsentrasi hambat minimal (KHM) / *Minimum Inhibitory Concentration (MIC)*, yaitu konsentrasi terendah (dalam satuan berat/volume atau w/v) suatu bahan yang dapat menghambat pertumbuhan suatu bakteri tertentu. Informasi tentang KHM suatu bahan alam terhadap bakteri penting untuk diketahui sebagai acuan dalam pengembangannya sebagai agen antimikroba. Suatu ekstrak bahan alam dinyatakan potensial sebagai agen antimikroba bila memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri dengan KHM 10 – 500 µg/ml (Nascimento et al., 2000). Belum ada penelitian aktifitas antimikroba ekstrak etanol buah dan daun mahkota dewa secara kuantitatif yang menentukan KHM terhadap bakteri *P.aeruginosa*.

Aktifitas antimikroba ekstrak etanol buah dan daun mahkota dewa terhadap sel bakteri *P.aeruginosa* juga belum diketahui apakah bersifat bakteristatik atau bakterisidal. Aktifitas antimikroba yang bersifat bakteristatik hanya mampu menghambat pembelahan atau pertumbuhan sel bakteri tanpa menyebabkan kerusakan morfologi maupun lisis sel bakteri. Bila paparan antimikroba yang bersifat bakteristatik dihilangkan maka bakteri akan dapat membelah atau tumbuh kembali. Sedangkan aktifitas antimikroba yang bersifat bakterisidal menyebabkan kerusakan morfologi dan kematian / lisis sel bakteri. Jika paparan antimikroba yang bersifat bakterisidal dihilangkan maka bakteri tidak bisa tumbuh kembali (Boyd, 1995). Untuk melihat aktifitas antimikroba apakah bersifat bakteristatik atau bakterisidal dapat dilakukan dengan menggunakan Mikroskop Elektron Skening (MES) dengan memperhatikan morfologi sel bakteri, pembelahan sel bakteri dan jumlah sel bakteri.

Oleh karena itulah perlu dilakukan penelitian uji antimikroba *invitro* untuk menentukan KHM secara kuantitatif dari ekstrak etanol buah dan ekstrak etanol daun

mahkota dewa terhadap bakteri *P.aeruginosa*, lalu dilanjutkan dengan pemeriksaan sel bakteri menggunakan MES untuk mengetahui terjadinya efek bakteristatik atau bakterisidal. Hasil yang didapat dari uji antimikroba secara dilusi agar dan pemeriksaan menggunakan MES kemudian digunakan untuk perbandingan potensi aktifitas antimikroba antara ekstrak etanol buah dan ekstrak etanol daun mahkota dewa terhadap bakteri *P.aeruginosa*.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah penelitian ini adalah:

1. Apakah ekstrak etanol buah dan ekstrak etanol daun mahkota dewa memiliki aktifitas antimikroba terhadap bakteri *P.aeruginosa*?
2. Berapakah konsentrasi hambat minimal (KHM) ekstrak etanol buah mahkota dewa dan ekstrak etanol daun mahkota dewa terhadap bakteri *P.aeruginosa*?
3. Apakah aktifitas antimikroba dari ekstrak etanol buah mahkota dewa dan ekstrak etanol daun mahkota dewa bersifat bakteristatik atau bakterisidal?
4. Apakah potensi aktifitas antimikroba terhadap bakteri *P.aeruginosa* dari ekstrak etanol buah mahkota dewa berbeda dengan ekstrak etanol daun mahkota dewa?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Tujuan umum penelitian adalah membuktikan adanya aktifitas antimikroba ekstrak etanol buah mahkota dewa dan ekstrak etanol daun mahkota dewa terhadap bakteri *P.aeruginosa*.

1.3.2 Tujuan khusus

Tujuan khusus penelitian adalah:

1. Menentukan KHM ekstrak etanol buah mahkota dewa dan KHM ekstrak etanol daun mahkota dewa terhadap bakteri *P.aeruginosa*.

2. Mengetahui sifat aktifitas antimikroba ekstrak etanol buah mahkota dewa dan ekstrak etanol daun mahkota dewa terhadap sel bakteri *P.aeruginosa*.
3. Membedakan potensi aktifitas antimikroba ekstrak etanol buah mahkota dewa dengan ekstrak etanol daun mahkota dewa terhadap bakteri *P.aeruginosa*.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat teoritis

Menghasilkan informasi ilmiah tentang potensi aktifitas antimikroba ekstrak etanol buah dan ekstrak etanol daun mahkota dewa terhadap bakteri *P.aeruginosa* serta sifat aktifitas antimikrobanya.

1.4.2 Manfaat praktis

Informasi tentang potensi aktifitas antimikroba ekstrak etanol buah dan ekstrak etanol daun mahkota dewa, serta sifat aktifitas antimikrobanya terhadap sel bakteri *P.aeruginosa* dapat digunakan sebagai dasar penelitian *invivo* dan pengembangan ekstrak etanol buah dan daun mahkota dewa sebagai antimikroba untuk terapi infeksi bakteri *P.aeruginosa*.

BAB 2**TINJAUAN PUSTAKA****2.1 Mahkota Dewa****2.1.1 Taksonomi mahkota dewa**

Tanaman mahkota dewa memiliki nama daerah Makuto dewo / Makuto ratu (Jawa) atau Simalakama (Sumatra / Melayu). Mahkota dewa secara taksonomi diklasifikasikan sebagai berikut (Winarto, 2007):

Divisi	: Spermaphyta
Subdivisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Ordo	: Thymelaeales
Famili	: Thymelaeaceae
Genus	: Phaleria
Spesies	: <i>Phaleria macrocarpa</i> (Scheff.) Boerl.

2.1.2 Lokasi geografi mahkota dewa

Tanaman mahkota dewa berasal dari Papua, tumbuh liar di hutan, pada ketinggian 10 - 1200 meter di atas permukaan laut dengan curah hujan 1000 - 2500 mm/tahun. Tanaman ini sekarang bisa ditemukan di berbagai daerah. Masyarakat menanam mahkota dewa di sekitar rumah, selain digunakan sebagai obat tradisional juga sebagai tanaman hias karena buahnya yang berwarna merah (Winarto, 2007).

Mahkota dewa yang digunakan pada penelitian ini berasal dari Kabupaten Jember. Secara geografis Kabupaten Jember terletak pada koordinat 113°30' - 113°45' BT dan 8°00' - 8°30' LS dengan ketinggian 83 m di atas permukaan laut. Permukaan tanah bergelombang dan sebagian besar merupakan wilayah perbukitan.

Dataran wilayahnya banyak dibentuk oleh tanah jenis *litosol* dan *regosol* coklat kekuningan. Kondisi ini menentukan tingkat kesuburan dan kedalaman efektif tanah, tingkat kesuburan berkisar di atas 90 cm. Daerah ini beriklim tropis, temperatur berkisar 23°C - 31°C, musim kemarau terjadi pada Mei - Agustus dan musim hujan terjadi pada September - Januari, curah hujan berkisar 1969 - 3394 mm / tahun (Anonim, 2003).

2.1.3 Morfologi mahkota dewa

Mahkota dewa merupakan tanaman perdu yang dapat tumbuh dan berbuah sepanjang tahun. Ketinggiannya 1 - 2,5 meter, bahkan dapat mencapai 6 meter bila tanpa pemangkasan. Tanaman mahkota dewa memiliki akar, batang, daun, bunga dan buah. Akar mahkota dewa termasuk akar tunggang, penyebaran akar ke arah samping sesuai ukuran panjang keliling lingkaran tajuk daun. Batang permukaannya kasar, berbentuk bulat dengan percabangan simpodial, berwarna coklat kehijauan, kayu berwarna putih dan kulitnya bergetah (Winarto, 2007).

Daun mahkota dewa adalah daun tunggal, saling berhadapan, tangkai bulat, berwarna hijau, permukaan licin, tidak berbulu, panjang 7 - 10 cm, lebar 2 - 5 cm, ujung dan pangkal daun runcing, serta pertulangan daunnya menyirip. Bunga mahkota dewa berwarna putih, berbau harum, berukuran kecil mirip dengan bunga cengkih, tergolong bunga majemuk, tersusun dalam kelompok 2 - 4 bunga dan muncul di sekitar batang atau ketiak daun. Bunga dapat muncul sepanjang tahun tidak mengenal musim, namun biasanya paling banyak pada musim penghujan (Winarto, 2007).

Buah mahkota dewa terdiri dari kulit, daging, cangkang dan biji. Buah saat masih muda berwarna hijau kemudian berubah warna menjadi merah saat sudah tua. Ukuran buah diameternya antara 3 - 5 cm. Daging buah berwarna putih, berserat

dengan ketebalan yang bervariasi. Secara tradisional buah merupakan bagian tanaman mahkota dewa yang sering dimanfaatkan untuk pengobatan.

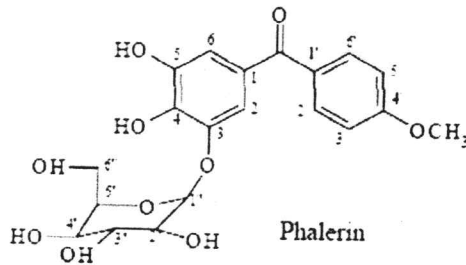
Biji mahkota dewa terbungkus cangkang, bentuk lonjong, diameter sekitar 1 cm, bagian dalam biji berwarna putih. Biji merupakan bagian tanaman yang paling beracun, bila tergigit lidah akan terasa terbakar, kaku dan mati rasa (Winarto, 2007). Penelitian ekstrak etanol biji mahkota dewa menunjukkan aktivitas sitotoksik dan menghambat proliferasi sel kanker payudara T47D (Bakhriansyah, 2004).



Gambar 2.1 Tanaman mahkota dewa

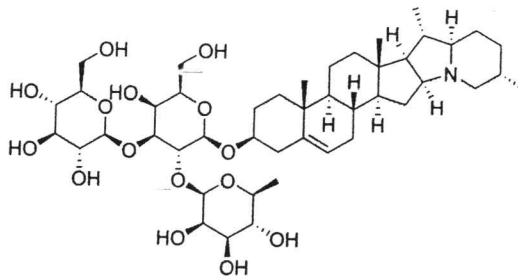
2.1.4 Kandungan senyawa kimia mahkota dewa

Buah mahkota dewa mengandung senyawa kimia golongan flavonoid, polifenol, saponin, tanin, alkaloid, steroid, terpenoid (Lisdawati, 2002; Purwantini, 2002; Guwito, 2003), sedangkan pada daunnya terdapat senyawa saponin, polifenol, flavonoid, tanin dan steroid (Juita, 2004). Penelitian Oshimi mendapatkan phalerin, mangiferin dan icariside C3 pada buah mahkota dewa (Oshimi et al., 2008). Icariside C3 mempunyai aktifitas vasorelaksan pada pembuluh darah aorta tikus yang mendapat induksi nor adrenalin. Dari ekstrak metanol daun juga didapatkan senyawa phalerin (Hartati dkk, 2005).



Gambar 2.2 Struktur kimia phalerin (Hartati dkk, 2005).

Senyawa saponin yang terkandung dalam buah dan daun mahkota dewa merupakan senyawa surfaktan alami yang berpotensi mempunyai aktifitas antimikroba dengan cara melisiskan membran sitoplasma sel bakteri. Saponin merupakan kelompok glikosida yang mengandung gugusan gula larut air terutama glukosa, galaktosa, xylosa, rhamnosa atau metil pentosa yang berikatan dengan suatu aglikon hidrofobik berupa steroid (C_{27}) (sapogenin) atau triterpenoid (C_{30}) (Harborne et al., 1999).



Gambar 2.3 Struktur kimia senyawa saponin.

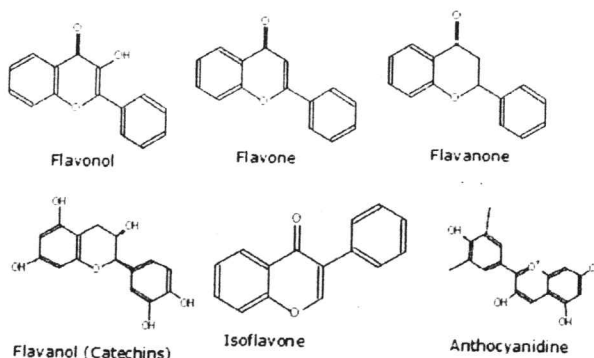
Struktur saponin sangat kompleks terjadi karena banyak variasi pada struktur aglikon, sifat dasar rantai dan posisi penempelan gugus gula pada aglikon. Saponin steroid memiliki kemiripan dengan saponin triterpenoid dalam struktur, biogenesis dan aktifitas biologisnya. Senyawa saponin ditemukan pada hampir semua bagian tanaman, pada beberapa tanaman terkonsentrasi pada akar, biji dan daun. Saponin mirip dengan sabun dapat membentuk busa bila dilarutkan dengan air dan memiliki

kemampuan untuk menurunkan tegangan permukaan (Harborne et al., 1999). Saponin tidak toksik terhadap manusia maupun binatang berdarah panas, namun bersifat toksik terhadap serangga, ikan dan siput. Selain itu saponin juga memiliki aktifitas antifungal dan antimikroba (Harborne et al., 1999) serta antiprotozoa melalui interaksi dengan kolesterol membran sel sehingga terjadi lisis sel protozoa (Cheeke, 1999).

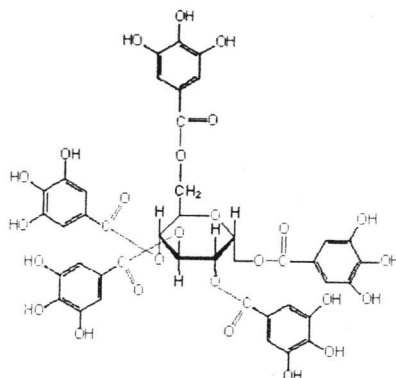
Polifenol yang terdapat dalam buah dan daun mahkota dewa merupakan suatu golongan senyawa kimia yang dapat diidentifikasi dengan adanya lebih dari satu gugusan senyawa fenol. Polifenol atau senyawa fenolik merupakan bahan tanaman yang secara umum memiliki cincin aromatik dengan satu atau lebih gugus hidroksil. Senyawa fenolik umumnya larut air, secara alami dapat berkombinasi dengan gula dalam bentuk glikosida, beberapa polimer penting dalam tanaman juga merupakan senyawa fenolik, misalnya lignan, melanin dan tanin (Harborne et al, 1999). Senyawa fenolik diklasifikasikan berdasarkan kompleksitas struktur dan asal biosintesisnya. Klasifikasi senyawa fenolik secara sederhana terdiri dari fenol, asam fenolik dan keton fenolik (Harborne et al., 1999). Fenol telah diketahui mempunyai efek antimikroba dengan cara merusak membran sitoplasma sel bakteri (Joklik et al., 1988), menonaktifkan enzim dan mendenaturasikan protein (Tortora et al., 1995), sehingga menimbulkan kebocoran dan lisis sel bakteri.

Ada sekitar 8000 senyawa fenolik di alam, sekitar setengahnya merupakan senyawa flavonoid (Harborne et al., 1999). Beberapa senyawa flavonoid secara farmakologi bermanfaat sebagai antimikroba, antiinflamasi dan antihepatotoksik (Harborne et al., 1999) serta sebagai antioksidan (Arung et al., 2009). Senyawa flavonoid tanaman berdasarkan afinitas pengikatan terhadap protein dikelompokkan menjadi lima (Harborne et al., 1999), yaitu: anthocyanin yang merupakan pigmen bunga yang berwarna merah-biru dan antochlor pigmen bunga yang berwarna kuning;

flavonoid minor yang meliputi flavanon, dihidroflavanol dan dihidrochalcon; flavon dan flavonol; isoflavonoid; serta tanin (Harborne et al., 1999).



Gambar 2.4 Struktur kimia senyawa turunan Flavonoid (Lakhanpal dan Rai, 2007).



Gambar 2.5 Struktur kimia senyawa tanin (Sengbusch, 2009).

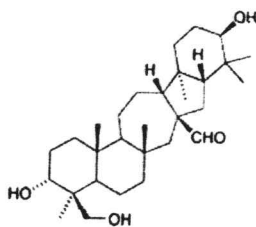
Tanin dapat berfungsi sebagai astringen yang mempercepat penyembuhan luka, selain itu tanin juga mampu menghambat proliferasi sel bakteri dengan cara menghambat enzim kunci metabolisme sel bakteri (Geidam et al., 2007).

Terpenoid merupakan komponen utama penyusun minyak atsiri yang kerangka senyawanya tersusun atas atom karbon dengan jumlah kelipatan lima. Sebagian besar terpenoid dibangun oleh dua atau lebih unit C_5 (isopren), unit-unit isopren tersebut saling berkaitan secara teratur (Kristanti dkk., 2008). Dari berbagai sumber tanaman telah diketahui lebih dari 20.000 struktur senyawa terpenoid (Harborne et al., 1999).

Berdasarkan jumlah atom karbon penyusunnya senyawa terpenoid diklasifikasikan seperti pada tabel berikut:

Tabel 2.1 Klasifikasi senyawa terpenoid (Kristanti dkk, 2008).

Kelompok Terpenoid	Jumlah atom C
Monoterpen	10
Seskuiterpen	15
Diterpen	20
Triterpen	30
Tetraterpen	40
Politerpen	> 40



Gambar 2.6 Struktur kimia senyawa triterpenoid (Connolly dan Hill, 2007).

Steroid merupakan kelompok senyawa yang sebagian besar strukturnya terdiri 17 atom karbon yang membentuk struktur dasar 1,2-siklopentanoperhidrofenantren. Pengelompokan senyawa steroid berdasarkan efek fisiologis yang ditimbulkannya. Perbedaan berbagai senyawa steroid ditentukan oleh panjang rantai karbon substituen, gugus fungsi pada substituen, jumlah maupun posisi gugus oksigen, ikatan rangkap pada kerangka rantai dasar dan konfigurasi pusat asimetris pada kerangka dasarnya (Kristanti dkk., 2008). Salah satu kelompok steroid adalah senyawa saponin, bila berikatan dengan gula menjadi senyawa glikosida yang dikenal sebagai saponin.

Bioaktivitas buah dan daun mahkota dewa yang telah diteliti antara lain adalah:

- Aktifitas antioksidan.

Pada tikus yang diinduksi CCl_4 , infus buah mahkota dewa dapat meningkatkan kadar *Superoksid Dismutase (SGD)* pada dosis 3,402 g / 200 g BB dan menurunkan kadar *Malondialdehid (MDA)* pada dosis 1,134 g / 200 g BB dan

3,402 g / 200 g BB. Perlakuan pemberian infus buah selama 8 hari berturut-turut (Handayani, 2003).

- Aktifitas sitotoksik.

Uji terhadap sel HeLa (sel kanker rahim), ekstrak air buah mahkota dewa mempunyai potensi penghambatan IC_{50} sebesar 196,74 mg / ml dan IC_{50} daunnya adalah 812,45 mg / ml, sehingga potensi penghambatan oleh ekstrak buah mahkota dewa lebih besar > 4 kali daripada daunnya (Sumastuti dan Solinmar, 2002). Dari ekstrak metanol daun mahkota dewa dapat diisolasi senyawa glikosida benzofenon (*Phalerin*) yang bersifat sitotoksik terhadap sel myeloma secara invitro (Hartati et al., 2005).

- Aktifitas antimikroba.

Perasan daun mahkota dewa terbukti *in vitro* secara difusi agar memiliki aktifitas antimikroba terhadap bakteri *Streptococcus mutans* (Wahyuni, 2007). Hasil pengujian daun mahkota dewa menunjukkan bahwa ekstrak metanol, fraksi metilen klorida, fraksi etil asetat mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *P.aeruginosa*, konsentrasi hambat minimalnya antara 25 - 12,5 % dan terhadap *B.cereus*, konsentrasi hambat minimalnya 0,40 - 0,20 % (Juita, 2004).

2.1.5 Mekanisme kerja bahan antimikroba

Aktifitas bahan antimikroba dapat bersifat mematikan / melisiskan bakteri (bakterisidal) atau hanya bersifat menghambat pertumbuhan bakteri (bakteriostatik). Antimikroba yang bersifat bakterisidal dapat segera membunuh bakteri, sangat diperlukan dalam keadaan terinfeksi bakteri yang mengancam jiwa. Sedangkan antimikroba yang bersifat bakteriostatik tidak dapat segera membunuh bakteri, hanya

menghambat pertumbuhan bakteri sehingga memberi kesempatan kepada tubuh untuk membentuk respon imun yang kemudian akan mematikan bakteri (Boyd, 1995).

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antimikroba dikelompokkan menjadi 5 golongan, yaitu : (1). Antimikroba yang mengganggu metabolisme sel bakteri; (2). Antimikroba yang menghambat sintesis dinding sel bakteri; (3). Antimikroba yang mengganggu keutuhan dan fungsi membran sitoplasma sel bakteri; (4). Antimikroba yang menghambat sintesis protein sel bakteri; dan (5). Antimikroba yang menghambat sintesis asam nukleat sel bakteri (Setiabudi dan Gan, 1995; Boyd, 1995).

Antimikroba yang mengganggu metabolisme sel bakteri.

Antimikroba golongan ini disebut juga sebagai antimetabolit, yaitu suatu senyawa yang strukturnya mirip dengan senyawa metabolit yang diperlukan sel bakteri tetapi berbeda fungsinya dan menjadi pesaing terhadap senyawa metabolit dalam melekat ke permukaan enzim, sehingga akan mengganggu metabolisme sel bakteri. Dengan cara menghambat metabolisme akan terjadi efek bakteristatik. Antimikroba yang masuk dalam golongan ini adalah Sulfonamid, Trimetoprim, Asam Para Amino Salisilat (PAS) dan Sulfon. Bakteri memerlukan asam folat yang harus disintesis sendiri dari asam para amino benzoat (*Para Amino Benzoic Acid / PABA*). Apabila Sulfonamid atau Sulfon menang bersaing dengan PABA dalam pembentukan asam folat maka akan terbentuk analog asam folat yang non fungsional, sehingga akan mengganggu metabolisme sel bakteri (Setiabudi dan Gan, 1995; Boyd, 1995).

Antimikroba yang menghambat sintesis dinding sel bakteri.

Antimikroba golongan ini terutama bekerja dengan cara menghambat sintesis peptidoglikan, salah satu komponen lapisan dinding sel bakteri. Peptidoglikan merupakan suatu kompleks polimer mukopeptida (glikopeptida). Antimikroba yang termasuk dalam golongan ini adalah Sikloserin, Penicilin, Basitracin, Vankomicin,

Carbapenem dan Cephalosporin. Sikloserin menghambat reaksi paling dini dalam sintesis peptidoglikan; diikuti oleh Bacitrasin, Vankomicin dan diakhiri oleh Penicilin dan Cephalosporin yang menghambat reaksi terakhir (*transpeptidase*) dalam rangkaian sintesis peptidoglikan. Gagalnya pembentukan peptidoglikan menyebabkan kerusakan dinding sel bakteri, kemudian akibat tekanan osmotik di dalam sel bakteri yang lebih besar daripada di luar sel akan terjadi lisis sel bakteri, sehingga terjadi efek bakterisidal (Setiabudi dan Gan, 1995; Boyd, 1995).

Antimikroba yang mengganggu keutuhan dan fungsi membran sel bakteri.

Antimikroba yang termasuk dalam kelompok ini adalah Polymyxin, golongan Polien dan antiseptik yang mengubah tegangan permukaan (*surface active agents*). Polymyxin sebagai senyawa amonium kuartener dapat merusak membran sel bakteri dengan cara bereaksi dengan fosfat pada fosfolipid membran sel bakteri. Antimikroba golongan Polien bereaksi dengan gugusan sterol yang terdapat pada membran fungi, sehingga mempengaruhi permeabilitas selektif membran tersebut. Sedangkan antiseptik yang mengubah tegangan permukaan dapat merusak permeabilitas selektif membran sel bakteri (Setiabudi dan Gan, 1995; Boyd, 1995).

Antimikroba yang menghambat sintesis protein sel bakteri.

Antimikroba yang termasuk kelompok ini adalah Aminoglikoside, Macrolide, Lincomycin, Tetracyclin dan Cloramphenicol. Untuk kehidupannya sel bakteri perlu mensintesis protein di ribosom. Berdasarkan konstanta sedimentasi ribosom bakteri terdiri dari dua sub unit, yaitu ribosom 30S dan 50S. Untuk proses sintesis protein kedua komponen ini akan menyatu pada pangkal rantai mRNA menjadi ribosom 70S.

Golongan Aminoglikoside (misalnya Streptomycin, Gentamicin, Kanamicin dan Neomicin) berikatan dengan ribosom 30S, menyebabkan kode pada mRNA salah dibaca oleh tRNA, sehingga terbentuk protein abnormal dan nonfungsional. Golongan

Macrolide (misal: Erytromicin) berikatan dengan ribosom 50S menghambat translokasi kompleks tRNA-peptida dari lokasi asam amino ke lokasi peptida. Cloramphenicol mengikat ribosom 50S menghambat pengikatan asam amino baru pada rantai polipeptida oleh enzim *peptidil transferase* (Setiabudi dan Gan, 1995; Boyd, 1995).

Antimikroba yang menghambat sintesis asam nukleat sel bakteri.

Antimikroba yang termasuk dalam kelompok ini adalah golongan Quinolon dan Rifampicin. Golongan quinolon menghambat enzim *DNA girase* yang berfungsi menata kromosom bakteri menjadi bentuk spiral (*super coiling*) sehingga bisa muat dalam sel bakteri. Rifampicin berikatan dengan enzim *RNA polimerase* sehingga menghambat sintesis RNA dan DNA (Setiabudi dan Gan, 1995; Boyd, 1995).

