

SKRIPSI

**POTENSI ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL DAUN
MIMBA (*Azadirachta indica* A. Juss) TERHADAP
*Salmonella pullorum***



KH 95/18
Ari
P

Oleh :

MARIA EKARISTA ARI

061411133081

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

2018



POTENSI ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL DAUN MIMBA
(*Azadirachta indica* A. Juss) TERHADAP *Salmonella pullorum*

Skripsi

sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar

Sarjana Kedokteran Hewan

pada

Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga

Oleh

MARIA EKARISTA ARI
061411133081

Menyetujui
Komisi Pembimbing,

(Sri Chusniati, drh., M.Si.)
Pembimbing Utama

(Prof. Dr. Sri Pantja Madyawati, drh., M.Si.)
Pembimbing Serta

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi yang berjudul:

Potensi Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) Terhadap *Salmonella Pullorum*

tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surabaya, 9 April 2018



Maria Ekarista Ari
NIM 061411133081

Telah dinilai pada Seminar Hasil Penelitian
Tanggal : 19 Maret 2018

KOMISI PENILAI SEMINAR HASIL PENELITIAN

Ketua : Dr. Lilik Maslachah, drh., M.Kes.
Sekretaris : Dr. Wiwiek Tyasningsih, drh., M.Kes.
Anggota : Dr. Kadek Rachmawati, drh., M.Kes.
Pembimbing Utama : Sri Chusniati, drh., M.Si.
Pembimbing Serta : Prof. Dr. Rr. Sri Pantja Madyawati, drh., M.Si.

Telah diuji pada
Tanggal : 2 April 2018

KOMISI PENGUJI SKRIPSI

Ketua : Dr. Lilik Maslachah, drh., M.Kes.
Anggota : Dr. Wiwiek Tyasningsih, drh., M.Kes.
: Dr. Kadek Rachmawati, drh., M.Kes.
: Sri Chusniati, drh., M.Si.
: Prof. Dr. Rr. Sri Pantja Madyawati, drh., M.Si.

Surabaya, 9 April 2018

Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Airlangga

Dekan,



Prof. Dr. Pudji Srianto, drh., M.Kes.
NIP. 195601051986011001

**POTENSI ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL DAUN MIMBA
(*Azadirachta indica* A. Juss) TERHADAP *Salmonella pullorum***

Maria Ekarista Ari

ABSTRACT

The neem leaves (*Azadirachta indica* A. Juss) have several active substance such as flavonoids, saponins, tannins, terpenoids, alkaloids, and polyphenols, which are potential as antibacterials agents. The neem leaves are extracted with maceration method using ethanol solvent, then pulled in vitro against *Salmonella pullorum*. *Salmonella pullorum* is a bacterium that causes pullorum disease in poultry, especially chickens and turkeys. Neem leaf extract was diluted using DMSO 1%. The dilution method used six treatments and two controls to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and continued by streaking on the *Salmonella Shigella Agar* (SSA) medium to determine the Minimum Bacteriocide Concentration (MBC). The treatment used were 1%, 2,5%, 5%, 7,5%, 10%, 12,5%, control negative and control positive. The treatment group contained of *Salmonella pullorum* and neem leaf extract, control negative contains of *Salmonella pullorum* and aquades, control positive which used Ciprofloxacin antibiotics and *Salmonella pullorum*, each treatment was repeated with three repetitions respectively. The MIC value can not be determined because all the MIC test tubes show similar turbidity, and there is no turbidity difference between before incubation and the last incubated. MBC test results showed neem leaf extract treated bacteriocide to *Salmonella pullorum* at 5% concentration.

Key words: neem, antibacteria, *Salmonella pullorum*, dilution



UCAPAN TERIMA KASIH

Puji dan syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Kuasa atas karunia dan rahmat-Nya penulis dapat melaksanakan penelitian dan menyelesaikan skripsi dengan judul Potensi Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) Terhadap *Salmonella pullorum* .

Pada kesempatan ini penulis ingin menyampaikan terima kasih kepada:

Prof. Dr. Pudji Srianto, drh., M. Kes selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas kesempatan mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Ibu Sri Chusniati, drh., M. Si selaku pembimbing pertama dan Ibu Prof. Dr. Rr. Sri Pantja Madyawati, drh., M.Si selaku pembimbing serta atas saran, bimbingan, serta ketulusan selama proses menyusun sampai selesainya penelitian dan skripsi ini.

Ibu Dr. Lilik Maslachah, drh., M.Kes selaku ketua penguji, Ibu Dr. Wiwiek Tyasningsih, drh., M.Kes selaku sekretaris penguji, dan Ibu Dr. Kadek Rachmawati, drh., M. Kes selaku anggota penguji, atas kesediaan waktu untuk menguji serta menilai skripsi ini dan juga atas segala saran dan masukan dan arahan yang membangun selama penelitian ini berjalan hingga selesainya skripsi ini.

Ibu Dr. Widya Paramita Lokapirnasari, drh., M.P selaku dosen wali yang telah meluangkan waktunya dan membimbing penulis untuk dapat berprestasi secara akademik maupun non akademik.

Seluruh bapak dan ibu dosen pengajar atas ilmu dan wawasan yang sangat bermanfaat bagi penulis selama mengikuti pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga.

Bapak dan Ibu staff kependidikan, Bagian Kemahasiswaan, Bagian Akademik, Bagian Keuangan, Bagian Tata Usaha dan Kerumahtanggaan serta Bagian Sistem Informasi yang telah banyak membantu selama penulis belajar di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

Seluruh laboran Eks. Laboratorium Bakteriologi dan Mikologi, Departemen Mikrobiologi Veteriner serta Eks. Laboratorium Farmakologi, Departemen Ilmu Kedokteran Dasar Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan penelitian.

Orang tua saya tercinta yang senantiasa selalu mendukung baik secara financial, semangat, dan doa, Bapak Kasimirus Oja dan Mama Rafaela Mbupu, Saudara kandung yang selalu mendukung dan memberi semangat, Kakak Martinus Mite, Adik Benyamin Paskalis Ude, dan Adik Sabinus Sebho, untuk keluarga yang selalu mendukung Ibu Ernesta Bura dan Bapak Yohanes Gu Wea.

Sahabat yang selalu mendukung, menyemangati, dan menghibur Anjelina Kristina Mogi, Dhimar Maulud Dyahningrum, Zakiah Saumi, Nurluqita, Vebry Utami Syafitri, Putri Rahayu, Bergita Dhei, Santi Andriani, Maulidiya Wardani. Teman-teman Asisten Dosen Departemen Parasitologi Taufik Tri Laksono, Erika Septiana Zahro, Amara Lintang Pagati, Achmad Hasan Sahani, Shendy Canadya Kurniawan, dan Rachmad Yusuf Wiranata. Pengurus Sie Kerohanian Katolik

(SKK) tahun 2017 Joshua Edbert Tansil, Ratna Andriani, Yoseph Eric, Kristina H. Mundur, dan Kristoforus A. Kosasih, Marteria Candra Monica, Kak Niluh Selly Frantika dan seluruh teman-teman Sie Kerohanian Katolik, teman-teman Kelas B, teman-teman Jurusan IPA SMA Negeri 1 Aesesa yang selalu memberi semangat dan membantu demi kelancaran penyelesaian skripsi ini.

Akhirnya penulis menyadari bahwa skripsi ini jauh dari kesempurnaan. Penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun. Dengan segala kerendahan hati penulis mengharapkan skripsi ini dapat bermanfaat bagi pihak yang membutuhkan . Terima kasih

Surabaya, April 2018

Penulis



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
HALAMAN IDENTITAS.....	iv
ABSTRACT	vi
UCAPAN TERIMA KASIH.....	vii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG	xv
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Landasan Teori.....	3
1.4 Tujuan Penelitian	5
1.5 Manfaat Hasil Penelitian.....	5
1.6 Hipotesis.....	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Tanaman Mimba (<i>Azadirachta indica</i>).....	6
2.1.1 Klasifikasi dan morfologi tanaman mimba.....	6
2.1.2 Kandungan bahan aktif di dalam daun mimba	7
2.2 <i>Salmonella pullorum</i>	9
2.2.1 Klasifikasi <i>Salmonella pullorum</i>	9
2.2.2 Sifat dan pertumbuhan <i>Salmonella pullorum</i>	10
2.2.3 Cara penularan <i>Salmonella pullorum</i>	11
2.2.4 Gejala klinis penyakit pullorum.....	12
2.3 Uji Antibakteri	13
BAB 3 MATERI DAN METODE.....	15
3.1 Rancangan Penelitian.....	15
3.2 Sampel dan Besar Sampel.....	15
3.2.1 Kelompok perlakuan	16
3.3 Variabel yang diamati	16
3.3.1 Variabel bebas	16
3.3.2 Variabel tergantung	16
3.3.3 Variabel kendali	17
3.4 Defenisi Operasional Variabel.....	17
3.4.1 Ekstrak etanol daun mimba.....	17
3.4.2 <i>Salmonella pullorum</i>	17

3.4.3	<i>Minimum inhibitory concentration</i>	17
3.4.4	<i>Minimum bactericide concentration</i>	18
3.5	Tempat dan Waktu Penelitian	18
3.6	Bahan dan Materi Penelitian	18
3.6.1	Alat penelitian	18
3.6.2	Bahan penelitian	18
3.7	Prosedur Penelitian	19
3.7.1	Sterilisasi alat	19
3.7.2	Pembuatan ekstrak etanol daun mimba.....	19
3.7.3	Pengenceran ekstrak daun mimba.....	20
3.7.4	Pembuatan media agar	20
3.7.5	Pembuatan suspensi <i>Salmonella pullorum</i>	20
3.7.6	Uji <i>Minimum inhibitory concentration</i> (MIC)	21
3.7.7	Uji <i>Minimum bactericide concentration</i> (MBC).....	22
3.8	Analisis Data	22
3.9	Alur Penelitian	24
BAB 4 HASIL PENELITIAN.....		25
4.1	Identifikasi <i>Salmonella pullorum</i>	25
4.2	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>	26
4.3	<i>Minimum Bactericide Concentration</i>	27
4.4	Hasil Analisa Data	29
BAB 5 PEMBAHASAN		31
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN.....		35
6.1	Kesimpulan	35
6.2	Saran.....	35
RINGKASAN		36
DAFTAR PUSTAKA		38
LAMPIRAN		41

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.3 Hasil uji <i>Minimum Bacteriocide Concentration</i> (MBC) ekstrak daun mimba terhadap <i>Salmonella pullorum</i>	28
4.4 Hasil LC ₅₀ ekstrak daun mimba terhadap <i>Salmonella pullorum</i> berdasarkan analisis probit	30

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Morfologi tanaman mimba berbatang tegak, daun majemuk, letak berhadapan, bentuk lonjong, dan tepi bergerigi.....	6
2.2 <i>Salmonella pullorum</i> bentuk batang langsing, Gram negatif, tidak membentuk spora, dan tidak berkapsul	10
4.1 Koloni <i>Salmonella pullorum</i> pada media SSA dengan koloni bulat, cembung, halus, jernih, terdapat <i>black spot</i>	26
4.2 Hasil uji <i>Minimum Inhibitory Concentration</i> (MIC).....	27
4.3 Hasil uji <i>Minimum Bactericide Concentration</i> (MBC)	28

