



**EFEK KOMBINASI EKSTRAK METANOL DAUN KEMBANG
SEPATU (*Hibiscus rosasinensis* L.) DAN CIPROFLOXACIN
TERHADAP *Shigella dysenteriae* SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

Oleh

**Billy Jusup Kurniawan
NIM 142010101052**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2018**



**EFEK KOMBINASI EKSTRAK METANOL DAUN KEMBANG
SEPATU (*Hibiscus rosasinensis* L.) DAN CIPROFLOXACIN
TERHADAP *Shigella dysenteriae* SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan Program Studi Pendidikan Dokter (S1)

Oleh

Billy Jusup Kurniawan
NIM 142010101052

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2018**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, taufiq, dan hidayah-Nya kepada saya serta Nabi Muhammad S.A.W yang menjadi panutan saya dalam setiap tindakan, perilaku, dan tutur kata;
2. Kedua orang tua tercinta, ibu Yekti Padminingsih dan ayah Sukirno (alm.), Kakak saya tercinta Aulia Kirnansih, Adik saya tersayang Cesar Candar Crismonika dan Keponakan saya terlucu Al'Keysha Fiernando yang selalu memberikan doa, dukungan, motivasi, semangat, nasihat, dan kasih sayang kepada saya;
3. Guru-guru dan dosen saya yang telah mendidik saya dengan penuh kesabaran dan keikhlasan mulai dari taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi; dan
4. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember yang saya banggakan.

MOTO

Sesungguhnya setelah kesulitan itu ada kemudahan. Maka apabila kamu telah selesai (dari sesuatu urusan), kerjakanlah dengan sungguh-sungguh (urusan) yang lain. Dan hanya kepada Tuhanmu-lah hendaknya kamu berharap.
(terjemahan Surat *Asy-Syarh* ayat 6-8)^{*)}

atau

Apabila kamu bersyukur nescaya akan Aku tambahkan nikmat-Ku, dan apabila kamu kufur maka adzab-Ku sangat pedih.
(terjemahan Surat *Ibrahim* ayat 7)^{*)}

atau

Allah tidak membebani seseorang melainkan sesuai dengan kesanggupannya. Dia mendapat pahala dari kebajikan yang dikerjakannya dan dia mendapat siksa dari kejahatan yang diperbuatnya.
(terjemahan Surat *Al-Baqaroh* ayat 286)^{*)}

^{*)} Departemen Agama Republik Indonesia. 2007. Al-Qur'an Al-Karim dan Terjemahan Makna ke Dalam Bahasa Indonesia. Bogor: Sygma.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Billy Jusup Kurniawan

NIM : 142010101052

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Efek Kombinasi Ekstrak Metanol Daun Kembang Sepatu (*Hibiscus rosasinensis* L.) dan Ciprofloxacin terhadap *Shigella dysentriae* secara *In Vitro*” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam kutipan disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus di junjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika dikemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, Januari 2018
Yang menyatakan,

Billy Jusup Kurniawan
142010101052

SKRIPSI

**EFEK KOMBINASI EKSTRAK METANOL DAUN KEMBANG
SEPATU (*Hibiscus rosasinensis* L.) DAN CIPROFLOXACIN
TERHADAP *Shigella dysenteriae* SECARA *IN VITRO***

Oleh
Billy Jusup Kurniawan
142010101052

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : dr. M. Ali Shodikin, M.Kes,Sp.A
Dosen Pembimbing Anggota : dr. Bagus Hermansyah, M.Biomed

PENGESAHAN

Skripsi yang berjudul “Efek Kombinasi Ekstrak Metanol Daun Kembang Sepatu (*Hibiscus rosasinensis* L.) dan Ciprofloxacin terhadap *Shigella dysentriae* secara *In Vitro*” karya Billy Jusup Kurniawan telah diuji dan disahkan pada:

hari,tanggal : Kamis, 4 Januari 2018

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Tim Penguji:

Ketua,

Anggota I,

dr. Dini Agustina, M.Biomed
NIP 198308012008122003

dr. Edy Junaidi, M.Sc, Sp.M
NIP 197508012003121003

Anggota II,

Anggota III,

dr. M. Ali Shodikin, M.Kes,Sp.A
NIP 197706252005011002

dr. Bagus Hermansyah, M.Biomed
NIP 198304052008121001

Mengesahkan,
Dekan Fakultas Kedokteran Universitas
Jember

dr.Enny Suswati, M.Kes
NIP 197002141999032001

RINGKASAN

Efek Kombinasi Ekstrak Metanol Daun Kembang Sepatu (*Hibiscus Rosasinensis* L.) Dan Ciprofloxacin Terhadap *Shigella dysenteriae* Secara *In Vitro*; Billy Jusup Kurniawan, 142010101052; 2017; 58 halaman; Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Indonesia merupakan negara beriklim hujan tropis dengan tingkat kelembaban udara yang tinggi (*Relative Humidity* >80%) dan suhu rata-rata 28°-33°C. Hal tersebut menyebabkan negara Indonesia menjadi tempat yang potensial untuk perkembangbiakan bakteri yang bersifat patogen terhadap manusia seperti *Shigella dysenteriae* (*S. dysenteriae*) sebagai penyebab disentri basiler atau Shigellosis. Penyakit shigellosis bersifat endemik di berbagai negara berkembang termasuk Indonesia, sekitar 80 juta diare berdarah di dunia dengan 700.000 diantaranya meninggal dunia disebabkan oleh penyakit tersebut. Bahkan 99% infeksi yang disebabkan oleh *Shigella* muncul di negara berkembang dengan 60% kasusnya terjadi pada anak-anak di bawah usia 5 tahun.

Ciprofloxacin merupakan antibiotik berspektrum luas yang menjadi pilihan pertama (*drug of choice*) pada semua kasus diare disertai darah termasuk yang disebabkan oleh bakteri patogen *S. dysenteriae* (Shigellosis). *Shigella dysenteriae* merupakan salah satu bakteri yang sering mengalami resistensi sehingga kemungkinan *S. dysenteriae* untuk menjadi tidak sensitif lagi terhadap ciprofloxacin di masa depan sangatlah besar. Hal tersebut didukung dengan adanya laporan di tahun 2003 dari beberapa negara (India, Bangladesh, Myanmar, dan Thailand) ditemukan *S. dysenteriae* yang resisten terhadap ciprofloxacin dan fluorokuinolon lain. Oleh sebab itu, dibutuhkan solusi untuk mengatasi terjadinya resistensi bakteri terhadap antibiotik di masa yang akan datang dengan cara mengkombinasikannya dengan senyawa antibakteri yang terkandung dalam kembang sepatu (*Hibiscus rosasinensis* L.) yaitu flavonoid, saponin, dan tanin.

Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui efek pemberian ekstrak metanol daun kembang sepatu dan ciprofloxacin terhadap bakteri *S. dysenteriae*. Jenis penelitian ini yaitu eksperimental laboratoris (*quasi experimental design*) dengan rancangan *posttest only group control design* menggunakan metode sumuran. Bakteri *S. dysenteriae* diswab ke media *Mueller Hinton Agar* kemudian dibuat sumuran dengan menggunakan besi pelubang media. Tiap sumuran diisi kelompok perlakuan P1-P9 (100 µl ekstrak metanol daun kembang sepatu dengan variasi konsentrasi berturut-turut 0,5 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL, 4 µg/mL, 8 µg/mL, 16 µg/mL, 32 µg/mL, 64 µg/mL, dan 128 µg/mL yang telah dikombinasikan dengan ciprofloxacin 5µg/5µL) dan kelompok K(+) (100 µl ciprofloxacin 5µg/5µL). Setelah itu diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C kemudian diamati diameter zona hambat yang terbentuk menggunakan jangka sorong.

Hasil dari penelitian ini didapatkan diameter zona hambat pada kelompok K(+) sebesar 32,53 mm, sedangkan pada kelompok P1-P9 berturut-turut sebesar

26,01 mm, 26,34 mm, 26,56 mm, 26,94 mm, 27,01 mm, 27,36 mm, 27,90 mm, 28,32 mm, dan 29,04 mm. Hasil uji *Saphiro-wilk* didapatkan $p > 0,05$ yang berarti data terdistribusi normal. Pada uji *varian Levene's* didapatkan $p > 0,05$ maka varian data tersebut dinyatakan homogen. Pada hasil uji *One Way ANOVA* didapatkan hasil $p = 0,000$ yang menunjukkan bahwa rata-rata kelompok berbeda signifikan, selanjutnya hasil dari uji LSD menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antar semua kelompok kecuali pada P2 terhadap P3 dan kelompok P4 terhadap P5. Penelitian ini menunjukkan bahwa kombinasi ekstrak daun kembang sepatu dengan konsentrasi 0,5 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$, 4 $\mu\text{g/mL}$, 8 $\mu\text{g/mL}$, 16 $\mu\text{g/mL}$, 32 $\mu\text{g/mL}$, 64 $\mu\text{g/mL}$, 128 $\mu\text{g/mL}$ dan ciprofloxacin sebesar 5 $\mu\text{g}/5\mu\text{L}$ dapat menghambat pertumbuhan *Shigella dysentriae* secara *in vitro* namun diameter zona hambat yang terbentuk lebih kecil daripada ciprofloxacin secara tunggal.



PRAKATA

Puji syukur peneliti panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah memberikan rahmat serta hidayahnya sehingga peneliti dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Efek Kombinasi Ekstrak Metanol Daun Kembang Sepatu (*Hibiscus rosasinensis* L.) dan Ciprofloxacin terhadap *Shigella dysentriae* secara *In Vitro*”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi persyaratan penyelesaian pendidikan strata satu (S1) di Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. dr. Enny Suswati, M.Kes, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
2. dr. M. Ali Shodikin, M.Kes., Sp.A, selaku Dosen Pembimbing Utama dan dr. Bagus Hermansyah, M.Biomed., selaku Dosen Pembimbing Anggota, yang telah banyak memberikan dukungan, nasihat, pujian, waktu, pikiran dan perhatiannya sejak awal hingga terselesaikannya skripsi ini;
3. dr. Dini Agustina, M.Biomed., selaku Dosen Penguji I dan dr. Edy Junaidi, M.Sc., Sp.M, selaku Dosen Penguji II yang telah meluangkan waktu untuk menguji dan memberikan kritik, saran, serta masukan yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
4. Lilis Lestari, A.Md, selaku Analis Laboratorium Mikrobiologi Universitas Jember yang telah memberikan semangat dan bantuan selama melakukan penelitian;
5. Kedua orang tua tercinta saya, Bapak Sukirno (alm.) dan Mama Yekti Padminingsih yang telah mengorbankan darah, keringat dan air matanya serta doa, kasih sayang, semangat, kesabaran, dukungan, biaya dan nasihat sedari kecil hingga dewasa;
6. Kakak saya tersayang, Aulia Kirnansih, adik saya tercinta, Cesar Candra Crismonika, dan Keponakan saya Al’Keysha Fiernando yang selalu mendukung dan memberikan semangatnya kepada peneliti untuk menyelesaikan studinya;

7. Sahabat spesial saya, Haryo Kunto, Mei Nurlita Hadi, Putri Ragefa, Fifi Isnaini, Gea Ross Alifa, Risma Laras Wati, Isnaini Miladiyah, Heri Puguh, Kesy Sasta, Maria Ulfa, Ariani, Hafid Aji, Annisa Sarfina, dan Nur Aqmarina;
8. Keluarga kedua saya yang sangat saya cintai, keluarga besar IPA 1 SMA Negeri 1 Madiun;
9. Teman-teman kos kalimantan X no.120 yang memberikan sarana prasarana, nasehat, dan dukungan penyusunan skripsi ini;
10. Teman-teman KKN Kelompok 82 Desa Garahan yang tak terlupakan;
11. Keluarga besar angkatan 2014 yang selalu memberikan bantuan dalam setiap masalah yang muncul dalam penyusunan skripsi ini;
12. Berbagai pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis menerima kritik dan saran yang membangun terhadap skripsi yang sudah terselesaikan ini. Penulis juga berharap skripsi ini dapat bermanfaat bagi semua orang yang membacanya.