2.2 Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

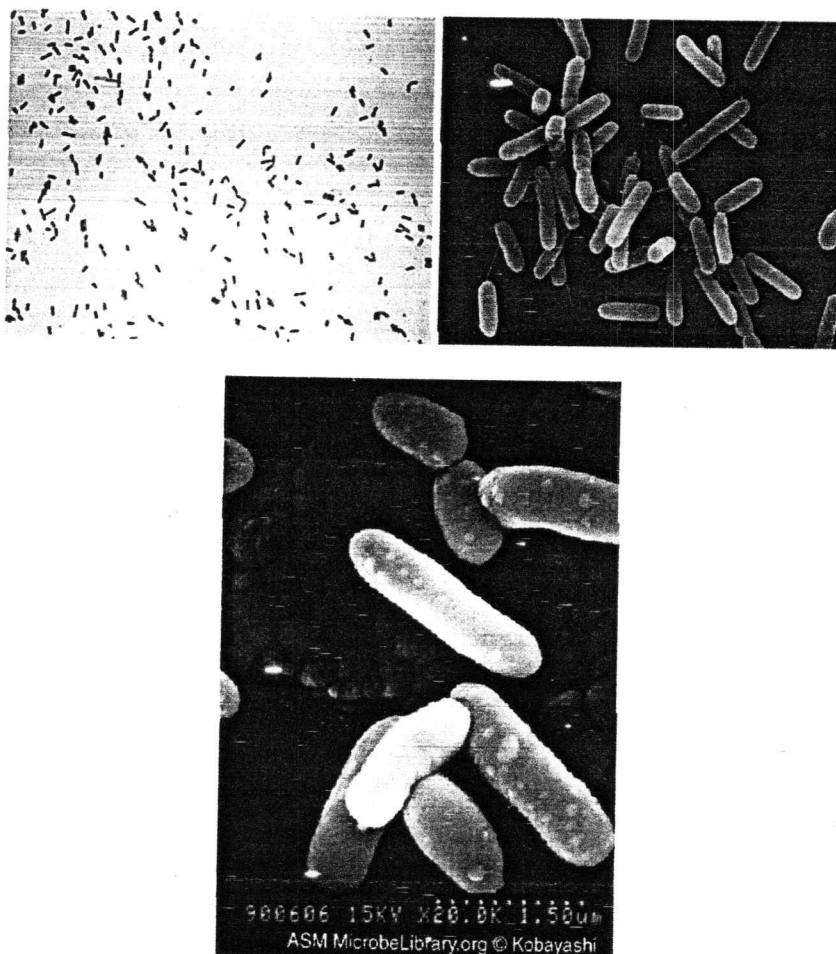
2.2.1 Klasifikasi *Pseudomonas aeruginosa*

Klasifikasi bakteri *Pseudomonas* didasarkan pada ciri khas biakan, morfologi, pemeriksaan biokimia dan homologi rRNA/DNA (Brooks et al., 2007). Taksonomi bakteri *P.aeruginosa* adalah sebagai berikut:

Kerajaan : Bakteria
Filum : Proteobakteria
Kelas : Gamma Proteobakteria
Ordo : Pseudomonadales
Famili : Pseudomonadaceae
Genus : *Pseudomonas*
Spesies : *Pseudomonas aeruginosa*

2.2.2 Morfologi *Pseudomonas aeruginosa*

Bentuk bakteri *P.aeruginosa* adalah batang lurus atau sedikit bengkok (Brock et al., 1994), Gram negatif, tidak berspora (*non-spore forming*), ukuran sel bakteri sekitar 0,5 – 1 μm x 3 - 4 μm (Joklik et al., 1988), 0,5 - 1 x 1,5 - 5 μm (Hill et al., 2007), 0,6 x 2 μm (Brooks et al., 2007), 0,5 - 0,8 x 1,5 – 3 μm (Todar, 2008a). Bakteri ini punya satu atau beberapa flagel di satu ujung sel (*unipolar flagel*) sebagai alat gerak, sehingga termasuk bakteri yang motil (Boyd, 1995). Struktur dinding selnya mirip dengan *Enterobacteriaceae*. Lipopolisakarida (LPS) mengandung 2-keto 3-deoxyoctonic acid dan lipid A yang serupa dengan basil usus (Joklik et al., 1988).



Gambar 2.7 Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. [kiri, menggunakan mikroskop cahaya (Todar, 2008a); kanan, menggunakan mikroskop elektron skening 3000x (Kunkel, 2004); bawah, di mukosa bronchus menggunakan mikroskop elektron skening 20.000x (Kobayashi, 1990)].

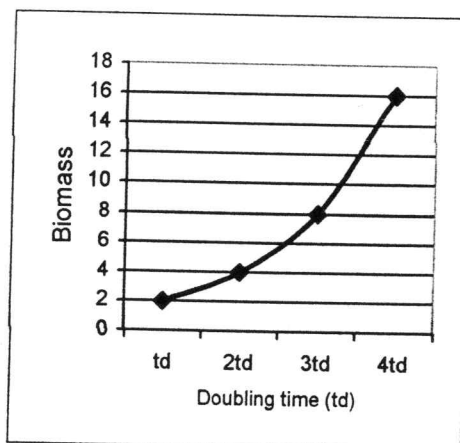
2.2.3 Pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa*

Bakteri *P.aeruginosa* banyak terdapat di tanah, air, permukaan tumbuhan dan hewan, bersifat obligat aerob, tidak seperti *Pseudomonas* lainnya yang fakultatif aerob (Brooks et al., 2007). Metabolisme *P.aeruginosa* secara obligat aerob menggunakan oksigen sebagai akseptor elektron terminal, sedangkan *Pseudomonas* lainnya mampu menggunakan nitrat (NO_3) sebagai akseptor elektron alternatif selain oksigen, sehingga dapat tumbuh dalam suasana anaerob / fakultatif anaerob (Todar, 2008a). Bakteri *P.aeruginosa* tidak memfermentasi laktosa, sehingga bila tumbuh pada media *Mac Conkey* koloni tampak transparan (Forbes et al., 2002). Tes katalase semua *Pseudomonas* adalah positif dan tes oksidase hampir semua *Pseudomonas* positif, kecuali *P.luteola* dan *P.oryzihabitant* (Hill et al., 2007). Bakteri *P.aeruginosa* dapat hidup di berbagai lingkungan, karena mampu menggunakan berbagai sumber nutrisi dan mampu bertahan pada rentang suhu 4 - 36°C (Hill et al., 2007), bahkan bisa tetap tumbuh pada suhu 42°C (Joklik et al., 1988; Todar, 2008a), suhu optimum pertumbuhannya 35°C (Joklik et al., 1988).

Isolat bakteri *P.aeruginosa* dapat menghasilkan tiga jenis koloni. Isolat dari tanah dan air di alam biasanya membentuk koloni ukuran kecil dengan permukaan kasar (*rough*). Sedangkan isolat dari sampel klinik membentuk koloni ukuran besar, permukaan halus (*smooth*), dan penampakan seperti telur goreng. Jenis koloni lainnya dari isolat klinik, terutama di saluran pernapasan dan saluran kemih adalah koloni berlendir (*mucoid*), yang menunjukkan adanya produksi polisakarida ekstraseluler alginat. Kemampuan bakteri ini memproduksi polisakarida ekstraseluler alginat merupakan salah satu faktor yang menentukan virulensinya (Todar, 2008a).

Kecepatan pertumbuhan / pembelahan sel bakteri *P.aeruginosa* secara eksponensial dihubungkan dengan terbentuknya biomasa / koloni / populasi sel

bakteri (Brooks et al., 2004), seperti gambar 2.8. Semakin cepat waktu yang diperlukan untuk membelah menjadi dua (*doubling time*) maka semakin cepat dan semakin banyak pula populasi sel bakteri yang dihasilkan.



Gambar 2.8 Hubungan antara kecepatan pembelahan (*doubling time*) dengan jumlah biomasa atau populasi bakteri (Brooks et al., 2004).

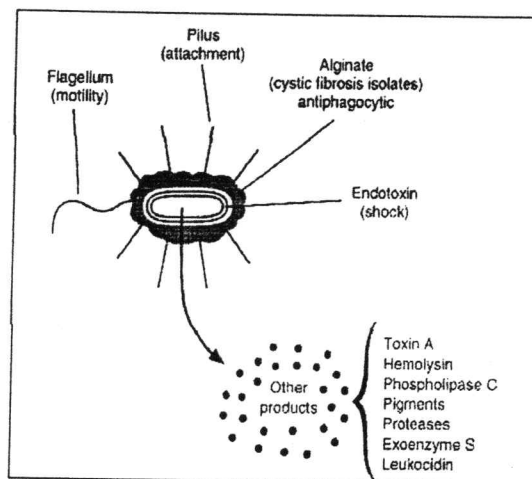
Bakteri *P.aeruginosa* dapat memproduksi dua jenis pigmen yang larut (*soluble pigment*), yaitu pigmen fluoresen pioverdin (*pyoverdin*) yang berwarna hijau kekuningan dan pigmen piosianin (*pyocyanin*). Pigmen yang terakhir berarti nanah biru merupakan ciri khusus pada infeksi bernanah yang disebabkan oleh bakteri *P.aeruginosa* (Todar, 2008a). Beberapa strain bakteri *P.aeruginosa* menghasilkan pigmen piorubin (*pyorubin*) yang berwarna merah gelap atau pigmen piomelanin (*pyomelanin*) yang berwarna hitam (Brooks et al., 2007). Pertumbuhan bakteri *P.aeruginosa* pada media perbenihan atau pada luka dapat menimbulkan bau seperti anggur (*grape like odor*) yang berasal dari zat *2-aminoacetophenone* yang dihasilkannya (Boyd, 1995).

2.2.4 Penentu patogenesis *Pseudomonas aeruginosa*

Bakteri *P.aeruginosa* selain memiliki struktur anatomi yang dapat membantu kolonisasi pada sel inang juga mampu memproduksi bahan ekstraseluler yang memicu terjadinya perubahan patologis pada berbagai sel inangnya (Joklik et al., 1988).

Patogenesis infeksi bakteri *P.aeruginosa* ditentukan oleh beberapa faktor, yaitu: (Brooks et al., 2007; Todar, 2008a)

- Adesin : Pili (*Fimbriae*) dan polisakarida ekstraseluler / eksopolisakarida / lendir alginat (*alginate / slime layer / biofilm*).
- Invasin : Alkalin protease, elastase, sitotoksin (*leucocidin*), pigmen piosianin serta dua hemolisin berupa fosfolipase (*phospholipase*) dan lesitinase (*lechitinase*).
- Motilitas : Flagela (*unipolar flagel*).
- Toksin : Eksotoksin A, eksoenzim S dan lipopolisakarida.



Gambar 2.9 Struktur anatomi dan penentu patogenesis *P.aeruginosa* (Iglewski, 2009)

2.2.5 Patogenesis penyakit infeksi *Pseudomonas aeruginosa*

Infeksi yang disebabkan oleh bakteri *P.aeruginosa* hampir semuanya bersifat invasif dan toksigenik (Todar, 2008a). Proses patogenesis infeksi bakteri *P.aeruginosa* yang sempurna dapat terdiri dari 3 tahapan, yaitu: perlekatan, invasi lokal dan penyebaran sistemik.

Perlekatan

Bakteri *P.aeruginosa* dapat melekat ke sel epitel saluran pernapasan atau ke sel lainnya dengan baik diperantarai oleh fimbriae / pili (Brooks et al., 2007). Sel epitel

pada jaringan yang mengalami jejas akan lebih mudah dilekati fimbriae bakteri, misalnya pada mukosa atau kulit yang luka dan saluran pernapasan yang sebelumnya terinfeksi virus influenza. Fimbriae berikatan dengan reseptor galaktosa atau manosa atau asam sialat yang spesifik di sel epitel (Todar, 2008a). Kolonisasi *P.aeruginosa* di saluran napas diawali dengan perlekatan fimbriae (*fimbrial adherence*), dibantu oleh enzim protease yang mendegradasi fibronektin di permukaan sel epitel, sehingga fimbriae dapat bertemu dengan reseptornya.

Strain *P.aeruginosa* mukoid yang memproduksi eksopolisakarida alginat, mampu melekatkan diri pada musin trakeobronkhial (*N-acetyl glukosamine*) (Todar, 2008a). Alginat merupakan polimer dari asam manuronat dan asam glukoronat yang membentuk lapisan lendir (*slime layer / biofilm*) di sekeliling bakteri *P.aeruginosa*. Lapisan lendir ini menjadi jangkar bagi sel bakteri *P.aeruginosa* terhadap lingkungannya, sedangkan dalam infeksi klinis berfungsi melindungi bakteri dari sistem pertahanan tubuh seperti fagositosis oleh limfosit, aktifitas silia saluran pernapasan, opsonisasi antibodi dan komplemen (Todar, 2008a).

Invasi lokal

Kemampuan bakteri *P.aeruginosa* melakukan invasi ke jaringan ditentukan oleh produksi enzim ekstraseluler dan toksin yang dapat merusak penghalang (*barier*) fisik dan merusak sel inang, sekaligus membentuk ketahanan terhadap respon sistem pertahanan tubuh inang. Ada dua enzim protease yang berkaitan dengan virulensi dan kemampuan invasi ke jaringan sekitar, yaitu: elastase dan alkalin protease. Enzim elastase dapat memecah kolagen, IgG, IgA, komplemen dan melisiskan fibronektin untuk memaparkan reseptor di mukosa saluran pernapasan terhadap fimbriae bakteri, sedangkan enzim alkalin protease mampu melisiskan fibrin (Todar, 2008a).

Bakteri *P.aeruginosa* memproduksi sitotoksin, yaitu protein yang dapat menyebabkan kebocoran sel (*pore forming protein*), sehingga terjadi kerusakan atau kematian sel inangnya. Sitotoksin awalnya disebut sebagai *leucocidin* karena efeknya merusak leukosit, tapi ternyata juga bersifat sitotoksik terhadap hampir semua sel eukaryotik (Todar, 2008a). Bakteri *P.aeruginosa* juga memproduksi dua jenis hemolisin yaitu fosfolipase (*phospholipase*) dan lesitinase (*lechinase*), keduanya secara sinergis mampu memecah lipid dan lesitin. Pigmen piosianin yang diproduksi *P.aeruginosa* juga berperan menentukan invasi bakteri dengan cara merusak epitel saluran pernapasan dan mengeluarkan efek pro inflamasi (Todar, 2008a).

Penyebaran sistemik

Infeksi bakteri *P.aeruginosa* dapat menyebar secara sistemik melalui peredaran darah diperantarai oleh faktor-faktor yang juga berperan dalam terjadinya invasi lokal. Bakteri *P.aeruginosa* tahan terhadap fagositosis maupun respon bakterisidal serum karena mempunyai kapsul mukoid / *slime layer* / *biofilm* dan protease yang mampu me-nonaktifkan komplemen, IFN, TNF dan IgG. Eksoenzim S dan eksotoksin A yang diekskresikan bakteri *P.aeruginosa* juga menimbulkan efek patologis selama fase penyebaran sistemik (Todar, 2008a).

Struktur eksoenzim S mirip dengan komponen subunit A toksin bakteri, memiliki aktifitas ribosilasi ADP (*ADP-ribosylating activity*) terhadap berbagai protein eukaryotik. Eksoenzim S yang diproduksi *P.aeruginosa* pada luka bakar dapat terdeteksi di darah sebelum bakterinya sendiri beredar di darah. Diperkirakan eksotoksin S mengganggu fagosit dalam sirkulasi untuk mempersiapkan invasi bakteri *P.aeruginosa* (Todar, 2008a).

Eksotoksin A mekanisme kerjanya sama dengan toksin diphteri, yaitu menyebabkan ribosilasi ADP yang menghambat sintesis protein pada sel eukaryotik

yang terinfeksi. Meskipun mekanisme kerjanya sama dengan toksin diphtheri namun secara antigenik berbeda. Aktifitas eksotoksin A menyebabkan nekrosis pada tempat kolonisasi bakteri. Strain yang membentuk toksin dapat menyebabkan pneumonia lebih parah dibandingkan dengan strain yang tidak membentuk toksin / nontoksigenik (Todar, 2008a).

2.2.6 Manifestasi klinis infeksi *Pseudomonas aeruginosa*

Bakteri *P.aeruginosa* dapat menginfeksi hampir semua jaringan dan organ tubuh manusia (Joklik et al., 1988). Tanda dan gejala infeksi oleh bakteri *P.aeruginosa* bersifat nonspesifik (Brooks et al., 2007), gejala yang timbul berbeda-beda berkaitan dengan jaringan atau organ yang terinfeksi.

Infeksi saluran pernapasan

Infeksi bakteri *P.aeruginosa* di saluran pernapasan terjadi kebanyakan pada orang yang sistem pertahanan tubuhnya menurun (*immunocompromised*). Bakteri ini pada penderita penyakit paru kronis dan gagal jantung kongestif dapat menyebabkan pneumonia primer. Sedangkan pneumonia yang berasal dari bakteremia, umumnya terjadi pada pasien kanker yang sedang mendapat kemoterapi (Todar, 2008a). Kontaminasi bakteri *P.aeruginosa* pada alat respirator dapat menimbulkan pneumonia yang disertai nekrosis pada pengguna respirator (Brooks et al., 2007). Penderita *cystic fibrosis* sering terinfeksi *P.aeruginosa* strain mukoid yang sulit untuk diberantas (Hill et al., 2007; Todar, 2008a).

Bakteriemia

Bakteri *P.aeruginosa* dapat menyebabkan bakteriemia dan sepsis yang fatal terutama pada pasien *immunocompromised*, misalnya pada pasien kanker darah, AIDS, neutropenia, diabetes mellitus dan luka bakar berat (Brooks et al., 2007). Hampir semua bakteriemia *P.aeruginosa* terjadi ketika pasien dalam perawatan di

rumah sakit. Bakteri *P.aeruginosa* merupakan penyebab sekitar 25% bakteriemia nosokomial yang disebabkan oleh bakteri Gram negatif (Todar, 2008a).

Infeksi di sistem saraf pusat

Infeksi *P.aeruginosa* dapat menyebabkan meningitis dan abses otak. Bakteri yang menginvasi susunan saraf pusat (SSP) dapat berasal dari infeksi di telinga dalam, sinus paranasal, inokulasi langsung melalui trauma kepala, pembedahan, prosedur diagnostik invasif misalnya pungsi lumbal (Brooks et al., 2007), dapat pula dari penyebaran infeksi yang lokasinya jauh seperti infeksi saluran kemih (Todar, 2008a).

Endokarditis

Infeksi bakteri *P.aeruginosa* dapat terjadi pada katub jantung buatan dan juga katub jantung pengguna narkotika secara intra vena. Bakteri ini dapat menginfeksi endokardium melalui invasi langsung dari peredaran darah.

Infeksi telinga

Pada kasus otitis eksterna, bakteri *P.aeruginosa* merupakan bakteri patogen yang utama. Bakteri ini jarang terdapat pada telinga yang normal tapi sering berada di saluran telinga luar yang mengalami trauma, maserasi, inflamasi (Todar, 2008a) dan kondisi lembab atau basah misalnya pada perenang (Brooks et al., 2007). Di RS Syaiful Anwar Malang, 17,65% penderita otitis media purulenta akut disebabkan oleh bakteri *P.aeruginosa* yang merupakan penyebab tertinggi (Suheryanto, 2000).

Infeksi mata

Bakteri *P.aeruginosa* merupakan salah satu bakteri yang paling sering menyebabkan infeksi pada kornea (*bacterial keratitis*). Bakteri ini dapat berkolonisasi di epitel kornea mata dengan perlekatan fimbriae ke reseptor asam sialat. Jika pertahanan di lingkungan mata terganggu maka bakteri *P.aeruginosa* akan

berkembang biak cepat, menghasilkan elastase, alkalin protease dan eksotoksin A, selanjutnya merusak kornea dan seluruh bola mata (Todar, 2008a). Infeksi bakteri ini pada mata terjadi setelah ada luka atau setelah tindakan bedah (Brooks et al., 2007).

Infeksi tulang dan persendian

Infeksi bakteri *P.aeruginosa* di tulang dan persendian dapat berasal dari inokulasi langsung atau berasal dari penyebaran hematogen. Infeksi tulang secara hematogen sering terjadi pada pengguna obat intra vena, infeksi saluran kemih dan infeksi di pelvis (Todar, 2008a). Bakteri *P.aeruginosa* dapat menyebabkan osteomyelitis kronis.

Infeksi gastrointestinal

Bakteri *P.aeruginosa* dapat menyebabkan penyakit di sepanjang saluran pencernaan, dapat berupa diare, enterokolitis nekrosis dan infeksi perirektal.

Infeksi saluran kemih

Infeksi saluran kemih (ISK) yang disebabkan bakteri *P.aeruginosa* biasanya didapat dari rumah sakit, berhubungan dengan kateterisasi, instrumentasi dan pembedahan (Brooks et al., 2007). Bakteri *P.aeruginosa* merupakan bakteri penyebab ISK peringkat ketiga, sebesar 12% dari semua ISK (Todar, 2008a). Dari saluran kemih bakteri *P.aeruginosa* dapat mencapai peredaran darah, 40% bakteriemia *P.aeruginosa* berasal dari ISK (Todar, 2008a).

Infeksi kulit dan jaringan lunak

Bakteri *P.aeruginosa* dapat menyebabkan infeksi kulit lokal maupun difus. Faktor predisposisi utama adalah rusaknya penghalang fisik seperti pada luka, trauma, dermatitis, luka bakar dan kelembapan seperti pada perenang, pendaki dan pengguna popok bayi. Infeksi pada luka dapat menimbulkan nanah berwarna kebiruan (Brooks et al., 2007).

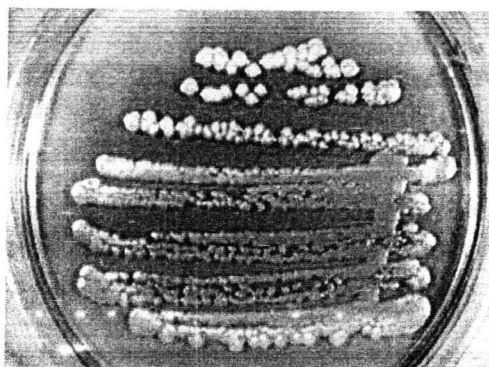
2.2.7 Diagnosis laboratorium *Pseudomonas aeruginosa*

Bahan pemeriksaan laboratorium untuk menegakkan diagnosis dapat diambil dari nanah, darah, dahak, cairan spinal, urine, dan feses yang diambil dari lokasi infeksi (Brooks et al., 2007). Diagnosis bakteri *P.aeruginosa* dapat ditegakkan berdasarkan morfologi dengan pengecatan Gram, bentukan koloni, adanya pigmen berfluoresen di bawah sinar ultraviolet, reaksi oksidase positif, fermentasi laktosa negatif dan kemampuannya tumbuh pada suhu 42°C, serta hasil pemeriksaan biokimiawi lainnya (Brooks et al., 2007; Todar, 2008a). Berikut ini pemeriksaan biokimiawi beberapa spesies *Pseudomonas* yang berasal dari spesimen klinik.

Tabel 2.2 Sifat biokimia dan fisiologi beberapa bakteri spesies *Pseudomonas* (Forbes et al., 2002).

Tes / substrat	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. fluorescen</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. monteilii</i>	<i>P. stutzeri</i>
Oxidase	+	+	+	+	+
Growth at 42°C	+	=	=	=	V
Nitrate reduction	+	V	=	=	+
Gas from nitrate	+	=	=	=	+
Gelatin liquified	=	=	=	=	=
Arginine dihydrolase	=	NT	+	+	+
Lysine decarboxylase	=	NT	=	=	=
Urea hydrolysis	+	+	V	V	V
Oxidizes glucose	+	=	+	+	+
Oxidizes lactose	+	=	=	V	V
Oxidizes manitol	+	=	V	V	V
Oxidizes xylose	+	=	+	+	+

NT, tidak di uji (not tested); V, bervariasi; +, >90% strain positif; =, >90% strain negatif.



Gambar 2.10 Koloni bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. (Todar, 2008a).

2.2.8 Epidemiologi *Pseudomonas aeruginosa*

Bakteri *P.aeruginosa* terdapat banyak di tanah, air, tanaman dan hewan, selain itu bakteri ini juga dapat ditemukan (meskipun jarang) di kulit orang sehat. Infeksi *P.aeruginosa* terjadi pada manusia yang sistem pertahanan tubuhnya terganggu, misalnya penderita kanker, penyakit metabolik, luka bakar atau yang mengalami instrumentasi dan pembedahan (Joklik et al., 1988; Brooks et al., 2007). Bakteri ini di Amerika Serikat merupakan penyebab infeksi nosokomial peringkat keempat, sebesar 10,1% dari semua bakteri yang diisolasi (Todar, 2008a). Bakteri *P.aeruginosa* di rumah sakit sering terdapat pada peralatan respirasi, baskom, makanan, dan toilet (Todar, 2008a). Bakteri ini dapat tumbuh subur di lingkungan basah, maka perhatian khusus harus ditujukan pada bak air, bak cuci, bak mandi (Brooks et al., 2007).

Bakteri *P.aeruginosa* masuk ke lingkungan rumah sakit melalui sayuran, buah, pengunjung dan pasien yang kemudian disebarkan ke alat dan fasilitas rumah sakit lainnya. Penularan kepada pasien dapat terjadi bila pasien kontak langsung dengan bakteri yang ada di reservoir. Penyebaran dari pasien ke pasien lainnya melalui tangan tenaga medis ternyata lebih signifikan dalam proses penyebaran bakteri ini ke seluruh rumah sakit bila dibandingkan dengan penyebaran melalui udara (Joklik et al., 1988). Penelitian di ruang neonatus RSUD dr. Soetomo Surabaya, 5 dari 20 perawat (25%) di jarinya terdapat bakteri *P.aeruginosa* sebelum penggunaan antiseptik, yang berkaitan dengan terjadinya sepsis pada neonatus (Damanik et al., 2004).

2.2.9 Pencegahan infeksi *Pseudomonas aeruginosa*

Penyebaran bakteri *P.aeruginosa* dapat dikendalikan dengan prosedur isolasi yang tepat, teknik aseptik, pembersihan dan desinfeksi peralatan, misalnya alat respirasi, kateter dan instrumen bedah (Joklik et al., 1988). Upayakan untuk menghilangkan tempat-tempat yang lembab, karena bakteri ini akan mati bila

mengalami kekeringan. Beberapa jenis vaksin sudah dicoba, tapi sampai sekarang belum ada yang tersedia untuk digunakan secara umum.