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Tabel hasil identifikasi <i>Salmonella pullorum</i>	41
2. Hasil analisa data	42
3. Alat penelitian	45
4. Bahan Penelitian	46
5. Hasil identifikasi <i>Salmonella pullorum</i>	47



SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG

atm	: <i>atmosfer</i>
cm	: <i>centimeter</i>
CMC Na	: <i>Sodium Carboxymethyl Cellulose (Natrium)</i>
DMSO	: <i>Dimetil Sulfoksida</i>
gr	: <i>gram</i>
KLT	: <i>Kromatografi Lapis Tipis</i>
KVC	: <i>Kromatografi Vakum Cair</i>
LC ₅₀	: <i>Lethal Concentration 50</i>
MBC	: <i>Minimum Bacteriocide Concentration</i>
MIC	: <i>Minimum Inhibitory Concentration</i>
MR	: <i>Methyl Red</i>
SCA	: <i>Simmon Citrat Agar</i>
SIM	: <i>Sulfit Indol Motility</i>
SSA	: <i>Salmonella Shigella Agar</i>
TSIA	: <i>Triple Sugar Iron Agar</i>
VP	: <i>Voges Proskauer</i>
%	: <i>Per seratus</i>
°C	: <i>derajat Celcius</i>

BAB 1 PENDAHULUAN



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Penelitian

Penyakit infeksius yang menyerang unggas menjadi kendala utama dalam usaha peternakan unggas saat ini terutama di Indonesia. Kasus penyakit infeksius dapat menyebabkan kerugian yang sangat besar pada sektor peternakan unggas. Salah satu penyakit yang banyak merugikan peternak adalah penyakit pullorum atau yang biasa disebut penyakit berak kapur. Penyakit ini menyerang unggas terutama ayam dan kalkun. Penyakit pullorum disebabkan oleh *Salmonella pullorum*, menyerang ayam muda dan itik umur 2-3 minggu dengan tingkat mortalitas tinggi (Quinn *et al.*, 2011). Penyakit pullorum juga menyebabkan penurunan produksi telur, daya tetas menurun, angka morbiditas serta mortalitas yang tinggi mencapai 80-100% (Shah *et al.*, 2005).

Pengendalian penyakit pullorum juga diatur oleh pemerintah dengan melakukan uji serologik pada semua *parent stock* yang dipelihara di *breeding farm*. Sejauh ini kejadian penyakit tersebut di tingkat *breeder* tergolong sangat jarang. Beberapa penelitian yang dilakukan menyebutkan bahwa, penyakit ini tersebar di berbagai peternakan ayam di Indonesia walaupun frekuensi kejadiannya masih tergolong rendah (Tabbu, 2004). Pada penelitian yang dilakukan Wiedosari dan Wahyuwardani (2015) persentase kasus pullorum di kabupaten Sukabumi dan Bogor (Jawa Barat) pada tahun 2012 sekitar 10%.

Pengobatan penyakit pullorum di lapangan masih menggunakan berbagai jenis antibiotik seperti Teramycin (Murtidjo, 2006). Menurut Tabbu (2004)

penyakit pullorum dapat diobati menggunakan antibiotik furazolidon, klortetrasiklin, dan kelompok kuinolon. Penggunaan klortetrasiklin telah dilaporkan dapat menimbulkan resistensi pada ayam. Keadaan ini sesuai dengan pendapat Kusumaningsih dan Sudarwanto (2011) yang menyatakan bahwa *Salmonella enteritidis* asal telur telah dilaporkan menunjukkan resistensi yang tinggi terhadap tiga jenis antibakteri yaitu neomisin, doksisisiklin, dan siprofloksasin, sedangkan *Salmonella enteritidis* asal manusia resisten terhadap antibakteri streptomisin, neomisin, tetrasiklin, dan doksisisiklin.

Penggunaan antibiotik yang berlebihan dapat dicegah dengan memanfaatkan sumber daya alam berupa tanaman sebagai antibakteri alami untuk mengobati penyakit pada hewan. Penggunaan tanaman sebagai obat semakin diminati karena lebih aman dan relatif lebih murah. Ekstrak dari berbagai tanaman telah terbukti mampu menghambat pertumbuhan bakteri. Penggunaan tanaman sebagai antibakteri mempunyai peran penting dalam mengendalikan penyakit infeksi (Sheikh *et al.*, 2012).

Salah satu tanaman yang potensial sebagai antibiotika alami adalah mimba (*Azadirachta indica*). Tanaman ini merupakan tanaman yang potensial karena tahan panas dan mempunyai banyak manfaat. Tanaman mimba dapat dimanfaatkan sebagai insektisida, fungisida, akarisisida, dan nematisida (Puspitasari dkk., 2009). Penelitian lain telah melaporkan manfaat tanaman mimba sebagai antibakteri. Ekstrak heksan biji mimba mampu menghambat *Pseudomonas aerogenosa*, *E. coli*, dan *Streptococcus pyogenes* (El-Mahmood *et al.*, 2010). Ekstrak daun mimba mampu menghambat *Bacillus cereus*, *Enterococcus*

faecalis, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus* (Pritima dan Pandian, 2008).

Menurut Ayini dkk., (2014) ekstrak daun mimba pada konsentrasi 5% mampu menghambat *Vibrio alginolyticus* (MIC), sedangkan konsentrasi yang mampu membunuh *Vibrio alginolyticus* terdapat pada konsentrasi 12,5% (MBC). Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan Ambarwati (2007), bahwa rendaman serbuk biji mimba pada konsentrasi 12,5% efektif menghambat *Salmonella thyposa* dengan diameter hambatan (tidak termasuk diameter *paper disc*) 18,67 mm dan *Staphylococcus aureus* sebesar 19,67 mm.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan pemaparan masalah di atas maka dapat dirumuskan:

1. Apakah ekstrak etanol daun mimba (*Azadirachta Indica* A. Juss) mempunyai potensi antibakteri terhadap *Salmonella pullorum* ?
2. Berapakah *Minimum Bactericide Concentration* (MBC) dan *Lethal Concentration 50* (LC₅₀) ekstrak etanol daun mimba (*Azadirachta Indica* A. Juss) terhadap *Salmonella pullorum* ?

1.3 Landasan Teori

Daun mimba mengandung beberapa senyawa yang berperan sebagai antibakteri. Identifikasi senyawa daun mimba menggunakan uji fitokimia menunjukkan bahwa daun mimba mengandung senyawa flavonoid (1,05%), saponin (3,14%), tanin (4,05%), terpenoid (2,33%), alkaloid (5,18%), dan polifenol (7,16%) (Sayekti, 2015). Menurut Ramadhani dkk. (2017) senyawa

yang berperan pada daun mimba adalah saponin. Hal ini dibuktikan dengan zona hambatan pada lempeng KLT ketika disemprot dengan pereaksi $SbCl_3$ terbentuk warna ungu. Identifikasi menggunakan skrining fitokimia menunjukkan bahwa senyawa yang berperan sebagai antibakteri dalam ekstrak etanol daun mimba adalah alkaloid, terpenoid, steroid, tanin, dan asam lemak (Handayani dkk., 2012). Senyawa flavonoid merusak membran sitoplasma, menghambat sintesis asam nukleat, serta menghambat metabolisme energi bakteri (Kwon *et al.*, 2010). Alkaloid merusak komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri (Robinson 1995 dalam Ayini dkk., 2014). Saponin mengganggu stabilitas dan permeabilitas membran sel bakteri (Cheok *et al.*, 2014). Senyawa tanin menghambat bakteri dengan cara menghancurkan membran plasma bakteri yang tersusun atas lemak dan protein (Mailoa *et al.*, 2014). Tanin juga menginaktifkan enzim, menginaktifkan adhesi sel mikroba, dan mengganggu transport protein pada lapisan dalam sel (Rijayanti, 2014). Daun mimba memiliki aktivitas antibakteri terhadap beberapa bakteri. Ekstrak etanol daun mimba mampu menghambat *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus* dan *Shigella flexneri* (Handayani dkk., 2012). Pada penelitian yang dilakukan Ayini dkk. (2014) uji ekstrak daun mimba terhadap *Vibrio alginolyticus* pada konsentrasi 5% sudah mampu menghambat bakteri (MIC) sedangkan kadar bunuh minimumnya (MBC) pada konsentrasi 12,5%. Hal ini sejalan dengan pendapat Ambarwati (2007) bahwa rendaman serbuk biji mimba pada konsentrasi 12,5% efektif menghambat *Salmonella thyposa* dengan diameter hambatan (tidak termasuk diameter *paper disc*) sebesar 18,67 mm dan *Staphylococcus aureus* sebesar 19,67 mm .

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan yang dicapai dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui potensi antibakteri ekstrak etanol daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) terhadap *Salmonella pullorum*
2. Mengetahui *Minimum Bactericide Concentration* (MBC) dan *Lethal Concentration 50* (LC₅₀) ekstrak etanol daun mimba (*Azadirachta Indica* A. Juss) terhadap *Salmonella pullorum*

1.5 Manfaat dan Hasil Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah hasil dari penelitian ini dapat dijadikan informasi ilmiah bahwa daun mimba mempunyai daya antibakteri terhadap *Salmonella pullorum*.

1.6 Hipotesis

1. Ekstrak etanol daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) mempunyai potensi antibakteri terhadap *Salmonella pullorum*
2. Ekstrak etanol daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) pada kadar tertentu dapat membunuh *Salmonella pullorum*

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Mimba (*Azadirachta indica*)

2.1.1 Klafikasi dan Morfologi Tanaman Mimba (*Azadirachta indica*)

Menurut Pankaj *et al.* (2011) berdasarkan taksonominya mimba tergolong:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Kelas	: Dycotiledoneae
Ordo	: Rutales
Sub Ordo	: Rutinieae
Famili	: Meliaceae
Sub famili	: Meliadeae
Genus	: <i>Azadirachta</i>
Spesies	: <i>Azadirachta indica</i>



Gambar 2.1 Morfologi tanaman mimba berbatang tegak, daun majemuk, letak berhadapan, bentuk lonjong, dan tepi bergerigi (Sumber:Dokumentasi pribadi)

Mimba (*Azadirachta indica*) merupakan tanaman dengan batang tegak dan didukung oleh akar tunggang. Permukaan batangnya kasar, berkayu dan memiliki kulit kayu yang tebal. Tinggi tanaman mimba bisa mencapai 30 meter dengan diameter batang mencapai 2-5 meter dan diameter kanopi mencapai 10 meter. Daun mimba majemuk, letak berhadapan, bentuk lonjong, tepi bergerigi, ujung lancip, panjang 5-7 cm, lebar 3-4 cm, tangkai daun panjang 8-20 cm, dan berwarna hijau yang dapat dilihat pada Gambar 2.1 . Biji bulat diameter 1 cm, dan berwarna putih. Mimba tumbuh baik di daerah panas di ketinggian 1-7000 meter dari permukaan laut (Kardinan, 2000).

