

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Mangga Bacang (*M. foetida* L.)

A.1. Klasifikasi

Klasifikasi tanaman mangga bacang adalah sebagai berikut (https://plants.usda.gov, 2014):

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Subkingdom	: <i>Tracheobionta</i>
Superdivisi	: <i>Spermatophyta</i>
Divisi	: <i>Magnoliophyta</i>
Kelas	: <i>Magnolispida</i>
Subkelas	: <i>Rosidae</i>
Odro	: <i>Sapindales</i>
Famili	: <i>Anacardiaceae</i>
Genus	: <i>Mangifera</i> L.
Spesies	: <i>Mangifera foetida</i> L.

A.2. Morfologi dan Penyebaran

Mangga bacang (*M. foetida* L.) merupakan salah satu spesies buah mangga dari golongan famili *anacardiaceae* yang dapat ditemukan tumbuh secara liar serta dibudidayakan di wilayah Indonesia, Malaysia, Myanmar, dan Thailand. Mangga bacang diyakini berasal dari Indonesia, meskipun cukup populer di negara-negara tersebut, mangga bacang ini tidak begitu dikenal sebanyak buah lainnya. Pohon mangga bacang banyak ditemukan di hutan-hutan primer di dataran rendah di daerah tropis. Mangga bacang ini beradaptasi di daerah dengan curah hujan tinggi yang merata sepanjang tahun dan tumbuh hingga pada ketinggian di atas 1000 m. Tinggi pohon dapat mencapai 30-35 m dengan batang yang lurus, kulit batang berwarna coklat gelap hingga coklat keabu-abuan, mengandung getah keputihan yang bersifat iritan dan akan berwarna hitam bila terpapar, mahkota padat, dedaunan hijau tua, cabang besar. Daun berbentuk lonjong, secara luas berbentuk bulat panjang, 15-40 cm x 9-15 cm, kaku, hijau tua pada bagian atas, hijau terang

pada bagian bawah daun. Bentuk dan ukuran buah bervariasi, bulat telur, lonjong atau hampir bulat, 4-14 cm x 7-12 cm, berwarna hijau gelap atau hijau kekuningan, halus, kusam, dengan lentisel coklat, ketebalan kulit 5 mm, daging buah kuning pucat atau kuning, berserat, berair, dengan bau terpenin yang kuat (Parmar, 2013). Morfologi daun dan buah mangga bacang (*M. foetida* L.) terlihat seperti pada gambar 2.1 berikut.



Gambar 2.1 Daun dan Buah Mangga Bacang (*M. foetida* L.) (Parmar, 2013)

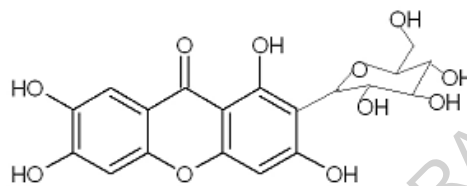
A.3. Kandungan Metabolit Sekunder dan Efek Farmakologis

Mangga merupakan sumber tinggi senyawa aktif alami mangiferin (Bhuvaneswari *et al.*, 2013). Selain mangiferin, hasil pemeriksaan fitokimia terhadap ekstrak air dan etanol daun mangga bacang menunjukkan adanya kandungan metabolit sekunder berupa steroid dan triterpenoid, alkaloid, fenol, flavonoid, tanin dan saponin (Purwaningsih *et al.*, 2011; Nuryanto, 2014). Rebusan daun mangga bacang dikatakan memiliki efek sebagai antipiretik dan bijinya memiliki efek antihelminik (Orwa *et al.*, 2009).

A.3.a. Mangiferin

Mangiferin merupakan senyawa yang tergolong xanton (Akbar, 1998). Mangiferin memiliki beberapa efek farmakologi yaitu sebagai antiinflamasi, analgesik, antitumor, antivirus, antihelminik, immunomodulator, antifungi dan antibakteri (Singh *et al.*, 2009). Mangiferin terbukti memiliki efek sebagai antimikroba terhadap beberapa spesies bakteri yaitu, *Bacillus pumilus*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*,

Staphylococcus citreus, *Escherichia coli*, *Salmonella agona*, *Klebsiella pneumoniae*, dan memiliki aktivitas antifungi terhadap; *Thermoascus aurantiacus*, *Trichoderma reesei*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus* (Stoilova *et al.*, 2005). Selain itu, ekstrak air dan etanol dari daun mangga bacang diketahui memiliki efek kelasi atau pengikatan terhadap feritin serum pasien talasemia (Purwaningsih *et al.*, 2011; Pohan *et al.*, 2013). Struktur kimia senyawa mangiferin terlihat seperti pada gambar 2.2 berikut.

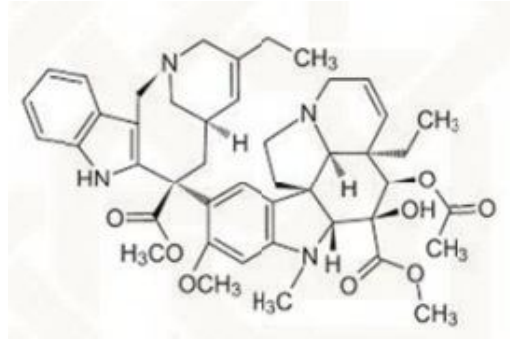


Gambar 2.2 Struktur Kimia Mangiferin (Singh *et al.*, 2009)

A.3.b. Alkaloid

Alkaloid adalah golongan Senyawa basa bernitrogen yang sebagian besar berupa heterosiklik dan banyak terdapat pada tanaman (Darwis dan Achmad, 2001). Senyawa aktif jenis alkaloid ini umumnya larut pada pelarut organik nonpolar, akan tetapi ada beberapa kelompok seperti pseudoalkaloid dan protoalkaloid yang larut pada pelarut polar seperti air (Lenny, 2006).

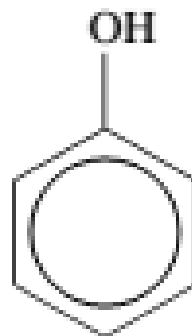
Mekanisme kerja dari alkaloid sebagai antibakteri diduga dengan mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut (Robinson, 1995). Mekanisme lain antibakteri alkaloid yaitu komponen alkaloid diketahui sebagai interkelator DNA dan menghambat enzim topoisomerase sel bakteri (Karou *et al.*, 2005). Struktur kimia dari alkaloid terlihat pada gambar 2.3 dimana alkaloid mempunyai sistem lingkaran heterosiklis dengan nitrogen sebagai hetero atomnya (Sumardjo, 2009).



Gambar 2.3 Struktur Kimia Alkaloid (Fattorusso dan Taglillatella, 2008)

A.3.c. Fenol

Fenol adalah senyawa yang berasal dari tumbuhan yang mengandung cincin aromatik dengan satu atau 2 gugus hidroksil. Fenol cenderung mudah larut dalam air karena berikatan dengan gula sebagai glikosida dan kebanyakan terdapat dalam vakuola sel (Harborne, 1987). Fenol dapat menghambat pertumbuhan bakteri karena dapat mengoksidasi bakteri dengan cara merusak dinding sel bakteri, menghilangkan substrat, menonaktifkan enzim, berikatan dengan adhesin yang merupakan protein pada bakteri (Cowan, 1999). Gambaran struktur kimia dari fenol terlihat pada gambar 2.4 berikut.