2.2.10 Terapi infeksi *Pseudomonas aeruginosa*

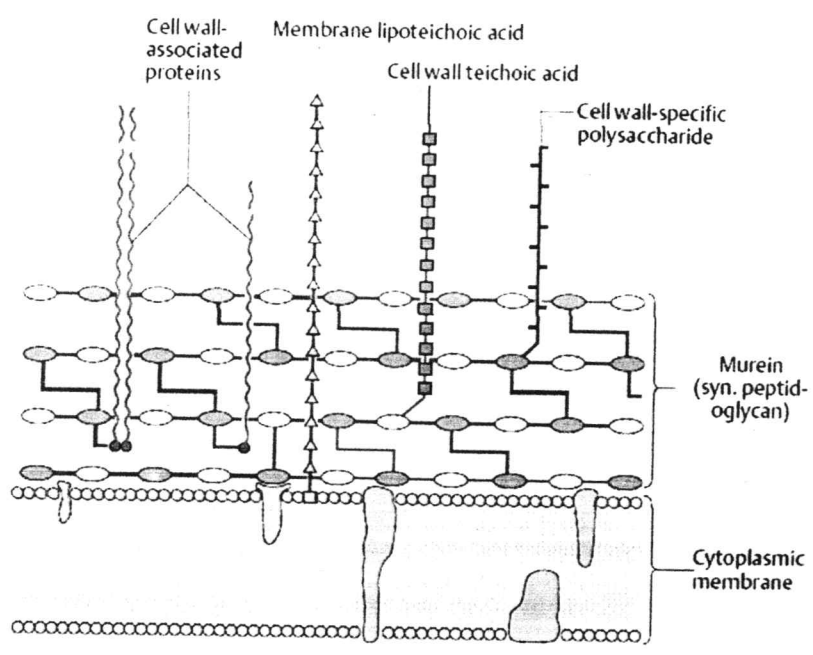
Terapi antimikroba harus didasarkan pada hasil uji sensitifitas secara *invitro* (Brooks et al., 2007). Jika memulai terapi antimikroba secara empirik, maka setelah itu kultur harus diuji di laboratorium, kemudian penggunaan antimikroba harus disesuaikan dengan hasil kultur tersebut. Sejumlah antimikroba dengan potensi *invitro* terhadap *P.aeruginosa* telah dikembangkan. Antimikroba tersebut adalah Cephalosporin generasi ketiga (Cefoperazone, Cefsulodine, Ceftazidime), Cephalosporin generasi keempat (Cefepime, Cefpirome, Cefclidin), Penicilin (Tikarcilin, Piperacilin, Azlocilin), Monobactam (Aztreonam), Carbapenem (Imipenem, Meropenem), dan Quinolon (Ciprofloxacin, Enoxacin, Ofloxacin) (Brooks et al., 2007).

Bakteri *P.aeruginosa* tahan atau resisten terhadap banyak antimikroba (Boyd, 1995; Brooks et al., 2007). Terapi infeksi bakteri *P.aeruginosa* menggunakan obat antimikroba kombinasi, karena terapi antimikroba tunggal keberhasilannya rendah dan bakteri cepat menjadi resisten (Brooks et al., 2007). Terapi dapat menggunakan kombinasi antimikroba golongan Aminoglikoside (Gentamicin, Tobramycin dan Amikacin) dengan golongan Penicilin yang aktif terhadap *P.aeruginosa* misalnya Ticarcilin, Mezlocilin dan Piperacilin (Brooks et al., 2007). Kombinasi Gentamicin dan Carbenecilin sering digunakan untuk mengatasi infeksi bakteri *P.aeruginosa* yang berat (Todar, 2008a). Meskipun banyak strain yang sensitif terhadap Gentamicin, Tobramycin, Colistin dan Quinolon, ternyata dapat juga terbentuk resistensi.

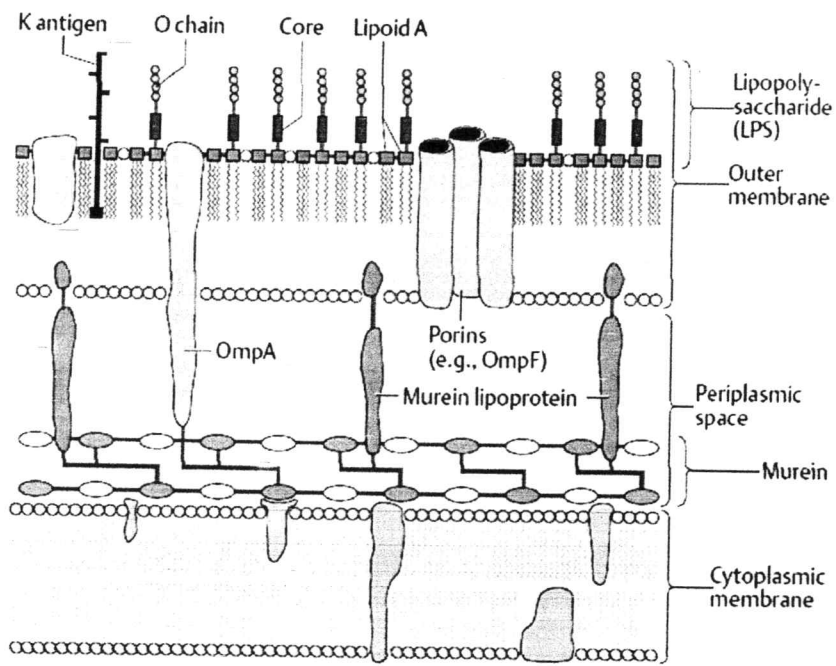
2.2.11 Resistensi *Pseudomonas aeruginosa* terhadap antimikroba

Bakteri *P.aeruginosa* yang resisten terhadap banyak antimikroba (*Multiple Drug Resistant /MDR*) berdampak buruk pada pasien. Dampaknya dapat berupa waktu rawat inap lebih lama, perlu prosedur yang invasif (misalnya drainase, bronkoskopi, trakeostomi dan pemasangan kateter), perlu tindakan bedah, penyakit menjadi kronis dan kematian (Aloush et al., 2006). Secara umum resistensi bakteri *P.aeruginosa* terhadap banyak antimikroba disebabkan oleh kombinasi beberapa faktor, yaitu:

- Kapasitas genetik besar, yang mengekspresikan kemampuan bertahan hidup dalam lingkungan tidak menguntungkan. Perhitungan jumlah gen yang diperlukan untuk pertumbuhan sel bakteri termasuk enzim metabolisme dan protein struktural pada media yang minim garam adalah sekitar 1,5 Mbp. Bakteri *P.aeruginosa* punya genom yang berisi 6,26 Mbp mampu mengkode 5567 gen. Kapasitas genom *P.aeruginosa* lebih besar dibandingkan dengan genom *E.coli* dan *S.aureus* yang masing-masing hanya berisi 4,64 Mbp (mengkode 4279 gen) dan 2,82 Mbp (mengkode 2594 gen). Hal ini bisa menjelaskan mengapa bakteri *P.aeruginosa* mudah beradaptasi dengan lingkungannya, termasuk mampu bertahan di lingkungan yang banyak mengandung antimikroba (Lambert, 2002).
- Resistensi intrinsik, disebabkan oleh permeabilitas dinding sel yang rendah terhadap bahan antimikroba dan adanya pompa efluks (*efflux pump*).
 - Bakteri *P.aeruginosa* yang termasuk bakteri Gram negatif memiliki struktur dinding sel yang lebih kompleks dibandingkan dengan bakteri Gram positif (gambar 2.11 dan 2.12). Permeabilitas dinding sel bakteri *P.aeruginosa* rendah terjadi karena ada membran luar (*outer membrane*) yang menjadi penghalang (*barrier*) penetrasi bahan antimikroba, mengurangi penetrasi molekul hidrofilik kecil dan menghalangi molekul yang lebih besar.



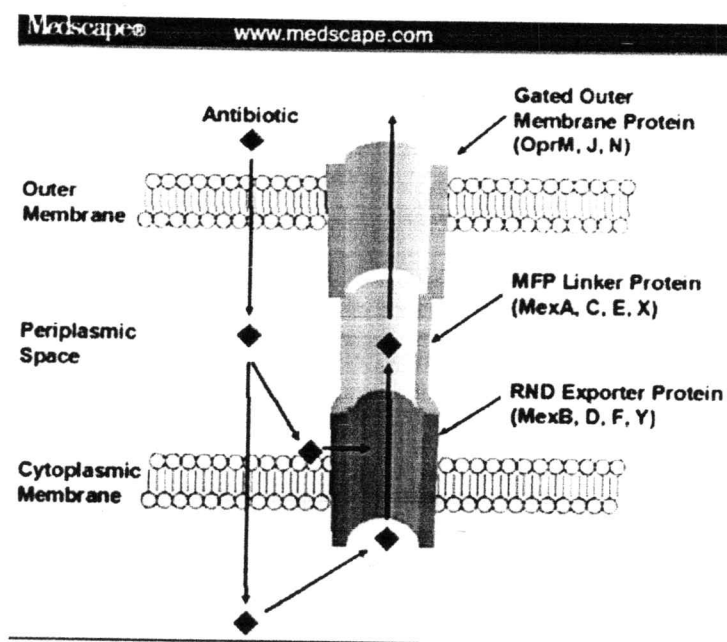
Gambar 2.11 Struktur dinding sel bakteri Gram positif (Kayser, et al., 2005).



Gambar 2.12 Struktur dinding sel bakteri Gram negatif (Kayser, et al., 2005).
[Dinding sel bakteri Gram negatif punya lapisan peptidoglikan (murein) yang relatif lebih tipis dibandingkan dengan bakteri Gram positif, serta tidak mengandung asam teichoat, tetapi punya membran luar / "outer membrane" yang melekat di luar lapisan peptidoglikan menggunakan molekul lipoprotein yang bersifat hidrofobik, menyebabkan permeabilitasnya rendah terhadap bahan antibiotika].

Bakteri *P.aeruginosa* memiliki porin *oprF* yang merupakan porin utama pada semua strain. Apabila porin *oprF* berkurang atau hilang maka akan menurunkan permeabilitas dinding selnya terhadap bahan antimikroba, sehingga terjadi resistensi. Sedangkan porin *oprD* berperan dalam penyerapan asam amino seperti lisin, hilangnya *oprD* dihubungkan dengan resistensi terhadap imipenem (Lambert, 2002).

- Pompa efluks yang efisien dapat membuang molekul antimikroba, sehingga menyebabkan kegagalan akumulasi antimikroba di dalam sel bakteri. Pada bakteri *P.aeruginosa* telah diketahui ada empat sistem pompa efluks antibiotika, yaitu : *mexAB-oprM*, *mexCD-oprJ*, *mexEF-oprN* dan *mexXY-oprM* (gambar 2.13).



Gambar 2.13 Skema struktur dan fungsi pompa efluks bakteri *P.aeruginosa*. [Bahan antibiotika dapat ditangkap dari ruang periplasma, membran sitoplasma dan ruang sitoplasma oleh Mex B, D, F atau Y. Mex A, C, E atau X sebagai penghubung antara sitoplasma dan membran luar. Sedangkan Opr M, J atau N sebagai tempat tahap akhir antibiotik keluar sel bakteri (Aeschlimann, 2003)].

Hampir semua golongan antimikroba (kecuali golongan Polymyxin) dapat dipompa keluar oleh salah satu sistem pompa efluks. MexAB-oprM berperan memompa keluar golongan Beta laktam, Quinolon dan beberapa disinfektan. MexXY-oprM memompa keluar Aminoglikoside dan mexEF-oprN memompa keluar Carbapenem dan Quinolon (Lambert, 2002).

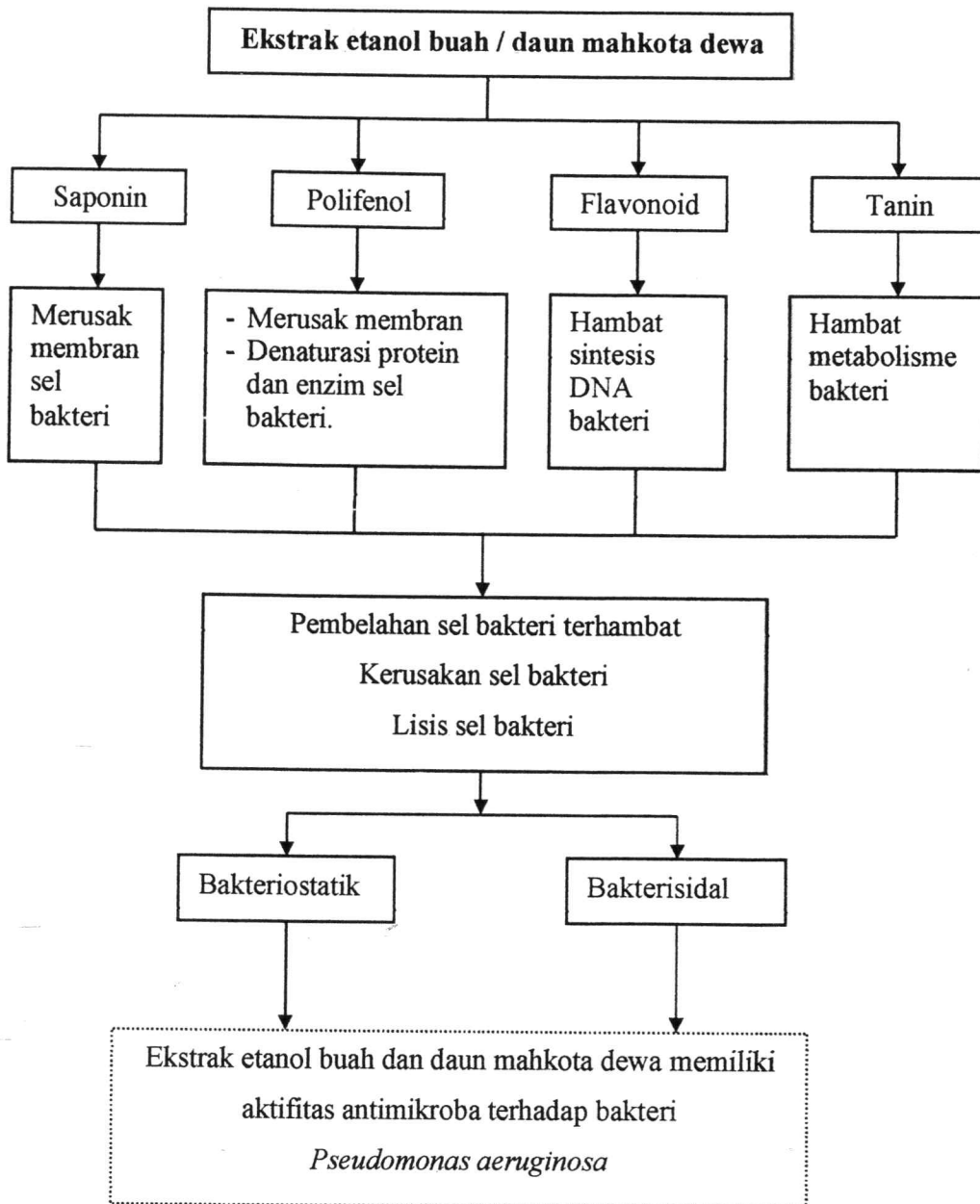
- Adanya lapisan eksopolisakarida alginat (*slime layer / biofilms*) di sekeliling bakteri *P.aeruginosa*. Alginat dapat mengikat kation antibiotik seperti pada aminoglikosida dan mengurangi difusinya ke dalam sel (Lambert, 2002).
- Mutasi spontan pada gen ampC dan ampR dapat menyebabkan ekspresi enzim beta laktamase yang dapat menonaktifkan antimikroba golongan Beta laktam, misalnya Penicillin dan Cephalosporine (Lambert, 2002).
- Mendapatkan tambahan gen resistensi yang berasal dari mikroorganisme lain melalui plasmid, transposon dan bakteriofag (Lambert, 2002). Plasmid yang sering menyebabkan resistensi *P.aeruginosa* adalah plasmid R (*resistance transfer plasmid*), yaitu plasmid yang membawa gen yang mengkode penonaktifan berbagai antimikroba (Brock et al., 1994).

BAB 3**KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN****3.1 Kerangka Konseptual**

Bakteri *P.aeruginosa* merupakan patogen oportunistik, penyebab infeksi nosokomial dan infeksi di berbagai organ tubuh manusia. Bakteri ini resisten terhadap banyak antimikroba, maka terapinya sulit sehingga meningkatkan morbiditas dan mortalitas. Antimikroba poten harganya mahal dan dapat terjadi efek samping, seperti hepatotoksik, nefrotoksik, neurotoksik dan alergi. Maka perlu dilakukan penelitian untuk mencari antimikroba baru yang efektif, murah dan aman.

Masyarakat secara tradisional telah menggunakan buah dan daun mahkota dewa untuk terapi penyakit kulit, hati, kanker, kencing manis, dan darah tinggi. Penapisan fitokimia buah mahkota dewa menunjukkan adanya flavonoid, polifenol, saponin, tanin, alkaloid, steroid, terpenoid, dan alkaloid. Penapisan fitokimia daun mahkota dewa menunjukkan adanya flavonoid, polifenol, saponin, tanin dan steroid. Beberapa golongan senyawa sejenis yang berasal dari tanaman lain berdasarkan literatur punya aktifitas antimikroba melalui beberapa mekanisme, yaitu: flavonoid menghambat sintesis DNA bakteri; fenol merusak membran sitoplasma, menonaktifkan enzim dan mendenaturasikan protein sel bakteri; saponin merusak membran sitoplasma; dan tanin menghambat enzim metabolisme sel bakteri.

Aktifitas antimikroba ekstrak etanol buah dan daun mahkota dewa dapat diketahui dengan uji antimikroba secara dilusi agar. Aktifitas antimikroba dapat bersifat bakteriostatik atau bakterisidal. Untuk melihat sifat bakteriostatik atau bakterisidal dengan jelas dapat dilakukan menggunakan Mikroskop Elektron Skening (MES) dengan memperhatikan morfologi, pembelahan sel dan jumlah sel bakteri.



Gambar 3.1 Skema kerangka konseptual.

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah dan kajian teori, maka ditentukan hipotesis penelitian sebagai berikut:

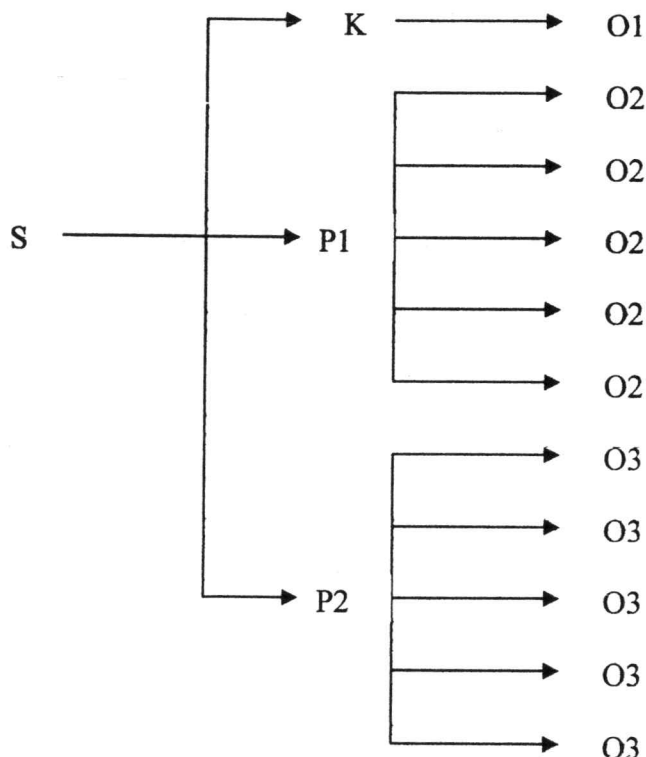
1. Ekstrak etanol buah mahkota dewa dan ekstrak etanol daun mahkota dewa memiliki aktifitas antimikroba terhadap bakteri *P.aeruginosa*
2. KHM ekstrak etanol buah mahkota dewa dan KHM ekstrak etanol daun mahkota dewa terhadap bakteri *P.aeruginosa* berada dalam rentang 10 – 500 µg / ml.
3. Aktifitas antimikroba ekstrak etanol buah mahkota dewa dan ekstrak etanol daun mahkota dewa bersifat bakterisidal terhadap bakteri *P.aeruginosa*.
4. Potensi aktifitas antimikroba terhadap bakteri *P.aeruginosa* dari ekstrak etanol buah mahkota dewa berbeda dengan ekstrak etanol daun mahkota dewa.

BAB 4

MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan penelitian “*The Posttest Only Control Group Design*” (Notoatmodjo, 2002).



Gambar 4.1 Skema rancangan penelitian.

Keterangan :

S: Sampel

K: Kelompok kontrol

Kelompok *P.aeruginosa* yang tidak dipapar ekstrak etanol buah dan ekstrak etanol daun mahkota dewa ($0 \mu\text{g/ml}$).

P1: Kelompok Perlakuan 1

Kelompok *P.aeruginosa* dipapar ekstrak etanol buah mahkota dewa $5 \times 10^4 \mu\text{g/ml}$; $4 \times 10^4 \mu\text{g/ml}$; $3 \times 10^4 \mu\text{g/ml}$; $2 \times 10^4 \mu\text{g/ml}$ dan $1 \times 10^4 \mu\text{g/ml}$.

P2: Kelompok Perlakuan 2

Kelompok *P.aeruginosa* dipapar ekstrak etanol daun mahkota dewa 5×10^4 $\mu\text{g/ml}$; 4×10^4 $\mu\text{g/ml}$; 3×10^4 $\mu\text{g/ml}$; 2×10^4 $\mu\text{g/ml}$ dan 1×10^4 $\mu\text{g/ml}$.

O1: Observasi kelompok kontrol.

O2: Observasi kelompok perlakuan 1.

O3: Observasi kelompok perlakuan 2.

4.2 Sampel

Sampel penelitian adalah isolat bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC (*American Type Culture Colection*) 27853 yang diperoleh dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan (BLK) Surabaya. Hasil uji biokimia bakteri di lampiran 3.

4.3 Besar Pengulangan

Pemeriksaan uji antimikroba diulang sebanyak 5 kali. Besar pengulangan / replikasi didapatkan dari rumus: (Hanafiah, 2005)

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

$$(6-1) \times (r-1) \geq 15$$

$$5r \geq 20$$

$$r \geq 4$$

Keterangan: r = jumlah replikasi, t = jumlah perlakuan.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel bebas

Variabel bebas penelitian adalah konsentrasi ekstrak etanol buah dan ekstrak etanol daun mahkota dewa dalam media Muller Hinton Agar (MHA), yaitu 5×10^4 $\mu\text{g/ml}$; 4×10^4 $\mu\text{g/ml}$; 3×10^4 $\mu\text{g/ml}$; 2×10^4 $\mu\text{g/ml}$; 1×10^4 $\mu\text{g/ml}$ dan 0 $\mu\text{g/ml}$.

4.4.2 Variabel tergantung

Variabel tergantung penelitian adalah pertumbuhan *P.aeruginosa* pada MHA.

4.4.3 Variabel kendali

Variabel kendali penelitian adalah media MHA untuk perbenihan bakteri *P.aeruginosa*, jumlah inokulum bakteri, ose terkalibrasi, sterilitas peralatan, suhu dan waktu inkubasi.

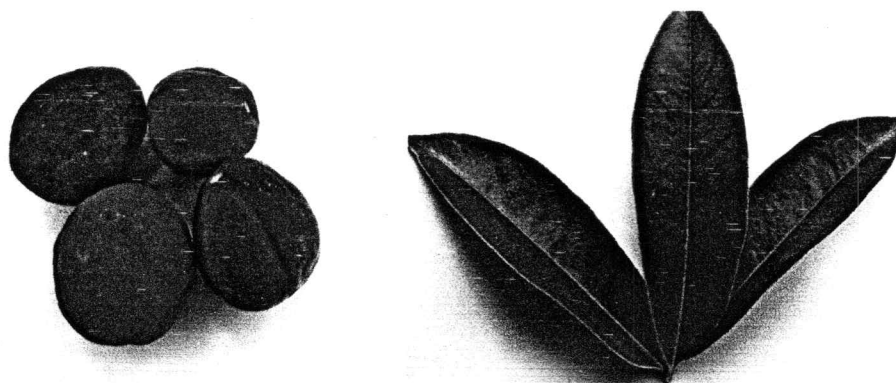
4.5 Definisi Operasional

- Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) adalah konsentrasi terendah dari ekstrak etanol buah dan ekstrak etanol daun mahkota dewa yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *P.aeruginosa*, sehingga pada media MHA tidak tampak ada koloni bakteri *P.aeruginosa* (Forbes, 2002).
- Bakterisidal adalah aktifitas antimikroba yang mampu membunuh sel bakteri, ditandai terjadinya kerusakan permanen dan lisis sel bakteri (Baron, 1994).
- Bakteriostatik adalah aktifitas antimikroba yang mampu menghambat pertumbuhan sel bakteri tetapi tidak membunuhnya, ditandai dengan terjadi hambatan pembelahan sel, tetapi sel bakteri tetap hidup utuh (Baron, 1994).

4.6 Bahan Penelitian

4.6.1 Buah dan daun mahkota dewa

Buah dan daun mahkota dewa diperoleh pada bulan April tahun 2009 berasal dari tanaman mahkota dewa yang telah berbuah (umur tanaman lebih dari 15 bulan), yang tumbuh di Kelurahan Kebonsari, Kabupaten Jember, Jawa Timur. Buah yang diambil adalah buah tua yang berwarna merah. Buah mahkota dewa dibelah, ambil daging buahnya, sedangkan bijinya dibuang. Sedangkan daun yang diambil adalah daun tua segar berwarna hijau tua. Tanaman mahkota dewa dideterminasi di Herbarium Jemberiense, Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Jember. Pelarut proses ekstraksi adalah etanol 96%.



Gambar 4.2 Buah mahkota dewa yang sudah tua berwarna merah (kiri) dan daun mahkota dewa yang berwarna hijau tua (kanan).

4.6.2 Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC (*American Type Culture Collection*)

27853 didapatkan dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan (BLK) Surabaya.

4.6.3 Media perbenihan

Media Muller Hinton Agar (MHA) (Oxoid, Inggris) pada petri dish diameter 35 mm (Becton Dickinson, AS) digunakan sebagai media inokulasi bakteri *P.aeruginosa* untuk menentukan KHM. Cara pembuatan media ikuti petunjuk dari pabrik pembuat media. Setiap petri dish diisi 3 ml media.

Media Muller Hinton Cair (MHC) (Becton Dickinson, Perancis) dalam tabung reaksi digunakan sebagai media inokulasi bakteri *P.aeruginosa* untuk pemeriksaan menggunakan Mikroskop Elektron Skening (MES).

4.6.4 Bahan pemeriksaan mikroskop elektron skening

Glutaraldehida, bufer fosfat, osmium tetroksida, akuades, etanol, amil asetat, dan bahan konduktif emas.

4.7 Instrumen Penelitian

4.7.1 Instrumen ekstraksi daun dan buah mahkota dewa

Penggilingan, maserator, kertas saring, corong kaca, *vacum rotary evaporator* (*rotavapor*), gelas becker.

4.7.2 Instrumen uji antimikroba

Neraca analitik, gelas ukur, gelas becker, tabung erlenmeyer, kompor listrik, api bunsen, ose terkalibrasi 10 μ l, pipet volume, pipet mikro, tip pipet mikro, petri dish diameter 35mm, pengaduk (*mixer*), pH meter, lemari pendingin, autoklaf, inkubator.

4.7.3 Instrumen pemeriksaan mikroskop elektron skening

Sentrifus, pipet pasteur, tabung reaksi, alat pengering di titik kritis (*critical point dryer*), alat pelapis bahan konduktif (*vacum evaporator*), Mikroskop Elektron Skening / *Scanning Electron Microscope* (JEOL JSM-T100).