Menurut Ramadhani dkk. (2017) ekstrak etanol daun mimba berwarna hitam kehijauan, berbau khas, konsistensi kental, rasa pahit, kadar abu ekstrak etanol sekitar 5,5 %, dan susut pengeringan sekitar 12%.

2.1.2 Kandungan Bahan Aktif di dalam Daun Mimba (*Azadirachta indica* A. Juss)

Daun mimba mengandung beberapa senyawa yang berperan sebagai antibakteri. Identifikasi senyawa daun mimba menggunakan uji fitokimia menunjukkan bahwa daun mimba mengandung senyawa flavonoid (1,05%), saponin (3,14%), tanin (4,05%), terpenoid (2,33%), alkaloid (5,18%), dan poliphenol (7,16%) (Sayekti, 2015).

Senyawa flavonoid mempunyai peran sebagai antibakteri, bersinergi dengan antibiotik, dan dapat menekan pertumbuhan bakteri. Mekanisme flavonoid sebagai antibakteri sebagai berikut, yaitu merusak membran sitoplasma (disebabkan oleh perforasi dan penurunan kestabilan membran), menghambat

sintesis asam nukleat, serta menghambat metabolisme energi bakteri dengan cara penghambatan *NADH-cytochrome c reductase* (Chusnie and Lamb, 2011). Flavonoid menghambat fase sintetik pada proses pembentukan DNA dan RNA akibatnya terjadi penghambatan sintesis asam nukleat dan bahan utama pembentuk bahan genetik DNA dan RNA. Sehingga terjadi gangguan pembentukan inti sel bakteri dan terjadi apoptosis sel bakteri dan sel bakteri mengalami kematian atau lisis (Kwon *et al.*, 2010).

Senyawa alkaloid yang mempunyai kemampuan sebagai antibakteri dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel (Robinson 1995 dalam Ayini dkk., 2014).

Saponin bekerja sebagai antibakteri dengan mengganggu stabilitas membran sel bakteri, sehingga menyebabkan sel bakteri lisis serta mengganggu permeabilitas membran sel bakteri yang mengakibatkan kerusakan membran sel dan menyebabkan keluarnya berbagai komponen penting dari dalam sel bakteri seperti protein, asam nukleat dan nukleotida (Cheok *et al.*, 2014).

Senyawa tanin merupakan polifenol yang dapat menghambat bakteri dengan menghancurkan membran plasma bakteri yang tersusun atas lemak dan protein dengan perbandingan 40% dan 60%. Tanin akan bereaksi dengan protein dan membentuk ikatan hidrogen sehingga protein terdenaturasi. Akibatnya membran sel bakteri rusak. Kerusakan ini akan menghambat masuknya nutrisi untuk bakteri untuk menghasilkan energi, sehingga pertumbuhan bakteri akan terhambat dan bakteri mati (Mailoa *et al.*, 2014). Tanin juga mempunyai daya

antibakteri dengan cara menginaktifkan enzim, menginaktifkan adhesi sel mikroba, dan mengganggu transport protein pada lapisan dalam sel (Rijayanti, 2014).

Menurut Ramadhani dkk. (2017) senyawa paling berperan pada daun mimba sebagai antibakteri diduga adalah senyawa saponin. Hal ini dibuktikan dengan noda zona hambatan pada lempeng KLT ketika disemprot dengan pereaksi $SbCl_3$ terbentuk warna ungu. Identifikasi menggunakan skrining fitokimia menunjukkan bahwa senyawa yang berperan sebagai antibakteri dalam ekstrak etanol daun mimba adalah alkaloid, terpenoid, steroid, tanin, flavonoid, dan asam lemak (Handayani dkk., 2012). Ekstrak etanol daun mimba berpotensi sebagai antibakteri karena mengandung senyawa saponin, alkaloid, terpenoid, steroid, tanin, flavonoid, dan asam lemak.

2.2 *Salmonella pullorum*

2.2.1 Klafikasi *Salmonella pullorum*

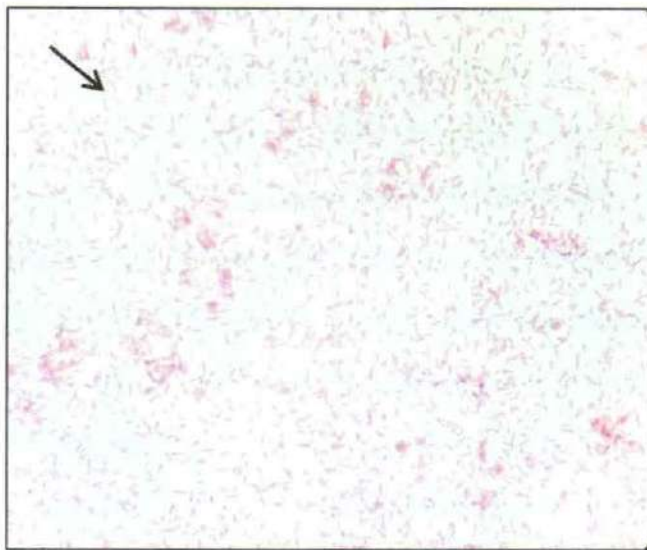
Berdasarkan *Bergey's Manual of Determinativa Bacteriology* (Holt et al., 1994) dan Dwidjoseputro, (2003) *Salmonella pullorum* dapat diklasifikasikan sebagai berikut :

Kingdom : Procaryotae
Divisi : Protophyta
Kelas : Schizomycetes
Ordo : Eubacteriales
Famili : Enterobacteriaceae
Genus : Sallmonella

Spesies : *Salmonella pullorum*

2.2.2 Sifat dan Pertumbuhan *Salmonella pullorum*

Salmonella pullorum merupakan serotype dari *Salmonella enterica* (McVey *et al.*, 2013), berbentuk batang langsing dengan ukuran panjang 1-2,5 μm dan lebar 0,3–0,5 μm . Bersifat Gram negatif, tidak bergerak, tidak membentuk spora dan tidak berkapsul. *Salmonella pullorum* tumbuh optimum pada suhu 37⁰C (Timoney *et al.*, 1988). Bersifat aerob dan fakultatif anaerob dan pH 6,8-7,2 (Iman dkk., 2011). Morfologi *Salmonella pullorum* dapat dilihat pada Gambar 2.2 dibawah ini.



Gambar 2.2. *Salmonella pullorum* bentuk batang langsing (tanda panah), Gram negatif, tidak membentuk spora dan tidak berkapsul, perbesaran 1000X (Sumber: Dokumentasi pribadi)

Koloni *Salmonella pullorum* pada *Nutrient Agar* (NA) berbentuk bulat, cembung, halus, mengkilap, dan licin. Pada media *Mac Conkey Agar* (MCA)

koloni berbentuk bulat, cembung, tidak berwarna sampai koloni keabu-abuan, pada media *Salmonella Shigella Agar* (SSA) koloni bulat, cembung, halus, jernih, tembus pandang, dan terdapat *black spot* karena bakteri menghasilkan H₂S, pada media *Sulfide Indol Motility* (SIM) menunjukkan sifat non motil karena tidak terbentuknya bentukan seperti cemara terbalik dan terdapat bentukan warna hitam yang menunjukkan adanya H₂S. Pada media *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA) menunjukkan sifat basa (merah) pada bidang miring dan asam (kuning) pada bidang tegak, membentuk gas dan memproduksi H₂S. Pada uji urease bersifat negatif, uji *Methyl Red* (MR) menunjukkan reaksi positif dengan terjadinya perubahan warna indikator menjadi merah, uji *Voges Proskauer* (VP) negatif. *Salmonella pullorum* dapat memfermentasi glukosa dan membentuk gas, tidak dapat memfermentasi dulcitol dan maltosa (Quinn *et al.*, 2011).

2.2.3 Cara penularan *Salmonella pullorum*

Salmonella pullorum menyerang unggas terutama ayam dan kalkun. Pada ayam derajat adaptasi terhadap bakteri tersebut lebih tinggi daripada kalkun yang derajat adaptasinya rendah (Tabbu, 2004). *Salmonella pullorum* dapat menular per oral, per inhalasi atau kongenital. Penularan per inhalasi terjadi di dalam mesin penetas telur dan di dalam kandang anak ayam. Penularan kongenital terjadi melalui telur. Apabila anak ayam menetas maka bakteri dapat berkembang di dalam saluran pencernaan anak ayam (Iman dkk., 2011).

Penularan *Salmonella pullorum* juga dapat terjadi selama periode penetasan dari anak ayam yang terinfeksi kepada anak ayam yang tidak terinfeksi. Penularan dalam suatu flock akibat adanya kanibalisme dari ayam yang terinfeksi,

memakan telur yang terinfeksi, masuknya *Salmonella pullorum* melalui luka, melalui pakan yang tercemar, melalui kandang atau peralatannya, dan produk asal unggas yang tercemar bakteri tersebut yang digunakan sebagai bahan pakan (Tabbu, 2004).

2.2.4 Gejala Klinis Penyakit Pullorum

Salmonella pullorum patogen terhadap anak-anak ayam umur 1-7 hari dan dapat mencapai kematian hingga 90% dengan gejala enteritis. Pada ayam dewasa menyebabkan ovaritis, turunnya produksi telur dan kematian (Iman dkk., 2011). Masa inkubasi sekitar 4-5 hari dan jalannya penyakit selama 5-12 hari. Pada anak ayam penyakit pullorum ditandai dengan gejala lesu, bergerombol di bawah pemanas, kehilangan nafsu makan, sayap terkulai, feses berwarna putih menyerupai kapur (pasta), kadang bercampur ekskreta berwarna coklat kehijauan di sekitar kloaka. Anak ayam yang sembuh akan mengalami gangguan pertumbuhan, berat badan yang menurun, dan gangguan pertumbuhan bulu. Pada ayam dewasa yang terinfeksi menunjukkan gejala jengger yang pucat, keriput, mengecil, dan berwarna kelabu. Produksi telur menurun, fertilitas dan daya tetas telur menurun. Ayam terlihat lesu, nafsu makan menurun, diare, dan dehidrasi (Tabbu, 2004).

Salmonella pullorum tahan berbulan-bulan bahkan beberapa tahun pada suhu lingkungan tetapi mudah dimusnahkan dengan menggunakan desinfektan atau formalin yang biasa dipakai untuk fumigasi pada mesin penetasan. Beberapa alternatif tindakan untuk mengurangi kejadian pullorum antara lain,

mengeliminasi atau tidak mencampur ayam yang sehat atau bebas dengan ayam karrier *Salmonella pullorum*. Menjaga sanitasi kandang dan lingkungan terutama dari rodent dan serangga lain sebagai pembawa *Salmonella pullorum*. Pada usaha pembibitan ayam, pullorum tes wajib dilakukan dan ayam yang positif harus dilakukan *culling* atau dimusnahkan sehingga siklus *Salmonella pullorum* terputus (Suwito dkk., 2010).