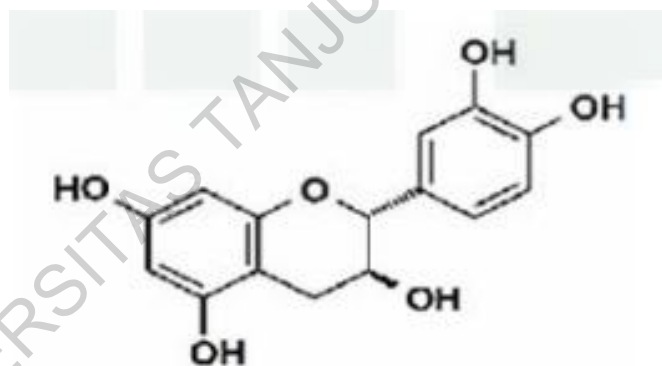


Gambar 2.4 Struktur Kimia Fenol (Wiley dan Sons, 2003)

A.3.d. Tanin

Senyawa tanin merupakan komponen zat organik yang terdapat dalam beberapa jenis tanaman terutama tanaman berkeping dua (dikotil). Ekstrak tanin terdiri dari campuran senyawa polifenol yang sangat kompleks dan biasanya tergabung dari karbohidrat rendah seperti glukosa (Linggawati *et al.*, 2002).

Aktivitas antibakteri dari tanin diduga karena efek dari tanin yang mampu mengkerutkan dinding sel atau membran sel sehingga mengganggu permeabilitas sel itu sendiri. Akibat terganggunya permeabilitas, sel tidak dapat melakukan aktivitas hidup sehingga pertumbuhannya terhambat atau bahkan mati (Ajizah, 2004). Selain itu, mekanisme lain kerja tanin sebagai antibakteri adalah menghambat enzim reverse transkriptase dan DNA topoisomerase sehingga sel bakteri tidak dapat terbentuk (Robinson, 1995). Gambaran struktur kimia dari tanin terlihat pada gambar 2.5 berikut.



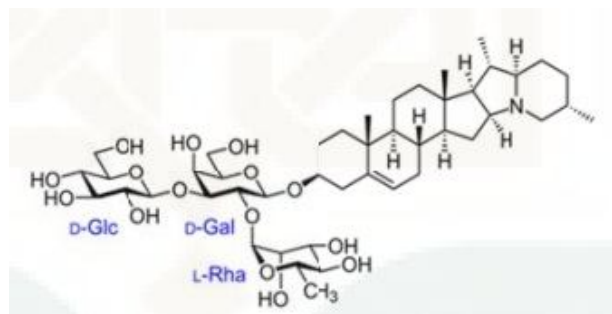
Gambar 2.5 Struktur Kimia Tanin (Hagerman, 2002)

A.3.d. Saponin

Saponin secara umum merupakan glikosida yang memiliki aglikon berupa steroid dan terpen. Saponin adalah senyawa yang dapat menimbulkan busa bila dikocok dalam air. Saponin dapat menyebabkan hemolisis pada sel darah merah. Hal ini disebabkan karena saponin berikatan dengan kolesterol dari membran sel sehingga dapat merusak membran (Faradisa, 2008).

Mekanisme kerja saponin sebagai antibakteri adalah dengan menurunkan tegangan permukaan sehingga mengakibatkan naiknya

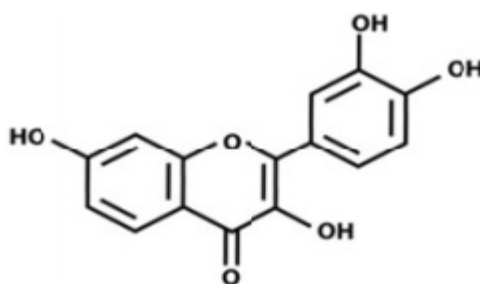
permeabilitas atau kebocoran sel dan mengakibatkan senyawa intraseluler akan keluar (Nuria *et al.*, 2009). Gambaran struktur kimia dari saponin terlihat pada gambar 2.6 berikut.



Gambar 2.6 Struktur Kimia Saponin (Harborne dan Baxter, 1995)

A.3.e. Flavonoid

Flavonoid merupakan golongan terbesar dari senyawa polifenol yang ditemukan di alam (Lenny, 2006). Flavonoid menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara merusak dinding sel, menonaktifkan kerja enzim, berikatan dengan adhesin, dan merusak membran sel (Cowan, 1999). Mekanisme antibakteri dari flavonoid disebabkan adanya gugus hidroksil yang terdapat pada struktur senyawa flavonoid seperti terlihat pada gambar 2.7 yang menyebabkan perubahan komponen organik dan transport nutrisi yang akhirnya mengakibatkan timbulnya efek toksik terhadap bakteri (Sabir, 2005).

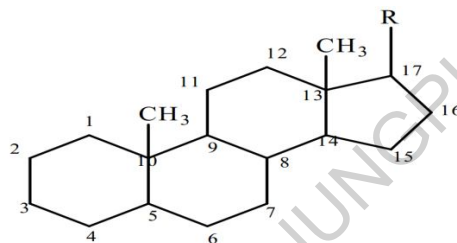


Gambar 2.7 Struktur Kimia Flavonoid (Pieta, 2000)

A.3.f. Steroid dan Terpenoid

Aktivitas antibakteri terpenoid diduga karena ikatan terpenoid dengan protein yang mengganggu membran sel bakteri. Membran sel bakteri terdiri

dari fosfolipid dan molekul protein. Kerusakan membran sel dapat terjadi ketika senyawa aktif antibakteri bereaksi dengan sisi aktif dari membran atau dengan melarutkan konstituen lipid atau protein dan meningkatkan permeabilitasnya sehingga dapat menyebabkan sel lisis (Mayanti *et al.*, 2011). Steroid dapat berinteraksi dengan membran fosfolipid sel sehingga menyebabkan integritas membran sel menurun, morfologi membran sel berubah dan akhirnya dapat menyebabkan membran sel lisis (Bangham dan Horne, 2006). Struktur kimia dari steroid dapat dilihat pada gambar 2.8 berikut.



Gambar 2.8 Struktur Kimia Steroid (Lenny, 2006)

B. Simplisia

Simplisia adalah bahan alamiah yang dipergunakan sebagai obat yang belum mengalami pengolahan apa pun juga dan kecuali dinyatakan lain, berupa bahan yang dikeringkan. Simplisia dibedakan menjadi simplisia nabati, simplisia hewani dan simplisia pelikan (mineral). Simplisia nabati adalah simplisia yang berupa tumbuhan utuh, bagian tumbuhan atau eksudat tumbuhan yaitu isi sel yang secara spontan keluar dari tumbuhan atau zat nabati lain yang dengan cara tertentu dikeluarkan dari tanamannya. Simplisia hewani adalah simplisia yang berupa hewan utuh, bagian hewan atau zat-zat berguna yang dihasilkan oleh hewan dan belum berupa zat kimia murni. Simplisia pelikan adalah simplisia yang berupa bahan pelikan atau mineral yang belum diolah dengan cara sederhana dan belum berupa zat kimia murni (Depkes RI, 1995).

C. Metode Ekstraksi

Metode ekstraksi dibagi menjadi cara dingin dan cara panas. Cara dingin yaitu maserasi dan perlokasi. Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengadukan pada temperatur ruangan, sedangkan perlokasi adalah ekstraksi dengan pelarut sampai sempurna (*exhaustive extraction*) yang umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Proses perlokasi terdiri dari tahapan pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetasan/penampungan ekstrak). Cara panas yaitu refluks, soxhlet, digesti, dan infus. Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Soxhlet adalah ekstraksi menggunakan pelarut yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinu dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Digesti adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinu) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan, yaitu secara umum dilakukan pada temperatur 40-50° C. Infus adalah sediaan cair yang dibuat dengan menyari simplisia nabati dengan air pada suhu 90° C selama 15 menit (Depkes RI, 2000).