Jember, Januari 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL.....	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTO.....	iv
HALAMAN PERNYATAAN.....	v
HALAMAN PENGESAHAN.....	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA.....	x
DAFTAR ISI.....	xii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan.....	4
1.4 Manfaat	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Kembang Sepatu (<i>Hibiscus rosasinensis</i> L.)	5
2.1.1 Morfologi dan Taksonomi.....	5
2.1.2 Kandungan Kimia dan Manfaat	6
2.1.3 Kembang Sepatu sebagai Antibakteri	8
2.2 Ciprofloxacin	10
2.2.1 Mekanisme Kerja	11
2.2.2 Farmakokinetik dan Farmakodinamik.....	11
2.2.3 Penggunaan Obat.....	12
2.2.4 Resistensi	12
2.2.5 Sediaan	13
2.2.6 Efek Samping dan Interaksi Obat.....	13
2.3 <i>Shigella dysenteriae</i>	14
2.3.1 Morfologi dan Taksonomi.....	14
2.3.2 Patogenitas.....	14
2.3.3 Resistensi.....	15
2.4 Uji Sensitivitas Antibioitik	16
2.4.1 Metode Difusi.....	16
2.4.2 Metode Dilusi	16
2.5 Kombinasi Obat	17
2.6 Kerangka Konsep.....	19
2.7 Hipotesis Penelitian.....	20
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	21
3.1 Jenis Penelitian	21

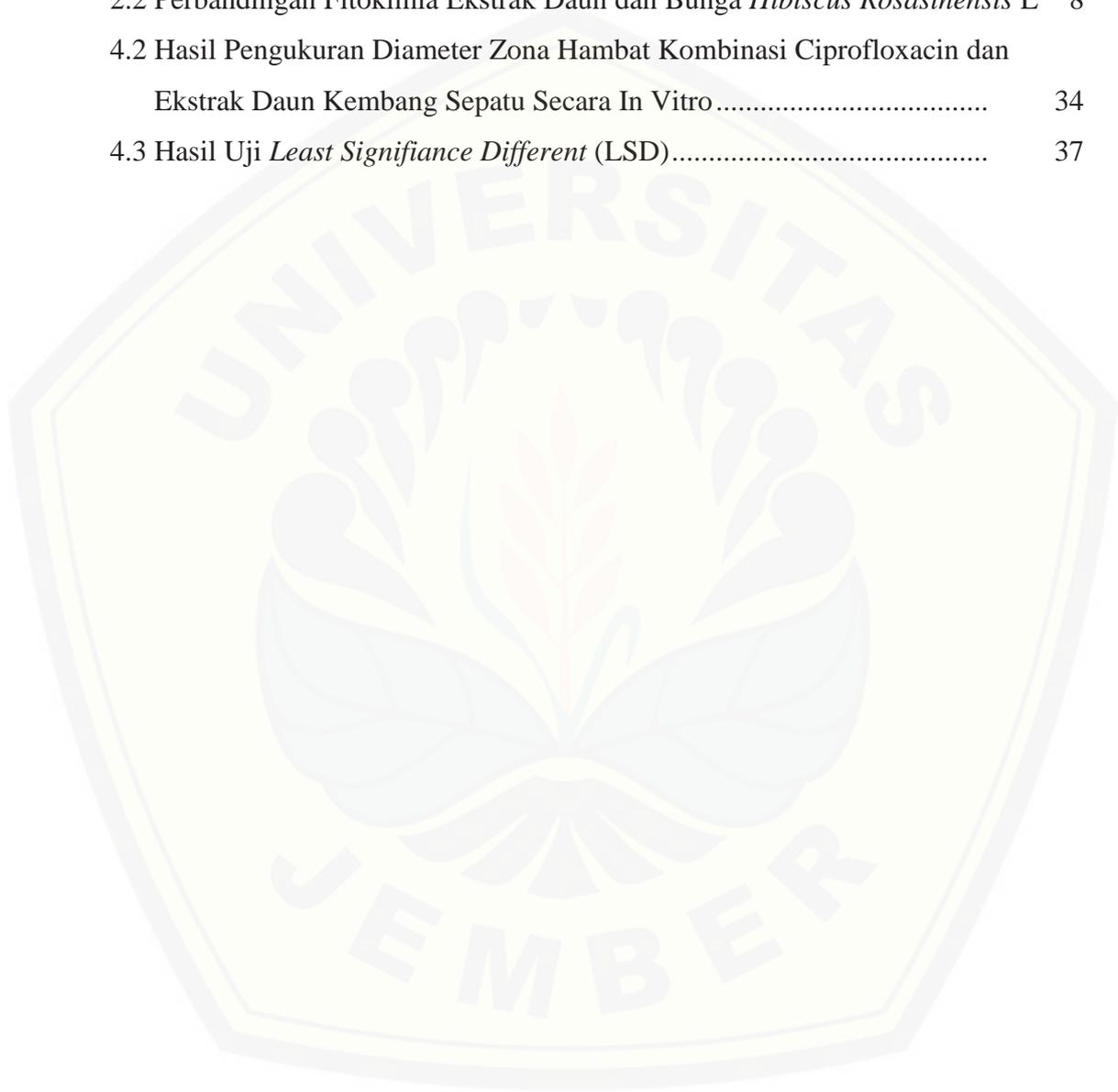
3.2 Rancangan Penelitian	21
3.3 Tempat dan Waktu Penelitian	22
3.4 Ukuran Sampel	23
3.5 Variabel Penelitian	24
3.5.1 Variabel Bebas	24
3.5.2 Variabel Terikat	24
3.5.3 Variabel Terkendali	24
3.6 Definisi Operasional	24
3.6.1 Ciprofloxacin	24
3.6.2 Ekstrak Daun Kembang Sepatu	25
3.6.3 Kombinasi Ekstrak Daun Kembang Sepatu dengan Ciprofloxacin	25
3.6.4 Uji Sensitivitas	25
3.7 Alat Dan Bahan Penelitian	25
3.7.1 Alat Penelitian.....	25
3.7.2 Bahan Penelitian	26
3.8 Prosedur Penelitian	26
3.8.1 Uji Kelayakan Etik.....	26
3.8.2 Uji Determinasi	27
3.8.3 Persiapan dan Pemakaian Alat Pelindung Diri (APD).....	27
3.8.4 Persiapan Alat Penelitian	27
3.8.5 Pembuatan Media <i>Nutrient Agar</i> (NA) dan Pemeliharaan Bakteri	27
3.8.6 Pembuatan Media <i>Mueller Hinton Agar</i> (MHA).....	28
3.8.7 Pembuatan Suspensi Bakteri.....	28
3.8.8 Pembuatan Larutan Ekstrak Daun Kembang Sepatu ...	29
3.8.9 Penilaian Derajat Keasaman (pH) Ekstrak Daun Kembang Sepatu	30
3.8.10 Pembuatan <i>Stock Solution</i> Ciprofloxacin.....	30
3.8.11 Metode Difusi Sumuran	30
3.8.12 Pengukuran Diameter Zona Hambat.....	31
3.8.13 Pengelolaan Limbah Penelitian.....	31
3.9 Analisis data	32
3.10 Alur penelitian	33
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	34
4.1 Hasil Penelitian	34
4.1.1 Hasil Determinasi dan Ekstraksi.....	34
4.1.2 Penilaian pH Larutan Ekstrak Daun Kembang Sepatu	34
4.1.3 Hasil Kombinasi Ciprofloxacin Dan Ekstrak Daun Kembang Sepatu.....	36
4.2 Analisis Data	37
4.3 Pembahasan	38
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	44
5.1 Kesimpulan	44