2.3 Uji Antibakteri

Antibakteri merupakan zat kemoterapeutika yang berasal dari produk mikroorganisme yang bersifat bakteriostatik atau menghambat pertumbuhan bakteri, tetapi pada konsentrasi yang lebih besar dapat bersifat bakteriosid atau membunuh bakteri (Iman dkk., 2011). Antibiotik digunakan sebagai obat untuk mengobati penyakit infeksi pada manusia, hewan atau tumbuhan. Dapat berupa bahan alami, sintetik dan semi sintetik (Quinn *et al.*, 2011).

Percobaan untuk mengetahui antibiotik yang paling sesuai untuk pengobatan yang efektif pada suatu penyakit tertentu dapat dilakukan pada isolat bakteri. Percobaan ini disebut sebagai uji *in vitro*. Uji *in vitro* tidak dapat menunjukkan berbagai faktor yang mempengaruhi aktivitas antibakteri secara *in vivo*. Beberapa cara yang sering digunakan untuk uji antibakteri diantaranya adalah dilusi agar dan cara difusi (Quinn *et al.*, 2011)

Metode dilusi merupakan seri pengenceran antibakteri pada media *broth* dan bakteri standar yang dimasukkan dalam tabung, kemudian diinkubasikan pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Metode dilusi digunakan untuk menentukan *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dan *Minimum Bactericide Concentration*

(MBC) dari suatu antibakteri pada bakteri uji. *Minimum Inhibitory Concentration* adalah pengenceran tertinggi suatu antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri uji. *Minimum Bacteriocide Concentration* adalah pengenceran tertinggi suatu antibakteri yang dapat membunuh bakteri uji (Quinn *et al.*, 2011).

Tujuan metode dilusi adalah untuk mengetahui seberapa banyak zat antibakteri yang dibutuhkan untuk menghambat pertumbuhan dan membunuh bakteri uji. Keuntungan uji dilusi adalah memungkinkan adanya hasil kuantitatif, yang menunjukkan bahwa zat antibakteri tersebut diperlukan untuk menghambat atau membunuh mikroorganisme yang diuji (Quinn *et al.*, 2011).

BAB 3

MATERI DAN METODE



BAB 3 MATERI DAN METODE

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara *in vitro* menggunakan uji sensitivitas metode dilusi dengan penentuan *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dan *Minimum Bacteriocide Concentration* (MBC). Rancangan penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Penentuan banyaknya sampel berdasarkan banyaknya perlakuan (t) dan ulangan (n). Rumus penentuan sampel RAL $t(n-1) \geq 15$ (Kusriningrum, 2008).

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

$$8(n-1) \geq 15$$

$$8n-8 \geq 15$$

$$8n \geq 15+8$$

$$n \geq 23/8$$

$$n \geq 2,875$$

$$n \geq 3 \text{ (dibulatkan)}$$

Keterangan: t : jumlah perlakuan n : jumlah ulangan

3.2 Sampel dan Besar Sampel

Sampel yang digunakan adalah *Salmonella pullorum* dan ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica*) dengan berbagai konsentrasi. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Ayini dkk., (2014) ekstrak daun mimba mampu menghambat *Vibrio alginolyticus* pada konsentrasi 5% (MIC) sedangkan kadar bunuh minimumnya (MBC) pada konsentrasi 12,5%. Pada penelitian ini menggunakan delapan perlakuan, yaitu ekstrak daun mimba dengan konsentrasi 1%, 2,5%, 5%,

7,5%, 10%, dan 12,5%, serta kontrol yaitu kontrol positif, dan kontrol negatif.

Setiap perlakuan diulang tiga kali.

3.2.1 Kelompok Perlakuan

- Perlakuan I : 1 ml ekstrak etanol daun mimba 1 % + 1 ml *Salmonella pullorum*
- Perlakuan II : 1 ml ekstrak etanol daun mimba 2,5 % + 1 ml *Salmonella pullorum*
- Perlakuan III : 1 ml ekstrak etanol daun mimba 5 % + 1 ml *Salmonella pullorum*
- Perlakuan IV : 1 ml ekstrak etanol daun mimba 7,5 % + 1 ml *Salmonella pullorum*
- Perlakuan V : 1 ml ekstrak etanol daun mimba 10 % + 1 ml *Salmonella pullorum*
- Perlakuan VI : 1 ml ekstrak etanol daun mimba 12,5 % + 1 ml *Salmonella pullorum*
- Perlakuan VI : 1 ml Ciprofloxacin 0,2% + 1 ml *Salmonella pullorum* (Kontrol Positif)
- Perlakuan VII : 1 ml *Salmonella pullorum* + 1 ml aquades (Kontrol Negatif)

3.3 Variabel yang diamati

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak daun mimba konsentrasi 1%, 2,5%, 5%, 7,5%, 10%, 12,5%

3.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah pertumbuhan *Salmonella pullorum* pada media *Salmonella Shigella Agar* (SSA) pada uji MBC.

3.3.3 Variabel Kendali

Variabel kendali pada penelitian ini adalah asal daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss), media biakan *Salmonella pullorum*, suhu dan lama inkubasi, metode pembuatan ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss), metode pengamatan pertumbuhan bakteri, dan peralatan yang digunakan pada penelitian.

3.4 Defenisi operasional variabel

3.4.1 Ekstrak Daun Mimba

Ekstrak etanol daun mimba adalah daun mimba yang sudah dihaluskan menjadi simplisia, diekstraksi dengan etanol 96% teknis dengan metode maserasi kemudian diencerkan menggunakan DMSO 1 % menjadi konsentrasi 1%, 2,5%, 5%, 7,5%, 10%, dan 12,5%

3.4.2 *Salmonella pullorum*

Salmonella pullorum adalah bakteri biakan murni yang diperoleh dari Eks. Laboratorium Bakteriologi dan Mikologi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan yang dibiakkan pada media SSA (*Salmonella Shigella Agar*) dan disetarakan dengan larutan *Mc Farland* 1, kemudian diencerkan menggunakan Nacl fisiologis menjadi 10^8 sel/ml, sehingga suspensi bakteri yang digunakan memenuhi syarat uji kepekatan yaitu 10^5 - 10^8 sel/ml (Carter and Cole, 1990 dalam Chusniati, 2014).

3.4.3 *Minimum Inhibitory Concentration (MIC)*

Minimum Inhibitory Concentration adalah ekstrak daun mimba pada pengenceran tertinggi yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella* yang ditandai dengan tabung pada uji MIC yang terlihat jernih.

3.4.4 *Minimum Bactericide Concentration* (MBC)

Minimum Bactericide Concentration adalah ekstrak daun mimba dari tabung uji MIC yang diinokulasi pada media SSA, pada pengenceran tertinggi mampu membunuh bakteri *Salmonella pullorum* yang ditandai dengan tidak tumbuhnya bakteri pada media SSA tersebut.

3.5 Tempat dan Waktu Penelitian

Pembuatan ekstrak daun mimba dilaksanakan pada bulan Januari 2018 di Eks. Laboratorium Farmakologi, Departemen Ilmu Kedokteran Dasar Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya. Uji *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dan *Minimum Bactericide Concentration* (MBC) dilaksanakan pada bulan Januari-Februari 2018 di Eks. Laboratorium Bakteriologi dan Mikologi, Departemen Mikrobiologi Veteriner, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya.

3.6 Bahan dan Materi Penelitian

3.6.1 Alat Penelitian

Peralatan yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah blender, seperangkat alat maserasi, gelas ukur, erlenmeyer, tabung reaksi, rak tabung, timbangan analitik, *rotary evaporator*, *autoclave*, lampu spiritus, korek api, cawan petri, jarum ose, inkubator, kapas steril, aluminium foil, mikroskop, gelas objek, pipet volumetrik, spidol, kertas label, pinset, penggaris, dan gunting.

3.6.2 Bahan Penelitian

Bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah daun mimba yang berasal dari Desa Waekokak, Kec. Aesesa, Kab Nagekeo, Nusa Tenggara Timur,

etanol 96% teknis, aquades, biakan *Salmonella pullorum*, media *Salmonella Shigella Agar* (SSA), antibiotik Ciprofloxacin 0,2%, dan Dimetil Sulfoksida (DMSO).

3.7 Prosedur Penelitian

3.7.1 Sterilisasi Alat

Peralatan yang akan digunakan pada penelitian disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121⁰C selama 15 sampai 20 menit (Dwijoseputro, 2003).

3.7.2 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Mimba (*Azadirachta indica* A. Juss)

Daun mimba yang digunakan pada penelitian ini berasal dari Desa Waekokak, Kec. Aesesa, Kab Nagekeo, Nusa Tenggara Timur. Daun mimba ditimbang sebanyak 1000 gram, dicuci bersih menggunakan air mengalir lalu dikeringkan di tempat teduh atau pada suhu ruangan (tidak langsung terkena sinar matahari). Daun mimba yang telah kering diiris dengan ketebalan 1-1,5 mm.

Daun mimba yang telah diiris dihaluskan dengan blender untuk memperoleh simplisia serbuk, kemudian serbuk daun mimba dimaserasi dengan pelarut etanol 96% teknis selama 3x24 jam. Ekstrak etanol yang diperoleh selanjutnya diuapkan dengan *vacuum rotary evaporator* dengan suhu 50⁰C sampai diperoleh ekstrak pekat etanol (Handayani dkk., 2012). Hasil akhir ekstrak etanol daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) berupa ekstrak kental, berwarna hitam kehijauan, berbau khas, dan rasa pahit (Ramadhani dkk., 2017).

3.7.3 Pengenceran Ekstrak Daun Mimba (*Azadirachta indica* A. Juss)

Hasil ekstrak daun mimba diencerkan menggunakan pelarut *Dimetil sulfoksida* (DMSO). Konsentrasi DMSO yang digunakan pada penelitian ini adalah 1 % (Ramadhani dkk., 2017).

Ekstrak daun mimba konsentrasi 100% digunakan untuk membuat ekstrak daun mimba dengan konsentrasi 1%, 2,5%, 5%, 7,5%, 10%, dan 12,5%, dengan cara sebagai berikut:

1. Konsentrasi 1% : 0,02 gram ekstrak daun mimba + DMSO 1 % ad 2 ml
2. Konsentrasi 2,5% : 0,05 gram ekstrak daun mimba + DMSO 1% ad 2 ml
3. Konsentrasi 5% : 0,1 gram ekstrak daun mimba + DMSO 1 % ad 2 ml
4. Konsentrasi 7,5 : 0,15 gram ekstrak daun mimba + DMSO 1 % ad 2 ml
5. Konsentrasi 10% : 0,2 gram ekstrak daun mimba + DMSO 1 % ad 2 ml
6. Konsentrasi 12,5% : 0,25 gram ekstrak daun mimba + DMSO 1 % ad 2 ml

3.7.4 Pembuatan Media Agar

Media yang digunakan pada penelitian ini adalah media *Salmonella Shigella Agar* (SSA). Bubuk SSA dilarutkan dengan aquades steril dalam erlenmeyer hingga homogen. Larutan dipanaskan sambil diaduk hingga larut. Media dituang ke cawan petri masing-masing sebanyak \pm 20 ml. Media dibiarkan memadat dan diuji sterilisasi dengan diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37⁰C.