4.8 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.8.1 Lokasi penelitian

Lokasi penelitian adalah sebagai berikut:

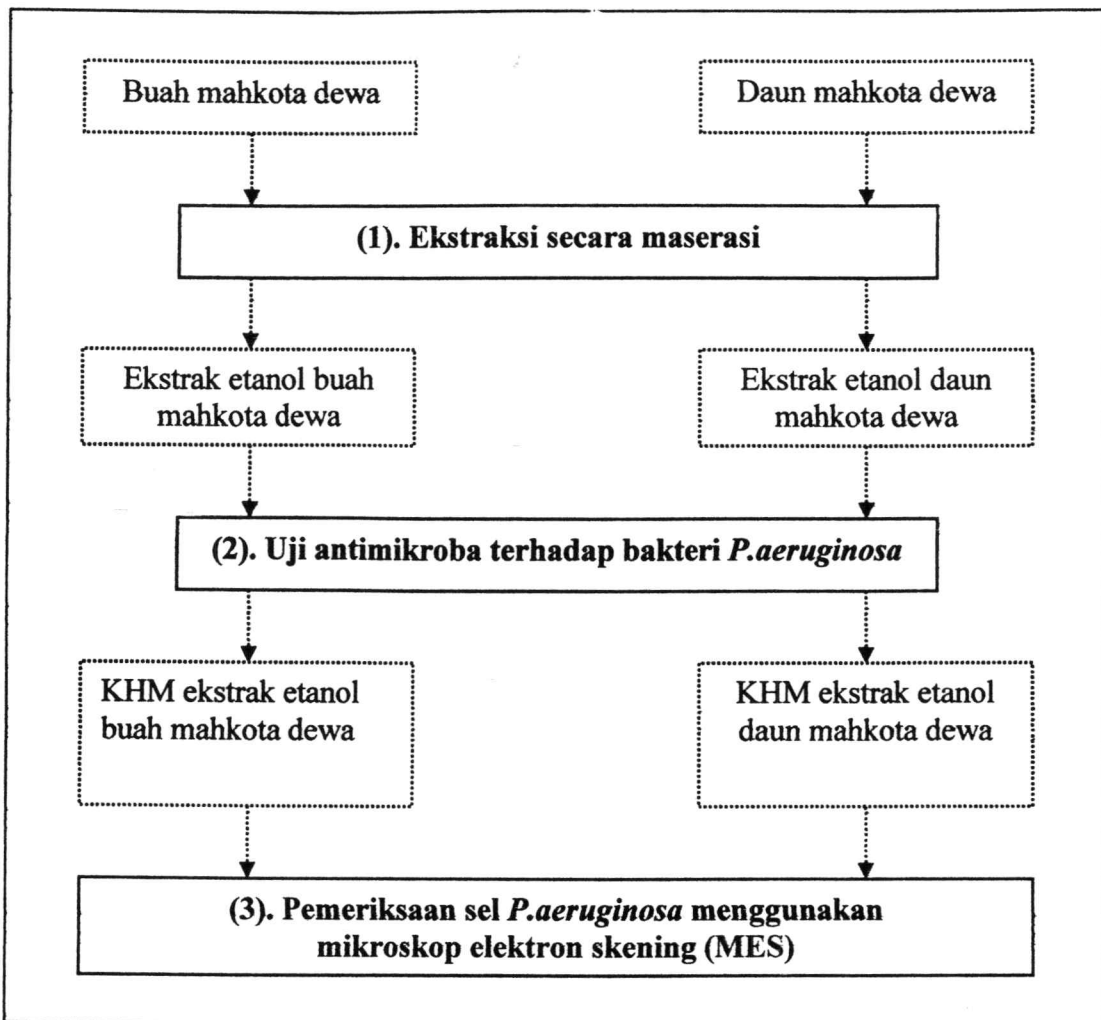
- Proses ekstraksi buah dan daun mahkota dewa dilaksanakan di Laboratorium Biologi Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Jember.
- Proses uji antimikroba ekstrak etanol buah dan daun mahkota dewa terhadap bakteri *P.aeruginosa* dilaksanakan di Instalasi Mikrobiologi Klinik RSU dr. Soetomo / Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya.
- Proses pemeriksaan mikroskop elektron skening dilaksanakan di UPT. Mikroskop Elektron, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya.

4.8.2 Waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret - Juni tahun 2009.

4.9 Prosedur Pengumpulan Data

Penelitian dilaksanakan dalam tiga tahap yaitu: (1). Ekstraksi buah dan daun mahkota dewa; (2). Uji antimikroba terhadap bakteri *P.aeruginosa* secara dilusi-agar; (3). Pemeriksaan sel bakteri *P.aeruginosa* menggunakan mikroskop elektron skening (MES).



Gambar 4.3 Tahapan pengumpulan data penelitian.

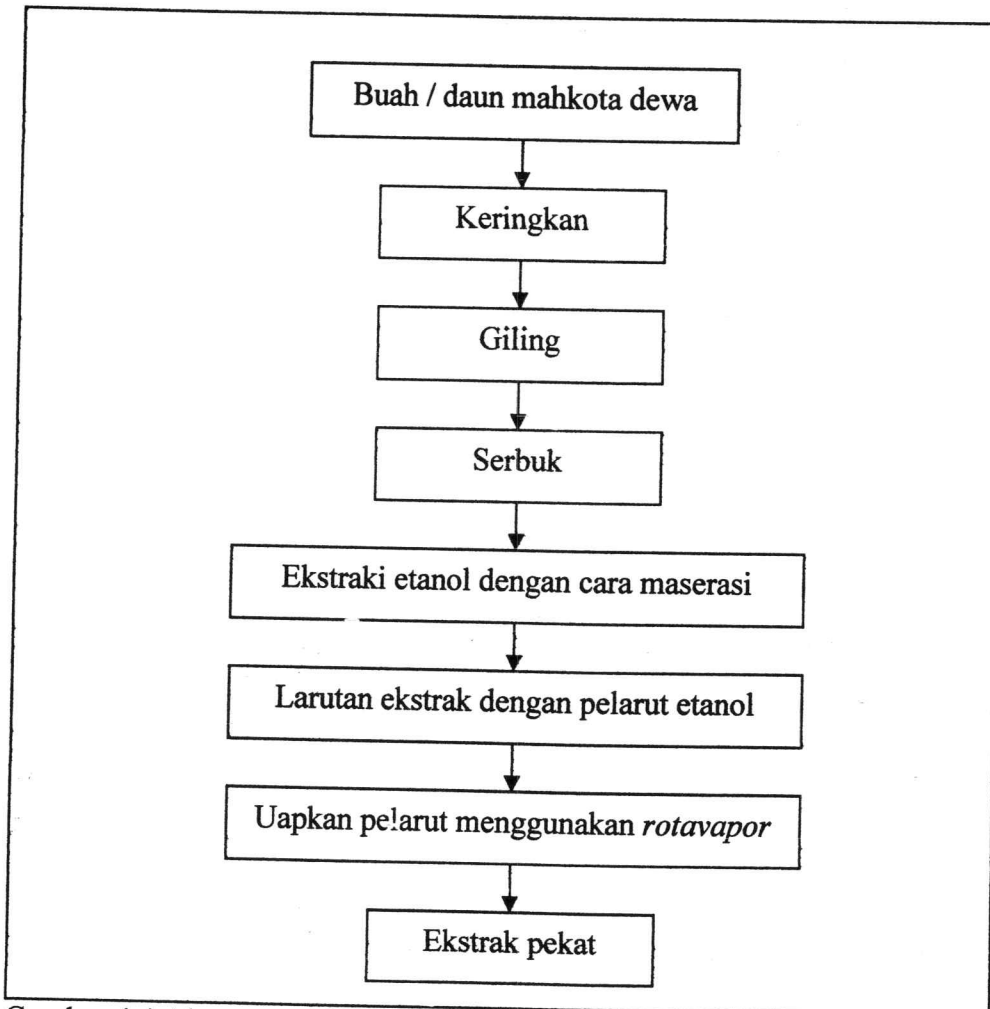
4.9.1 Prosedur ekstraksi buah dan daun mahkota dewa

(1). Prosedur mendapatkan ekstrak etanol buah mahkota dewa sebagai berikut:

- Buah mahkota dewa segar, daging buah diiris tipis, sedangkan bijinya dibuang.
- Anginkan sampai kering. Giling daging buah kering hingga menjadi serbuk.
- Serbuk buah mahkota dewa diekstraksi secara maserasi menggunakan etanol 96% selama 24 jam pada suhu ruang. Kemudian disaring untuk memisahkan filtrat (maserat) dari ampas (residu), lalu tampung filtrat.
- Uapkan pelarut etanol dalam filtrat menggunakan *rotary vacuum evaporator* (*Rotavapor*) pada suhu 30°C - 40°C (Harborne, 2006).
- Hasilnya berupa ekstrak etanol buah mahkota dewa pekat.

(2). Prosedur mendapatkan ekstrak etanol daun mahkota dewa sebagai berikut:

- Sediakan daun mahkota dewa segar, berwarna hijau tua.
- Anginkan daun sampai kering. Giling daun kering hingga menjadi serbuk.
- Serbuk daun mahkota dewa diekstraksi secara maserasi menggunakan etanol 96% selama 24 jam pada suhu ruang. Kemudian disaring untuk memisahkan filtrat (maserat) dari ampas (residu), lalu tampung filtrat.
- Uapkan pelarut etanol dalam filtrat menggunakan *rotary vacuum evaporator* (*Rotavapor*) pada suhu 30°C - 40°C (Harborne, 2006).
- Hasilnya berupa ekstrak etanol daun mahkota dewa pekat.



Gambar 4.4 Alur prosedur ekstraksi buah dan daun mahkota dewa.

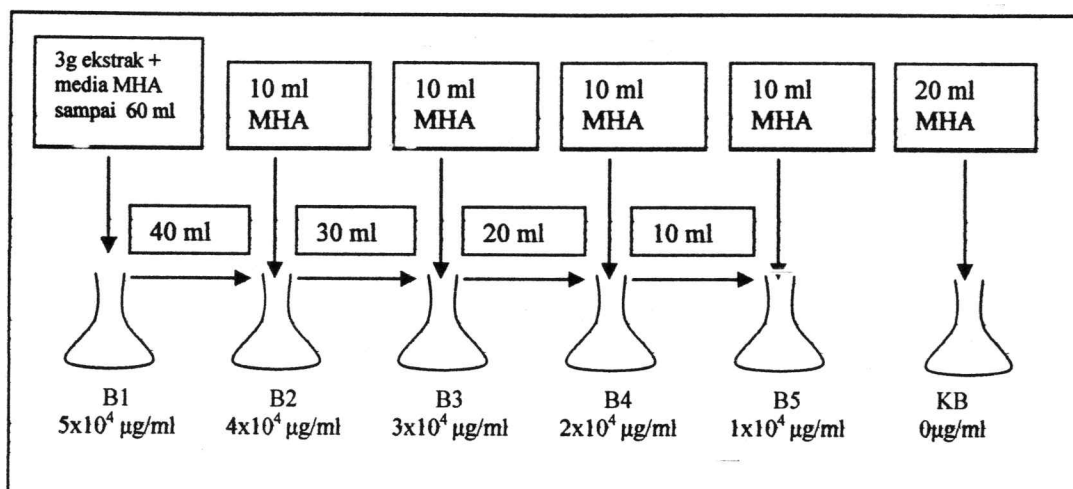
4.9.2 Prosedur uji antimikroba

Hari Pertama

1. Buat larutan standar $\frac{1}{2}$ Mc Farland yang terdiri dari: 0,5 ml Asam sulfat (H_2SO_4) 1% dan 99,5 ml Barium Chloride ($BaCl_2$) 1,175%. Larutan standar $\frac{1}{2}$ Mc Farland setara dengan suspensi bakteri $1,5 \times 10^8$ CFU/ml (Forbes et al., 2002).
2. Buat suspensi bakteri *P. aeruginosa* dalam larutan garam fisiologis, samakan kekeruhannya dengan larutan $\frac{1}{2}$ Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ CFU/ml), gunakan kertas putih bergaris hitam sebagai latar belakang. Encerkan suspensi bakteri dengan larutan garam fisiologis (1:150) sehingga konsentrasinya menjadi 1×10^6 CFU/ml. Suspensi ini diambil menggunakan ose terkalibrasi 10 μ l untuk diinokulasikan pada media MHA yang mengandung ekstrak, sehingga jumlah bakteri yang diinokulasikan adalah 1×10^4 CFU (Forbes et al., 2002).
3. Buat media MHA, ikuti petunjuk pabrik pembuat media.
4. Prosedur pembuatan media MHA yang mengandung ekstrak etanol buah mahkota dewa berbagai konsentrasi adalah sebagai berikut:
 - Buat larutan induk ekstrak etanol buah mahkota dewa, masukkan 3 g ekstrak etanol buah mahkota dewa ke dalam erlenmeyer, lalu tambahkan media MHA yang masih hangat sampai volume menjadi 60 ml. Sehingga konsentrasinya adalah 3 g / 60 ml (5×10^4 μ g/ml). Kemudian aduk.
 - Siapkan 6 erlenmeyer steril. Beri tanda B (buah) pada erlenmeyer yaitu: B1, B2, B3, B4, B5 dan KB (kontrol B).
 - Masukkan 60 ml larutan induk ekstrak buah mahkota dewa (5×10^4 μ g/ml) ke erlenmeyer B1. Kemudian lakukan serangkaian pengenceran.
 - Masukkan 10 ml MHA hangat ke setiap erlenmeyer B2, B3, B4, dan B5.
 - Ambil 40 ml dari erlenmeyer B1, masukkan ke erlenmeyer B2. Aduk.

- Ambil 30 ml dari erlenmeyer B2, masukkan ke erlenmeyer B3. Aduk.
- Ambil 20 ml dari erlenmeyer B3, masukkan ke erlenmeyer B4. Aduk.
- Ambil 10 ml dari erlenmeyer B4, masukkan ke erlenmeyer B5. Aduk.
- Erlenmeyer KB hanya diisi 15 ml MHA hangat tanpa ekstrak.

Sehingga konsentrasi larutan ekstrak buah mahkota dewa dalam media MHA di erlenmeyer B1, B2, B3, B4, B5 dan KB berturut – turut adalah $5 \times 10^4 \mu\text{g/ml}$; $4 \times 10^4 \mu\text{g/ml}$; $3 \times 10^4 \mu\text{g/ml}$; $2 \times 10^4 \mu\text{g/ml}$; $1 \times 10^4 \mu\text{g/ml}$ dan $0 \mu\text{g/ml}$.



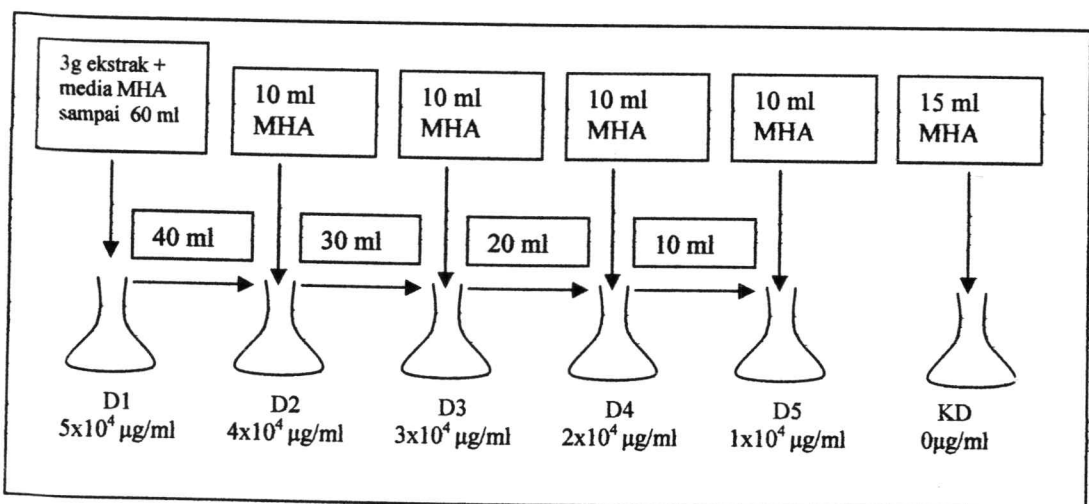
Gambar 4.5 Skema pengenceran konsentrasi ekstrak etanol buah mahkota dewa dalam media MHA hangat.

- Dari setiap erlenmeyer kemudian tuangkan ke dalam 5 petri dish (\varnothing 35 mm) masing-masing berisi 3 ml (ketebalan media 3 mm). Sisa media MHA yang mengandung ekstrak etanol buah mahkota dewa di dalam setiap erlenmeyer diperiksa kadar keasaman (pH)-nya menggunakan pH meter.
 - Tunggu sampai media MHA di dalam petri dish memadat.
5. Prosedur pembuatan media MHA yang mengandung ekstrak etanol daun mahkota dewa berbagai konsentrasi adalah sebagai berikut:
- Buat larutan induk ekstrak etanol daun mahkota dewa, masukkan 3 g ekstrak etanol daun mahkota dewa ke dalam erlenmeyer, lalu tambahkan media MHA

yang masih hangat sampai volume menjadi 60 ml. Sehingga konsentrasinya adalah $3 \text{ g} / 60 \text{ ml}$ ($5 \times 10^4 \mu\text{g/ml}$). Kemudian aduk.

- Siapkan 6 erlenmeyer steril. Beri tanda D (daun) pada erlenmeyer yaitu: D1, D2, D3, D4, D5 dan KD (kontrol D).
- Masukkan 60 ml larutan induk ekstrak daun mahkota dewa ($5 \times 10^4 \mu\text{g/ml}$) ke erlenmeyer D1. Kemudian lakukan serangkaian pengenceran.
- Masukkan 10 ml MHA hangat ke setiap erlenmeyer D2, D3, D4, dan D5.
- Ambil 40 ml dari erlenmeyer D1, masukkan ke erlenmeyer D2. Aduk.
- Ambil 30 ml dari erlenmeyer D2, masukkan ke erlenmeyer D3. Aduk.
- Ambil 20 ml dari erlenmeyer D3, masukkan ke erlenmeyer D4. Aduk.
- Ambil 10 ml dari erlenmeyer D4, masukkan ke erlenmeyer D5. Aduk.
- Erlenmeyer KD hanya diisi 15 ml MHA hangat tanpa ekstrak.

Sehingga konsentrasi larutan ekstrak daun mahkota dewa dalam media MHA di erlenmeyer D1, D2, D3, D4, D5 dan KD berturut – turut adalah $5 \times 10^4 \mu\text{g/ml}$; $4 \times 10^4 \mu\text{g/ml}$; $3 \times 10^4 \mu\text{g/ml}$; $2 \times 10^4 \mu\text{g/ml}$; $1 \times 10^4 \mu\text{g/ml}$ dan $0 \mu\text{g/ml}$.

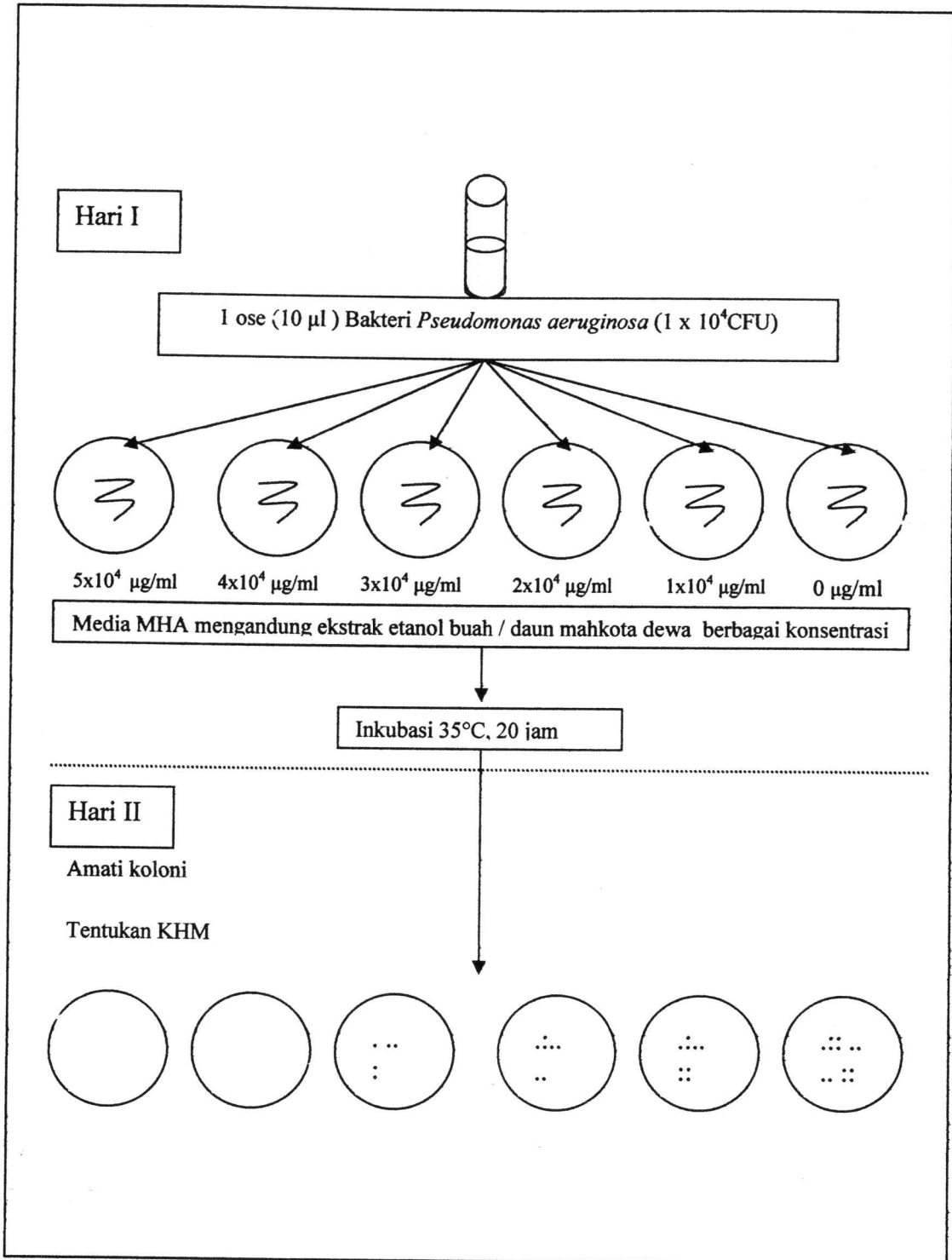


Gambar 4.6 Skema pengenceran konsentrasi ekstrak etanol daun mahkota dewa dalam media MHA hangat.

- Dari setiap erlenmeyer kemudian tuangkan ke dalam 5 petri dish (\varnothing 35 mm), masing-masing berisi 3 ml (ketebalan media 3 mm). Sisa media MHA yang mengandung ekstrak etanol daun mahkota dewa di dalam setiap erlenmeyer diperiksa kadar keasaman (pH) menggunakan pH meter.
 - Tunggu sampai media MHA di dalam petri dish memadat.
6. Media MHA yang sudah padat diinkubasi semalam untuk memastikan apakah media yang mengandung ekstrak dalam keadaan steril atau terkontaminasi.
 7. Setelah inkubasi, apabila media tetap steril tanpa kontaminasi, maka lakukan inokulasi bakteri *P.aeruginosa* sejumlah 1×10^4 CFU ke setiap permukaan media MHA di petri dish (Forbes et al., 2002), menggunakan 1 mata ose terkalibrasi (*calibrated loop*) 10 μ l.
 8. Cara inokulasi, buat goresan tegak lurus pada diameter media, kemudian buat goresan melintasi goresan yang pertama (Forbes et al., 2002).
 9. Inkubasi selama 20 jam pada suhu 35°C (Forbes et al., 2002).

Hari Kedua:

10. Amati pertumbuhan bakteri pada setiap petri dish.
11. Tentukan konsentrasi hambat minimal (KHM) ekstrak etanol buah dan ekstrak etanol daun mahkota dewa terhadap bakteri *P.aeruginosa*.
12. Tentukan nilai rata-rata KHM dari ekstrak etanol buah dan ekstrak etanol daun mahkota dewa terhadap bakteri *P.aeruginosa*.



Gambar 4.7 Alur prosedur uji antimikroba ekstrak etanol buah dan ekstrak etanol daun mahkota dewa terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

4.9.3 Prosedur pemeriksaan mikroskop elektron skening (MES)

1. Buat media Muler Hinton Cair (MHC) untuk pembiakan bakteri *P.aeruginosa* yang akan dipapar dengan ekstrak etanol buah dan daun mahkota dewa, yang selanjutnya digunakan sebagai spesimen dalam pemeriksaan MES. Pembuatan media MHC ikuti petunjuk dari pabrik pembuat media.
2. Sebelum inokulasi bakteri *P.aeruginosa*, media MHC yang sudah mengandung ekstrak etanol buah atau ekstrak etanol daun diambil satu ose untuk ditanam pada media agar darah (*Blood agar plate / BAP*) lalu diinkubasi pada 35°C 20 jam untuk uji sterilitas media MHC yang mengandung ekstrak.
3. Persiapkan 7 tabung yang terdiri dari:
 - Tabung A: berisi media MHC, suspensi bakteri *P.aeruginosa* konsentrasi 1×10^4 CFU / ml tanpa ekstrak etanol buah dan daun mahkota dewa ($0 \mu\text{g/ml}$), sebagai kontrol.
 - Tabung B: berisi media MHC, ekstrak etanol daun mahkota dewa konsentrasi $\frac{1}{2}$ nilai rata-rata KHM nya dan suspensi bakteri *P.aeruginosa* konsentrasi 1×10^4 CFU / ml.
 - Tabung C: berisi media MHC, ekstrak etanol daun mahkota dewa konsentrasi sama dengan nilai rata-rata KHM nya dan suspensi bakteri *P.aeruginosa* konsentrasi 1×10^4 CFU / ml.
 - Tabung D: berisi media MHC, ekstrak etanol daun mahkota dewa konsentrasi 2 kali nilai rata-rata KHM nya dan suspensi bakteri *P.aeruginosa* konsentrasi 1×10^4 CFU / ml.
 - Tabung E: berisi media MHC, ekstrak etanol buah mahkota dewa konsentrasi $\frac{1}{2}$ nilai rata-rata KHM nya dan suspensi bakteri *P.aeruginosu* konsentrasi 1×10^4 CFU / ml.