5.2 Saran	44
DAFTAR PUSTAKA	45
LAMPIRAN.....	52



DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Hasil Analisis Fitokimia <i>Hibiscus Rosasinensis</i> L	8
2.2 Perbandingan Fitokimia Ekstrak Daun dan Bunga <i>Hibiscus Rosasinensis</i> L	8
4.2 Hasil Pengukuran Diameter Zona Hambat Kombinasi Ciprofloxacin dan Ekstrak Daun Kembang Sepatu Secara In Vitro	34
4.3 Hasil Uji <i>Least Significance Different</i> (LSD).....	37

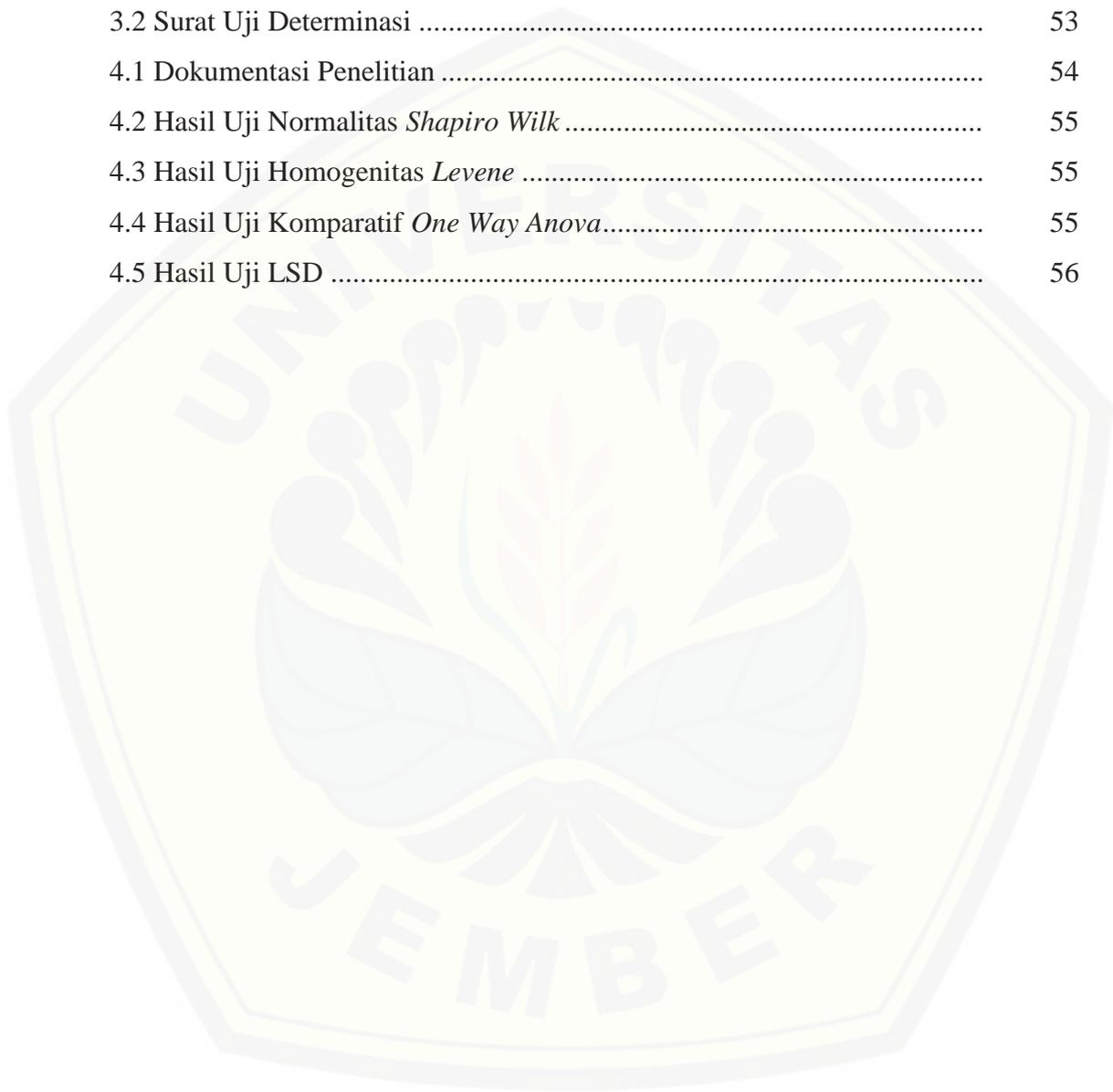


DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Morfologi Kembang Sepatu (<i>Hibiscus Rosasinensis</i> L.).....	5
2.2 Struktur Kimia Ciprofloksasin.....	10
2.3 Kerangka Konsep Penelitian.....	19
3.1 Rancangan Penelitian.....	21
3.2 Jumlah total sampel dan <i>power analysis</i> berdasarkan G*Power.....	23
3.3 Alur Penelitian.....	33
4.1 Hasil Penelitian Kombinasi Ciprofloksacin dan Ekstrak Daun Kembang Sepatu terhadap <i>S. dysenteriae</i> pada Media MHA.....	35
4.2 Diagram Batang Rata-Rata Diameter Zona Hambat pada Setiap Kelompok Penelitian.....	36

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
3.1 Surat Persetujuan Etik.....	52
3.2 Surat Uji Determinasi	53
4.1 Dokumentasi Penelitian	54
4.2 Hasil Uji Normalitas <i>Shapiro Wilk</i>	55
4.3 Hasil Uji Homogenitas <i>Levene</i>	55
4.4 Hasil Uji Komparatif <i>One Way Anova</i>	55
4.5 Hasil Uji LSD	56



BAB 1. PENDAHULUAN

2.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara beriklim hujan tropis dengan tingkat kelembaban udara yang tinggi (*Relative Humidity* >80%) dan suhu rata-rata 28°-33°C (Talanca dan Mas'ud, 2009). Hal tersebut menyebabkan negara Indonesia menjadi tempat yang potensial untuk perkembangbiakan mikroorganisme baik bakteri, virus, parasit maupun jamur. Salah satu bakteri yang bersifat patogen terhadap manusia seperti *Shigella dysenteriae* (*S. dysenteriae*). *Shigella dysenteriae* merupakan bakteri penyebab infeksi saluran pencernaan yang ditandai dengan diare akut yang disertai darah, lendir atau nanah (disentri basiler atau Shigellosis). Penyakit shigellosis bersifat endemik di berbagai negara berkembang termasuk Indonesia, sekitar 80 juta diare berdarah di dunia dengan 700.000 diantaranya meninggal dunia disebabkan oleh penyakit tersebut. Bahkan 99% infeksi yang disebabkan oleh *Shigella* muncul di negara berkembang dengan 60% kasusnya terjadi pada anak-anak di bawah usia 5 tahun (WHO, 2005), sedangkan berdasarkan laporan epidemiologi yang dilakukan *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) tahun 2017 kasus disentri basiler di dunia mencapai 80-165 juta dengan 600.000 kasus diantaranya meninggal dunia (CDC, 2017). Menurut data Survei Demografi Dan Kesehatan Indonesia tahun 2012 mencatat bahwa diare berdarah terjadi pada 1 tiap 1000 anak yang berumur 1-5 tahun (Badan Pusat Statistik, 2012).