3.7.5 Pembuatan Suspensi *Salmonella pullorum*

Salmonella pullorum dibiakkan pada media SSA (*Salmonella Shigella Agar*) dengan cara streak menggunakan ose steril, kemudian diinkubasikan pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Pertumbuhan koloni yang ditunjukkan pada media

berupa koloni yang halus, bulat, tembus cahaya, tidak berwarna dan terdapat *black spot*. Koloni bakteri dari media SSA dilakukan uji mikroskopis menggunakan teknik pewarnaan gram serta uji urease, uji TSIA, uji SIM, uji MR-VP dan uji gula-gula untuk mengetahui sifat biokimianya.

Pembuatan suspensi *Salmonella pullorum* dilakukan dengan cara mengambil koloni pada media SSA sebanyak 4-5 koloni dengan menggunakan jarum ose dan dimasukkan ke dalam NaCl fisiologis lalu disentrifugasi hingga homogen. Kekeruhan dari suspensi bakteri tersebut disetarakan dengan kepadatan bakteri *Mc Farland 1* yang diasumsikan mengandung 3×10^8 sel/mL (Balley and Scott's, 2002). Suspensi *Salmonella pullorum* yang setara *Mc Farland 1* sebanyak 1 ml ditambah 2 ml NaCl fisiologis kemudian disentrifugasi hingga homogen. Hasil akhir berupa suspensi dengan koloni bakteri 10^8 sel/ml, sesuai dengan syarat untuk uji kepekaan yaitu : 10^5 - 10^8 sel/ml (Carter and Cole, 1990 dalam Chusniati, 2014).

3.7.6 Uji *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC)

Disediakan delapan tabung steril, pada tabung 1 ditambahkan 1 ml ekstrak etanol daun mimba 1%, tabung 2 ditambahkan 1 ml ekstrak daun mimba 2,5%, tabung 3 ditambahkan 1 ml ekstrak daun mimba 5%, tabung 4 ditambahkan 1 ml ekstrak daun mimba 7,5%, tabung 5 ditambhkan 1 ml ekstrak etanol daun mimba 10%, dan tabung 6 berisi 1 ml ekstrak etanol daun mimba 12,5%. Pada masing-masing tabung ditambahkan 1 ml suspensi *Salmonella pullorum* dengan kepadatan bakteri 10^8 /mL. Pada tabung 7 ditambahkan 1 ml antibiotik Ciprofoxacin dan 1 ml suspensi bakteri sebagai kontrol positif. Tabung 8

ditambahkan 1 ml suspensi *Salmonella pullorum* dan 1 ml aquades sebagai kontrol negatif. Semua tabung ditutup dengan kapas dan diinkubasi 37⁰C selama 24 jam (Wilujeng, 2010).

Pengamatan hasil *Minimum Inhibitory Concentration* dari ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) adalah dengan melihat perubahan warna pada tabung uji MIC yang tetap terlihat jernih atau keruh dibandingkan dengan kontrol. Apabila terlihat keruh maka ekstrak daun mimba tidak mampu menghambat pertumbuhan *Salmonella pullorum* dan terlihat jernih maka ekstrak daun mimba mampu menghambat pertumbuhan *Salmonella pullorum*. Nilai MIC terdapat pada tabung yang terlihat jernih dan memiliki konsentrasi paling rendah.

3.7.7 Uji *Minimum Bacteriocide Concentration* (MBC)

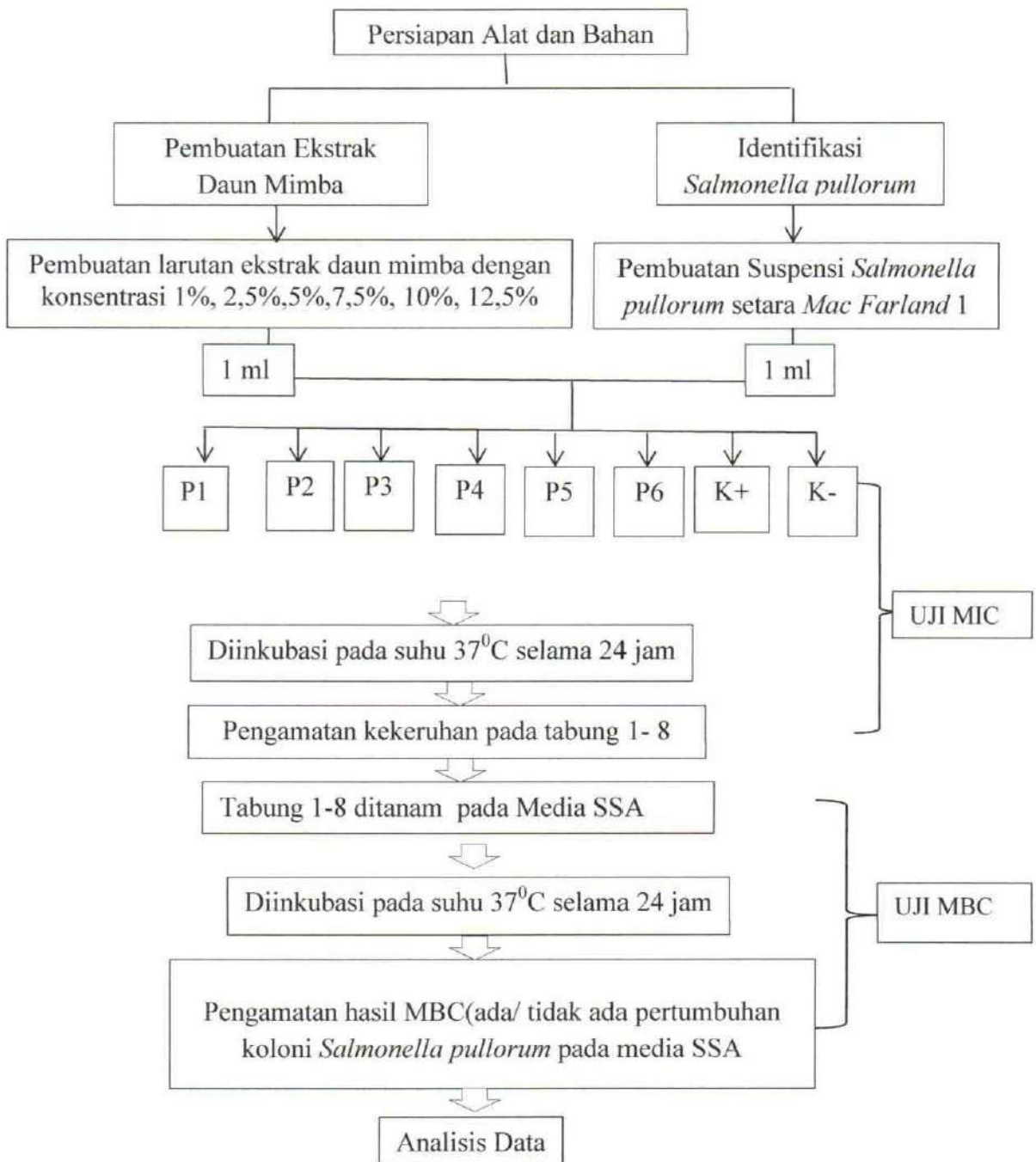
Pengujian selanjutnya adalah menentukan daya bunuh dari ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) dengan cara menanam semua konsentrasi hasil uji MIC pada media SSA (*Salmonella Shigella Agar*) dan dinkubasikan pada suhu 37⁰C selama 24 jam. Penentuan MBC adalah apabila tumbuh koloni *Salmonella pullorum* pada media SSA maka ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) tidak mampu membunuh *Salmonella pullorum* tetapi bila tidak tumbuh koloni *Salmonella pullorum* pada media SSA artinya ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) mampu membunuh *Salmonella pullorum*.

3.8 Analisis Data

Data hasil percobaan dianalisa dengan analisis probit menggunakan *Statistical Product and Service Solutions* (SPSS) versi 22 *for windows*. Analisis

probit bertujuan untuk menentukan nilai *Lethal Concentration* 50 (LC50) ekstrak daun mimba terhadap *Salmonella pullorum*.

3.9 Alur penelitian



BAB 4

HASIL PENELITIAN



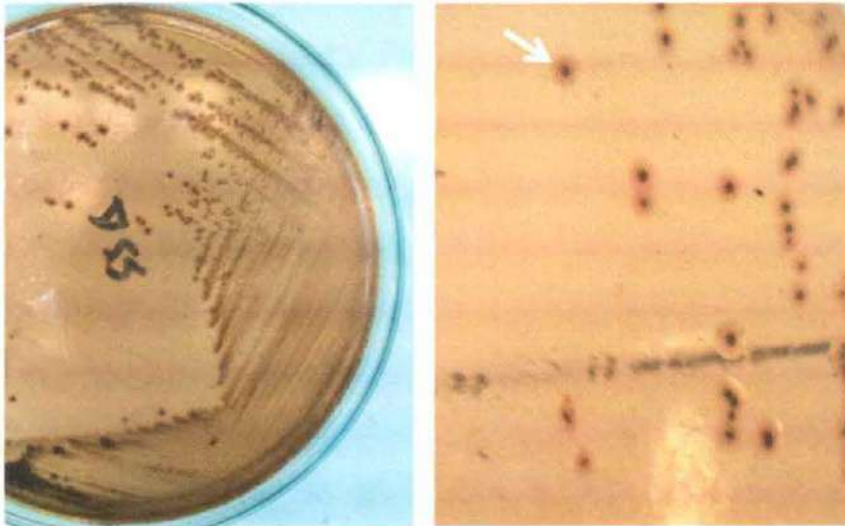
BAB 4 HASIL PENELITIAN

4.1 Identifikasi *Salmonella pullorum*

Identifikasi *Salmonella pullorum* dilakukan untuk menguji kebenaran bakteri uji yang digunakan. *Salmonella pullorum* yang diperoleh dari Eks. laboratorium Bakteriologi dan Mikologi, Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, diuji secara mikroskopis dengan pewarnaan gram dan uji biokimia.