- Tabung F: berisi media MHC, ekstrak etanol buah mahkota dewa konsentrasi sama dengan nilai rata-rata KHM nya dan suspensi bakteri *P.aeruginosa* konsentrasi 1×10^4 CFU / ml.
 - Tabung G: berisi media MHC, ekstrak etanol buah mahkota dewa konsentrasi 2 kali nilai rata-rata KHM nya dan suspensi bakteri *P.aeruginosa* konsentrasi 1×10^4 CFU / ml.
4. Inkubasi tabung A – G pada 35°C selama 20 jam.
 5. Kemudian dari tabung A-G diambil sebagai spesimen untuk pemeriksaan menggunakan MES.
 6. Tahapan persiapan spesimen untuk pemeriksaan MES adalah sebagai berikut: (Hoediasmoro dkk., 1984).
 - Fiksasi.
 - Fiksasi dengan glutaraldehida dalam larutan penyangga fosfat pada $0 - 4^\circ\text{C}$ selama 1-2 jam, bilas dengan larutan penyangga fosfat sebanyak 3 kali, masing-masing selama 15 menit.
 - Fiksasi ulang (fiksasi kedua) dengan larutan osmium tetroksida dalam larutan penyangga fosfat selama 3-12 jam.
 - Bilas dengan larutan penyangga fosfat masing-masing selama 15 menit.
 - Dehidrasi.
 - Dehidrasi menggunakan etanol 25%, etanol 50%, etanol 70%, etanol 80%, etanol 90%, masing - masing selama 15 menit.
 - Etanol 100% selama 15 menit, dilakukan 2 kali.

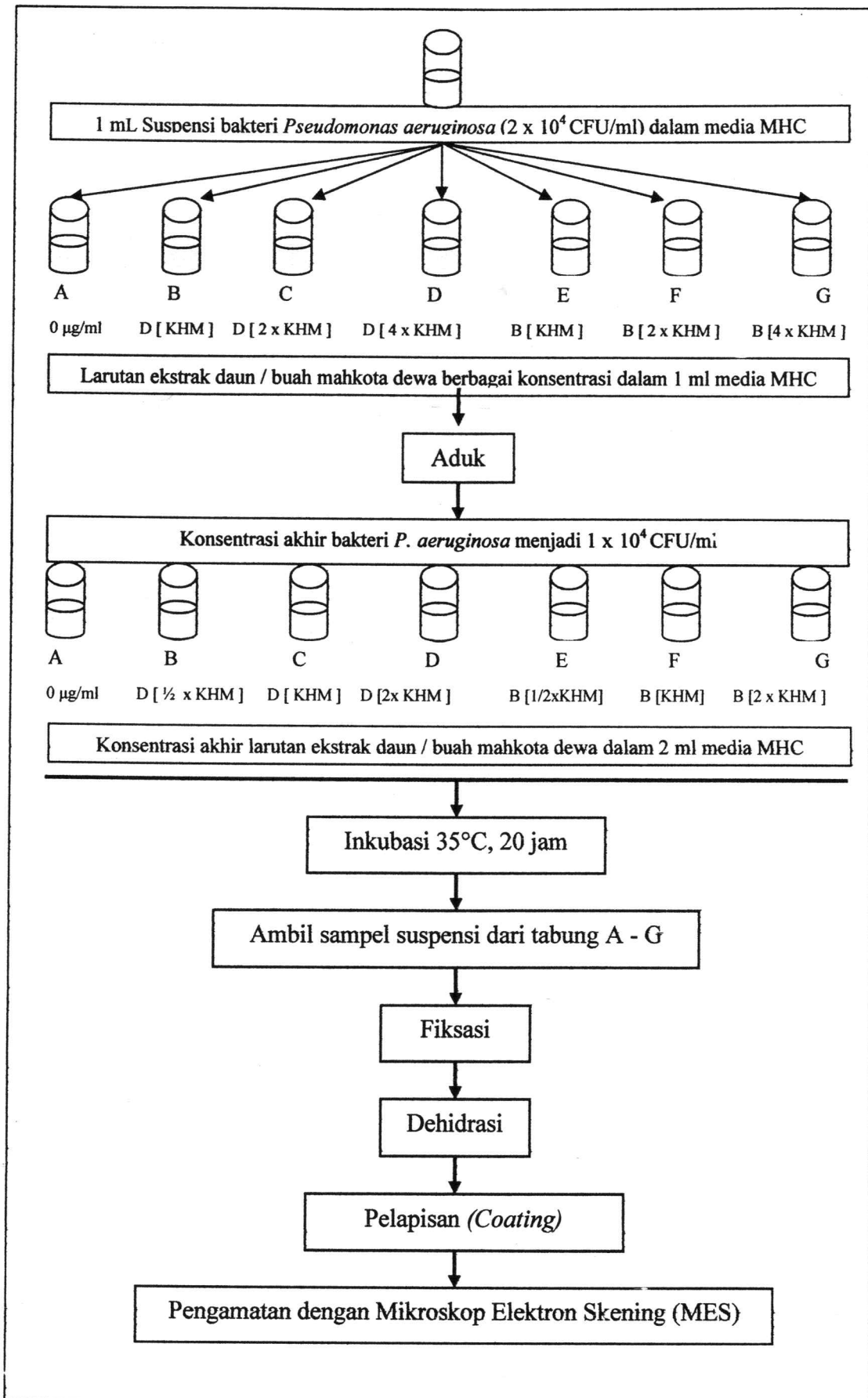
Kemudian dilakukan pengeringan titik kritis (*critical point drying*).

- Pelapisan (*Coating*).
 - Pelapisan bahan yang akan diperiksa dengan bahan konduktif, yang paling baik menggunakan emas murni.
 - Emas diuapkan dalam ruang hampa dengan pemanasan pada suhu yang sangat tinggi. Partikel dalam bentuk uap tersebut akan mengalami kondensasi dalam ruang hampa kemudian akan berjatuh seperti hujan melapisi sediaan.

7. Pengamatan dengan MES.

Dalam pengamatan menggunakan MES untuk mengetahui sifat aktifitas antimikroba ekstrak etanol buah dan ekstrak etanol daun mahkota dewa terhadap bakteri *P.aeruginosa* yang perlu diperhatikan adalah:

- Morfologi sel bakteri *P.aeruginosa* apakah tetap utuh, atau mengalami kerusakan atau lisis.
- Pembelahan sel bakteri *P.aeruginosa*.
- Jumlah sel bakteri *P.aeruginosa* per lapangan pandang.



Gambar 4.8 Alur prosedur pemeriksaan mikroskop elektron skening (MES).

4.10 Analisis Data

Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) ditentukan dari ada atau tidak adanya koloni bakteri *P.aeruginosa* pada media MHA yang mengandung ekstrak etanol buah dan ekstrak etanol daun konsentrasi tertentu, pengamatan secara langsung menggunakan mata (*visual*).

Untuk membandingkan potensi antimikroba ekstrak etanol buah dan ekstrak etanol daun mahkota dewa dilakukan dengan cara membandingkan nilai rata-rata KHM ekstrak etanol buah mahkota dewa dengan nilai rata-rata KHM ekstrak etanol daun mahkota dewa, data dianalisis secara statistik menggunakan *Student's T Test*.

Untuk mengetahui sifat aktifitas antimikroba ekstrak etanol buah dan ekstrak etanol daun mahkota dewa terhadap bakteri *P.aeruginosa* pada KHM apakah bakterisidal atau bakteriostatik dilakukan menggunakan mikroskop elektron skening (MES). Hasil pemeriksaan MES dijabarkan secara diskriptif.

BAB 5

HASIL DAN ANALISIS PENELITIAN

5.1 Hasil Penelitian

5.1.1 Hasil ekstraksi buah dan daun mahkota dewa.

Pada penelitian ini 100 g buah mahkota dewa kering digiling menghasilkan 90 g serbuk buah, sedangkan 50 g daun mahkota dewa kering digiling menghasilkan 45 g serbuk daun. Serbuk buah dan daun mahkota dewa digunakan untuk proses ekstraksi secara maserasi menggunakan pelarut etanol 96%, menghasilkan ekstrak etanol buah mahkota dewa pekat sebanyak 19,35 g dan ekstrak etanol daun mahkota dewa pekat sebanyak 9,28 g.

Tabel 5.1 Bahan dan hasil ekstraksi

Bahan	Berat	Pelarut	Volume pelarut	Hasil ekstrak pekat	Rendemen (ekstrak pekat / serbuk x100%)
Serbuk buah mahkota dewa	90 g	Etanol 96%	1250 ml	19,35 g	21,5 %
Serbuk daun mahkota dewa	45 g	Etanol 96%	500 ml	9,28 g	20,6 %

5.1.2 Hasil uji antimikroba.

Konsentrasi ekstrak etanol buah dan ekstrak etanol daun mahkota dewa yang akan diuji aktifitas antimikrobanya terhadap bakteri *P.aeruginosa* diperoleh melalui uji pendahuluan. Konsentrasi ekstrak dimulai dari yang terendah 5 µg/ml sampai konsentrasi yang bisa menghambat pertumbuhan bakteri. Hasilnya pada konsentrasi 5×10^4 µg/ml ekstrak etanol buah dan ekstrak etanol daun mahkota dewa masing-masing dapat menghambat pertumbuhan 1×10^2 CFU bakteri *P.aeruginosa*, sedangkan

pada konsentrasi 5×10^3 $\mu\text{g/ml}$ ekstrak etanol buah dan ekstrak etanol daun mahkota dewa tidak dapat menghambat bakteri *P.aeruginosa* (tabel 5.2).

Dilakukan uji pendahuluan lagi pada konsentrasi antara 5×10^3 $\mu\text{g/ml}$ – 5×10^4 $\mu\text{g/ml}$, jumlah inokulum 1×10^4 CFU sesuai dengan inokulum yang akan digunakan dalam uji antimikroba pada penelitian ini. Hasilnya ekstrak etanol buah mahkota dewa mampu menghambat bakteri *P.aeruginosa* pada konsentrasi 5×10^4 $\mu\text{g/ml}$, sedangkan ekstrak etanol daun mahkota dewa mampu menghambat bakteri *P.aeruginosa* pada konsentrasi 2×10^4 $\mu\text{g/ml}$ (tabel 5.3).

Tabel 5.2 Hasil uji pendahuluan 1. Pertumbuhan *P.aeruginosa* (1×10^2 CFU) pada media MHA yang mengandung ekstrak etanol buah dan daun mahkota dewa.

	Koloni bakteri <i>P.aeruginosa</i> pada MHA yang mengandung ekstrak					
	($5 \times 10^4 \mu\text{g/ml}$)	($5 \times 10^3 \mu\text{g/ml}$)	($5 \times 10^2 \mu\text{g/ml}$)	($50 \mu\text{g/ml}$)	($5 \mu\text{g/ml}$)	($0 \mu\text{g/ml}$)
Ekstrak Buah	-	+	+	+	+	+
Ekstrak Daun	-	+	+	+	+	+

Keterangan: + = Ada pertumbuhan bakteri; - = Tidak ada pertumbuhan bakteri.

Tabel 5.3 Hasil uji pendahuluan 2. Pertumbuhan *P.aeruginosa* (1×10^4 CFU) pada media MHA yang mengandung ekstrak etanol buah dan daun mahkota dewa.

	Koloni bakteri <i>P.aeruginosa</i> pada MHA yang mengandung ekstrak					
	($5 \times 10^4 \mu\text{g/ml}$)	($4 \times 10^4 \mu\text{g/ml}$)	($3 \times 10^4 \mu\text{g/ml}$)	($2 \times 10^4 \mu\text{g/ml}$)	($1 \times 10^4 \mu\text{g/ml}$)	($0 \mu\text{g/ml}$)
Ekstrak Buah	-	+	+	+	+	+
Ekstrak Daun	-	-	-	-	+	+

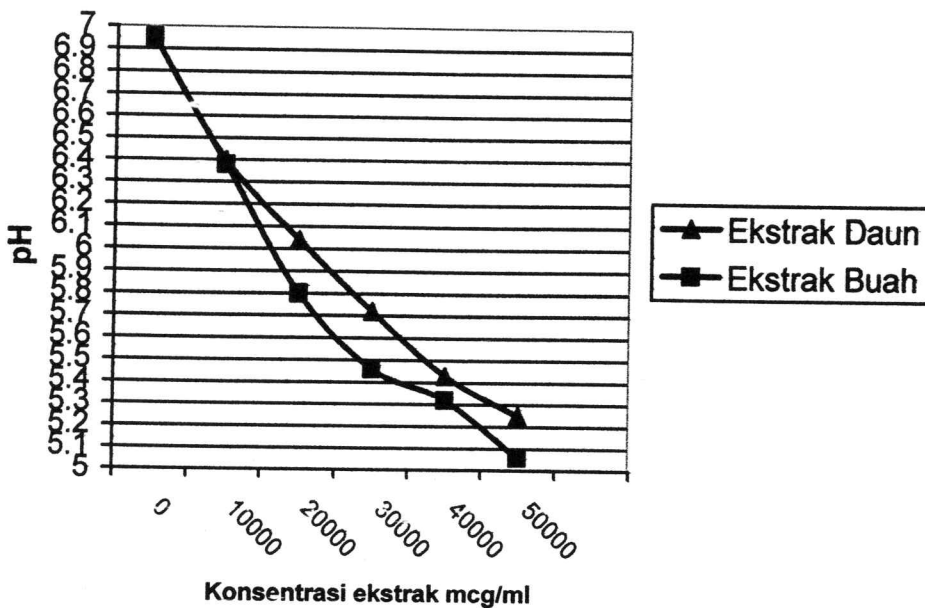
Keterangan: + = Ada pertumbuhan; - = Tidak ada pertumbuhan bakteri.

Berdasarkan hasil uji pendahuluan maka ditetapkan konsentrasi ekstrak etanol buah dan ekstrak etanol daun mahkota dewa yang akan diuji aktifitas antimikrobanya terhadap bakteri *P.aeruginosa* adalah 5×10^4 $\mu\text{g/ml}$, 4×10^4 $\mu\text{g/ml}$, 3×10^4 $\mu\text{g/ml}$, 2×10^4 $\mu\text{g/ml}$ dan 1×10^4 $\mu\text{g/ml}$ serta kontrol tanpa mengandung ekstrak ($0 \mu\text{g/ml}$).

Pada penelitian ini diperiksa keasaman (pH) ekstrak etanol buah dan ekstrak etanol daun mahkota dewa serta media MHA yang mengandung ekstrak berbagai konsentrasi. Hasil pengukuran menggunakan pH meter menunjukkan pH ekstrak etanol buah mahkota dewa lebih rendah (pH= 4,40) daripada ekstrak etanol daun mahkota dewa (pH= 4,43). Media MHA yang mengandung ekstrak etanol buah mahkota dewa juga menunjukkan pH yang lebih rendah daripada media MHA yang mengandung ekstrak etanol daun mahkota dewa pada konsentrasi yang sama (tabel 5.4 dan gambar 5.1).

Tabel 5.4 Kadar keasaman (pH) media MHA yang mengandung ekstrak etanol buah dan ekstrak etanol daun mahkota dewa berbagai konsentrasi.

Konsentrasi ekstrak dalam media MHA	Kadar keasaman (pH)	
	Buah	Daun
Ekstrak pekat murni	4,40	4,43
5×10^4 µg/ml	5,06	5,25
4×10^4 µg/ml	5,32	5,43
3×10^4 µg/ml	5,46	5,72
2×10^4 µg/ml	5,80	6,04
1×10^4 µg/ml	6,38	6,40
0 µg/ml	6,95	6,95



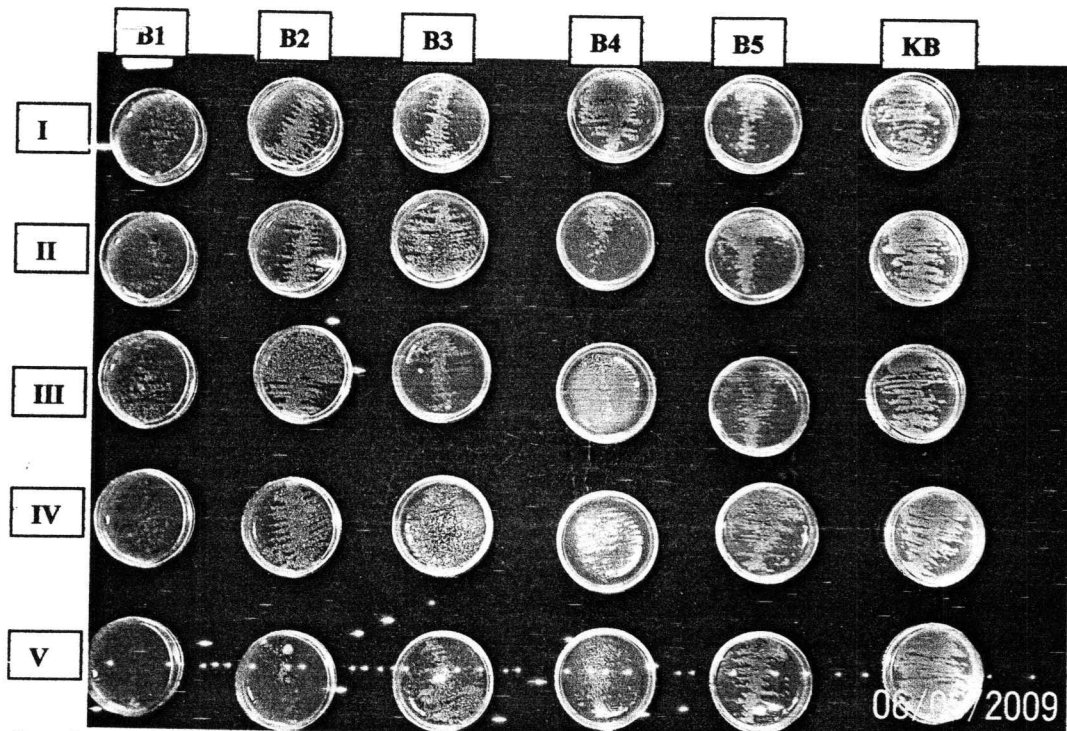
Gambar 5.1 Grafik kadar keasaman (pH) media MHA yang mengandung ekstrak etanol buah dan ekstrak etanol daun mahkota dewa.

Hasil uji antimikroba ekstrak etanol buah mahkota dewa terhadap bakteri *P.aeruginosa* menunjukkan ada koloni bakteri *P.aeruginosa* di permukaan media MHA yang mengandung ekstrak etanol buah mahkota dewa semua konsentrasi (tabel 5.5 dan gambar 5.2). Ekstrak etanol buah mahkota dewa sampai konsentrasi 5×10^4 $\mu\text{g/ml}$ tidak mampu menghambat bakteri *P.aeruginosa* pada semua pengulangan, maka nilai rata-rata KHM-nya lebih dari 5×10^4 $\mu\text{g/ml}$.

Tabel 5.5 Pertumbuhan bakteri *P.aeruginosa* pada media MHA yang mengandung ekstrak etanol buah mahkota dewa.

Repli kasi	Koloni bakteri <i>P.aeruginosa</i> pada petri dish					
	B1 ($5 \times 10^4 \mu\text{g/ml}$)	B2 ($4 \times 10^4 \mu\text{g/ml}$)	B3 ($3 \times 10^4 \mu\text{g/ml}$)	B4 ($2 \times 10^4 \mu\text{g/ml}$)	B5 ($1 \times 10^4 \mu\text{g/ml}$)	KB ($0 \mu\text{g/ml}$)
1	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+

Keterangan : + = Ada pertumbuhan bakteri.



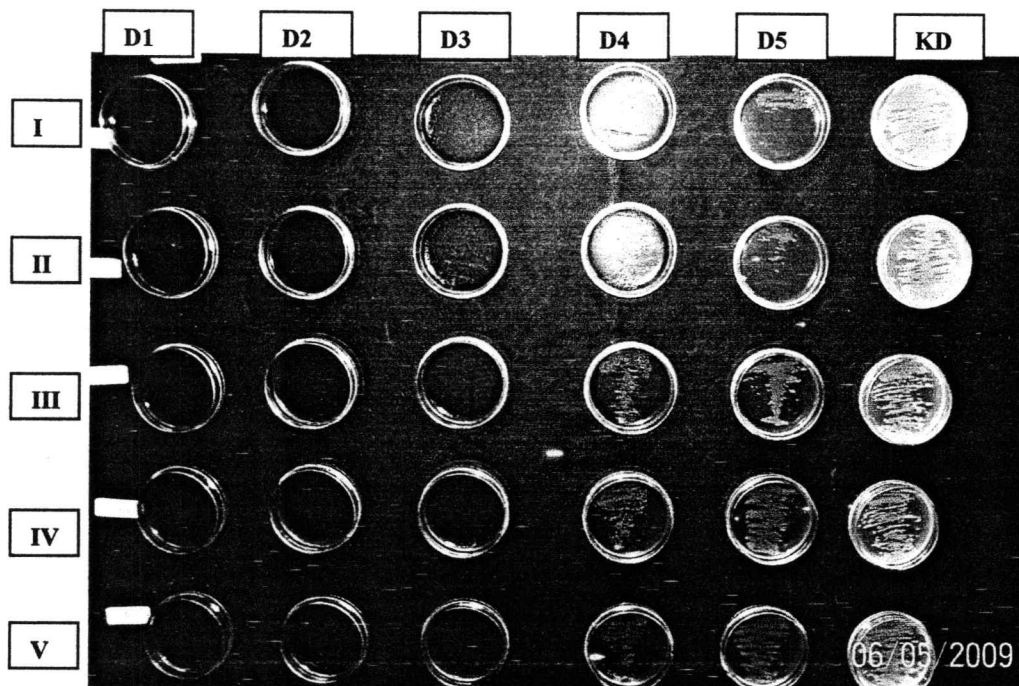
Gambar 5.2 Hasil uji antimikroba ekstrak etanol buah mahkota dewa terhadap bakteri *P.aeruginosa*. (Baris I-V adalah replikasi, kolom kiri ke kanan adalah konsentrasi ekstrak etanol buah mahkota dewa dalam media MHA, B1: $5 \times 10^4 \mu\text{g/ml}$, B2: $4 \times 10^4 \mu\text{g/ml}$, B3: $3 \times 10^4 \mu\text{g/ml}$, B4: $2 \times 10^4 \mu\text{g/ml}$, B5: $1 \times 10^4 \mu\text{g/ml}$ dan KB: $0 \mu\text{g/ml}$).

Hasil uji antimikroba ekstrak etanol daun mahkota dewa terhadap bakteri *P.aeruginosa* menunjukkan adanya pertumbuhan koloni bakteri *P.aeruginosa* di permukaan media MHA yang mengandung ekstrak etanol daun mahkota dewa konsentrasi 0 µg/ml – 30.000 µg/ml, tetapi pada konsentrasi 40.000 µg/ml dan 50.000 µg/ml tidak ada pertumbuhan koloni bakteri (tabel 5.6 dan gambar 5.3).

Tabel 5.6 Pertumbuhan bakteri *P.aeruginosa* pada media MHA yang mengandung ekstrak etanol daun mahkota dewa.

Repli Kasi	Koloni bakteri <i>P.aeruginosa</i> pada petri dish					KD (0µg/ml)
	D1 (50.000µg/ml)	D2 (40.000µg/ml)	D3 (30.000µg/ml)	D4 (20.000µg/ml)	D5 (10.000µg/ml)	
1	-	-	+	+	+	+
2	-	-	+	+	+	+
3	-	-	+	+	+	+
4	-	-	+	+	+	+
5	-	-	+	+	+	+

Keterangan: + = Ada pertumbuhan bakteri; - = Tidak ada pertumbuhan bakteri.



Gambar 5.3 Hasil uji antimikroba ekstrak etanol daun mahkota dewa terhadap bakteri *P.aeruginosa*. (Baris I-V adalah replikasi, kolom kiri ke kanan adalah konsentrasi ekstrak etanol daun mahkota dewa dalam media MHA, D1: 50.000 µg/ml, D2: 40.000 µg/ml, D3: 30.000 µg/ml, D4: 20.000 µg/ml, D5: 10.000 µg/ml dan KD: 0 µg/ml).

Bakteri *P.aeruginosa* tidak tumbuh di permukaan media MHA yang mengandung ekstrak etanol daun mahkota dewa mulai konsentrasi 4×10^4 $\mu\text{g/ml}$, hal ini terjadi pada semua pengulangan, sehingga rata-rata KHM ekstrak etanol daun mahkota dewa terhadap bakteri *P.aeruginosa* adalah 4×10^4 $\mu\text{g/ml}$.

Nilai rata-rata KHM ekstrak etanol buah mahkota dewa terhadap bakteri *P.aeruginosa* adalah $> 5 \times 10^4$ $\mu\text{g/ml}$, sedangkan nilai rata-rata KHM ekstrak etanol daun mahkota dewa terhadap bakteri *P.aeruginosa* adalah 4×10^4 $\mu\text{g/ml}$ (tabel 5.7).

Tabel 5.7 Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) ekstrak etanol buah dan ekstrak etanol daun mahkota dewa terhadap bakteri *P.aeruginosa*.

Repli Kasi	KHM ekstrak etanol buah Mahkota dewa	KHM ekstrak etanol daun mahkota dewa
1	$> 5 \times 10^4$ $\mu\text{g/ml}^*$	4×10^4 $\mu\text{g/ml}$
2	$> 5 \times 10^4$ $\mu\text{g/ml}^*$	4×10^4 $\mu\text{g/ml}$
3	$> 5 \times 10^4$ $\mu\text{g/ml}^*$	4×10^4 $\mu\text{g/ml}$
4	$> 5 \times 10^4$ $\mu\text{g/ml}^*$	4×10^4 $\mu\text{g/ml}$
5	$> 5 \times 10^4$ $\mu\text{g/ml}^*$	4×10^4 $\mu\text{g/ml}$
Rerata	$> 5 \times 10^4$ $\mu\text{g/ml}^*$	4×10^4 $\mu\text{g/ml}$

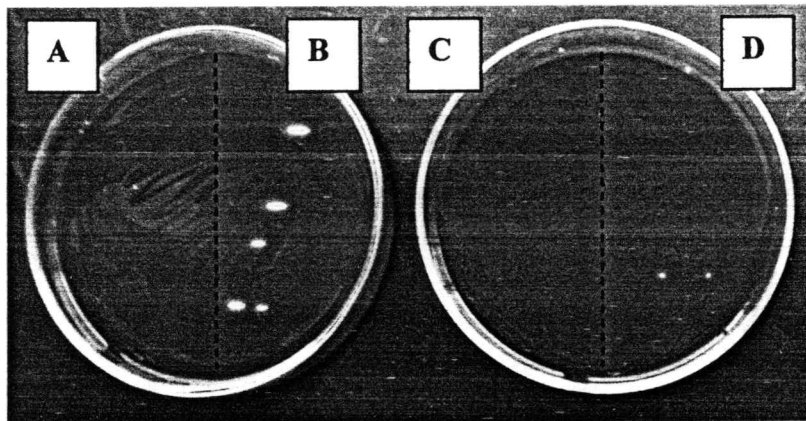
Keterangan : * = Sampai konsentrasi 5×10^4 $\mu\text{g/ml}$ tidak menghambat *P.aeruginosa*.