Terapi farmakologi untuk mengatasi penyakit tersebut yaitu antibiotik yang bekerja sebagai penghambat pertumbuhan bakteri atau pembunuh bakteri. Sayangnya, resistensi *Shigella* terhadap ampicillin, co-trimoxazole, dan asam nalidixat telah berkembang luas sehingga obat-obat tersebut tidak direkomendasikan lagi (WHO, 2005; Nafianti, 2005). Pernyataan tersebut juga didukung oleh Yenny (2007) bahwa selama beberapa dekade *Shigella* secara progresif menjadi resisten terhadap *first-line antimicrobial drugs*, seperti ampicillin, kotrimoksazol, kloramfenikol dan tetrasiklin, akibat penggunaan obat

antimikroba secara luas. Hal tersebut menjadikan ciprofloxacin sebagai antibiotik berspektrum luas yang menjadi pilihan pertama (*drug of choice*) pada semua kasus diare disertai darah termasuk yang disebabkan oleh bakteri patogen *S. dysenteriae* (Shigellosis) (WHO, 2005).

Shigella dysenteriae merupakan salah satu bakteri yang sering mengalami resistensi sehingga kemungkinan *S.dysenteriae* untuk menjadi tidak sensitif lagi terhadap antimikrobanya di masa depan sangatlah besar. Hal tersebut didukung dengan adanya laporan di tahun 2003 dari beberapa negara (India, Bangladesh, Myanmar, dan Thailand) bahwa ditemukan *S.dysenteriae* yang resisten terhadap ciprofloxacin dan fluorokuinolon lain (WHO, 2005; Talukder dkk., 2004). Beberapa hal menyebabkan obat tersebut menjadi resisten yaitu regio pengikat kuinolon pada enzim sasaran yang mengalami mutasi, protein Qnr pada plasmid yang melindungi DNA girase, dan varian aminoglikosida transferase yang mampu memodifikasi ciprofloxacin dengan cara mengasetilasi ciprofloxacin sehingga aktivitasnya turun 4 kali lipat (Katzung dkk., 2013; Dalhoff, 2012). Berdasarkan hal tersebut, dibutuhkan solusi untuk mengatasi terjadinya resistensi bakteri terhadap antibiotik di masa yang akan datang. Tanaman yang mengandung antimikroba menjadi salah satu cara untuk mengatasi resistensi bakteri terhadap antibiotiknya.

Beberapa tanaman yang tumbuh subur di Indonesia ternyata merupakan tanaman yang memiliki khasiat beragam terhadap kesehatan manusia. Menurut Wulandari (2012) Indonesia merupakan negara dengan tanaman obat terbesar di dunia dengan sekitar 35 ribu jenis tumbuhan tingkat tinggi dan 3500 diantaranya dilaporkan sebagai tumbuhan obat. Menurut Khan dkk. (2014) terdapat lebih dari 258.650 tumbuhan tingkat tinggi yang berhasil ditemukan, yang mana 10% diantaranya merupakan tanaman obat yang belum seluruhnya diidentifikasi. Salah satu tanaman obat yang memiliki efek terhadap kesehatan manusia yaitu kembang sepatu (*Hibiscus rosasinensis* L.).

Kembang sepatu (*Hibiscus rosasinensis* L.) merupakan tanaman perdu keluarga *Malvacaceae* yang umumnya dijadikan sebagai tanaman penghias pagar. Tanaman tersebut dapat tumbuh mencapai 4 meter dan mudah untuk

dikembangbiakkan secara stek batang (Agarwal dan Prakash, 2014). Banyak sekali pengobatan tradisional yang memanfaatkan kembang sepatu sebagai obat antiasma, analgesik, antipiretik, dan antitumor (Udo dkk., 2016). Tanaman tersebut terbukti memiliki beragam manfaat yang salah satunya telah dibuktikan bahwa konsentrasi 20% ekstrak bunga kembang sepatu potensial dalam menghambat jamur *Candida albicans* (Mariyani, 2016). Kembang sepatu juga mengandung beberapa senyawa yang berpotensi sebagai antimikroba yaitu flavonoid, saponin, dan tanin. Studi sebelumnya membuktikan bahwa daun kembang sepatu dapat berpotensi menyembuhkan beberapa penyakit yang disebabkan oleh bakteri patogen (Agarwal dan Prakash, 2014). Berbagai bagian tanaman baik daun, bunga maupun akar dari tanaman kembang sepatu dapat dimanfaatkan sebagai penghambat pertumbuhan bakteri. Daun dari kembang sepatu memiliki aktivitas antimikroba paling tinggi daripada bunga dan akarnya dalam menghambat beberapa patogen seperti *Staphylococcus aureus* dan *Candida parapsilosis* hanya dengan konsentrasi yang rendah yaitu 2,5 µg/mL (Kumari dkk., 2015).

Penelitian mengenai senyawa antibakteri dalam ekstrak daun kembang sepatu (*Hibiscus rosasinensis* L.) yang dikombinasikan dengan ciprofloxacin belum pernah dilakukan sebelumnya. Berdasarkan hal tersebut, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efek kombinasi diantara keduanya yang diduga memiliki efek sinergis untuk menghambat *S.dysenteriae*. Produk alam yang melimpah ditambah meningkatnya kasus resistensi antibiotik mendasari peneliti untuk menguji secara *in vitro* efek kombinasi ekstrak daun kembang sepatu dan ciprofloxacin terhadap *S. dysenteriae*.

2.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah apakah terdapat efek pemberian kombinasi ekstrak metanol daun kembang sepatu (*Hibiscus rosasinensis* L.) dan ciprofloxacin terhadap bakteri *S. dysenteriae* secara *in vitro*?

2.3 Tujuan

Tujuan pada penelitian ini adalah untuk mengetahui efek pemberian kombinasi ekstrak metanol daun kembang sepatu (*Hibiscus rosasinensis* L.) dan ciprofloxacin terhadap bakteri *S. dysenteriae* secara *in vitro*.