Koloni *Salmonella pullorum* pada media SSA berbentuk bulat, cembung, halus, jernih dan terdapat *black spot* karena bakteri menghasilkan H_2S , yang dapat dilihat pada Gambar 4.1. Pada pewarnaan gram sel *Salmonella pullorum* berbentuk batang langsing dan berwarna merah muda menunjukkan bahwa bakteri bersifat gram negatif. Pada *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA) bersifat basa pada bidang tegak dan asam pada bidang miring. Sifat basa ditunjukkan dengan perubahan warna media menjadi merah dan kuning menunjukkan sifat asam. *Salmonella pullorum* juga memproduksi H_2S dan memproduksi gas. Produksi H_2S ditunjukkan dengan adanya kabut hitam pada media TSIA. *Salmonella pullorum* tidak menghasilkan urease sehingga urea tidak difermentasi dan tidak ada perubahan warna menjadi merah muda pada uji urease. *Salmonella pullorum* pada uji *Sulfit Indol Motility* (SIM) menunjukkan sifat non motil karena tidak adanya bentukan seperti cemara terbalik, tidak memproduksi indol dan menghasilkan H_2S . Pada uji *Simmon Citrat Agar* (SCA) bersifat negatif, menunjukkan bahwa *Salmonella pullorum* tidak menggunakan citrat sebagai sumber carbon. Pada uji *Metyl red* (MR) menunjukkan reaksi positif dengan perubahan warna indikator menjadi merah dan *Voges Proskauer* bersifat negatif. *Salmonella pullorum*

mampu memfermentasi glukosa dan membentuk gas, memfermentasi manitol dan maltosa serta tidak mampu memfermentasi laktosa dan sukrosa.



Gambar 4.1 Koloni *Salmonella pullorum* pada media SSA dengan koloni bulat, cembung, halus, jernih dan terdapat *black spot* (tanda panah)
(Sumber: Dokumentasi pribadi)

4.2 *Minimum Inhibitory Concentration (MIC)*

Semua tabung pada uji MIC menunjukkan kekeruhan yang hampir sama, dan tidak ada perbedaan kekeruhan saat sebelum dan sesudah diinkubasi, sehingga sulit menentukan nilai MIC. Ekstrak daun mimba yang berwarna hijau kehitaman menyebabkan warna larutan pada uji MIC menjadi hijau keruh yang dapat dilihat pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Hasil uji *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC)
(Sumber: Dokumentasi pribadi)

4.3 *Minimum Bactericide Concentration* (MBC)

Minimum Bactericide Concentration (MBC) adalah pengenceran tertinggi suatu antibakteri yang dapat membunuh bakteri uji (Quinn *et al.*, 2011). Pengamatan nilai MBC dilakukan dengan cara hasil uji MIC diinokulasikan pada media SSA kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰C. Pengamatan MBC dilakukan dengan melihat ada tidaknya pertumbuhan *Salmonella pullorum* pada media SSA. Apabila ada pertumbuhan *Salmonella pullorum* pada media SSA maka ekstrak daun mimba tidak mampu membunuh *Salmonella pullorum*, jika tidak terdapat pertumbuhan bakteri maka ekstrak daun mimba mampu membunuh *Sallmonella pullorum*.

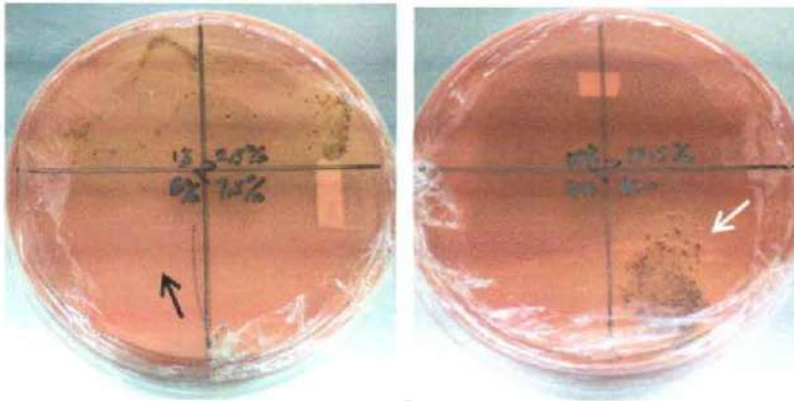
Hasil uji MBC ekstrak daun mimba terhadap *Sallmonella pullorum* dapat diamati pada Tabel 4.3 dan Gambar 4.3 di bawah ini

Tabel 4.3 Hasil uji *Minimum Bacteriocide Concentration* (MBC) ekstrak daun mimba terhadap *Salmonella pullorum*

Nomor Cawan	Perlakuan	ULANGAN		
		I	I	III
1	K-	+	+	+
2	1%	+	+	+
3	2,5%	+	+	+
4	5%	-	-	-
5	7,5%	-	-	-
6	10%	-	-	-
7	12,5%	-	-	-
8	K+	-	-	-

Ket: + : Ada pertumbuhan koloni bakteri

- : Tidak ada pertumbuhan koloni bakteri



Gambar 4.3 Hasil uji *Minimum Bacteriocide Concentration* (MBC). Terdapat pertumbuhan bakteri (panah putih) dan tidak terdapat pertumbuhan bakteri (panah hitam) (Sumber: Dokumentasi pribadi)

Data yang diperoleh menunjukkan pada konsentrasi 5%, 7,5%, 10%, 12,5% dan kontrol positif semua ulangan tidak terdapat pertumbuhan koloni *Salmonella pullorum*. Konsentrasi 1%, 2,5% dan kontrol negatif semua ulangan terdapat pertumbuhan koloni *Salmonella pullorum*.

Konsentrasi 5% sampai 12,5% tidak terdapat pertumbuhan koloni *Salmonella pullorum*. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak daun mimba mampu membunuh atau bersifat bakteriosid pada konsentrasi 5% sampai 12,5%. Konsentrasi minimum ekstrak daun mimba yang bersifat bakteriosid terdapat pada konsentrasi 5%.

Pada konsentrasi 1% dan 2,5% terdapat pertumbuhan koloni *Salmonella pullorum*. Hal ini dapat dikatakan bahwa ekstrak daun mimba pada konsentrasi 1% dan 2,5% tidak mampu membunuh *Salmonella pullorum*. Konsentrasi 1% dan 2,5% merupakan konsentrasi paling rendah. Konsentrasi ekstrak yang rendah mengakibatkan kemampuan untuk membunuh juga semakin rendah.

Kontrol negatif merupakan suspensi bakteri tanpa ekstrak daun mimba. Terdapat pertumbuhan koloni *Salmonella pullorum* yang menunjukkan bahwa suspensi *Salmonella pullorum* 10^8 sel/ml berada pada kondisi hidup dan aquades yang digunakan tidak bersifat bakteriosid dan dalam keadaan steril, terbukti dengan adanya pertumbuhan koloni *Salmonella pullorum* dan tidak ada pertumbuhan bakteri lain.

Pada kontrol positif terdapat suspensi *Salmonella pullorum* dan antibiotik Ciprofloxacin 0,2%, tidak terdapat pertumbuhan koloni *Salmonella pullorum*. Ciprofloxacin terbukti dapat membunuh *Salmonella pullorum*.

4.4 Hasil Analisis Data

Analisis data yang digunakan pada penelitian ini adalah analisis probit. Analisis probit bertujuan untuk menentukan nilai *Lethal Concentration* 50 (LC50)

ekstrak daun mimba terhadap *Salmonella pullorum*. Hasil Analisis dapat dilihat pada Tabel 4.4

Tabel 4.4 Hasil LC₅₀ ekstrak daun mimba terhadap *Salmonella pullorum* berdasarkan analisis probit

	Probabilitas	Batas Kepercayaan 95% untuk Konsentrasi		
		Estimasi	Batas Bawah	Batas Atas
PROBIT	.010	5.869	.	.
	.020	5.549	.	.
	.030	5.355	.	.
	-	-	-	-
	-	-	-	-
	.300	4.051	.	.
	.350	3.937	.	.
	.400	3.831	.	.
	.450	3.732	.	.
	.500	3.637	.	.
	.550	3.544	.	.
	.600	3.452	.	.
	.650	3.360	.	.
	.700	3.265	.	.
	-	-	-	-
	-	-	-	-
	.970	2.470	.	.
	.980	2.383	.	.
.990	2.253	.	.	

Berdasarkan Tabel 4.4 di atas bahwa nilai LC₅₀ ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) terhadap bakteri *Salmonella pullorum* sebesar 3,637%.

BAB 5

PEMBAHASAN



BAB 5 PEMBAHASAN

Data hasil penelitian menunjukkan bahwa pada konsentrasi 1% dan 2,5% ekstrak daun mimba tidak mampu membunuh *Salmonella pullorum*, ditandai dengan adanya pertumbuhan koloni *Salmonella pullorum*. Pada konsentrasi 5% sampai 12,5% tidak terdapat pertumbuhan koloni bakteri, menandakan bahwa ekstrak daun mimba mampu membunuh *Salmonella pullorum*. Konsentrasi minimum ekstrak daun mimba yang mampu membunuh *Salmonella pullorum* (MBC) terdapat pada konsentrasi 5%.

Konsentrasi ekstrak daun mimba 1% dan 2,5% tidak mampu membunuh *Salmonella pullorum* disebabkan karena konsentrasi ekstrak daun mimba yang digunakan rendah, sedangkan suspensi *Salmonella pullorum* dalam jumlah banyak. Pada konsentrasi rendah ekstrak daun mimba tidak mampu membunuh *Salmonella pullorum*. Hal ini sesuai dengan pendapat Sri K *et al.* (2005) dalam Ayini dkk. (2014) bahwa semakin tinggi konsentrasi zat antimikroba maka semakin tinggi kemampuannya untuk mengendalikan dan membunuh mikroorganisme tersebut .

Konsentrasi 5%, 7,5%, 10%, dan 12,5% mampu membunuh *Salmonella pullorum*. Hal ini disebabkan karena konsentrasi daun mimba yang digunakan dalam jumlah yang lebih banyak. Semakin tinggi konsentrasi daun mimba maka semakin tinggi pula kandungan senyawa saponin, flavonoid, alkaloid dan tanin yang terkandung dalam ekstrak daun mimba.

Ekstrak daun mimba dapat membunuh *Salmonella pullorum* karena mengandung senyawa-senyawa yang bekerja merusak komponen penyusun sel

bakteri. Senyawa saponin dapat mengganggu stabilitas membran sel bakteri sehingga menyebabkan sel bakteri lisis serta mengganggu permeabilitas membran sel bakteri yang mengakibatkan kerusakan membran sel dan menyebabkan keluarnya berbagai komponen penting seperti protein, asam nukleat, dan nukleotida (Cheok *et al.*, 2014). Senyawa flavonoid dapat menekan pertumbuhan bakteri. Flavonoid dapat merusak membran sitoplasma, menghambat sintesis asam nukleat, serta menghambat metabolisme energi bakteri (Chusnie and Lamb, 2011).

Senyawa alkaloid pada tanaman mimba mempunyai kemampuan sebagai antibakteri dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel (Robinson 1995 dalam Ayini dkk., 2014). *Salmonella pullorum* merupakan bakteri gram negatif dengan susunan dinding sel bakteri berupa lapisan peptidoglikan satu lapis, berbeda dengan peptidoglikan dari bakteri gram positif yang berlapis-lapis (Iman dkk., 2011). Lapisan peptidoglikan yang tipis ini menyebabkan bakteri gram negatif mudah lisis jika bereaksi dengan senyawa alkaloid.