D. Pelarut

Pelarut merupakan salah satu faktor yang menentukan dalam proses ekstraksi, sehingga banyak faktor yang harus diperhatikan dalam pemilihan pelarut (Guenther, 2006). Terdapat dua pertimbangan utama dalam memilih jenis pelarut, yaitu pelarut harus mempunyai daya larut yang tinggi dan pelarut tidak berbahaya atau tidak beracun. Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi harus dapat melarutkan ekstrak yang diinginkan saja, mempunyai kelarutan yang besar, tidak menyebabkan perubahan secara kimia pada komponen ekstrak, dan titik didih kedua bahan tidak boleh terlalu dekat (Bernasconi, 1995)

Cairan penyari yang digunakan air, etanol dan campuran air etanol (Depkes RI, 1979). Pemilihan cairan penyari/pelarut harus

mempertimbangkan kriteria sebagai berikut, murah dan mudah diperoleh, stabil secara fisika dan kimia, bereaksi netral, tidak mudah menguap dan tidak mudah terbakar, selektif yaitu hanya menarik zat berkhasiat yang dikehendaki, tidak mempengaruhi zat yang berkhasiat, diperbolehkan oleh peraturan. Pertimbangan air dipakai sebagai penyari karena air mudah diperoleh dan murah, stabil, tidak mudah menguap dan tidak mudah terbakar, tidak beracun, dan alamiah. Namun penggunaan air sebagai pelarut memiliki beberapa kerugian yaitu, tidak selektif, sari dapat ditumbuhi kapang dan kuman dan cepat rusak, serta untuk pengeringan diperlukan waktu lama (Depkes RI, 1986).

E. Infusa

Infusa adalah sediaan cair yang dibuat dengan menyari simplisia dengan air pada suhu 90° C selama 15 menit. Infundasi adalah proses penyarian yang umumnya digunakan untuk menyari zat kandungan aktif yang larut dalam air dari bahan-bahan nabati. Penyarian dengan cara ini menghasilkan sari yang tidak stabil dan mudah tercemar oleh kuman dan kapang. Oleh sebab itu, sari yang diperoleh dengan cara ini tidak boleh disimpan lebih dari 24 jam. Infusa dibuat dengan cara membasahi bahan bakunya, biasanya dengan air dua kali bobot bahannya. Penyaringan dilakukan pada saat cairan masih panas dengan kain flanel, kecuali bahan yang mudah menguap (Depkes RI, 1999).

Teknik infusa mempunyai beberapa keuntungan bila dibandingkan dengan teknik pembuatan ekstrak yaitu karena teknik infusa lebih murah, lebih cepat, dan alat serta caranya sederhana. Sedangkan dalam pembuatan ekstrak, kandungan dari bahan tumbuhan dan pelarut yang paling tepat untuk masing-masing kandungan harus diketahui lebih dahulu. Dengan zat pelarut yang tepat, zat aktif yang diinginkan akan terpisah dari bahan aslinya dan bercampur dengan pelarut yang digunakan. Selanjutnya pemisahan zat aktif dari pelarutnya dengan lebih mudah dilakukan untuk memperoleh zat aktif yang benar-benar murni (Santoso, 1993).

F. Sterilisasi

Sterilisasi adalah suatu proses fisika atau kimia untuk menghancurkan atau melenyapkan semua kehidupan mikroba secara menyeluruh termasuk spora (Brooks *et al.*, 2007). Cara sterilisasi yang umum dilakukan yaitu secara fisik dan secara kimia.

F.1. Sterilisasi Secara Fisik

F.1.a Sterilisasi Dengan Panas

Pemakaian panas adalah tindakan paling sederhana untuk mensterilisasi bahan, asalkan bahan tersebut tahan terhadap kerusakan akibat panas. Temperatur 100⁰ C akan membunuh semua bakteri kecuali bentuk spora dalam waktu 2-3 menit dalam biakan pada skala laboratorium; temperatur 121⁰ C selama 15 menit digunakan untuk membunuh spora. Dengan temperatur yang sangat tinggi yang digunakan dalam jangka waktu yang lama, panas bekerja dengan cara mendenaturasi protein sel dan asam nukleat serta dengan cara merusak membran sel (Brooks *et al.*, 2007).

F.1.b. Radiasi

Sinar ultraviolet dan radiasi pengion mempunyai berbagai kegunaan sebagai agen sterilisator. Cara kerjanya sama dengan sterilisasi dengan panas (Brooks *et al.*, 2007).

F.2. Sterilisasi Secara Kimia

Metode sterilisasi kimia dapat dilakukan dengan menggunakan gas (dengan cara fumigasi atau pengasapan) atau radiasi. Beberapa bahan kimia yang dapat digunakan untuk sterilisasi gas adalah etilen oksida, gas formaldehid, asam parasetat, dan glutaraldehid alkalin. Sterilisasi kimia dapat juga dilakukan dengan penggunaan cairan disinfektan berupa senyawa aldehid, hipoklorit, fenolik, alkohol (Pratiwi, 2008).

G. Skrining Fitokimia

Pendekatan skrining fitokimia meliputi analisis kualitatif kandungan kimia dalam tumbuhan atau bagian tumbuhan (akar, batang, daun, bunga, buah, biji), terutama kandungan metabolit sekunder yang bioaktif yaitu alkaloida, antrakinon, flavanoida, glikosida jantung, kumarin, saponin

(steroid dan triterpenoid), tanin (polifenolat), minyak atsiri (terpenoid), iridoid, dan sebagainya. Tujuan utama pendekatan skrining fitokimia adalah untuk mensurvei tumbuhan untuk mendapatkan kandungan bioaktif atau kandungan yang berguna untuk pengobatan (Robinson, 1995).

Alkaloid merupakan senyawa bersifat basa yang mengandung satu atau lebih atom nitrogen, bersifat optis aktif (Harborne, 1987). Untuk mengetahui senyawa alkaloid dapat dilakukan dengan metode Mayer, Wagner dan Dragendorff. Sebagian besar alkaloid alami yang bersifat sedikit asam memberikan endapan dengan reaksi yang terjadi dengan reagent Mayer (Larutan Kalium Merkuri Iodida); reagent Wagner (larutan Iodida dalam Kalium Iodida); dengan larutan asam tanat, atau dengan reagen Dragendorff (larutan Kalium Bismuth Iodida). Endapan ini berbentuk amorf atau terdiri dari kristal dari berbagai warna, *cream* (Mayer), kuning (Hager), coklat kemerah–merahan (Wagner dan Dragendorff). Hasil positif alkaloid dengan uji Mayer ditandai dengan terbentuknya endapan putih. Pada uji alkaloid dengan pereaksi Mayer, nitrogen pada alkaloid akan bereaksi dengan ion K^+ dari kalium tetraiodomerkurat (II) membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap. Pada uji wagner, ion logam K^+ akan membentuk ikatan kovalen koordinat dengan nitrogen pada alkaloid membentuk kompleks kalium-alkaloid yang mengendap. Pada uji alkaloid dengan pereaksi Dragendorff, nitrogen digunakan untuk membentuk ikatan kovalen koordinat dengan bismut menghasilkan endapan jingga sampai merah (Marliana *et al.*, 2005)

Tanin merupakan gambaran umum senyawa golongan polimer fenolik (Cowan, 1999). Untuk mengetahui senyawa tanin, dapat dilakukan dengan menggunakan $FeCl_3$, hasil positif jika terbentuk warna hijau kehitaman. Pada penambahan larutan $FeCl_3$ 1% diperkirakan larutan ini bereaksi dengan salah satu gugus hidroksil yang ada pada senyawa tanin (Robinson, 1995).