5.1.3 Hasil pemeriksaan mikroskop elektron skening (MES)

Berdasarkan hasil uji antimikroba secara *in vitro* metode dilusi-agar yang menunjukkan ekstrak etanol buah mahkota dewa sampai konsentrasi 5×10^4 $\mu\text{g/ml}$ tidak memiliki aktifitas antimikroba terhadap bakteri *P.aeruginosa*, maka tidak dilanjutkan dengan pemeriksaan menggunakan MES. Sedangkan ekstrak etanol daun mahkota dewa yang memiliki aktifitas antimikroba terhadap bakteri *P.aeruginosa* dengan nilai rata-rata KHM sebesar 4×10^4 $\mu\text{g/ml}$ dilanjutkan dengan pemeriksaan menggunakan MES untuk mengetahui sifat aktifitas antimikroba ekstrak etanol daun mahkota dewa apakah bakterisidal atau bakteriostatik.

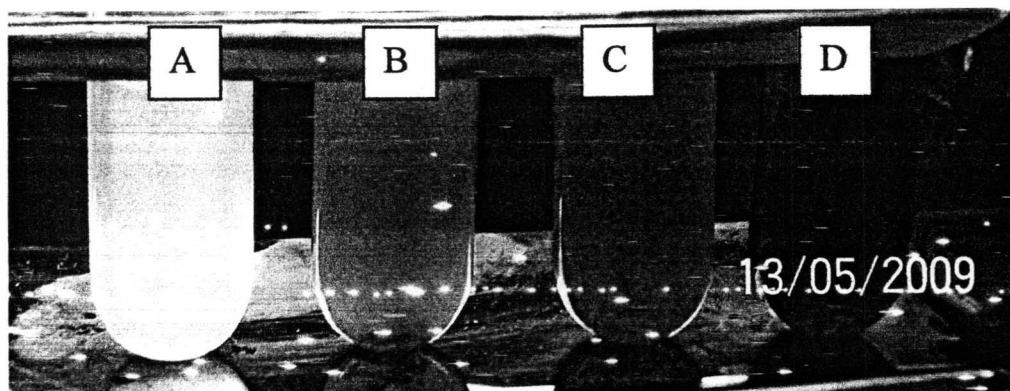
Media perbenihan Muller Hinton Cair (MHC) yang mengandung ekstrak etanol daun mahkota dewa beberapa konsentrasi dibuat dalam tabung A, 0 $\mu\text{g/ml}$ (kontrol);

tabung B, 2×10^4 $\mu\text{g/ml}$ ($\frac{1}{2}$ x KHM); tabung C, 4×10^4 $\mu\text{g/ml}$ (KHM); dan tabung D, 8×10^4 $\mu\text{g/ml}$ (2 x KHM). Hasil uji sterilitas media MHC dari tabung A, B, C dan D yang ditanam pada media agar darah menunjukkan tidak ada koloni bakteri (gambar 5.4), sehingga dipastikan media MHC yang mengandung ekstrak etanol daun mahkota dewa pada tabung A, B, C dan D dalam keadaan steril.



Gambar 5.4 Hasil uji sterilitas media MHC dari tabung A, B, C dan D pada media agar darah. (Satu petri dish dibagi dua, menunjukkan tidak ada bakteri / steril).

Hasil penanaman bakteri *P.aeruginosa* ke tabung A, B, C dan D setelah inkubasi tampak ada pertumbuhan koloni bakteri *P.aeruginosa* pada tabung A, B dan C, ditandai adanya kekeruhan dan koloni putih pada media MHC, sedangkan pada tabung D tidak ada pertumbuhan koloni bakteri (gambar 5.5). Suspensi dari masing-masing tabung digunakan sebagai spesimen pemeriksaan menggunakan MES.



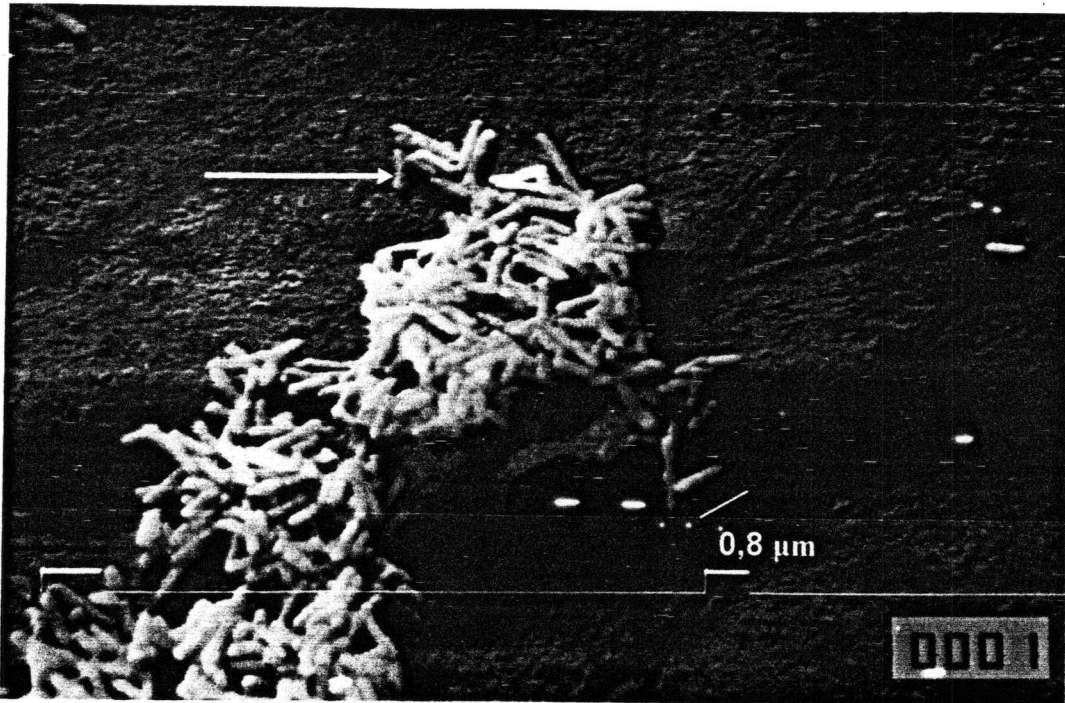
Gambar 5.5 Hasil inkubasi tabung A, B dan C keruh, tabung D tidak keruh.

Hasil pemeriksaan menggunakan MES terhadap bakteri *P.aeruginosa* yang tidak dipapar dengan ekstrak etanol daun mahkota dewa, konsentrasi $0 \mu\text{g/ml}$ (kontrol, yang berasal dari tabung A) menunjukkan sel bakteri *P.aeruginosa* tidak mengalami kerusakan morfologi, ukuran panjang sel bakteri $0,8 \mu\text{m}$, tampak ada pembelahan sel dan jumlah sel perlapangan pandang sangat banyak (gambar 5.6).

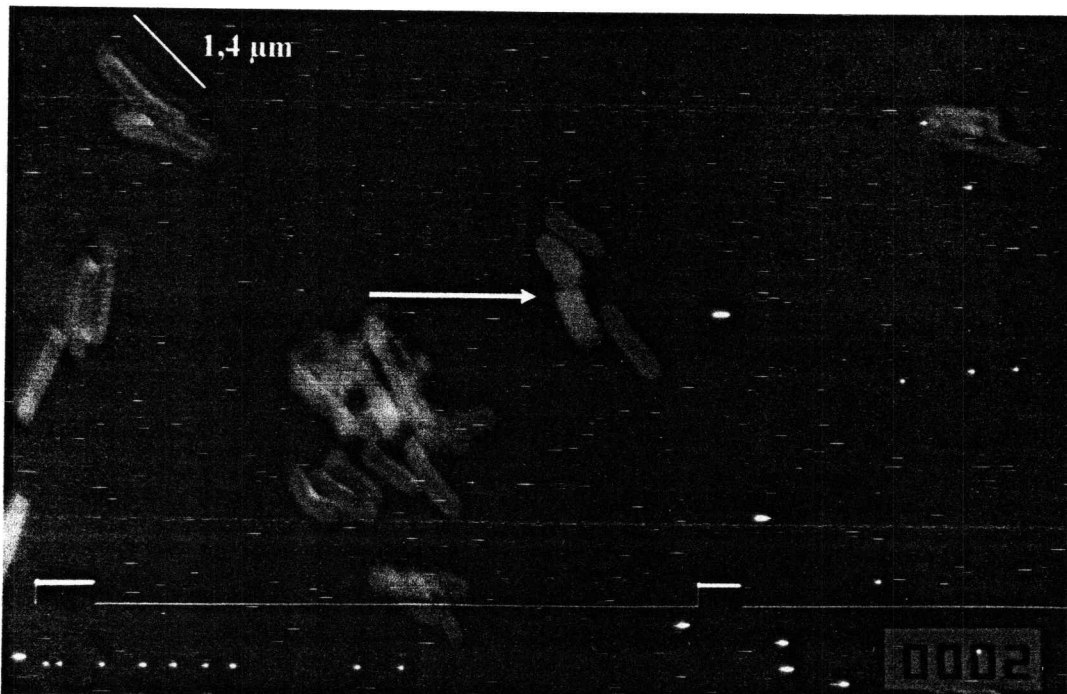
Hasil pemeriksaan menggunakan MES terhadap bakteri *P.aeruginosa* yang dipapar dengan ekstrak etanol daun mahkota dewa konsentrasi $2 \times 10^4 \mu\text{g/ml}$ ($1/2 \times$ KHM, yang berasal dari tabung B) menunjukkan sel bakteri *P.aeruginosa* tidak mengalami kerusakan, tetapi panjang sel bakteri bertambah mencapai $1,4 \mu\text{m}$, ukuran tampak lebih besar daripada yang bakteri yang tidak dipapar ekstrak etanol daun mahkota dewa. Tampak ada pembelahan sel tetapi jumlah sel bakteri perlapangan pandang lebih sedikit daripada yang tidak dipapar ekstrak etanol daun mahkota dewa (gambar 5.7).

Hasil pemeriksaan menggunakan MES terhadap bakteri *P.aeruginosa* yang dipapar dengan ekstrak etanol daun mahkota dewa konsentrasi $4 \times 10^4 \mu\text{g/ml}$ (KHM yang berasal dari tabung C) menunjukkan sel bakteri *P.aeruginosa* tidak mengalami kerusakan, tetapi ukuran sel tampak lebih besar dari pada bakteri yang dipapar ekstrak etanol daun dari tabung B, ada sel bakteri yang panjangnya mencapai $1,6 \mu\text{m}$, masih tampak ada pembelahan sel tetapi jumlah sel perlapangan pandang tinggal sedikit, seperti tampak pada gambar 5.8.

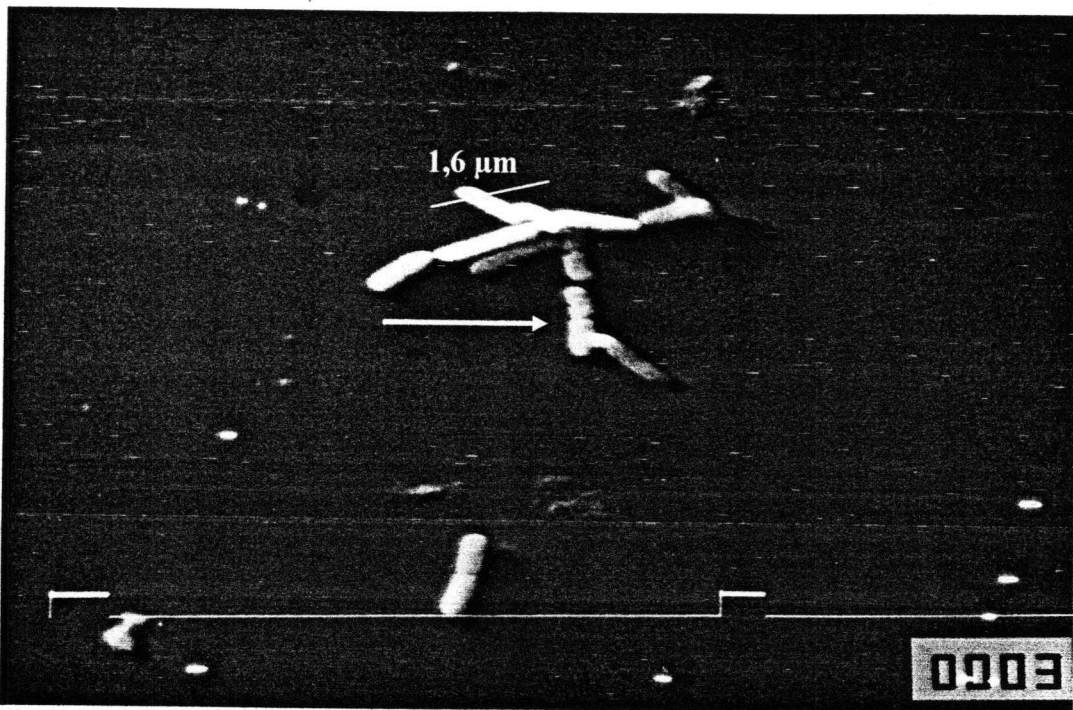
Hasil pemeriksaan menggunakan MES terhadap bakteri *P.aeruginosa* yang dipapar dengan ekstrak etanol daun mahkota dewa konsentrasi $8 \times 10^4 \mu\text{g/ml}$ ($2 \times$ KHM yang berasal dari tabung D) menunjukkan sel bakteri *P.aeruginosa* mengalami kerusakan morfologi sehingga lisis, menyisakan debris tanpa ada sel bakteri yang utuh (gambar 5.9).



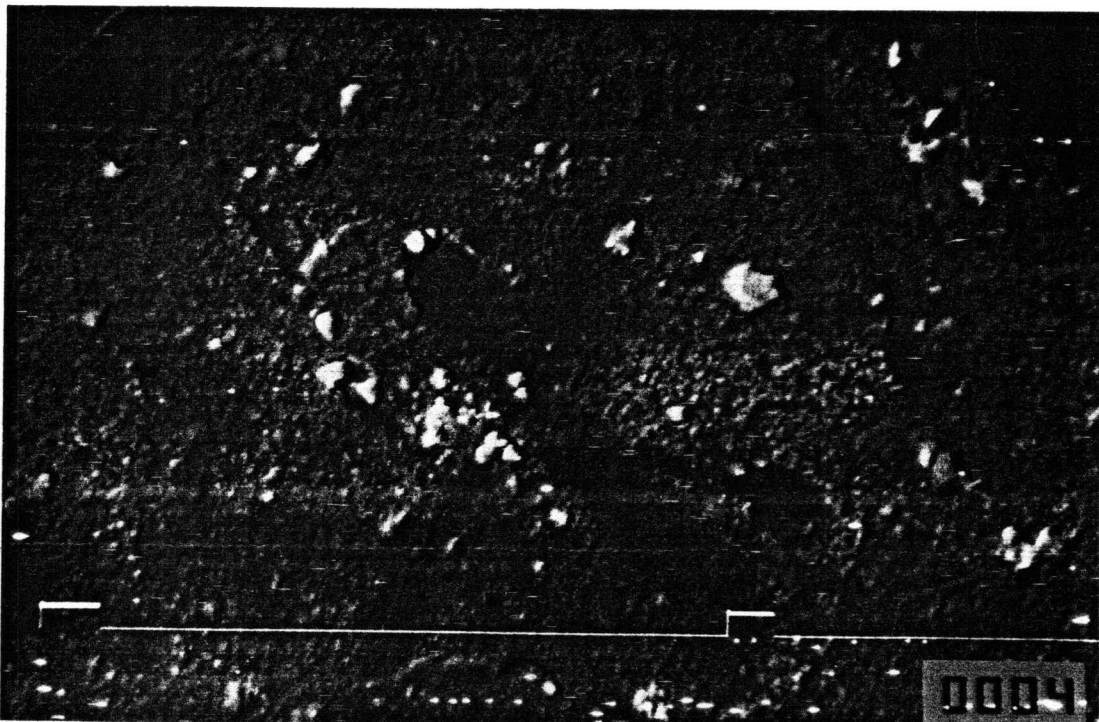
Gambar 5.6 Mikrograf elektron skening bakteri *P.aeruginosa* yang tidak dipapar dengan ekstrak etanol daun mahkota dewa / konsentrasi 0 $\mu\text{g/ml}$ (kontrol). Tanda panah menunjukkan pembelahan sel *P.aeruginosa*, tanda garis menunjukkan panjang bakteri, pembesaran 7500 kali.



Gambar 5.7 Mikrograf elektron skening bakteri *P.aeruginosa* yang dipapar dengan ekstrak etanol daun mahkota dewa konsentrasi $2 \times 10^4 \mu\text{g/ml}$, ($1/2 \times \text{KHM}$). Tanda panah menunjukkan pembelahan sel *P.aeruginosa*, tanda garis menunjukkan panjang bakteri, pembesaran 7500 kali.



Gambar 5.8 Mikrograf elektron skening bakteri *P.aeruginosa* yang dipapar dengan ekstrak etanol daun mahkota dewa konsentrasi 4×10^4 $\mu\text{g/ml}$, (KHM). Tanda panah menunjukkan pembelahan sel bakteri *P.aeruginosa*, tanda garis menunjukkan panjang bakteri, pembesaran 7500 kali.



Gambar 5.9 Mikrograf elektron skening bakteri *P.aeruginosa* yang dipapar dengan ekstrak etanol daun mahkota dewa konsentrasi 8×10^4 $\mu\text{g/ml}$, (2 x KHM). Sel bakteri *P.aeruginosa* mengalami lisis, sehingga tidak ada sel bakteri *P.aeruginosa* yang utuh. Pembesaran 7500 kali.

5.2 Analisis Hasil Penelitian

5.2.1 Perbedaan potensi antimikroba ekstrak etanol buah mahkota dewa dan ekstrak etanol daun mahkota dewa terhadap bakteri *P.aeruginosa*.

Berdasarkan hasil uji antimikroba secara dilusi agar, nilai rerata KHM ekstrak etanol daun mahkota dewa terhadap bakteri *P.aeruginosa* adalah 4×10^4 µg/ml. Sedangkan nilai KHM ekstrak etanol buah mahkota dewa secara absolut tidak dapat ditentukan, karena hingga konsentrasi 5×10^4 µg/ml tidak dapat menghambat bakteri *P.aeruginosa*, sehingga nilai rerata KHM-nya adalah $> 5 \times 10^4$ µg/ml. Nilai KHM yang tidak dapat ditentukan ini menyebabkan data tidak dapat dianalisis secara statistik menggunakan *Student's T test*. Sehingga perbedaan potensi antimikroba antara ekstrak etanol buah mahkota dewa dan ekstrak etanol daun mahkota dewa secara statistik tidak dapat ditentukan.

Meskipun secara statistik tidak dapat dianalisis perbedaan potensi antimikrobanya, tetapi secara nyata tampak rerata KHM ekstrak etanol daun mahkota dewa lebih rendah daripada rerata KHM ekstrak etanol buah mahkota dewa. Hal ini menunjukkan potensi antimikroba ekstrak etanol daun mahkota dewa lebih kuat daripada ekstrak etanol buah mahkota dewa terhadap bakteri *P.aeruginosa*.

5.2.2 Perbedaan sifat aktifitas antimikroba ekstrak etanol buah mahkota dewa dan ekstrak etanol daun mahkota dewa terhadap bakteri *P.aeruginosa*.

Pada penelitian ini perbedaan sifat aktifitas antimikroba ekstrak etanol buah mahkota dewa dan ekstrak etanol daun mahkota dewa terhadap bakteri *P.aeruginosa* tidak dapat dilakukan. Hal ini terjadi karena pemeriksaan sifat aktifitas antimikroba menggunakan MES hanya dilakukan terhadap ekstrak etanol daun mahkota dewa saja, sedangkan ekstrak etanol buah mahkota dewa tidak diperiksa karena sampai konsentrasi 5×10^4 µg/ml tidak memiliki aktifitas antimikroba terhadap bakteri *P.aeruginosa*.

Berdasar hasil pemeriksaan MES didapatkan ekstrak etanol daun mahkota dewa mampu melisiskan sel bakteri *P.aeruginosa* pada konsentrasi 8×10^4 $\mu\text{g/ml}$ (bersifat bakterisidal), seperti terlihat pada gambar 5.9. Sementara itu pada konsentrasi 2×10^4 $\mu\text{g/ml}$ dan 4×10^4 $\mu\text{g/ml}$ tampak morfologi sel bakteri tetap utuh dan masih terjadi pembelahan sel, tetapi peningkatan konsentrasi ekstrak etanol daun mahkota dewa ternyata menghambat pertumbuhan dan menurunkan jumlah sel *P.aeruginosa* perlapangan pandang, sehingga menunjukkan sifat bakteriostatik. Peningkatan konsentrasi ekstrak etanol daun mahkota dewa juga menyebabkan peningkatan ukuran sel bakteri *P.aeruginosa*, terutama terjadi pemanjangan (*elongation*) sel bakteri (seperti pada gambar 5.6, 5.7 dan 5.8).

BAB 6**PEMBAHASAN**

Pada penelitian ini proses ekstraksi buah dan daun mahkota dewa menggunakan cara maserasi. Berdasarkan literatur, metode ekstraksi secara maserasi ataupun perkolasi dapat digunakan untuk memperoleh ekstrak tanaman yang diduga mengandung bahan antimikroba dan akan diuji aktifitas antimikrobanya (Dey, 1991). Etanol dipilih sebagai pelarut proses ekstraksi dalam penelitian ini karena hampir semua senyawa tanaman yang punya aktifitas antimikroba merupakan senyawa aromatik atau terlarut dalam senyawa organik yang dapat dilarutkan melalui ekstraksi awal menggunakan etanol atau metanol (Cowan, 1999), selain itu juga sesuai dengan metode yang digunakan dalam farmakognosi bahan tanaman, yang menyatakan bahwa alkohol merupakan pelarut umum bagi banyak senyawa dalam tanaman (Evans, 2002). Konsentrasi etanol yang digunakan dalam penelitian ini adalah 96%, tujuannya selain untuk melarutkan senyawa-senyawa yang ada di dalam serbuk buah dan daun mahkota dewa juga untuk mendapatkan ekstrak yang kandungan airnya sedikit sehingga lebih mudah diuapkan pada suhu rendah untuk mendapatkan ekstrak pekat. Ekstrak pekat dapat diperoleh dengan cara menguapkan pelarut dalam keadaan vakum / *in vacuo* pada suhu rendah agar tidak merusak bahan yang tidak tahan panas / *thermolabile* (Dey, 1991).

Ekstraksi serbuk buah mahkota dewa dan serbuk daun mahkota dewa menghasilkan ekstrak etanol buah mahkota dewa pekat dan ekstrak etanol daun mahkota dewa pekat dengan rendemen (berat ekstrak pekat / berat serbuk x 100%) masing-masing adalah 20,6 % dan 21,5 %. Hasil ekstraksi ini menunjukkan bahwa metode ekstraksi yang dilakukan dalam penelitian ini menghasilkan ekstrak pekat

hampir sama dengan penelitian Oshimi dkk. yang memperoleh rendemen ekstrak metanol buah mahkota dewa sebesar 24% (Oshimi et al., 2008).

Bahan ekstrak etanol buah dan ekstrak etanol daun mahkota dewa yang akan diuji aktifitas antimikrobanya pada penelitian ini tidak disterilisasi terlebih dahulu karena sterilisasi menggunakan autoklaf dapat merusak bahan yang tidak tahan panas dan sterilisasi menggunakan membran filter juga memiliki kelemahan yaitu mengurangi jumlah bahan antimikroba yang terserap oleh bahan membran filter, sedangkan sterilisasi yang dianjurkan adalah menggunakan radiasi sinar gama (Dey, 1991). Sebelum penanaman bakteri *P.aeruginosa* pada media MHA yang mengandung ekstrak etanol buah dan ekstrak etanol daun mahkota dewa, terlebih dahulu dilakukan uji sterilitas terhadap media MHA yang mengandung ekstrak. Uji sterilitas media MHA yang mengandung ekstrak etanol buah dan ekstrak etanol daun mahkota dewa menunjukkan hasil yang steril sehingga dipastikan tidak ada bakteri yang berasal dari bahan ekstrak (gambar 5.4).

Keasaman (pH) ekstrak dan media MHA yang mengandung ekstrak berbagai konsentrasi perlu diperiksa sebelum dilakukan uji antimikroba. Hal ini diperlukan karena bakteri mungkin tidak dapat tumbuh bila ekstrak terlalu asam atau terlalu basa (Dey, 1991). Hasil pemeriksaan keasaman menunjukkan pH ekstrak etanol buah mahkota dewa lebih rendah / lebih asam daripada ekstrak etanol daun mahkota dewa. Hal ini berpengaruh terhadap pH media MHA yang mengandung ekstrak etanol buah mahkota dewa ternyata juga lebih rendah / lebih asam daripada media MHA yang mengandung ekstrak etanol daun mahkota dewa pada konsentrasi yang sama (lihat tabel 5.4 dan gambar 5.1). Pada media MHA yang mengandung ekstrak etanol buah mahkota dewa meskipun pH-nya lebih rendah daripada media MHA yang mengandung ekstrak etanol daun mahkota dewa ternyata terdapat pertumbuhan

bakteri *P.aeruginosa* pada semua konsentrasi dan semua pengulangan (tabel 5.5 gambar 5.2). Hal ini menunjukkan pH ekstrak etanol buah mahkota dewa yang lebih rendah tidak berpengaruh dalam menghambat pertumbuhan bakteri *P.aeruginosa*. Keadaan ini dapat terjadi karena media MHA yang mengandung ekstrak etanol buah mahkota dewa memiliki pH 5,06 – 6,38 mendekati rentang keasaman lingkungan yang sesuai bagi pertumbuhan bakteri *P.aeruginosa*, yaitu antara pH 5,6 – 8.0 (Todar, 2008b). Kemudian dapat pula disimpulkan bahwa tidak adanya pertumbuhan bakteri pada media MHA yang mengandung ekstrak etanol daun mahkota dewa konsentrasi 4×10^4 $\mu\text{g/ml}$ dan 5×10^4 $\mu\text{g/ml}$ bukan karena faktor keasamannya, tapi disebabkan oleh bahan yang memiliki aktifitas antimikroba terhadap bakteri *P.aeruginosa* di dalam ekstrak etanol daun mahkota dewa.