2.4 Manfaat

Berdasarkan latar belakang, rumusan masalah dan tujuan penelitian yang telah dijelaskan diatas maka manfaat dari penelitian ini adalah :

1. Manfaat Teoritis

Sebagai sumber informasi mengenai daya antibakteri ekstrak metanol daun kembang sepatu (*Hibiscus rosasinensis* L.) terhadap efektivitas kerja ciprofloxacin dalam menghambat *S. dysenteriae* secara *in vitro*.

2. Manfaat Aplikatif

Hasil penelitian ini dapat dijadikan sebagai tambahan pustaka untuk peneliti lain dan klinisi mengenai daya antibakteri ekstrak metanol daun kembang sepatu (*Hibiscus rosasinensis* L.) terhadap efektivitas kerja ciprofloxacin dalam menghambat *S. dysenteriae* secara *in vitro*.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kembang Sepatu (*Hibiscus Rosasinensis L.*)

2.1.1 Morfologi Dan Taksonomi

Tanaman bunga sepatu (*Hibiscus rosasinensis L.*) merupakan tanaman perdu yang tumbuh tegak dengan banyak cabang. Tingginya mencapai 1-4 meter, tumbuh dari dataran rendah sampai pegunungan. Daun tunggal, berbentuk bulat telur dengan tepi bergerigi kasar dan tulang daun menjari, ujung meruncing, panjang daun 3,5-9,5 cm dan lebar 2-6 cm dengan daun penumpu berbentuk garis. Daun mempunyai tangkai dengan panjang tangkainya 7 cm. Bunga tunggal, keluar dari ketiak daun, sekaligus menggantung dengan tangkai bunga beruas, warna bunga ada yang merah, oranye, kuning, putih, dan sebagainya. Tanaman bunga sepatu biasanya ditanam sebagai pagar hidup atau tanaman hias karena dapat dimanfaatkan untuk mewarnai kain, makanan dan dipakai untuk menggosok sepatu agar mengkilap sehingga disebut bunga sepatu. Pengembangbiakan tanaman ini dengan cara stek. (Hajar, 2011; Mariyani, 2016). Morfologi *Hibiscus rosa-sinensis L.* ditunjukkan pada Gambar 2.1



Gambar 2.1 Morfologi kembang sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis L.*) (Sumber: Hajar, 2011)

Taksonomi tanaman bunga sepatu sebagai berikut:

- Divisi : Spermatophyta
- Subdivisi : Angiospermae
- Class : Dicotyledonae
- Ordo : Malvales

Familia : Malvaceae
Spesies : *Hibiscus rosasinensis* L.

(Hajar, 2011).

Nama daerah untuk *Hibiscus rosasinensis* L. berbeda-beda untuk setiap daerah, khususnya di Indonesia. Di Sumatera, tanaman bunga sepatu ini disebut bungong raja (Aceh), bunga-bunga (Batak), soma-soma (Nias), bakeyu (Mentawai), dan bunga raya (Melayu). Di Pulau Jawa, khususnya daerah Jakarta menyebut *Hibiscus rosasinensis* L. sebagai bunga sepatu dan uribang, orang Sunda menyebutnya kembang wera, di Jawa disebut wora-wari dan di Madura disebut rebhang atau mandhaleka (Hajar, 2011).

2.1.2 Kandungan Kimia dan Manfaat

Daun kembang sepatu mengandung berbagai senyawa seperti alkaloids, saponins, flavonoids, *cardiac glycosides*, antraquinone, dan *phlobatanins*. Tabel hasil analisis fitokimia ditunjukkan pada Tabel 2.1. Tanin, flavonid, dan saponin ditemukan lebih banyak pada bagian daun dibandingkan bagian yang lainnya, seperti yang ditunjukkan pada Tabel 2.2 (Kumari dkk., 2015; Udo dkk., 2016).

Tanin merupakan senyawa aktif metabolit sekunder yang diketahui mempunyai beberapa khasiat yaitu sebagai astringen, antidiare, antibakteri, dan antioksidan. Tanin merupakan komponen zat organik yang sangat kompleks, terdiri dari senyawa fenolik yang sukar dipisahkan dan sukar mengkristal, mengendapkan protein dari larutannya dan bersenyawa dengan protein tersebut (Malangi, 2012). Senyawa ini dapat ditemukan hampir di setiap bagian dari tanaman seperti kulit kayu, daun, buah, atau akar (Latifah, 2015). Sebagian besar tumbuhan yang banyak mengandung tanin dihindari oleh hewan pemakan tumbuhan karena rasanya sepat sehingga mungkin mempunyai arti sebagai pertahanan bagi tumbuhan. Tanin memiliki peranan biologis yang kompleks mulai dari pengendap protein, pengkelat logam hingga antioksidan biologis (Malangi, 2012).

Flavonoid terdapat pada semua bagian tumbuhan baik vegetatif (daun, akar, dan batang) maupun generatif (bunga, biji, dan buah) (Latifah, 2015;

Markham, 1988). Keunggulan lain dari flavonoid, selain ditemukan dibagian mana saja dari tumbuhan yaitu memiliki toksisitas yang rendah terhadap sel mamalia (Chusnie dan Lamb, 2005).

Flavonoid merupakan salah satu kelompok senyawa metabolit sekunder yang paling banyak ditemukan di dalam jaringan tanaman (Redha, 2010). Flavonoid berperan sebagai antioksidan dengan cara mendonasikan atom hidrogennya atau melalui kemampuannya mengkelat logam, berada dalam bentuk glukosida (mengandung rantai samping glukosa) atau dalam bentuk bebas yang disebut aglikon (Redha, 2010). Unit flavonoid terikat gula sebagai glukosa yang mungkin ditemukan dalam bentuk kombinasi glikosida pada tanaman (Waji, 2009).

Saponin juga merupakan senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan spesies tanaman yang berbeda. Kebanyakan saponin ditemukan di tanaman dikotil yang berperan sebagai sistem pertahanan tanaman dan termasuk ke dalam kelompok besar molekul pelindung tanaman. Saponin diketahui mempunyai efek sebagai antibakteri, antifungi, antioksidan, dan antikarsinogenik (Ustundag dan Mazza, 2007). Saponin mempunyai tingkat toksisitas yang tinggi melawan fungi (Ustundag dan Mazza, 2007; Mariyani, 2016). Saponin paling tepat diekstraksi dari tanaman dengan pelarut etanol 70-95% atau metanol. Ekstrak saponin akan lebih banyak dihasilkan jika diekstraksi menggunakan metanol karena saponin bersifat polar sehingga akan lebih mudah larut daripada memakai pelarut lain (Suharto, 2015).