Saponin merupakan senyawa aktif permukaan, bersifat seperti sabun dan dapat dideteksi berdasarkan kemampuannya membentuk busa dan menghemolisis sel darah. Pembentukan busa yang mantap sewaktu

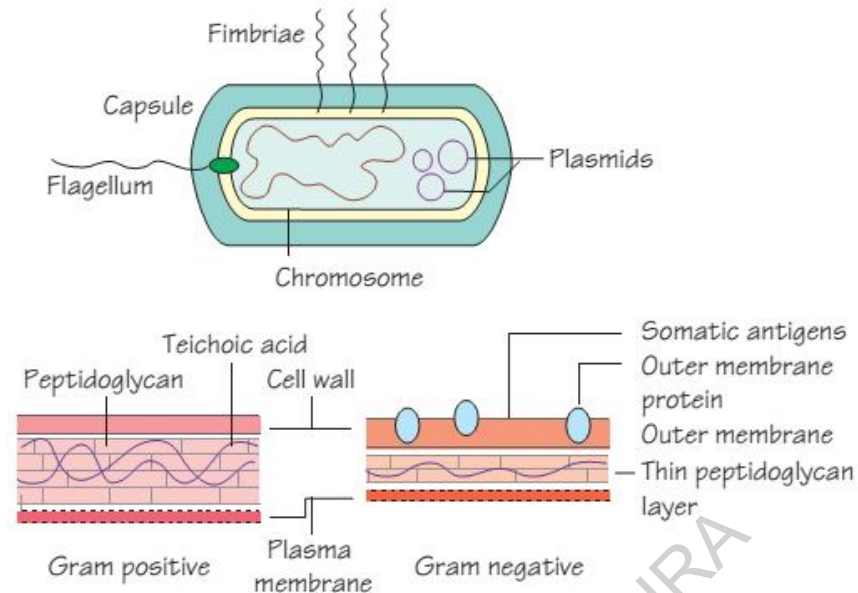
mengekstraksi tumbuhan atau pada waktu memekatkan ekstrak tumbuhan merupakan bukti terpercaya akan adanya saponin (Harbone, 1987).

Uji flavonoid dengan HCl dan Mg untuk mendeteksi senyawa yang mengandung inti benzopiranon. Warna merah atau warna ungu yang terbentuk merupakan garam benzopirilium, yang disebut juga garam flavilium (Marlinda *et al.*, 2012).

Steroid adalah triterpenoida yang kerangka dasarnya sistem cincin siklopentana perhidrofenantren. Uji yang biasa digunakan adalah reaksi Liebermann Burchard yang dengan kebanyakan triterpen dan steroid memberikan warna hijau-biru (Harborne, 1987).

H. Bakteri

Bakteri merupakan organisme prokariot, yaitu memiliki kromosom tunggal dan tidak memiliki nukleus. Untuk mengemas kromosom di dalam sel, DNA menggulung (*coil* dan *supercoil*) suatu proses yang diperantarai oleh sistem enzim DNA girase. Ribosom bakteri berbeda dengan ribosom eukariot, menjadikannya target untuk terapi antibakteri. Bakteri juga mengandung DNA tambahan dalam bentuk plasmid. Dinding sel bakteri yang kaku dapat mempertahankan bentuknya dan melindungi sel dari perubahan tekanan osmotik antara sel dengan lingkungannya. Dinding sel gram positif memiliki lapisan peptidoglikan yang tebal dan membran sel, sementara dinding sel gram negatif memiliki tiga lapisan, yaitu membran dalam, membran luar, dan lapisan peptidoglikan yang lebih tipis (Gillespie dan Bamford, 2008). Struktur serta klasifikasi bakteri berdasarkan jenis gram terlihat pada gambar 2.9 berikut.



Gambar 2.9 Struktur dan Klasifikasi Bakteri (Gillespie dan Bamford, 2008).

Pertumbuhan mikroorganisme seperti bakteri dipengaruhi oleh beberapa hal yaitu, sumber energi metabolik, nutrisi, lingkungan (zat makanan, pH, suhu, aerasi, tekanan osmotik dan onkotik), serta metode pembiakan (Brooks *et al.*, 2007).

I. *Shigella flexneri*

I.1. Taksonomi

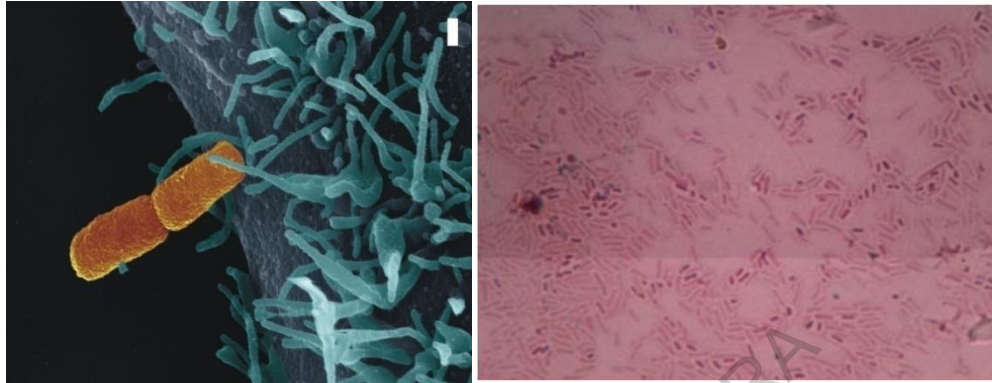
Kerajaan : *Bacteria*
Filum : *Proteobacteria*
Kelas : *Gamma Proteobacteria*
Ordo : *Enterobacteriales*
Famili : *Enterobacteriaceae*
Genus : *Shigella*
Spesies : *Shigella flexneri*

(Brooks *et al.*, 2007)

I.2. Morfologi dan Identifikasi

Shigella sp. adalah batang gram negatif yang ramping, bentuk kokobasil ditemukan pada biakan yang muda. *Shigella* sp. bersifat fakultatif anaerob tetapi tumbuh paling baik secara aerob. Koloni berbentuk konveks,

bulat, transparan dengan tepi yang utuh dan mencapai diameter 2 mm dalam 24 jam (Brooks *et al.*, 2007). Morfologi *Shigella* sp. di bawah mikroskop elektron dan pada pewarnaan gram terlihat seperti pada gambar 2.10 berikut.



Gambar 2.10 *S. flexneri* di bawah mikroskop elektron dan pewarnaan gram
(<http://www.mpiib-berlin.mpg.de>, 2010; Firdaus, 2011)

Semua *Shigella* sp. memfermentasi glukosa dan tidak memfermentasi laktosa kecuali *Shigella sonnei* yang dapat memfermentasi laktosa dengan lambat. *Shigella* sp. membentuk asam dari karbohidrat tetapi jarang menghasilkan gas. Organisme ini juga dapat dibagi berdasarkan kemampuannya memfermentasi manitol dimana *S. flexneri*, *S. boydii*, *S. sonnei* dapat memfermentasi manitol sedangkan *Shigella dysenteriae* tidak dapat memfermentasi manitol. Media spesifik untuk *Shigella* sp. adalah *deoxycholate citrate agar* (DCA), *xylose lysine deoxycholate* (XLD) agar, *Salmonella Shigella* (SS) agar dan *Hectose Enteric* (HE) agar (Brooks *et al.*, 2007; Parija 2009).

I.3. Faktor Virulensi

Faktor virulensi dari *Shigella* terdiri dari dinding sel polisakarida sebagai antigen halus, kemampuan mengadakan invasi enterosit dan proliferasi dan adanya toksin. Kemampuan untuk tetap hidup dalam perjalanannya melawan pertahanan hospes kemungkinan karena adanya antigen O. Struktur lipopolisakarida menyebabkan bentuk koloni yang halus, disebut tipe koloni fase I, dimiliki oleh *S. sonnei* dan *S. flexneri*. Organisme ini memiliki plasmid besar 120-140 kb yang menyandi *Ospecific*

side chains. Apabila plasmid ini hilang, akan menjadi tipe koloni fase II atau koloni yang kasar dan menjadi organisme yang avirulen (Dzen *et al.*, 2003).

Proses invasi ke sel epitel mukosa (misal, sel M), terjadi dengan menginduksi fagositosis, keluar dari vakuola fagositik, bermultiplikasi dan menyebar di dalam sitoplasma sel epitel, dan kemudian menyebar ke sel yang ada didekatnya. *Shigella* yang virulen mampu mengadakan penetrasi ke dalam mukosa dan sel epitel, tetapi jarang bisa menembus lamina propria. Internalisasi bakteri merupakan hasil dari endositosis yang diperantarai oleh reseptor atau karena beberapa produk bakteri yang menyebabkan respon hospes. Baik sel hospes maupun sel bakteri harus dalam keadaan metabolisme aktif untuk terjadinya internalisasi shigella (Brooks *et al.*, 2007; Dzen *et al.*, 2003).