Senyawa tanin merupakan polifenol yang dapat menghambat bakteri dengan cara menginaktifkan enzim, menginaktifkan adhesi sel mikroba, mengganggu transport protein pada lapisan dalam sel (Rijayanti, 2014). Tanin juga dapat menghancurkan membran plasma bakteri yang tersusun atas lemak. Kerusakan membran sel bakteri menghambat masuknya nutrisi ke dalam bakteri untuk menghasilkan energi, sehingga pertumbuhan bakteri terhambat dan bakteri

mati (Mailoa *et al.*, 2014). *Salmonella pullorum* mempunyai struktur dinding sel yang terdiri dari protein lipopolisakarida dan lipid, sehingga mudah dirusak oleh tanin dan menyebabkan rusaknya dinding sel bakteri. Dinding sel yang rusak menyebabkan proses masuknya bahan dari luar terhambat dan mengakibatkan kematian bakteri.

Kandungan senyawa yang terkandung dalam daun mimba akan tetap terjaga tergantung pada proses pembuatan ekstrak. Pembuatan ekstrak pada penelitian ini melalui proses maserasi menggunakan pelarut etanol. Etanol merupakan senyawa polar sehingga senyawa yang bersifat polar banyak yang tertarik ke dalam ekstrak (Kusmayati dan Agustini (2007). Penggunaan etanol sebagai pelarut dapat melarutkan senyawa alkaloid dan polifenol yang terdapat dalam daun mimba (Ayini dkk., 2014). Berdasarkan penelitian ini maka dapat disimpulkan bahwa senyawa-senyawa flavonoid, terpenoid, polifenol, tanin, saponin dan alkaloid larut dalam pelarut etanol.

Ekstrak daun mimba yang digunakan pada penelitian ini merupakan ekstrak pekat dan berwarna hijau kehitaman. Pelarut yang digunakan untuk mengencerkan ekstrak menjadi beberapa konsentrasi adalah *Dimetil Sulfoksida* (DMSO) 1%. Penggunaan DMSO 1% sebagai pelarut terbukti tidak membunuh atau bersifat bakteriosid terhadap bakteri. Penelitian ini juga menggunakan pelarut CMC Na 1% dan setelah diuji tidak ada perbedaan antara penggunaan CMC Na 1% dan DMSO 1%. CMC Na 1% dan DMSO 1% sama-sama dapat melarutkan ekstrak dan tidak bersifat bakteriosid.

Data hasil penelitian dianalisis menggunakan analisis probit untuk menentukan *Lethal Concentration* 50 (LC_{50}) yaitu konsentrasi yang mampu membunuh 50% jumlah populasi uji dalam waktu tertentu (Effendi dkk., 2012). Hasil analisa menunjukkan bahwa LC_{50} ekstrak daun mimba terhadap *Salmonella pullorum* berada pada konsentrasi 3,637%, artinya pada pada konsentrasi 3,637% ekstrak daun mimba mampu membunuh 50% *Salmonella pullorum*.

BAB 6
KESIMPULAN DAN SARAN

BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah:

1. Ekstrak daun mimba mempunyai kemampuan sebagai antibakteri terhadap *Salmonella pullorum*
2. Ekstrak daun mimba bersifat bakteriosid terhadap *Salmonella pullorum* dengan *Minimum Bactericide Concentration* (MBC) 5% dan nilai *Lethal Concentration 50* (LC₅₀) pada konsentrasi 3,637%

6.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang diperoleh maka melalui penelitian ini disarankan:

1. Ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) dapat digunakan sebagai alternatif untuk membunuh *Salmonella pullorum*
2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan secara *in vivo* terhadap hewan coba sehingga dapat diperoleh informasi tentang penerapan obat di lapangan



RINGKASAN

Penyakit pullorum atau penyakit berak kapur disebabkan oleh *Salmonella pullorum*, menyerang ayam muda dan itik umur 2-3 minggu dengan tingkat mortalitas tinggi. Ekstrak etanol daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) mampu menghambat bakteri *Vibrio alginolyticus* pada konsentrasi 5% (MIC) dan konsentrasi yang mampu membunuh terdapat pada konsentrasi 12,5%.

Tujuan diadakan penelitian ini adalah untuk mengetahui potensi antibakteri ekstrak etanol daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) terhadap *Salmonella pullorum* serta mengetahui *Minimum Bactericide Concentration* (MBC) ekstrak etanol daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) terhadap *Salmonella pullorum* dengan metode dilusi.

Senyawa yang berperan sebagai antibakteri dalam ekstrak etanol daun mimba adalah alkaloid, terpenoid, steroid, tanin, dan asam lemak serta saponin. Ekstrak etanol daun mimba mampu menghambat bakteri *Vibrio alginolyticus* pada konsentrasi 5% (MIC) dan konsentrasi yang mampu membunuh terdapat pada konsentrasi 12,5%. Rendaman serbuk biji mimba pada konsentrasi 12,5% efektif menghambat *Salmonella thyposa*.

Penelitian ini dilakukan secara *in vitro* menggunakan metode dilusi. Rancangan penelitian adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL), sampel berupa daun mimba dan *Salmonella pullorum*. Jumlah perlakuan yang digunakan sebanyak delapan perlakuan yaitu konsentrasi 1%, 2,5%, 5%, 7,5%, 10%, 12,5%, Kontrol positif dan Kontrol negatif, setiap perlakuan diulang tiga kali. Perlakuan berisi *Salmonella pullorum* dan ekstrak etanol daun mimba masing-masing

perlakuan. Kontrol negatif berupa suspensi *Salmonella pullorum*, dan kontrol positif berisi suspensi *Salmonella pullorum* dan antibiotik Ciprofloxacin 0,2%. Pengamatan hasil *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) adalah dengan melihat perubahan warna pada tabung uji MIC yang terlihat jernih atau keruh. Hasil uji MIC selanjutnya distreak pada media SSA untuk mengetahui nilai *Minimum Bactericide Concentration* (MBC). Pengamatan nilai MBC adalah dengan melihat ada tidaknya pertumbuhan koloni *Salmonella pullorum* pada media SSA.

Nilai MIC ekstrak daun mimba terhadap *Salmonella pullorum* tidak dapat ditentukan, disebabkan kerana semua tabung uji MIC menunjukkan kekeruhan yang hampir sama dan tidak ada perbeadaan kekeruhan antara sebelum dan sesudah diinkubasi. Hasil uji MBC menunjukkan ekstrak etanol mampu membunuh *Salmonella pullorum* pada konsentrasi 5%.

Kesimpulan dari penelitian ini adalah ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) mempunyai kemampuan sebagai antibakteri terhadap *Salmonella pullorum*. Ekstrak daun mimba bersifat bakteriosid terhadap *Salmonella pullorum* dengan *Minimum Bactericide Concentration* (MBC) pada konsentrasi 5% dan nilai *Lethal Concentration 50* (LC₅₀) pada konsentrasi 3,637%.

DAFTAR PUSTAKA



DAFTAR PUSTAKA

- Ambarwati. 2007. Efektivitas zat antibakteri biji mimba (*Azadirachta indica*) untuk menghambat pertumbuhan *Salmonella thyposa* dan *Staphylococcus aureus*. Biodiversitas. 8(3) : 320-325
- Ayini, U., S. Harnina, dan T.C. Dewi. 2014. Efek antibakteri ekstrak daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) terhadap bakteri *Vibrio alginolyticus* secara in vitro. Biosaintifika. 6(1):67-74
- Balley and Scott's, 2002. Diagnostic Microbiology. 11th Edition. The C.V. Mosby Company. St. Louis. United State of America. 232-240
- Cheok, C.Y., H. Salman, dan R. Sulaiman. Extraction and quantification of saponins. Food Research International. 59:16-40
- Chusniati, S. 2014. Potensi crude chorella sebagai antibakteri *Salmonella pullorum* secara in vitro. Journal of Basic Medicine Veterinary. 3(2):112-117
- Chusnie, T.P.T. and A.J. Lamb. 2011. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. International Journal of Antimicrobial Agent; 38 :102
- Dwidjoseputro, D. 2003. Dasar-Dasar Mikrobiologi. Edisi Kelimabelas. Penerbit Djambatan. Jakarta. Hal 41, 119-133
- Effendi, H., H.E. Aditya, W. Yusli, dan K. Majariana. 2012. Toksisitas akut (LC₅₀) serbuk bor (*cuttings*) terhadap *Daphnia sp.* Departemen Manajemen Sumberdaya Perairan, FPIK, Institut Pertanian Bogor
- El-Mahmood, A.M., O.B. Ogbonna, and M. Raji. 2010. The antibacterial activity of *Azadirachta indica* (Neem) seeds extract against bacterial pathogens associated with eye and ear infection. Journal of Medicinal Plants Research. Vol 4
- Handayani, N., M.W. Wartono, dan R.K. Murti. 2012. Identifikasi dan uji aktivitas antibakteri fraksi teraktif daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss). Alchemy Jurnal Penelitian Kimia. 8(1)57-69
- Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley and S.T. Williams. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th Edition. A Wolters Kluwer Company. Philadelphia.
- Iman, E.R.S., R. Ratnasari, H.E. Narumi, Suryanie, W. Tyasningsih, dan S. Chusniati. 2011. Mikrobiologi Veteriner 1. Edisi Pertama. Pusat Penerbitan dan Percetakan Unair (AUP). Surabaya. 235-239

- Kardinan, A. 2000. Pesticida Nabati Ramuan dan Aplikasi. PT. Penebar Semangat. Jakarta
- Khan, I., S.R. Srikakolupu, S. Darsipudi, S.D. Gotteti, and C. Amaranadh. 2010. Phytochemical studies and screening of leaves extracts of *Azadirachta indica* for its anti-microbial activity againts dental pathogens. Science Research 2: 246-250
- Kusmayati dan N.W. R. Agustini. 2007. Uji aktivitas senyawa antibakteri dan mikroalga (*Porphyridium cruentum*). Biodiveristas. 8(1), 48-53
- Kusriningrum. 2012. Perancangan Percobaan. Edisi Ketiga. Pusat Penerbitan dan Percetakan Unair (AUP). Surabaya. 43-63
- Kusumaningsih, A. dan M. Sudarwanto. 2011. Infeksi *Salmonella enteritidis* pada telur ayam dan manusia serta resistensinya terhadap antimikroba. . BeritaBiologi 10(6) 771-779
- Kwon H.K., J.S. Hwang, C.G. Lee, A. Sahoo, J.H. Ryu, W.K. Jeon, B.S Ko, G.R. Im, S.H. Lee, Z.Y. Park, and S.H. Im. 2010. Cinnamon extract induces tumor cell death through inhibition of NF-B and AP 10. Pubmed online, p. 329
- Mailoa, M.N., M. Mahendradatta, A. Laga, and N. Djide. 2014. Antimicrobial activities of tannins extract from Guava Leaves (*Psidium guava L*) on pathogens microbial. International Journal of Scientific and Technology Research; 3(1):239-240
- McVey, D.S, M. Kennedy, and M.M. Chengappa. 2013. Veterinary Microbiology. 3rd Edition. Wiley-Blackwell. Inc. P76
- Murtidjo, B.A. 2006. Pengendalian Hama dan Penyakit Ayam. Edisi ke-12. Penerbit Kanisius. Yogyakarta
- Pankaj, S., T. Lokeshwar, B. Mukesh, and B. Vishnu. 2011. Review of neem (*Azadirachta indica*) : Tousand problems one solution. International research journal of pharmacy, 2(12): 97-102
- Poernomo, J.S. 2004. Variasi tipe antigen *Salmonella pullorum* yang ditemukan di Indonesia dan penyebaran serotipe Salmonella pada ternak. Wartazoa 14: 143-159
- Pritima, R.A and R.S. Pandian. 2008. Antibacterial potency of crude extact of *Azadirachta indica* A. Juss (leaf) againts microbes causing reproductive tract infections among women. Current Biotica. Vol 2:6
- Puspitasari, A., Sudarso, dan B.A. Dhiani. 2009. Aktivitas antijamur ekstrak etanol soxhletasi dan maserasi daun mimba (*Azadirachta indica*) terhadap *Candida albicans*. Pharmacy. Vol 6 (2):6-13