Daun kembang sepatu juga mengandung serat (3,99%), protein (7,01%), lemak (9,6%), dan karbohidrat (31,66%). Sedangkan dari segi mineral daun kembang sepatu mengandung banyak kalsium (772,57 mg/g), kalium (181 mg/g) dan magnesium (90,33%)(Udo dkk., 2016). Tanaman bunga sepatu sudah lama diketahui berkhasiat sebagai obat penyakit kulit, demam, obat anti nyeri, dan obat sariawan (Agarwal dan Prakash, 2014). Bagian bunga juga dimanfaatkan untuk mengatasi disentri, batuk, mumps, infeksi saluran kemih, bisul, dan melancarkan haid (Pal, 2015).

Tabel 2.1 Hasil analisis fitokimia *Hibiscus rosasinensis* L

S.No	Phytochemicals	<i>Hibiscus rosasinensis</i>
1	saponin	+ve
2	phenol	+ve
3	alkaloids	+ve
4	protein and amino acids	+ve
5	tannin	+ve
6	flavonoids	+ve
7	carbohydrate/ reducing sugar	+ve
8	phlobatannin	-ve
9	anthraquinone	-ve
10	terpenoids	-ve
11	glycosides	-ve
12	resin	+ve

+ve: positif (ada); -ve: negatif (tidak ada)

(Sumber: Paul, 2016)

Tabel 2.2 Perbandingan fitokimia ekstrak daun dan bunga *Hibiscus rosasinensis* L

Phytochemicals	Name of phytochemical test	Methanolic leaf extract of <i>Hibiscus rosasinensis</i>	Methanolic flower extract of <i>Hibiscus rosasinensis</i>
alkaloids	mayers and dragendroff's	+	+
glycosides	keller kilani	+	-
flavonoids	shinoda's and zn-hcl	+	-
proteins and amino acids	ninhydrin, biuret	-	+
phytosterols	salkowski and liebermann burchad	-	+
carbohydrates	benedicts and fehling	-	+
tannin and phenol	ferric chloride	+	-
saponins	frothing test	+	+

(Sumber: Tiwari dkk., 2015)

2.1.3 Kembang Sepatu sebagai Antibakteri

Berbagai penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, membuktikan bahwa baik daun, bunga maupun akar dari tanaman kembang sepatu ini memiliki aktivitas antibakteri. Daun kembang sepatu memiliki daya hambat terhadap bakteri patogen lebih besar daripada bagian bunga dan akarnya, bahkan dengan konsentrasi rendah (2,5 µg/mL) ekstrak daun kembang sepatu menghasilkan diameter zona hambat yang lebih besar daripada ekstrak bunga atau akarnya terhadap *Staphylococcus aureus* (Kumari dkk., 2015). Seperti yang telah

dijelaskan sebelumnya bahwa daun kembang sepatu memiliki beragam manfaat terutama dalam mengatasi penyakit infeksi, hal tersebut disebabkan karena di dalam daun kembang sepatu terkandung banyak sekali zat-zat yang berperan sebagai antibakteri yaitu flavonoid, saponin, dan tanin (Kairupan, 2014).

Flavonoid merupakan salah satu kelompok senyawa metabolit sekunder yang paling banyak ditemukan di dalam jaringan tanaman. Flavonoid termasuk dalam golongan senyawa fenolik dengan struktur kimia C₆-C₃-C₆ (Redha, 2010). Flavonoid mempunyai aktivitas sebagai antibakteri dan antivirus yang dapat menekan pertumbuhan bakteri dan virus. Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri yaitu dengan menghambat sintesis asam nukleat dan merusak membran sel bakteri baik lapisan luar maupun dalam (Chusnie dan Lamb, 2005). Kerusakan membran bakteri diakibatkan oleh larutnya lemak yang terdapat pada dinding sel. Senyawa ini mampu melakukan migrasi dari fase cair ke fase lemak. Terjadinya kerusakan pada membran sel mengakibatkan terhambatnya aktivitas dan biosintesa enzim-enzim spesifik yang diperlukan dalam reaksi metabolisme bakteri sehingga menyebabkan kematian pada bakteri (Rohyani, 2015).

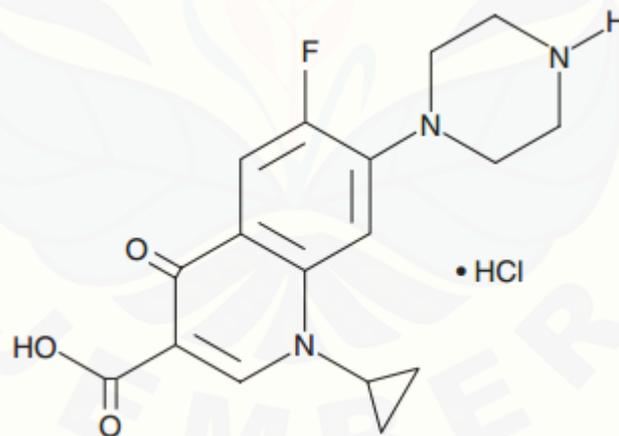
Saponin sebagai antibakteri bekerja dengan cara menurunkan tegangan permukaan sehingga permeabilitas sel meningkat dan mengakibatkan senyawa intraseluler akan keluar. Senyawa ini berdifusi melalui membran luar dan dinding sel yang rentan kemudian mengikat membran sitoplasma dan mengganggu kestabilannya. Hal ini menyebabkan sitoplasma bocor keluar dari sel sehingga sel bakteri mati (Ngajow dkk., 2013)

Toksisitas tanin dapat merusak membran sel bakteri, senyawa astringent tanin dapat menginduksi pembentukan kompleks senyawa ikatan terhadap enzim atau substrat mikroba dan pembentukan suatu kompleks ikatan tanin terhadap ion logam yang dapat menambah daya toksisitas tanin itu sendiri. Tanin diduga dapat mengkerutkan dinding sel atau membran sel sehingga mengganggu permeabilitas sel bakteri. Akibat terganggunya permeabilitas, sel tidak dapat melakukan aktivitas hidup sehingga pertumbuhannya terhambat atau bahkan mati (Mariyani, 2016; Ajizah, 2004).

Menurut Ngajow (2013), tanin mempunyai target pada polipeptida dinding sel sehingga pembentukan dinding sel menjadi kurang sempurna. Hal ini menyebabkan sel bakteri menjadi lisis karena tekanan osmotik maupun fisik sehingga sel bakteri akan mati. Tanin bersifat bakteriostatik terhadap *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumonia*, *Bacillus anthracis*, *Shigella dysenteriae*, and *Salmonella senftenberg* (Chung dkk., 2010).