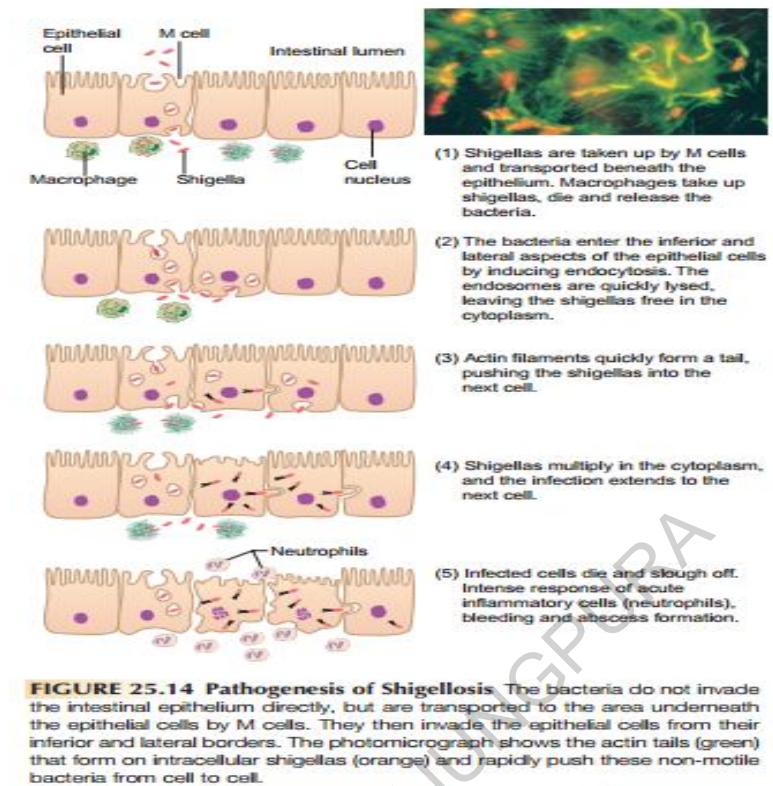
Shigella sp. memiliki dua macam toksin yaitu endotoksin dan eksotoksin. Endotoksin berasal dari lipopolisakarida dinding sel bakteri gram negatif yang bersifat toksik. Bila bakteri mengalami kerusakan sel atau autolisis maka endotoksin ini akan dilepaskan. Endotoksin ini mungkin berpengaruh pada iritasi dinding usus. Sedangkan eksotoksin diproduksi oleh *S. dysenteriae* tipe 1 yang memiliki shigatoksin. Eksotoksin ini tidak tahan panas yang mempengaruhi usus dan susunan saraf pusat. Eksotoksin ini adalah protein yang bersifat antigenik (merangsang produksi antitoksin) dan mematikan pada binatang percobaan. Sebagai enterotoksin, zat ini menimbulkan diare seperti verotoksin *E. coli*, mungkin dengan mekanisme yang sama. Pada manusia, enterotoksin juga menghambat penyerapan gula dan asam amino pada usus halus. Sebagai neurotoksin, materi ini menyebabkan infeksi *S. dysenteriae* yang sangat berat dan fatal serta menimbulkan reaksi susunan saraf pusat yang berat (misalnya meningismus, koma). Pasien yang menderita infeksi *S. flexneri* atau *Shigella sonnei* membentuk antitoksin yang menetralkan eksotoksin *S. dysenteriae* secara *in vitro*. Aktivitas yang bersifat toksik ini berbeda dengan sifat invasif *Shigella* pada disentri. Keduanya dapat bekerja berurutan, toksin menyebabkan diare awal yang tidak berdarah, encer dan

banyak kemudian invasi usus besar mengakibatkan disentri lanjut dengan feses yang disertai dengan darah dan nanah (Brooks et al., 2007).

I.4. Patogenesis dan Patologi

Infeksi *Shigella* sp. selalu hampir terbatas pada saluran cerna, jarang terjadi invasi ke saluran darah. *Shigella* sp. sangat menular, dosis infektifnya adalah 10^3 organisme (sedangkan pada *Salmonella* dan *Vibrio* biasanya 10^5 - 10^8). Penyebarannya terjadi sangat cepat di lingkungan padat dengan sanitasi yang buruk. Manusia dan primata merupakan sasaran infeksi, namun bakteri ini dapat bertahan dimakanan selama lebih dari sebulan. *Shigella* sp. menyebar lewat makanan yang terkontaminasi, jari-jari, lalat-lalat, feses, dan muntah. Bermain, mandi, dan mencuci pakaian di sumber air yang terkontaminasi memainkan peran penting dalam penyebarannya. Di daerah dengan sanitasi yang baik, infeksi biasanya terjadi dikarenakan perilaku mencuci tangan yang buruk (Brooks et al., 2007; Black, 2011).

Invasi spesies *Shigella* pada epitel saluran cerna menyebabkan respon inflamasi yang berat. Invasi terjadi dengan memanfaatkan fungsi antigen sel M. Sel M biasanya menangkap mikroba dan mentransfernya ke makrofag. Spesies *Shigella* selektif menempel pada sel M dan dengan demikian dapat melintasi sawar epitel. Selama tertelan oleh makrofag, bakteri menuju ke fagosom dan bermultiplikasi di dalam sitoplasma makrofag. Bakteri dilepaskan saat makrofag yang terinfeksi mengalami apoptosis. Bakteri yang terlepas berikatan dengan reseptor spesifik di dekat basal sel epitel dan menginduksi sel tersebut untuk membawa bakteri ini masuk ke dalam sel epitel. Ketika di dalam, *Shigella* sp. lari dari endosom dan bermultiplikasi di sitoplasma. Bakteri nonmotil ini dapat berpindah ke sel saluran pencernaan di sebelahnya dengan memproduksi sebuah protein yang membentuk “*actin tail*”. Infeksi akhirnya menyebabkan kematian dan pengelupasan lapisan epitel. Daerah yang terinfeksi menjadi sangat meradang, tertutup oleh nanah dan darah, menyebabkan nanah dan darah pada disentri basiler (Nester; 2009). Gambaran mekanisme patogenesis dari *Shigella* sp. terlihat seperti pada gambar 2.11 berikut.



Gambar 2.11 Patogenesis Shigellosis (Nester *et al.*, 2009)

I.5. Gejala Klinis

Shigellosis atau sering disebut sebagai disentri basiler merupakan suatu infeksi akut pada usus besar yang disebabkan oleh kuman dari genus *Shigella* (Sudoyo *et al.*, 2009). Setelah masa inkubasi yang pendek (1-2 hari), secara mendadak timbul nyeri perut, demam dan diare cair. Diare ini disebabkan oleh kerja endotoksin di usus halus. Sehari atau beberapa hari kemudian setelah infeksi telah mengenai ileum dan kolon, jumlah feses meningkat, lebih kental, sering mengandung lendir dan darah. Setiap pergerakan usus diikuti oleh “mengedan” dan tenesmus (spasme rektum) yang menyebabkan nyeri perut bagian bawah. Pada lebih dari setengah kasus pada orang dewasa, demam dan diare menghilang spontan dalam 2-5 hari. Namun pada anak-anak dan lanjut usia, kehilangan air dan elektrolit dapat menyebabkan dehidrai, asidosis, dan bahkan kematian (Brooks *et al.*, 2007).

I.6. Diagnosis

I.6.a. Spesimen

Feses segar, lendir, dan usapan rektum dapat digunakan untuk biakan. Ditemukan banyak leukosit pada feses dan kadang-kadang juga ditemukan beberapa sel darah merah pada pemeriksaan mikroskopik. Spesimen serum, apabila dibutuhkan, harus diambil dengan jarak 10 hari untuk melihat kenaikan titer antibodi aglutinasi (Brooks *et al.*, 2007).