- Quinn, P.J., B.K. Markey, F.C. Leonard, E.S.FitzPatrick, S. Fanning, and P.J. Hartigan. 2011. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Second edition. Wiley-Blackwell.UK. pp 273-280
- Ramadhani, N., A.G. Samudra, dan J. Armando. 2017. Identifikasi senyawa ekstrak etanol daun mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) sebagai antibakteri secara KLT- Bioautografi terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Jurnal Ilmiah Ibnu Sina*. 2(1) : 74-81
- Rijayanti, R.P. 2014. Uji antibakteri ekstrak etanol daun mangga bacang (*Mangifera foetida* L.) terhadap *Staphylococcus aureus* secara In Vitro. Naskah Publikasi Universitas Tanjungpura. pp. 7-9
- Sayekti, S.F. 2015. Perbedaan Efektifitas Daya Antibakteri Ekstrak Daun Mimba (*Azadirachta indica* A. Juss) Dibanding NaOCl 2,5% Terhadap *Enterococcus faecalis*
- Shah, D.H., M.J. Lee, J.H. Park, S.K. Eo, J.T. Kwon, and J.S. Chae.2005. Identification of *Salmonella gallinarum* virulence genes in a chicken infection model using PCR-based signature-tagged mutagenesis. *Microbiology* 151:3957-3968
- Sheikh, M., R.M. Abdul, Meghavanshi, and M. Irshad. 2012. Studies on some plant extracts for their antimicrobial potential againts certain pathogenic microorganisms. *American Journal of Plant Science*. 3:209-213
- Suwito, W., Supriadi, dan E. Winarti. 2010. Seroprevalensi antibodi *Salmonella pullorum* dari peternakan sektor IV ayam buras di Gunung Kidul Yogyakarta. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner 2010. Balai PengkajianTeknologi Pertanian. Yogyakarta.
- Tabbu, C.R., 2004. Penyakit Ayam dan Penanggulangannya. Cetakan kelima. Penerbit Kanisius. Yogyakarta.
- Timoney, J.F., J.H. Gillespie, F.W. Scott, and J.E. Barlough. 1988. Hagan and Bruner's *Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals*. 8th Edision. Cornell University Press. p.74-87
- Wiedosari,E dan S. Wahyuwardani. 2015. Studi kasus penyakit ayam pedaging di Kabupaten Sukabumi dan Bogor. *Jurnal Kedokteran Hewan*. 9(1): 9-13
- Wilujeng, M.T.T., 2010. Uji Sensitivitas Ekstrak *Sargassum sp.* Terhadap bakteri *Salmonella spp.* Dengan Metode Dilusi Uji In Vitro (Skripsi). Fakultas Perikanan dan Kelautan. Universitas Airlangga.

P

LAMPIRAN

Lampiran 1. Tabel hasil identifikasi *Salmonella pullorum*

PARAMETER	HASIL
Koloni pada <i>Salmonella Shigella Agar</i> (SSA): Bentuk koloni	Jernih, tembus pandang, terdapat <i>Black Spot</i>
Pewarnaan Gram Bentuk sel	- Batang langsing
<i>Sulfit Indol Motility</i> (SIM): Motilitas Produksi Indol Produksi H ₂ S	- - +
<i>Triple Sugar Iron Agar</i> (TSIA): Bagian Miring Bagian Tegak Produksi H ₂ S Produksi Gas	Basa Asam + +
Urea Agar Produksi Urease	-
<i>Simmon Citrat Agar</i> (SCA): Menggunakan citrat sebagai sumber carbon	-
<i>Methyl Red</i> (MR) <i>Voges Proskauer</i> (VP)	+ -
Gula-gula: Glukosa Laktosa Sukrosa Manitol Maltosa	Fermentasi: +, Gas (+) - - + +

Lampiran 2: Hasil Analisa Data**Probit Analysis****Parameter Estimates**

	Parameter	Estimate	Std. Error	Z	Sig.	95%Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
PROBIT ^a	Konsentrasi	-11.192	6.358	-1.760	.078	-23.654	1.270
	Intercept	6.275	3.796	1.653	.098	2.479	10.072

a. PROBIT model: $PROBIT(p) = \text{Intercept} + BX$ (Covariates X are transformed using the base 10.000 logarithm.)

Chi-Square Tests

		Chi-Square	df ^b	Sig.
PROBIT	Pearson Test	Goodness-of-Fit .302	4	.990 ^a

a. Since the significance level is greater than .150, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

b. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

Cell Counts and Residuals

	Number	Konsentrasi	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Probabilit y
PROBIT	1	.000	3	3	3.000	.000	1.000
	2	.398	3	3	2.897	.103	.966
	3	.699	3	0	.183	-.183	.061
	4	.875	3	0	.001	-.001	.000
	5	1.000	3	0	.000	.000	.000
	6	1.097	3	0	.000	.000	.000

Confidence Limits

	Probability	95% Confidence Limits for Konsentrasi			95% Confidence Limits for log(Konsentrasi) ^a		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT	.010	5.869	.	.	.769	.	.
	.020	5.549	.	.	.744	.	.
	.030	5.355	.	.	.729	.	.
	.040	5.213	.	.	.717	.	.
	.050	5.101	.	.	.708	.	.
	.060	5.008	.	.	.700	.	.
	.070	4.927	.	.	.693	.	.
	.080	4.856	.	.	.686	.	.
	.090	4.792	.	.	.681	.	.
	.100	4.734	.	.	.675	.	.
	.150	4.501	.	.	.653	.	.
	.200	4.324	.	.	.636	.	.
	.250	4.178	.	.	.621	.	.
	.300	4.051	.	.	.608	.	.
	.350	3.937	.	.	.595	.	.
	.400	3.831	.	.	.583	.	.
	.450	3.732	.	.	.572	.	.
	.500	3.637	.	.	.561	.	.
	.550	3.544	.	.	.549	.	.
	.600	3.452	.	.	.538	.	.
	.650	3.360	.	.	.526	.	.
	.700	3.265	.	.	.514	.	.
	.750	3.165	.	.	.500	.	.
.800	3.059	.	.	.486	.	.	
.850	2.938	.	.	.468	.	.	
.900	2.794	.	.	.446	.	.	
.910	2.760	.	.	.441	.	.	
.920	2.724	.	.	.435	.	.	
.930	2.684	.	.	.429	.	.	

	.940	2.641	.	.	.422	.	.
	.950	2.593	.	.	.414	.	.
	.960	2.537	.	.	.404	.	.
	.970	2.470	.	.	.393	.	.
	.980	2.383	.	.	.377	.	.
	.990	2.253	.	.	.353	.	.

a. Logarithm base = 10.

Lampiran 3: Alat Penelitian



Keterangan:

1. Gelas ukur	10. Pipet volumetrik
2. Erlenmeyer	11. Tabung reaksi
3. Kapas	12. Mortar
4. Pembakar bunsen	13. Timbangan analitik
5. Cawan petri	14. Centrifuge
6. Plastik Wrap	15. <i>Rotary evaporator</i>
7. Rak tabung	16. Inkubator
8. Objek glass	17. Autoclave
9. Ose	18. <i>Laminar flow</i>

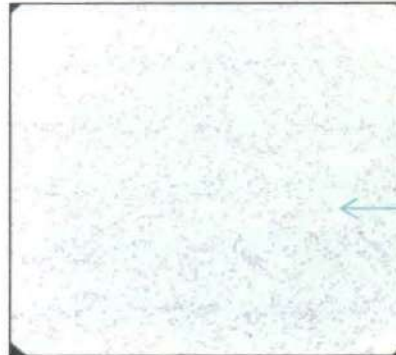
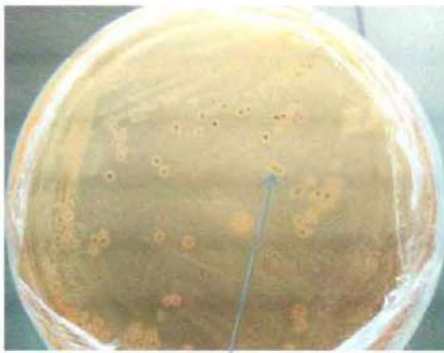
Lampiran 4: Bahan Penelitian



Keterangan:

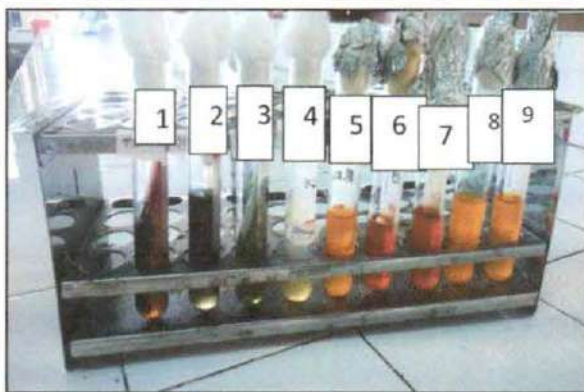
1. Daun mimba segar
2. Daun mimba kering
3. *Dimetil Sulfoksida*
4. Antibiotik Ciprofloxacin
5. Media *Salmonella Shigella Agar (SSA)*
6. Standar *Mc Farland* No. 1 dan suspensi bakteri
7. Media uji biokimia

Lampiran 5: Hasil Identifikasi *Salmonella pullorum*



Pewarnaan Gram:
sel *Salmonella pullorum*
berbentuk batang
langsing, dan
bersifat Gram
negatif

Koloni *S. pullorum* pada media SSA
berbentuk bulat, cembung, halus, jernih
dan terdapat *black spot*



Keterangan:

1. *Triple Sugar Iron Agar* : Basa/Asam, gas (+), H₂S (+)
2. *Sulfit Indol Motility* : non motil, indol (-), H₂S (+)
3. *Simmon Citrat Agar*: negatif
4. Urease: negatif
5. Glukosa: positif, gas (+)
6. Sukrosa: negatif
7. Laktosa: negatif
8. Manitol: positif
9. Maltosa: positif
10. *Methyl Red (MR)*: positif
11. *Voges Proskauer (VP)*:negatif