Uji aktifitas antimikroba ekstrak etanol buah dan ekstrak etanol daun mahkota dewa terhadap bakteri *P.aeruginosa* dalam penelitian ini dilakukan secara dilusi-agar dalam media Muller Hinton Agar (MHA). Dilusi-agar merupakan metode yang tepat untuk digunakan menguji aktifitas antimikroba suatu ekstrak tanaman (walaupun dalam keadaan tidak steril) karena organisme aerob tidak bisa tumbuh dibawah agar yang padat, meskipun terjadi kontaminasi di permukaan media perbenihan maka akan mudah diketahui (Dey, 1991). Selain itu kelebihan metode dilusi-agar adalah apabila bahan ekstrak tanaman yang diuji mengandung minyak esensial, bahan yang non polar dan bahan antimikroba yang tidak dapat berdifusi maka masih dapat diuji menggunakan metode ini (Dey, 1991). Media MHA mengandung kasein hidrolisat, daging sapi dalam bentuk infus (*beef infusion form*), pati, agar dan mengandung ion elektrolit sesuai untuk pertumbuhan bakteri *P.aeruginosa* (Forbes et al., 2002). Pada penelitian ini bahan ekstrak etanol buah dan ekstrak etanol daun mahkota dewa dicampurkan ke dalam media MHA yang baru dibuat dan masih dalam bentuk cair

hangat, kemudian dilakukan rangkaian pengenceran sehingga menghasilkan konsentrasi ekstrak dalam media MHA (berat/volume = w/v) 5×10^4 $\mu\text{g/ml}$, 4×10^4 $\mu\text{g/ml}$, 3×10^4 $\mu\text{g/ml}$, 2×10^4 $\mu\text{g/ml}$ dan 1×10^4 $\mu\text{g/ml}$.

Hasil uji antimikroba ekstrak etanol buah dan ekstrak etanol daun mahkota dewa secara dilusi-agar berbeda dengan hasil uji pendahuluan. Pada uji pendahuluan ekstrak etanol buah mahkota dewa konsentrasi 5×10^4 $\mu\text{g/ml}$ dapat menghambat pertumbuhan bakteri *P.aeruginosa* (tabel 5.3), tetapi pada uji antimikroba ekstrak etanol buah mahkota dewa sampai konsentrasi 5×10^4 $\mu\text{g/ml}$ pada semua pengulangan tidak dapat menghambat pertumbuhan koloni bakteri *P.aeruginosa* (tabel 5.5 dan gambar 5.2). Sementara itu ekstrak etanol daun mahkota dewa pada uji pendahuluan konsentrasi 2×10^4 $\mu\text{g/ml}$ sudah dapat menghambat pertumbuhan bakteri *P.aeruginosa* (tabel 5.3), namun pada uji antimikroba hambatan pertumbuhan baru terjadi pada konsentrasi 4×10^4 $\mu\text{g/ml}$ (tabel 5.6 dan gambar 5.3). Terjadinya perbedaan ini dapat disebabkan faktor berikut:

- Adanya sisa etanol pada ekstrak etanol buah pekat maupun ekstrak etanol daun pekat yang digunakan pada uji pendahuluan. Setelah ada jeda waktu 1 minggu antara uji pendahuluan dan uji antimikroba memungkinkan terjadinya penguapan etanol yang ada pada ekstrak pekat.
- Adanya perubahan senyawa aktif yang ada di dalam ekstrak.
Ekstrak pekat telah disimpan dalam lemari pendingin / *refrigerator* dengan suhu sekitar 4°C sesuai dengan cara penyimpanan bahan ekstrak tanaman yang baik sebelum digunakan (Evans, 2002). Sehingga adanya perubahan bukan disebabkan oleh faktor suhu penyimpanan namun perubahan dapat terjadi karena oksidasi dan reduksi pada senyawa di dalam ekstrak yang labil.

Berdasarkan hasil uji antimikroba secara dilusi-agar, ekstrak etanol buah mahkota dewa sampai konsentrasi $5 \times 10^4 \mu\text{g/ml}$ tidak dapat menghambat pertumbuhan koloni bakteri *P.aeruginosa*, sementara itu ekstrak etanol daun mahkota dewa dapat menghambat pertumbuhan koloni bakteri mulai pada konsentrasi $4 \times 10^4 \mu\text{g/ml}$. Sehingga ekstrak etanol buah mahkota dewa memiliki KHM $> 5 \times 10^4 \mu\text{g/ml}$, dan ekstrak etanol daun mahkota dewa memiliki KHM $4 \times 10^4 \mu\text{g/ml}$ terhadap bakteri *P.aeruginosa*. Meskipun secara kualitatif pemeriksaan fitokimia di dalam buah dan daun mahkota dewa sama terdapat senyawa saponin, polifenol, flavonoid dan tanin (Lisdawati, 2002; Purwantini, 2002; Guwito, 2003; Juita, 2004) yang mempunyai aktifitas antimikroba, ternyata hasil uji antimikroba menunjukkan hasil yang berbeda. Perbedaan ini dapat disebabkan kandungan senyawa aktif di atas secara kuantitatif berbeda antara buah dan daun mahkota dewa, kemungkinan kuantitasnya lebih banyak terdapat pada daun mahkota dewa. Konsentrasi suatu bahan antimikroba dapat mempengaruhi potensinya, menurut Joklik et al. penurunan konsentrasi antimikroba akan menurunkan potensinya, sehingga penurunan sebanyak setengahnya dapat meningkatkan waktu yang diperlukan sebanyak 64 kali lipat untuk membasmi bakteri (Joklik et al., 1988).

Nilai KHM sebesar $4 \times 10^4 \mu\text{g/ml}$ apalagi $> 5 \times 10^4 \mu\text{g/ml}$ sudah jauh di atas ambang batas untuk menentukan apakah potensi antimikroba ekstrak yang berasal dari suatu bahan alam layak dikembangkan untuk digunakan sebagai agen antimikroba. Suatu ekstrak bahan alam dinyatakan layak untuk dikembangkan sebagai agen antimikroba bila mampu menghambat pertumbuhan bakteri (KHM) pada konsentrasi 10 – 500 $\mu\text{g/ml}$ (Nascimento et al., 2000). Selain itu untuk menentukan adanya bahan antiinfeksi (antibakteri, antifungi, antivirus dan antiparasit) yang potensial dari suatu bahan alam, Cos et al. merekomendasikan agar dalam percobaan

uji antiinfeksi secara *invitro* menggunakan konsentrasi kurang dari 100 µg/ml untuk ekstrak tanaman dan di bawah 25µM untuk isolat senyawa murni, hal ini untuk menghindari hasil positif palsu (Cos et al., 2006). Ketika didapatkan hasil uji antimikroba ekstrak buah mahkota dewa KHM nya > 5x10⁴ µg/ml maka tidak perlu terus menaikkan konsentrasi, karena selain sudah melewati batasan Nascimento et al. dan Cos et al. juga perlu mempertimbangkan adanya efek samping bila dosis terlalu tinggi.

Jika dibandingkan dengan obat antimikroba yang selama ini digunakan untuk terapi infeksi *P.aeruginosa*, misalnya Carbenicilin dinyatakan peka bila KHM < 128 µg/ml, kebal bila > 512 µg/ml; Azlocilin dan Mezlocilin dinyatakan peka bila KHM < 64 µg/ml dan kebal bila >128 µg/ml (Koneman, 1997); Cefotaxime peka bila KHM < 8 µg/ml dan kebal bila > 64 µg/ml; Imipenem dan Gentamicin peka bila KHM < 4 µg/ml dan kebal bila > 16 µg/ml; Ciprofloxacin peka bila KHM < 1 µg/ml dan kebal bila > 4 µg/ml (CLSI, 2008), maka nilai KHM dari ekstrak etanol buah dan ekstrak etanol daun mahkota dewa sudah sangat tinggi. Semakin tinggi nilai KHM menunjukkan potensi antimikroba yang semakin lemah (Frobes et al., 2002).

Setelah ekstrak etanol daun mahkota dewa diketahui mempunyai aktifitas antimikroba terhadap bakteri *P.aeruginosa*, maka perlu pula diketahui bagaimana sifat aktifitas antimikrobanya bila diamati dengan menggunakan mikroskop elektron skening (MES). Hasil mikrograf elektron skening menunjukkan ekstrak etanol daun mahkota dewa konsentrasi 2x10⁴ µg/ml (= ½x KHM) dan 4x10⁴ µg/ml (= KHM) mampu menghambat pertumbuhan sel bakteri *P.aeruginosa* yang dibuktikan dengan adanya penurunan jumlah sel bakteri perlapangan pandang (gambar 5.7 dan 5.8). Pada penelitian ini bakteri *P.aeruginosa* yang diinokulasikan ke dalam setiap tabung A, B, C dan D jumlahnya sama yaitu 1x10⁴ CFU/ml, maka seharusnya setelah inkubasi

pada suhu dan waktu yang sama jumlah bakteri akan bertambah dengan kecepatan yang sama sehingga menghasilkan populasi bakteri yang sama pula. Tetapi hasil pemeriksaan MES menunjukkan adanya perbedaan (penurunan) populasi bakteri *P.aeruginosa* bila konsentrasi paparan ekstrak daun mahkota dewa meningkat. Apabila jumlah awalnya sama tapi setelah inkubasi jumlahnya berbeda (menurun) serta tidak ada tanda-tanda kerusakan atau lisis sel bakteri, maka penurunan itu dapat disebabkan oleh perbedaan kecepatan pembelahan sel bakteri (Brooks et al., 2004).

Penurunan jumlah bakteri *P.aeruginosa* yang dipapar ekstrak etanol daun mahkota dewa dapat disimpulkan sebagai efek dari hambatan kecepatan pertumbuhan / pembelahan (*doubling time*) oleh senyawa aktif yang ada di dalam ekstrak etanol daun mahkota dewa terhadap bakteri *P.aeruginosa*. Pada penelitian ini sampai konsentrasi 4×10^4 $\mu\text{g/ml}$ (= KHM) aktifitas ekstrak etanol mahkota dewa bersifat bakteristatik, yang ditandai dengan sel bakteri tetap utuh, tidak mengalami kerusakan permanen atau lisis tetapi terjadi penurunan jumlah sel perlapangan pandang yang menunjukkan adanya hambatan pertumbuhan bakteri, hal ini sesuai dengan definisi bakteristatik menurut Baron et al.

Sementara itu ekstrak etanol daun mahkota dewa apabila konsentrasinya ditingkatkan sampai 8×10^4 $\mu\text{g/ml}$ (= 2xKHM) ternyata mampu melisis sel bakteri *P.aeruginosa*. Mikrograf elektron skening pada gambar 5.9 menunjukkan tidak ada sel bakteri *P.aeruginosa* yang utuh pada semua lapangan pandang, maka disimpulkan pada konsentrasi 8×10^4 $\mu\text{g/ml}$ (=2 x KHM) aktifitas antimikroba ekstrak etanol daun mahkota dewa bersifat bakterisidal, yang ditandai dengan terjadi lisis sel bakteri *P.aeruginosa*, hal ini sesuai dengan definisi bakterisidal menurut Baron et al.

Hasil mikrograf elektron skening pada penelitian ini selain menunjukkan adanya penurunan jumlah bakteri *P.aeruginosa* perlapangan pandang juga menunjukkan

adanya peningkatan ukuran sel, terutama pemanjangan (*elongation*) sel bakteri *P.aeruginosa* bila terpapar ekstrak etanol daun mahkota dewa pada konsentrasi 2×10^4 $\mu\text{g/ml}$ dan 4×10^4 $\mu\text{g/ml}$ (gambar 5.7 dan 5.8). Pemanjangan sel bakteri *P.aeruginosa* tampak nyata bila dibandingkan dengan sel bakteri yang tidak dipapar ekstrak etanol daun mahkota dewa (gambar 5.6). Adanya pemanjangan sel bakteri *P.aeruginosa* pada penelitian ini sesuai dengan penelitian Aonuma et al. yang menyebutkan bakteri *P.aeruginosa* bila dipapar antibiotika Sulbenicillin juga mengalami pemanjangan (*elongation*) sel (Aonuma et al., 1987). Pemanjangan sel yang tampak dengan pemeriksaan mikroskop elektron transmisi (MET) ternyata pada akhirnya disertai kerusakan pada lapisan peptidoglikan, tetapi lapisan membran luar bakteri (*outer membrane*) tetap utuh, maka disimpulkan mekanisme kerja antibiotika Sulbenicillin adalah merusak lapisan peptidoglikan tetapi tidak merusak lapisan membran luar dinding sel bakteri *P.aeruginosa* (Aonuma et al., 1987). Persamaan adanya pemanjangan sel bakteri *P.aeruginosa* antara yang dipapar ekstrak etanol daun mahkota dewa pada penelitian ini dengan yang dipapar Sulbenicillin pada penelitian Aonuma et al. dapat disebabkan oleh mekanisme yang sama, sehingga diduga mekanisme kerja senyawa aktif yang ada dalam ekstrak etanol daun mahkota dewa adalah merusak lapisan peptidoglikan dinding sel bakteri *P.aeruginosa*.

Berdasarkan hasil uji antimikroba secara dilusi-agar diperoleh KHM ekstrak etanol daun mahkota dewa sebesar 4×10^4 $\mu\text{g/ml}$ dan KHM ekstrak etanol buah mahkota dewa $> 5 \times 10^4$ $\mu\text{g/ml}$ serta berdasarkan hasil pemeriksaan MES menunjukkan ekstrak etanol daun mahkota dewa bersifat bakteristatik pada konsentrasi 4×10^4 $\mu\text{g/ml}$ namun bersifat bakterisidal pada konsentrasi 8×10^4 $\mu\text{g/ml}$, semuanya menunjukkan potensi aktifitas antimikroba ekstrak etanol daun mahkota dewa lebih kuat daripada ekstrak etanol buah mahkota dewa. Meskipun potensi aktifitas antimikroba ekstrak

etanol daun mahkota dewa lebih kuat daripada ekstrak etanol buah mahkota dewa, tetapi nilai KHM di atas juga menunjukkan potensi antimikroba ekstrak etanol daun mahkota dewa sangat lemah terhadap bakteri *P.aeruginosa*. Sehingga ekstrak etanol daun mahkota dewa bila digunakan sebagai agen terapi infeksi bakteri *P.aeruginosa* perlu dosis sangat besar untuk menghambat pertumbuhan atau membunuh bakteri *P.aeruginosa*.

Suatu bahan antimikroba supaya efektif ketika digunakan sebagai agen terapi terhadap infeksi bakteri, selain memiliki KHM rendah yang diperoleh dari uji secara *invitro*, bahan itu juga harus dapat mencapai kadar di dalam serum (*serum level*) minimal di atas KHM-nya (Koneman et al., 1997). Pencapaian kadar dalam serum dipengaruhi oleh konsentrasi dan cara masuk bahan antimikroba, misalnya Carbenecilin untuk mencapai kadar serum 187 µg/ml dibutuhkan dosis 5000 mg intra vena (IV), Cefalexin untuk mencapai kadar serum 10.6 µg/ml diperlukan dosis 1000 mg per oral (PO), Cefotaxime untuk mencapai kadar serum 19,4 µg/ml diperlukan dosis 1000 mg IV sedangkan Gentamicin untuk mencapai kadar serum 6,3 µg/ml dibutuhkan dosis 80 mg IV (Koneman et al., 1997). Ekstrak etanol daun mahkota dewa yang nilai KHM-nya terhadap bakteri *P.aeruginosa* dalam penelitian ini mencapai 4×10^4 µg/ml, supaya efektif sebagai antimikroba terhadap infeksi sistemik *P.aeruginosa*, maka kadarnya dalam serum juga harus mencapai minimal 4×10^4 µg/ml. Volume cairan intravaskular manusia dewasa sekitar 5000 ml (Guyton, 1994). Ekstrak etanol daun mahkota dewa bila dimasukkan secara IV, untuk mencapai kadar serum 4×10^4 µg/ml maka dibutuhkan ekstrak etanol daun mahkota dewa sebanyak 4×10^4 µg/ml x 5000 ml, didapatkan kebutuhan ekstrak etanol daun mahkota dewa adalah 2×10^8 µg (2×10^5 mg = 2×10^2 g = 0,2 kg). Sedangkan ekstrak etanol buah mahkota dewa yang KHM nya $> 5 \times 10^4$ µg/ml tentu membutuhkan jumlah yang lebih

besar untuk dapat mencapai kadar serum supaya efektif terhadap infeksi bakteri *P.aeruginosa*. Jika ingin mendapatkan aktifitas yang bersifat bakterisidal maka dibutuhkan lebih banyak ekstrak etanol daun mahkota dewa, yaitu $8 \times 10^4 \mu\text{g/ml} \times 5000 \text{ ml} = 4 \times 10^8 \mu\text{g}$ ($4 \times 10^5 \text{ mg} = 4 \times 10^2 \text{ g} = 0,4 \text{ kg}$). Bila ekstrak etanol daun mahkota dewa diberikannya per oral maka diperlukan ekstrak lebih banyak lagi, karena pemberian peroral akan melalui dan dipengaruhi oleh proses absorpsi di saluran pencernaan.

Berdasarkan penelitian terdahulu tentang pengaruh ekstrak butanol buah mahkota dewa terhadap ginjal mencit yang diberikan melalui suntikan tunggal intra peritoneal kemudian setelah 3 minggu diamati efeknya terhadap jaringan ginjal, didapatkan dosis sebesar 80 mg/kgBB mulai menimbulkan disintegrasi sel epitel tubuler dan pada dosis 170 mg/kg BB dapat menimbulkan kebocoran dan nekrosis ringan pada tubulus proksimalis meskipun belum menimbulkan gangguan fungsi ginjal yang nyata (Soeksmanto, 2006). Karena konsumsi ekstrak etanol buah ataupun ekstrak etanol daun mahkota dewa dosis yang sangat tinggi dapat menimbulkan efek samping yang berbahaya bagi penggunaannya maka tidak layak digunakan untuk agen terapi infeksi *P.aeruginosa*.

Pada penelitian ini tidak dilakukan proses pemurnian, identifikasi dan kuantifikasi senyawa aktif yang memiliki aktifitas antimikroba di dalam ekstrak serta tidak pula diketahui mekanisme pasti dan target sasarannya pada bakteri *P.aeruginosa*. Meskipun demikian dari penelitian ini dapat diketahui adanya aktifitas antimikroba yang lemah dan sifat aktifitas antimikroba ekstrak etanol daun mahkota terhadap bakteri *P.aeruginosa* serta dugaan mekanisme kerjanya pada lapisan peptidoglikan dinding sel bakteri.

Aktifitas antimikroba yang ditemukan pada penelitian ini dapat disebabkan oleh faktor senyawa aktif yang ada di dalam ekstrak etanol daun mahkota dewa, yaitu:

flavonoid, saponin, polifenol dan tanin. Peneliti lain mendapatkan senyawa flavanoid mampu menghambat bakteri *Klebsiella pneumoniae* yang menghasilkan enzim β laktamase spektrum luas / *Extended-Spectrum β Lactamase (ESBL)*, yang setara dengan Ofloxacin (Ozcelik et al., 2008), sedangkan *Chrysin* (5,7-dihydroxyflavone) diketahui mampu menghambat bakteri *P.aeruginosa* dan *E.coli*, kemampuannya setara dengan Streptomycin (Bylka, 2004). Sementara itu, saponin diketahui mampu menghambat bakteri Gram positif (*S.aureus*) tapi tidak mampu menghambat pertumbuhan bakteri Gram negatif (*E.coli*) (Soetan, 2006). Penelitian lainnya telah membuktikan polifenol yang berasal dari tanaman famili *Geraniaceae* dan *Rosaceae* punya aktifitas antimikroba (bakteriostatik atau bakterisidal) terhadap bakteri oportunistik: *B.cereus*, *E.coli*, *P.aeruginosa* dan *S.aureus* (Nikitina et al., 2007), sedangkan tanin mampu menghambat proliferasi sel bakteri dengan cara menghambat enzim kunci metabolisme sel bakteri (Geidam et al., 2007).

Aktifitas antimikroba yang lemah dapat disebabkan oleh rendahnya konsentrasi (jumlah / kuantitas) senyawa-senyawa tersebut di dalam ekstrak etanol daun mahkota dewa. Menurut Joklik et al., konsentrasi suatu senyawa / bahan antimikroba dapat mempengaruhi potensinya (Joklik, et al., 1988). Ekstrak etanol yang digunakan dalam penelitian ini merupakan ekstrak kasar (*crude extract*), masih dapat dilakukan fraksinasi, purifikasi dan isolasi terhadap masing-masing senyawa sehingga didapatkan senyawa aktif dengan konsentrasi yang lebih tinggi. Jumlah senyawa murni yang lebih banyak diharapkan memiliki aktifitas antimikroba yang lebih baik sehingga dapat diperoleh nilai KHM yang lebih rendah daripada aktifitas antimikroba ekstrak etanol.

Faktor bakteri *P.aeruginosa* yang menyebabkan bakteri ini relatif tahan terhadap bahan antimikroba antara lain adalah: (1). Lapisan alginat disekeliling sel bakteri

P.aeruginosa (*slime layer / biofilms*) yang dapat mengikat kation bahan antimikroba dan mengurangi difusinya ke dalam sel (Lambert, 2002); (2). Struktur dinding sel bakteri *P.aeruginosa* yang kompleks, terutama membran luar (*outer membrane*) yang bersifat hidrofobik menjadi penghalang (*barrier*) penetrasi bahan antimikroba, sehingga permeabilitas dinding sel rendah terhadap bahan antimikroba (Lambert, 2002); (3). Pompa efluks (*Efflux pump*) pada bakteri *P.aeruginosa* (*mexAB-oprM*, *mexCD-oprJ*, *mexEF-oprN* dan *mexXY-oprM*) dapat membuang molekul antimikroba, sehingga menyebabkan kegagalan akumulasi molekul antimikroba di dalam sel bakteri (Lambert, 2002).

Interaksi antara faktor senyawa aktif dengan faktor bakteri *P.aeruginosa* di atas perlu diteliti lebih lanjut agar dapat diketahui senyawa apa yang paling aktif sebagai antimikroba, berapa kuantitasnya dan bagaimana mekanisme kerja terhadap targetnya pada sel bakteri *P.aeruginosa*.

BAB 7**PENUTUP****7.1 Kesimpulan**

1. Ekstrak etanol buah mahkota dewa sampai konsentrasi 5×10^4 $\mu\text{g/ml}$ tidak memiliki aktifitas antimikroba terhadap *P.aeruginosa*, sedangkan ekstrak etanol daun mahkota dewa memiliki aktifitas antimikroba mulai konsentrasi 4×10^4 $\mu\text{g/ml}$.
2. KHM ekstrak etanol buah mahkota dewa dan KHM ekstrak etanol daun mahkota dewa terhadap *P.aeruginosa* adalah $> 5 \times 10^4$ $\mu\text{g/ml}$ dan 4×10^4 $\mu\text{g/ml}$.
3. Aktifitas antimikroba ekstrak etanol daun mahkota dewa konsentrasi 4×10^4 $\mu\text{g/ml}$ terhadap bakteri *P.aeruginosa* bersifat bakteristatik, namun pada konsentrasi 8×10^4 $\mu\text{g/ml}$ bersifat bakterisidal.
4. Potensi antimikroba ekstrak etanol daun mahkota dewa lebih kuat daripada ekstrak etanol buah mahkota dewa terhadap bakteri *P.aeruginosa*.

7.2 Saran

1. Potensi aktifitas antimikroba ekstrak etanol buah dan daun mahkota dewa terhadap bakteri *P.aeruginosa* sangat lemah, sehingga tidak layak dikembangkan sebagai agen antimikroba terhadap bakteri *P.aeruginosa*.
2. Aktifitas antimikrobanya terhadap bakteri lain perlu diteliti.
3. Perlu dilakukan pemurnian, identifikasi dan kuantifikasi senyawa aktif yang punya aktifitas antimikroba di dalam daun mahkota dewa.
4. Perlu diteliti aktifitas antimikroba dari masing-masing golongan senyawa aktif yang ada di dalam ekstrak etanol daun mahkota dewa, adanya efek sinergisme atau antagonisme bila dikombinasikan dan bagaimana mekanisme kerjanya.

DAFTAR PUSTAKA

TOTO-COPY
AIRLANGGA
031-5713282

DAFTAR PUSTAKA

- Aeschlimann, JR., 2003. The Role of Multidrug Efflux Pumps in Antibiotic Resistance: Multidrug Efflux Pump-Based Resistance in Gram-Negative Bacteria, *Pharmacotherapy* 23 (7).
- Aloush, V., Venezia, SN., Igra, YS., et al., 2006. Multidrug Resistant *Pseudomonas Aeruginosa*: Risk Factors and Clinical Impact, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, P. 43-48 Vol. 50, No. 1.
- Anonim, 2003. Profil Kota Jember, Dinas Kimpraswil Jember.
- Aonuma, S., Arijji, F., Oizumi, K., and Konno, K., 1987. Electron Microscopy of *Pseudomonas aeruginosa* Treated with Sulbenicillin and Dibekacin, *Tohoku J. exp. Med.*, 152, 119-128.
- Arima, H., Ashida, H., and Danno, G., 2002. Rutin-enhanced Antibacterial Activities of Flavonoid Against *Bacillus cereus* and *Salmonella enteritidis*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66(5), 1009-1014.
- Arung, ET., Wicaksono, DB., Sandra, F., 2009. Prenylated Flavanoid Sebagai Senyawa Anti Kanker yang Berpotensi, *Cermin Dunia Kedokteran* 167 / vol 36 no.1.
- Bakhriansyah, M., 2004. Pengaruh Ekstrak Etanol Biji Mahkota Dewa (*Phaleria Macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) Pada Sel Kanker Payudara T47d: Kajian Aktivitas Sitotoksik, Antiproliferasi Dan Penghambatan Ekspresi Siklooksigenase, Program Pasca Sarjana UGM, Yogyakarta.
- Baron, EJ., Peterson, LR., Finegold, SM., 1994. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*, Mosby Inc, St.Louis.
- Boyd, RF., 1995. *Basic Medical Microbiology* 5th edition, Litle Brown and Company, Boston.
- Brock, TD., Madigan, MT., Martinko, JM., et al., 1994. *Biology of Microorganisms* 7th Edition, Prentice Hall International Inc, New Jersey.
- Brooks, GF., Butel, JS., Ornston, LN., editors. 2007. *Jawetz, Melnick & Adelberg Medical Microbiologi* 24th edition, McGraw-Hill Companies.
- Bylka, W., Matlawska, I., Pilewski, NA., 2004. Natural Flavonoid as Antimicrobial Agents, *JANA* vol. 4, No. 2.
- Cheeke, PR., 1999. Actual and Potential Applications of *Yucca Schidigera* and *Quillaja Saponaria* Saponinsin Human and Animal Nutrition, *Proceedings of the American Society of Animal Science*.

- CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute), 2008. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Eighteenth Informational Supplement, vol. 28 no.1, Wayne USA.
- Connolly, JD and Hill, RA., 2007. Triterpenoids, *Nat.Prod.Rep.*, 24, 465.
- Cos, P., Vlietinck, AJ., Berghe, DV., Maes, L., 2006. Anti-infective Potential of Natural Products: How to Develop a Stronger in vitro 'Proof-of-Concept', *Journal of Ethnopharmacology* 106(2006) 290-302.
- Cowan, MM., 1999. Plants Product as Antimicrobial Agents, *Clinical Microbiology Review*, Vol 12. No. 4 p. 564-582.
- Damanik, ST., Gunawan C., Kuntaman, et al., 2004. Efficacy of Ethyl Alcohol Glycerin 69% Handrub in Neonatal Ward dr.Soetomo Hospital, *Folia Medica Indonesiana*, Vol.40 No.3.
- Dey, PM., and Harborne, JB., 1991. *Methods in Plant Biochemistry*, Volume 6 Assay for Bioactivity, Academic Press, London.
- Evans, WC., 2002. *Trease and Evans Pharmacognosy*, 5th edition, WB Saunders, London.
- Forbes, BA., Sahm, DF., Weissfeld, AS., 2002. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology* 11th edition, Mosby Inc, St.Louis.
- Geidam, YA., Ambali, AG., Onyeyeli, PA., 2007. Preliminary Phytochemical and Antibacterial Evaluation of Crude Aqueous Extract of *Psidium guajava* Leaf, *Journal of Applied Science* 7(4):511-514.
- Guwito, B., 2003. Analisis Farmakognosi dan Fitokimia Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.), Fakultas Farmasi Universitas Padjajaran Bandung.
- Guyton, AC., 1994. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran (Textbook of Medical Physiology)* Edisi 7, Penerjemah: Tengadi, LMAKA dkk., EGC, Jakarta.
- Hachem, RY., Chemaly, RF., Ahmar, CA., et al., 2007. Colistin Is Effective in Treatment of Infections Caused by Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Cancer Patients, *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, Vol. 51, No. 6, P. 1905-1911
- Hanafiah, KA., 2005. *Rancangan Percobaan Aplikatif : Aplikasi Kondisional Bidang Pertanian, Perternakan, Perikanan, Industri dan Hayati*, Raja Grafindo Persada, Jakarta.
- Handayani, S., 2003. Pengaruh Infus Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) Terhadap Kadar Malondialdehid Plasma Dan Superoksida Dismutase Sel Darah Merah Pada Tikus Putih Yang Diinduksi Carbon Tetraklorida, Fakultas Farmasi Universitas Pancasila.

- Harborne, JB., 2006. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan, Terbitan Kedua Cetakan Ke-4*, Penerjemah Padmawinata, K., Penerbit IIB Bandung.
- Harborne, JB., Baxter, H., Moss, GP., 1999. *Phytochemical Dictionary a Handbook of Bioactive Compounds from Plants 2nd edition*, Taylor & Francis Ltd, London.
- Hartati, MS., Mubarika, S., Gandjar, IG., et al., 2005. Phalerin, Glukosida Benzofenon Baru Diisolasi dari Ekstrak Metanolik Daun Mahkota Dewa [*Phaleria macrocarpa* (scheff). Boerl.], *Majalah Farmasi Indonesia*, 16 (1), 51 – 57.
- Hill, EB., Henry, DA., Speert, DP., in Murray, PR., Baron, EJ., Jorgensen, JH., et al. editors, 2007. *Manual of Cincial Microbiology 9th edition*, ASM Press, Washington.
- Hoediasmoro, DS., Santoso., Hardjopranjoto, S., Kristanto., 1984. *Petunjuk Praktis Mikroskopi Elektron*, Airlangga University Press, Surabaya.
- Iglewski, BH., 2009. *Medmicro Chapter 27: Pseudomonas*, <http://gsbs.utmb.edu/microbook/ch027.htm>.
- Joklik, WK., Willet, HP., Amos, DB., Wifert, CM., 1988. *Zinsser Microbiology 19th edition*, Appleton & Lange.
- Juita, N., 2004. *Aktifitas Antibakteri Daun Mahkota Dewa (Phaleria macrocarpa (Scheff.) Boerl.) Terhadap Bakteri Pseudomonas aeruginosa dan Bacillus cereus Dengan Metode Difusi Agar*, Fakultas Farmasi Universitas Padjajaran Bandung.
- Kayser, FH., Bienz, KA., Eckert, J., Zinkernagel, RM., 2005. *Medical Microbiology*, Thieme, Stuttgart.
- Kobayashi, H., 1990. Available at: http://student.ccbcmd.edu/courses/bio141/lecguide/unit2/bacpath/pseudo_SEM.html.
- Koneman, EW., Allen, SD., Janda, WM., et al., 1997. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology 5th edition*, Lippincott William & Wilkins, Philadelphia.
- Kristanti, AN., Aminah, NS., Tanjung, M., Kurniadi, B., 2008. *Buku Ajar Fitokimia*, Airlangga University Press, Surabaya.
- Kunkel, D., 2004. *Dennis Kunkel Microscopy, Inc. Science Stock Photography: 97270 A*. available at: <http://www.denniskunkel.com/index.php>.
- Lakhanpal, P and Rai, DK., 2007. *Quercetin: A Versatile Flavonoid*, *Internet Journal Of Medical Update Jul-Dec;2(2)*: http://www.Geocities.Com/Agnihotrined/Paper_05_Jul-Dec2007.Htm.

- Lambert, PA., 2002. Mechanisms of Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, *J R Soc Med* 95 (Suppl. 41).
- Lisdawati, V., 2002. Brine Shrimp Lethality Test (BSLT), Bioasai Antikanker In Vitro Dengan Sel Leukimia L 1210, Dan Isolasi Serta Penentuan Struktur Molekul Senyawa Kimia Dari Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Sceff.) Boerl.), Tesis S2 Dept. Farmasi UI.
- Merlo, CA., Boyle, MP., West MD et al., 2007. Incidence and Risk Factors for Multiple Antibiotic-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis, *Chest* 132:562-568.
- Nascimento, GGF., Locatelli, J., Freitas, PC., et al., 2000. Antibacterial Activity of Plant Extracts and Phytochemicals on Antibiotic-Resistant Bacteria, *Braz. J. Microbiol.* vol.31 no.4.
- Nikitina, VS., Kuz'mina, LY., Melent'ev, AI., and Shendel, GV., 2007. Antibacterial Activity of Polyphenolics Compound Isolated from Plants Geraniaceae and Rosaceae Families, *Applied Biochemistry and Microbiology*, Vol.43 no.6, pp. 629-634.
- Notoatmodjo, S., 2002. Metodologi Penelitian Kesehatan, PT Rineka Cipta, Jakarta.
- Oshimi, S., Zaima, K., Zaini, NC., Indrayanto, G., et al., 2008. Studies on the Constituents From the Fruits of *Phaleria macrocarpa*, *J Nat Med* 62:207-210.
- Ozcelik, B., Orhan, DD., Ergun, F., 2008. Antimicrobial Activity of Flavonoid against Extended Spectrum β Lactamase (ES β L)-Producing *Klebsiella pneumoniae*, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 7(4): 1151-1157.
- Palilingan, JF., 2007. Hospital-Acquired Pneumonia in HIV/AIDS, Disampaikan pada Pertemuan Nasional ke 3 HIV AIDS, Surabaya.
- Purwantini, I., dkk., 2002. Uji Toksisitas Ekstrak Etanol: Buah, Biji, Daun Makutadewa (*Phaleria Macrocarpa*) Terhadap *Artemia Salina* Leach Dan Profil Kromatogram Lapis Tipis Ekstrak Aktif. *Majalah Farmasi Indonesia* 13(2), 101-106.
- Renety, Y., 2001. Toksisitas Akut Peroral Rebusan Daging Buah Makuto Dewo (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl.) Pada Mencit, Fakultas Farmasi Universitas Snata Darma, Yogyakarta.
- Sengbusch, P., 2009. Basic Structure of Tannin, <http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/e26/11.htm>.
- Setiabudy, R., dan Gan, VHS., 1995. Pengantar Antimikroba, dalam *Ganiswara SG* (editor utama), *Farmakologi dan Terapi*, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, Jakarta, hal. 571-583.

- Soetan KO., Oyenkunle MA., Aiyelaagbe OO., Fafunso MA., 2006. Evaluation of the antimicrobial activity of saponins extract of *Sorghum bicolor* L.Moench, African Jurnal of Biotechnology, Vol.5 (23), pp.2405-2407.
- Sudarmono, P and Wiwing, V., 2007. Hospital Acquired bacterial Infection in Burns Unit at Cipto Mangunkusumo Hospital Jakarta, Microbiology Indonesia, Vol 1 No 1 p23-26.
- Suheryanto, R., 2000. Efektifitas Ofloxacin Tetes Telinga pada Otitis Media Purulenta Akuta Perforata di Poliklinik THT RSUD Dr Saiful Anwar Malang: Uji Klinis, Spektrum, dan Uji Kepekaan Kuman Aerob, Cermin Dunia Kedokteran No.128, Hal 45-48.
- Soeksmanto, A., 2006. Pengaruh Ekstrak Butanol Buah Tua Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) Terhadap Jaringan Ginjal Mencit (*Mus musculus*), Jurnal Biodiversitas, vol 7 no 3, hal 278-281.
- Sumastuti dan Solinmar, M., 2002. Efek Sitotoksik Ekstrak Buah dan Daun Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boer!) Terhadap Sel HeLa, Medika XXVII, No12, hal. 773-777.
- Todar, K., 2008a. *Pseudomonas aeruginosa*, Todar's online textbook of bacteriology, University of Wisconsin, <http://www.textbookofbacteriology.net/>.
- Todar, K., 2008b. Nutrition and Growth of Bacteria, Todar's online textbook of bacteriology, University of Wisconsin, http://www.textbookofbacteriology.net/nutgro_4.html.
- Tortora, GJ., Funke, BR., Case, CL., 1995. Microbiology an Introduction 5th edition, The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc, California.
- Wahyuni, DT., 2007. Uji Zona Hambat Perasan Daun Mahkota Dewa (*Phaleria papuana* Warb.var.Wichanni) Terhadap Pertumbuhan *Streptococcus mutans*, Fakultas Kedokteran Universitas Jember, Jember.
- Widowati, L., 2005. Kajian Hasil Penelitian Mahkota Dewa, Jurnal Bahan Alam Indonesia vol.4 (1) hal 223-227.
- Winarto, WP., 2007. Mahkota Dewa Budi Daya dan Pemanfaatan untuk Obat, Penebar Swadaya, Jakarta.

Lampiran 1**Jadwal kegiatan penelitian**

KEGIATAN		BULAN				
		FEB 09	MAR 09	APR 09	MEI 09	JUN 09
	Persiapan					
1	Konsultasi proposal	■				
2	Persiapan ujian proposal	■				
3	Ujian proposal		■			
	Pelaksanaan					
4	Pengambilan sampel daun dan buah mahkota dewa		■			
5	Pengeringan daun dan buah Mahkota dewa		■			
6	Proses ekstraksi			■		
7	Pengambilan sampel bakteri			■		
8	Pemeriksaan uji antimikroba				■	
9	Pengamatan MES				■	
	Pelaporan					
10	Pengolahan dan analisa data				■	
11	Penyusunan tesis				■	

Lampiran 2**Rincian biaya penelitian**

No	Rincian	Biaya (rupiah)
1.	Sampel bakteri	250.000,-
2.	Sampel daun dan buah mahkota dewa	250.000,-
3.	Identifikasi tanaman	250.000,-
4.	Ekstraksi buah dan daun	1.000.000,-
5.	Uji antimikroba	1.750.000,-
6.	Pemeriksaan mikroskop elektron skening	2.500.0000
7.	ATK	1.000.000,-
	Total	7.000.000,-

Lampiran 3

Hasil uji biokimia bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

DEPARTEMEN KESEHATAN REPUBLIK INDONESIA
BALAI BESAR LABORATORIUM KESEHATAN SURABAYA
 Jalan Karangmenjangan No. 18 Surabaya 60286
 Telp. Tata Usaha : 031-5021451, Kabag. TU / Fax.: 031-5021452 pes. 104, 031-5020388
 E-mail : blksub@idola.net.id



29 April 2009

Hasil Uji Biokimia terhadap bakteri :

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC (27853)

No	Macam-macam Uji	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
1.	Glukose	Negatif
2.	Laktose	Negatif
3.	Maltose	Negatif
4.	Oksidase	Positif
5.	Katalase	Positif
6.	Indol	Negatif
7.	Metyl Red	Negatif
8.	Cimon citrate	Positif
9.	Motility	Positif
10.	Lysine decarboxylase	Positif
11.	Ornithine decarboxylase	Positif
12.	Arginine dehydrolase	Positif
13.	Pigmen	Positif
14.	Pengecatan gram	Gram neg batang

Balai Besar Laboratorium Kesehatan
 Surabaya
 Kepala Seksi Laboratorium Klinik



dr. Eveline Irawan
 NIP. 140 206 418

Lampiran 4**Surat keterangan identifikasi tanaman Mahkota Dewa****HERBARIUM JEMBERIENSE (JR)
JURUSAN BIOLOGI-FMIPA UNIVERSITAS JEMBER
JEMBER, INDONESIA****SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI**

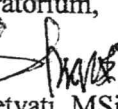
Berdasarkan hasil pengamatan pada spesimen tumbuhan yang dikirimkan ke Herbarium Jemberiense, Laboratorium Botani dan Kultur Jaringan, Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Jember oleh :

Nama/Hp : dr. M. Ali Shodikin / 08155007780
Jur./Fak./PT : Fak. Kedokteran Unej

maka dapat disampaikan hasilnya bahwa spesimen tersebut:

1. *Phaleria macrocarpa* Boerl. (Thymelaeaceae)

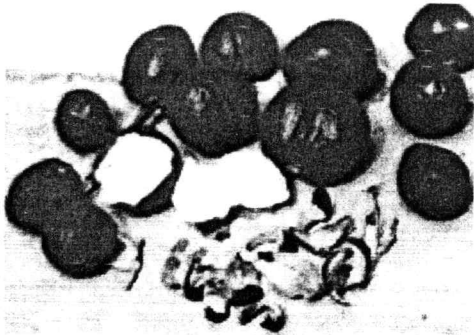
Demikian mudah-mudahan bermanfaat.

Jember, 5 Maret 2009
Ks. Laboratorium,

Dra. Dwi Setyati, MSi
NIP 131 943 801

Determined by Dra. Umiyah, MSc.agr.

Lampiran 5

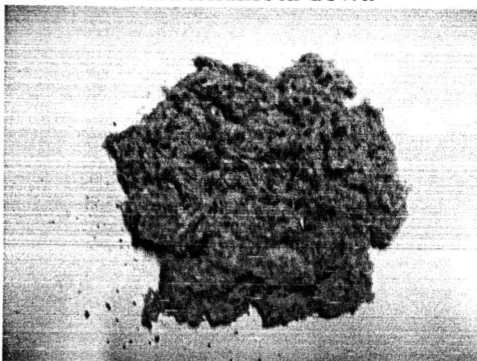
Bahan dan alat penelitian



Buah mahkota dewa



Daun mahkota dewa



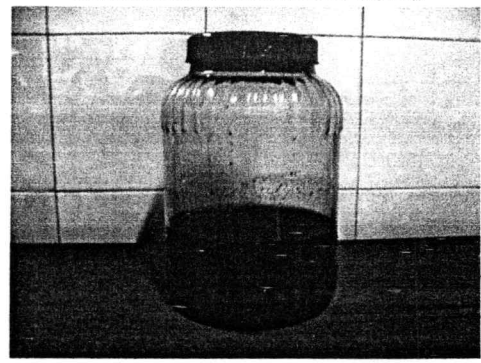
Serbuk buah mahkota dewa



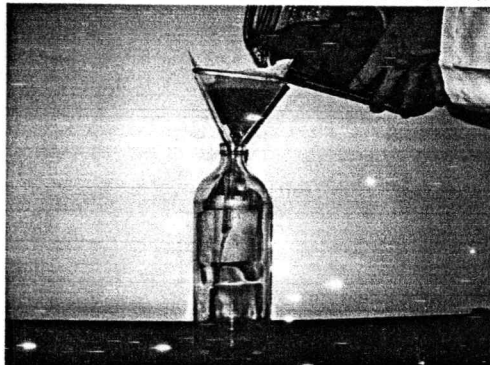
Serbuk daun mahkota dewa



Maserasi serbuk buah mahkota dewa



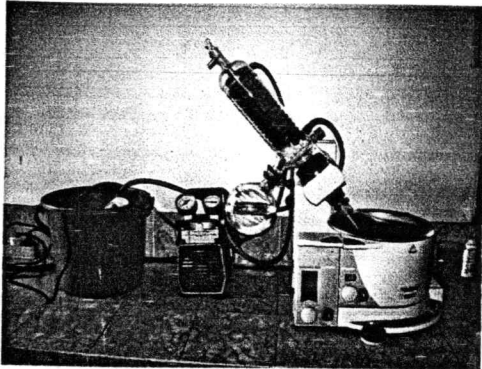
Maserasi serbuk daun mahkota dewa



Filtrat / maserat buah disaring



Filtrat / maserat daun disaring



Vacuum rotary evaporator / Rotavapor



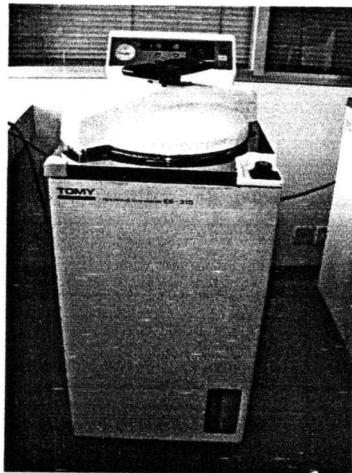
Ekstrak etanol buah dan daun mahkota dewa pekat



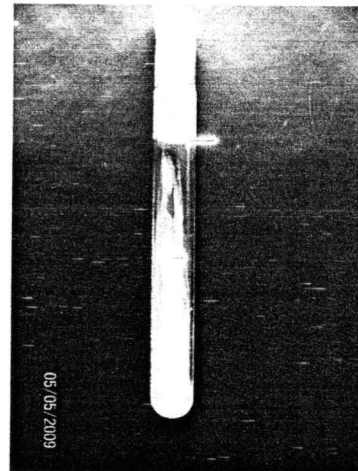
Timbangan Analitik



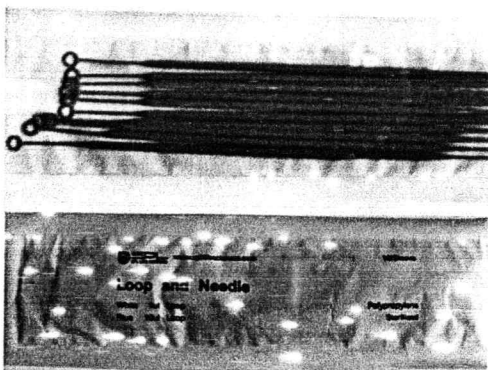
Serbuk media Muller Hinton Agar



Autoklaf



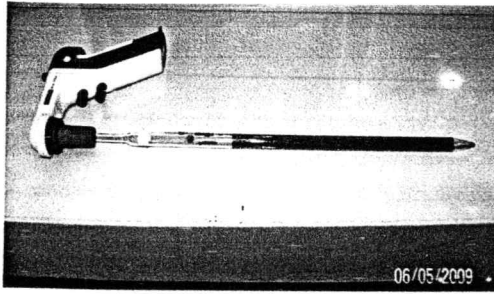
Bakteri *P.aeruginosa*, ATCC 27853



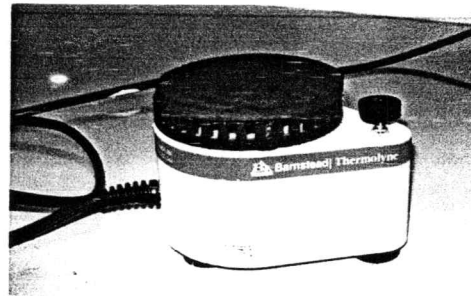
Ose 10 µl terkalibrasi



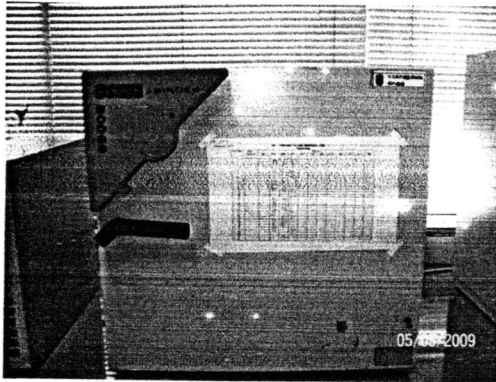
Petri dish Ø 35 mm



Pipet volume 25 ml



Pengaduk / "Mixer"



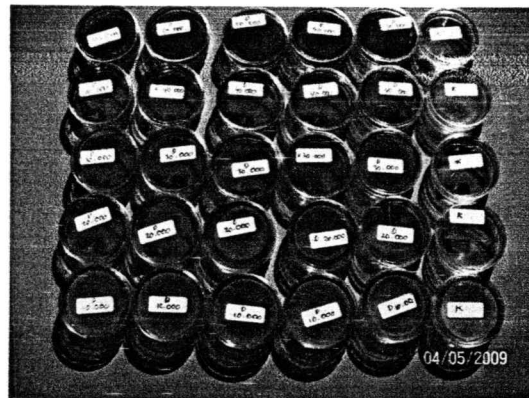
Inkubator



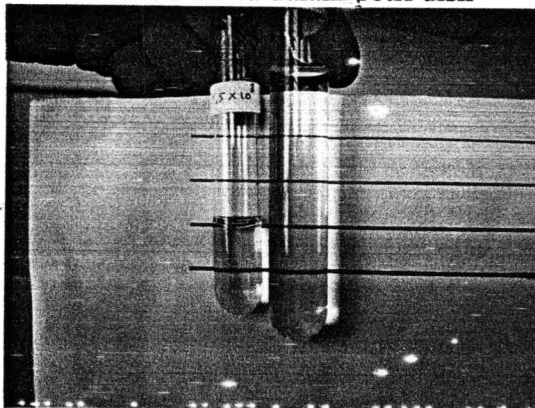
pH meter



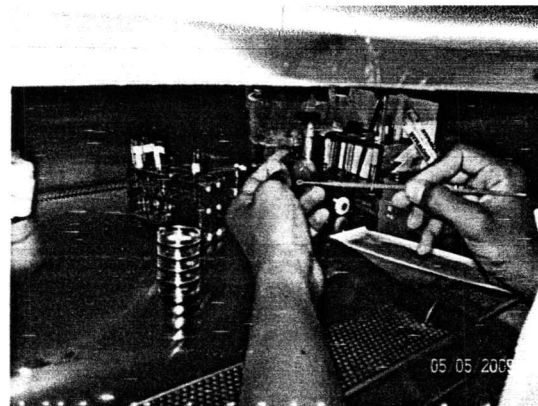
Media MHA + ekstrak etanol buah mahkota dewa dalam petri dish



Media MHA + ekstrak etanol daun mahkota dewa dalam petri dish



Kekeruhan suspensi bakteri disamakan dengan larutan 1/2 Mc Farland



Inokulasi bakteri *P.aeruginosa*



Media Muller Hinton Cair + ekstrak etanol daun mahkota dewa



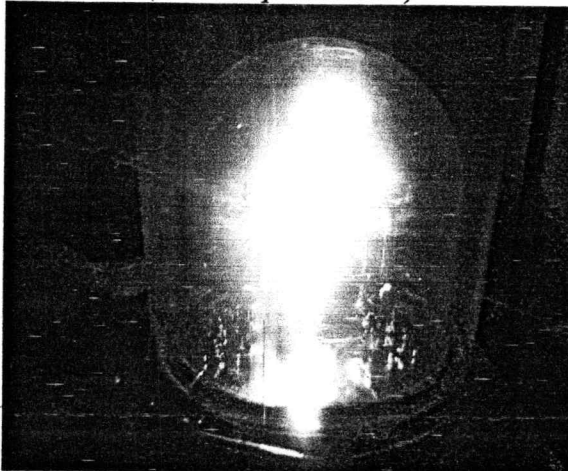
Sentrifus



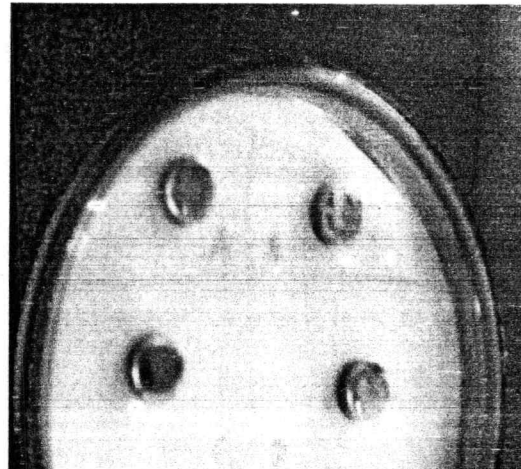
Alat pengering di titik kritis
(Critical point Drier)



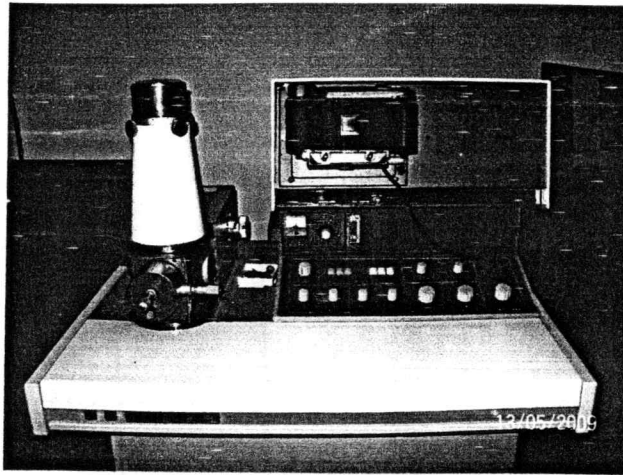
Alat untuk pelapisan bahan konduksi
(coating)



Proses "coating" dengan emas



Preparat setelah dilapisi (Coating) emas



Mikroskop Elektron Skening (MES)



Preparat dimasukkan ke dalam tempatnya



Pengamatan obyek di monitor MES