I.6.b. Biakan

Bahan digoreskan pada media diferensial dan pada medium selektif, bakteri *Enterobacteriaceae* lain dan gram positif tidak akan tumbuh pada medium selektif. Pada TSIA koloni tidak menghasilkan H₂S, menghasilkan asam, tidak menghasilkan gas pada dasar dan bagian miring agar. Bersifat tidak motil pada pemeriksaan di agar motil. Sebaiknya dilakukan pemeriksaan aglutinasi *slide* dengan antiserum spesifik *Shigella* (Brooks *et al.*, 2007).

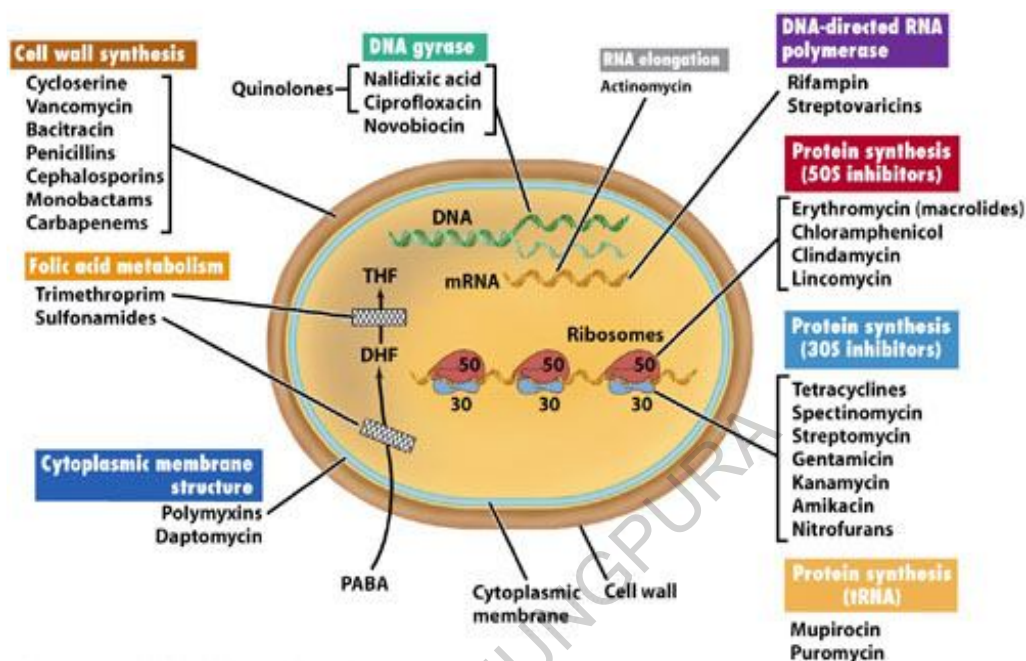
I.7. Pengobatan

Siprofloksasin, ampisilin, dosisiklin, dan trimetoprim-sulfametoksazol merupakan inhibitor yang paling sering untuk isolat *Shigella* dan dapat menekan serangan klinis disentri akut dan memperpendek durasi gejala. Obat-obat tersebut mungkin tidak dapat membasmi organisme tersebut dari saluran cerna. Resistensi terhadap banyak obat dapat ditransmisikan oleh plasmid, dan infeksi yang resisten telah menyebar luas. Banyak kasus yang dapat tumbuh sendiri. Pemberian opioid sebaiknya dihindarkan pada disentri *Shigella* (Brooks *et al.*, 2007).

J. Antimikroba

Antimikroba adalah obat pembasmi mikroba, khususnya mikroba yang merugikan manusia. Mikroba hanya terbatas pada jasad renik yang tidak termasuk kelompok parasit (Setiabudy, 2007). Antimikroba dapat bersifat sebagai antibakteri, antivirus, antifungi, dan sebagai agen antiparasit (Goodman dan Gilman, 2007). Mekanisme kerja antibakteri terlihat pada gambar 2.12 yaitu dengan menghambat sintesis dinding sel, menghambat

fungsi membran sel, menghambat sintesis protein, dan menghambat sintesis asam nukleat (Brooks *et al.*, 2007).



Gambar 2.12 Mekanisme Kerja Antibakteri (Madigan *et al.*, 2011)

Contoh-contoh agen antimikroba yang bekerja dengan cara menghambat sintesis dinding sel adalah penisilin, sefalosporin, vankomisin, dan sikloserin. Contoh-contoh agen antimikroba yang bekerja dengan menghambat fungsi membran sel adalah amfoterisin B, kolistin, imidazol serta triazol. Antimikroba yang bekerja dengan menghambat sintesis protein adalah eritromisin, linkomisin, tetrasiklin, aminoglikosida, dan kloramfenikol. Sedangkan agen antimikroba yang bekerja dengan menghambat sintesis asam nukleat adalah kuinolon, pirimetamin, rifampin, sulfonamid, trimetroprim, dan trimetreksat (Brooks *et al.*, 2007).

Banyak faktor dan keadaan yang dapat mempengaruhi kerja zat antimikroba dalam bekerja menghambat atau membasmi mikroorganisme patogen. Hal-hal yang dapat mempengaruhi aktivitas antibakteri *in vitro* antara lain pH lingkungan, komponen medium, stabilitas obat, ukuran inokulum, lama inkubasi dan aktivitas metabolik mikroorganisme (Brooks *et al.*, 2007).

K. Karakterisasi Bakteri Uji

K.1. Pewarnaan Gram

Pewarnaan diferensial menggunakan lebih dari satu pewarna dan memiliki reaksi yang berbeda untuk setiap bakteri, sehingga digunakan untuk membedakan bakteri. Pewarnaan diferensial yang sering digunakan adalah pewarnaan gram. Pewarnaan gram ini mampu membedakan dua kelompok besar bakteri, yaitu gram positif dan gram negatif. Pada pewarnaan gram ini, bakteri yang telah difiksasi dengan panas sehingga membentuk noda pada kaca objek diwarnai dengan pewarna basa yaitu kristal ungu. Karena warna ungu memenuhi semua sel, maka pewarnaan ini disebut pewarnaan primer. Selanjutnya pewarna dicuci dan pada noda spesimen ditetesi iodine yang merupakan mordant (penajam). Setelah iodine dicuci, baik bakteri gram positif maupun gram negatif tampak berwarna ungu. Selanjutnya noda spesimen dicuci dengan alkohol yang merupakan senyawa peluntur warna yang pada spesies bakteri tertentu dapat menghilangkan warna ungu dari sel. Setelah alkohol dicuci, noda spesimen diwarnai kembali dengan safranin yang merupakan pewarna basa berwarna merah. Bakteri yang tetap berwarna ungu digolongkan ke dalam gram positif, sedangkan bakteri yang berwarna merah digolongkan ke dalam gram negatif. Perbedaan warna antara bakteri gram positif dan bakteri gram negatif disebabkan oleh adanya perbedaan struktur pada dinding selnya. Dinding bakteri gram positif banyak mengandung peptidoglikan, sedangkan dinding bakteri gram negatif banyak mengandung lipopolisakarida. Kompleks kristal ungu-iodine yang masuk ke dalam sel bakteri gram positif tidak dapat tercuci oleh alkohol karena adanya lapisan peptidoglikan yang kokoh pada dinding sel, sedangkan pada bakteri gram negatif alkohol akan merusak lapisan lipopolisakarida. Kompleks kristal ungu-iodine pada bakteri gram negatif dapat tercuci dan menyebabkan sel bakteri tampak transparan yang akan berwarna merah setelah diberi safranin (Pratiwi, 2008).

K.2. Penanaman pada Medium Selektif, *Salmonella-Shigella* (SS) Agar

Salmonella-Shigella (SS) Agar merupakan metode diferensial. SS Agar adalah media selektif untuk isolasi *Shigella* dan *Salmonella* dari spesimen

patologis, bahan makanan, dll. Gram positif dan organisme *coliform* dihambat oleh komponen penghambat selektif *brilliant green*, garam empedu, tiosulfat, dan sitrat. Hasil uji positif pada isolasi *Shigella* apabila terbentuk koloni berwarna jernih dan tidak menghasilkan H₂S (Bridson, 2006).

K.3. Uji Biokimia dengan Triple Sugar Iron Agar (TSIA)

Triple Sugar Iron Agar (TSIA) sebuah media gabungan bagi diferensiasi *Enterobacteriaceae* sesuai dengan kemampuannya untuk memfermentasi laktosa, sukrosa dan glukosa, dan untuk menghasilkan hidrogen sulfida (Bridson, 2006). Karakteristik khas dari *Shigella* yaitu menghasilkan basa (berwarna merah) pada permukaan miring agar, dan asam (berwarna kuning) pada dasar agar, dengan sedikit atau tidak menghasilkan gas, serta tidak menghasilkan H₂S (WHO, 2002).

K.4. Uji Fermentasi Manitol

Fermentasi merupakan salah satu aktivitas biokimia yang dilakukan oleh mikroba. Fermentasi adalah proses perubahan senyawa makromolekul organik menjadi senyawa yang lebih sederhana oleh aktivitas mikroba pada kondisi anaerob. Fermentasi dapat menghasilkan berbagai senyawa akhir, contohnya fermentasi karbohidrat yang dapat menghasilkan berbagai senyawa asam seperti asam laktat dan propionet, ester-ester, keton dan gas (Pelczar, 2006).

Shigella sp. membentuk asam dari fermentasi karbohidrat tetapi jarang menghasilkan gas. Organisme ini dapat dibedakan berdasarkan kemampuannya memfermentasi manitol dimana *S. flexneri*, *S. boydii*, *S. sonnei* dapat memfermentasi manitol sedangkan *S. dysenteriae* tidak dapat memfermentasi manitol (Brooks *et al.*, 2007)

L. Siprofloksasin

Siprofloksasin termasuk dalam golongan fluorokuinolon. Daya antibakteri fluorokuinolon jauh lebih kuat dibandingkan golongan kuinolon yang lama. Golongan fluorokuinolon dapat digunakan untuk penanggulangan infeksi berat, khususnya yang disebabkan oleh kuman gram negatif. Daya antibakterinya terhadap kuman gram positif relatif lemah (Setiabudy, 2007).

Pada bakteri gram positif mekanisme kerja kuinolon yaitu dengan menghambat aktivitas topoisomerase IV, sedangkan pada bakteri gram negatif target utama kuinolon adalah DNA girase. Kedua untai DNA helix ganda harus dipisahkan untuk memungkinkan terjadinya replikasi atau transkripsi DNA bakteri. Namun, pemisahan kedua untai tersebut akan menyebabkan terjadinya *supercoiling* (pembentukan gulungan DNA) positif yang berlebihan (“*overwinding*”) pada DNA tersebut di depan titik pemisahan. Untuk mengatasi rintangan mekanis ini, enzim DNA girase bakteri bertanggung jawab untuk melakukan pengenalan *supercoiling* negatif yang kontinyu ke dalam DNA. Ini adalah reaksi tergantung ATP yang memerlukan pemotongan pada kedua untai DNA untuk membuka lintasan bagi satu segmen DNA melewati celah tersebut, celah tersebut kemudian akan tertutup kembali. Quinolon menghambat aktivitas girase dalam memotong dan menutup dan pada konsentrasi yang lebih tinggi memblokir aktivitas dekatenas (sambung silang) topoisomerase IV (Goodman dan Gilman, 2007).

Indikasi penggunaan siprofloksasin yaitu pada infeksi saluran kemih, infeksi saluran cerna, infeksi saluran nafas, infeksi tulang dan sendi, penyakit yang ditularkan melalui hubungan seksual dan infeksi kulit serta jaringan lunak. Pada infeksi saluran cerna, siprofloksasin mempunyai efektivitas yang baik terhadap demam tifoid. Efek samping penggunaan siprofloksasin yaitu gangguan saluran cerna, gangguan susunan saraf pusat, hepatotoksisitas, kardiotoxiksisitas, disglukemia dan fototoksisitas (Setiabudy, 2007).

Siprofloksasin digunakan sebagai agen antimikroba untuk menguji aktivitas antibakteri secara *in vitro* terhadap *Shigella* sp. dikarenakan terjadinya resistensi terhadap ampisilin, dan trimetoprim-sulfametoksazol serta asam nalidiksat yang meluas (WHO, 200). Kepekaan antimikroba menggunakan siprofloksasin 5 µg dilihat dari berdasarkan ukuran zona hambat yang dibentuk setelah diinkubasi selama 24 jam yaitu, ≥ 21 mm diinterpretasikan sebagai sensitif, 16-20 mm *intermediate* dan ≤ 15 mm resisten (CLSI, 2013).

M. Pengujian Aktivitas Antibakteri

M.1 Metode Dilusi

Metode dilusi dibedakan menjadi dua yaitu dilusi cair (*broth dilution*) dan dilusi padat (*solid dilution*). Metode dilusi cair (*broth dilution*) mengukur MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) atau KHM (Kadar Hambat Minimum) dan MBC (*Minimum Bactericidal Concentration* atau Kadar Bunuh Minimum, KBM). Metode dilusi padat (*solid dilution*) serupa dengan metode dilusi cair namun menggunakan metode padat. Keuntungan metode ini adalah satu konsentrasi agen antimikroba yang di uji dapat digunakan untuk menguji beberapa mikroba uji (Pratiwi, 2008).

Senyawa uji dicampur dengan media yang sesuai yang sebelumnya telah diinokulasi dengan organisme uji. Metode ini dapat dilakukan dalam cairan serta media padat. Pertumbuhan mikroorganisme dapat diukur dalam sejumlah cara. Pada prinsipnya sejumlah obat antimikroba diencerkan hingga diperoleh beberapa konsentrasi. Pada dilusi cair, masing-masing konsentrasi obat ditambah suspensi kuman dalam media. Sedangkan pada dilusi padat tiap konsentrasi obat dicampur dengan media agar, kemudian ditanami mikroba. Metode dilusi cair adalah metode untuk menentukan konsentrasi minimal dari suatu antijamur yang dapat menghambat atau membunuh mikroorganisme. Konsentrasi terendah yang dapat menghambat pertumbuhan jamur ditunjukkan dengan tidak adanya kekeruhan dan, disebut Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) pada dilusi cair (Maheswari *et al.*, 2010).

M.2 Metode Difusi

Metode difusi digunakan untuk menentukan aktifitas agen antimikroba. Cawan yang berisi agen antimikroba diletakan pada media agar yang telah ditanami mikroorganisme yang akan berdifusi tersebut. Area jernih mengidentifikasi adanya hambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh agen antimikroba pada permukaan media agar (Pratiwi, 2008). Metode difusi agar dibagi menjadi tiga, yaitu metode cakram kertas, metode lubang/sumuran, dan metode gores silang.

Metode difusi cakram digunakan untuk menentukan adanya aktivitas dari agen antimikroba. Metode ini dilakukan dengan cara meletakkan kertas cakram yang berisi agen antimikroba pada media agar yang telah ditanami mikroorganisme kemudian diinkubasi selama 18-48 jam pada suhu 37⁰ C. Agen antimikroba tersebut akan berdifusi pada media agar, kemudian zona hambatnya diukur. Parameter untuk mengetahui zona hambat yaitu adanya area jernih yang mengindikasikan adanya hambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh agen antimikroba pada permukaan media agar. *Cup-plate technique* atau metode sumuran serupa dengan metode difusi cakram, sumur dibuat pada media agar yang telah ditanami dengan mikroorganisme dan pada sumur tersebut diberi agen antimikroba yang akan di uji. Suspensi bakteri yang telah sesuai dengan standar 0,5 McFarland sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam cawan petri steril dan dituangkan media *Mueller Hinton Agar* sampai mencapai kedalaman 4 mm. Cawan petri digoyang-goyang hingga suspensi bakteri dan media menjadi homogen dan media dibiarkan memadat. Setelah itu ditanamkan sumur dengan diameter 5-6 mm dengan bantuan alat pencadangan atau dibuat cetakan sumur dari potongan ujung mikropipet (yang telah disterilisasi) dengan bantuan pinset pada setiap agar, kemudian ke dalamnya dimasukkan agen antimikroba yang akan diuji. Setiap sumur dibuat dengan jarak yang sama baik antar sumur maupun dengan pinggiran cawan petri. Cawan-cawan tersebut kemudian diinkubasi pada suhu 37⁰ C selama 24 jam dan diukur secara teliti ukuran zona hambat yang terbentuk. Metode gores silang dilakukan dengan menggoreskan suspensi dari mikroba diatas cakram kertas steril yang diletakkan di atas media agar steril dan telah ditetesi zat uji (Pratiwi, 2008; NCCLS, 1999 dalam Rahmawati, 2010).

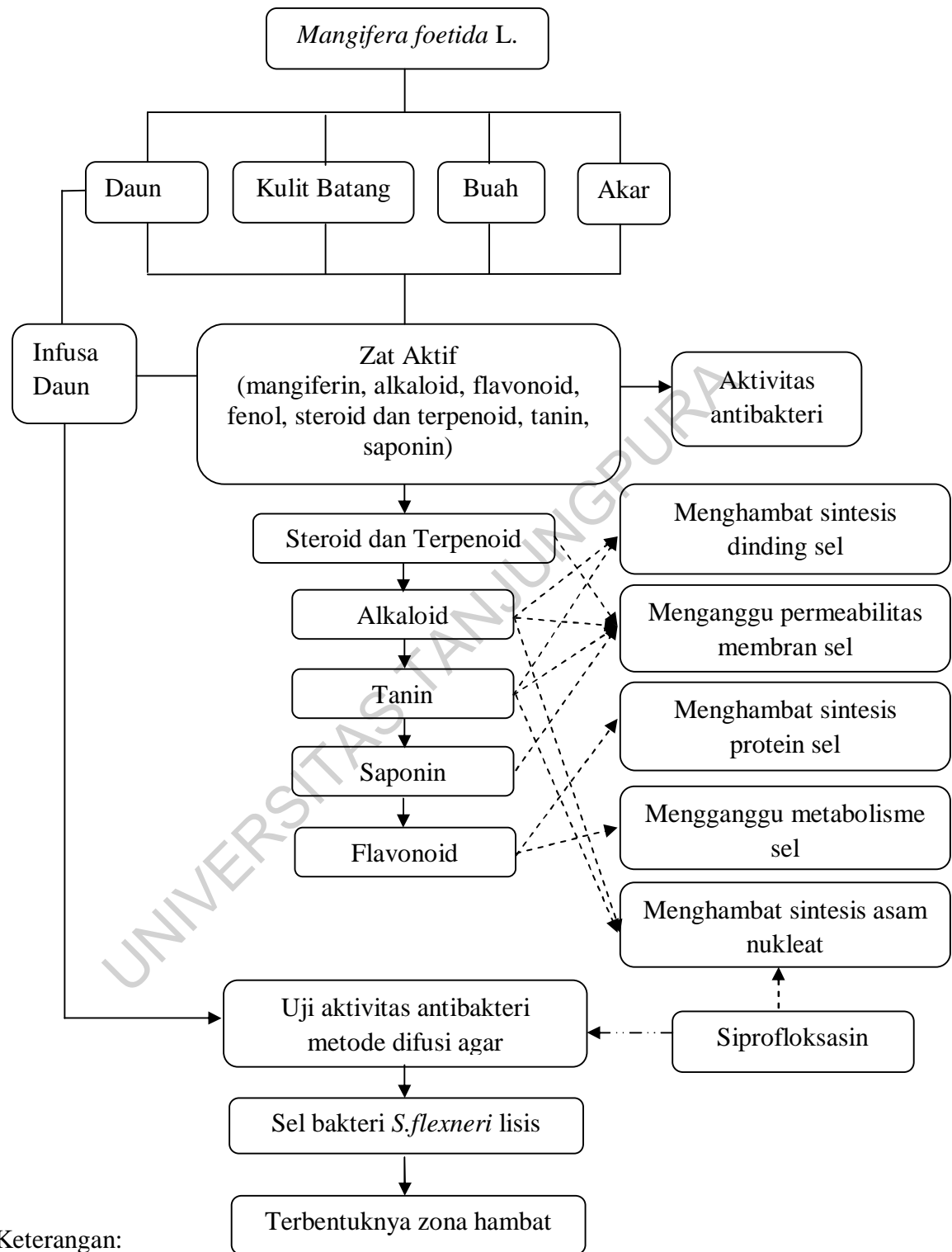
N. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)

Konsentrasi minimum penghambatan (KHM) atau lebih dikenal dengan MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) adalah konsentrasi terendah dari antibiotik atau antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba tertentu. Nilai KHM adalah spesifik untuk tiap-tiap

kombinasi dari antibiotik dan mikroba. KHM dari sebuah antibiotik terhadap mikroba digunakan untuk mengetahui sensitivitas dari mikroba terhadap antibiotik. Nilai KHM berlawanan dengan sensitivitas mikroba yang diuji. Semakin rendah nilai KHM dari sebuah antibiotik, sensitivitas dari bakteri akan semakin besar. KHM dari sebuah antibiotik terhadap spesies mikroba adalah rata-rata KHM terhadap seluruh strain dari spesies tersebut. Strain dari beberapa spesies mikroba sangat berbeda dalam hal sensitivitasnya (Brooks *et al.*, 2007).

UNIVERSITAS TANJUNGPURA

O. Kerangka Teori

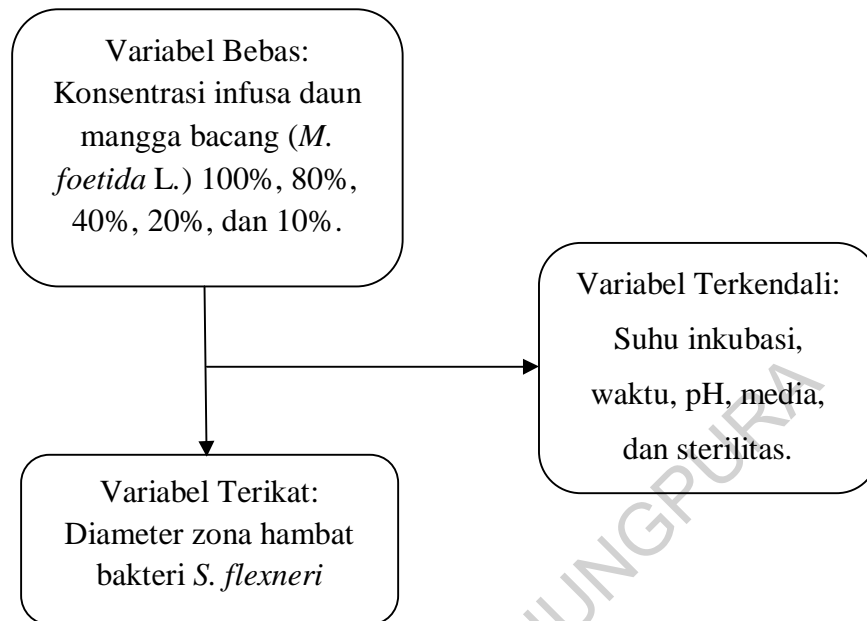


Keterangan:

- - - - - = Kontrol Positif
- - - - - = Mekanisme Kerja

Gambar 2.12 Kerangka Teori

P. Kerangka Konsep



Gambar 2.13 Kerangka Konsep

Q. Hipotesis

Infusa daun manga bacang (*M. foetida* L.) memiliki aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan *S. flexneri*.