2.2 Ciprofloxacin

Ciprofloxacin merupakan senyawa flurokuinolon dengan 4-kuinolon terfloresensi. Struktur senyawa ciprofloxacin ditunjukkan pada Gambar 2.2. Ciprofloxacin menunjukkan perkembangan terapeutik yang lebih penting dibandingkan dengan kuinolon lainnya karena senyawa ini memiliki aktivitas antimikroba yang lebih luas dan efektif dalam pemberian secara oral (Goodman, 2011).



Gambar 2.2 Struktur kimia ciprofloxasin (Sumber: Cayman, 2016)

2.2.1 Mekanisme Kerja

Kuinolon menghambat pembentukan DNA bakteri dengan menghambat topoisomerase II (DNA girase) dan topoisomerase IV bakteri. Topoisomerase II

(DNA girase) terdapat pada bakteri Gram negatif sedangkan topoisomerase IV terdapat pada bakteri Gram positif (Goodman dkk., 2011). Inhibisi DNA girase menghambat relaksasi gulungan DNA yang diperlukan untuk proses transkripsi dan replikasi normal. Inhibisi topoisomerase IV mencegah pemisahan DNA baru setelah replikasi DNA bakteri selesai dilakukan (Katzung dkk., 2013). Terhambatnya enzim-enzim tersebut menyebabkan tidak terbentuknya DNA bakteri sehingga tidak terbentuk pula sel-sel bakteri yang baru.

2.2.2 Farmakokinetik Dan Farmakodinamik

Enzim topoisomerase II berfungsi menimbulkan relaksasi pada DNA yang mengalami pilinan positif yang berlebihan pada waktu transkripsi dalam proses replikasi DNA bakteri. Topoisomerase IV berfungsi dalam pemisahan DNA baru setelah replikasi DNA kuman selesai. Golongan kuinolon menghambat kerja enzim tersebut pada kuman sehingga bersifat bakterisidal (Katzung dkk., 2013).

Ciprofloxacin merupakan florokuinolon lama yang memiliki daya antibakteri kuat pada *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Haemophilus influenza*, *Providencia*, *Serratia*, *Salmonella*, *Neisseria meningitis*, *Neisseria gonorrhoea*, *Branhamella catarrhalis* dan *Yersinea enterocolita*. Terhadap gram positif daya antibakterinya kurang baik (Milla, 2015).

Ciprofloxacin diabsorpsi dengan baik setelah pemberian oral dan terdistribusi secara luas di seluruh cairan dan jaringan tubuh. Dosis untuk dewasa 250-750 mg tiap 12 jam. Waktu paruh dalam serum 3-5 jam. Antibiotika ini juga dapat ditemukan di air susu ibu. Penyerapan oral terganggu oleh kation divalen dan trivalen yang terdapat dalam antasida sehingga obat ini perlu diminum 2 jam sebelum atau 4 jam setelah mengkonsumsi antasida (Katzung dkk., 2013). Perlu penyesuaian dosis apabila digunakan kepada pasien insufisiensi ginjal karena terjadi bersihan oleh renal namun aman digunakan oleh pasien gagal hati (Sukandar dkk., 2009). Penyesuaian ini sangat bergantung pada derajat gangguan ginjal dan

obat golongan fluorokuinolon lain yang akan digunakan (Katzung dkk., 2013).

2.2.3 Penggunaan Obat

Ciprofloxacin digunakan sebagai antibiotik untuk infeksi kuman Gram positif dan Gram negatif. Obat tersebut juga digunakan untuk infeksi saluran kemih, infeksi jaringan lunak, dan sebagai profilaksis pada bedah saluran pencernaan bagian atas (Sukandar dkk., 2009; Katzung dkk., 2013).

2.2.4 Resistensi

Fluorokuinolon khususnya ciprofloxacin biasa digunakan dalam terapi penyakit akibat *S.dysenteriae*, namun selama terapi fluorokuinolon organisme resisten muncul pada sekitar satu dari setiap 10^7 - 10^9 organisme (Katzung dkk., 2013). Fluorokuinolon relatif mudah mengalami resisten karena proses resistensinya diperantarai oleh plasmid. Mekanisme resistensi yang diperantarai oleh plasmid yang pertama yaitu menggunakan protein Qnr untuk melindungi DNA girase dari kerja fluorokuinolon sehingga DNA girase tidak dapat dihambat. Kedua, variasi dari aminoglikosida asetiltransferase yang mampu secara langsung memodifikasi ciprofloxacin dengan cara mengasetilasi ciprofloxacin sehingga aktivitasnya turun 4 kali lipat (Dalhoff, 2012). Kedua mekanisme diatas akan menyebabkan resisten derajat rendah yang kemudian memicu resistensi derajat tinggi dengan terjadinya mutasi titik. Apabila terjadi resistensi terhadap satu fluorokuinolon, terutama jika derajat tinggi maka umumnya menghasilkan resistensi silang pada semua anggota kelompok obat ini (Katzung dkk., 2013).

Terdapat juga mekanisme resistensi tambahan yang sering kali terjadi pada bakteri Gram negatif yaitu kombinasi *efflux pump* dan menurunnya *drug uptake* karena membran barrier yang sulit ditembus (Al-Alak, 2015). Terdapat 2 tipe *efflux pump* obat yang dikenal sebagai faktor penyebab dari resistensi fluokuinolon yaitu OqxAB dan Qep. Kedua efflux tersebut dapat muncul di plasmid apabila terjadi mutasi gen QepA (Dalhoff, 2012).

2.2.5 Sediaan

Ciprofloxacin tersedia dalam sediaan oral dengan dosis 250-750 mg. Pada sediaan parenteral intravena tersedia dalam dosis 200-400 mg (Sukandar dkk., 2009).

2.2.6 Efek Samping Dan Interaksi Obat

Reaksi merugikan yang sering muncul akibat konsumsi ciprofloxacin pada 3-17% pasien yaitu rasa mual, muntah, atau sakit perut ringan (Goodman, 2011). Terkadang juga timbul nyeri kepala, pusing bergoyang, insomnia, ruam kulit, atau gangguan tes fungsi hati (Katzung dkk., 2013). Pada pasien dengan defisiensi Glukosa 6 Fosfat Dehidrogenae (G6DP) dapat timbul reaksi anafilaktik ketika menggunakan ciprofloxacin (Sukandar dkk., 2009).

Tidak dianjurkan untuk anak-anak karena dapat merusak tulang rawan yang sedang tumbuh dan menyebabkan atropati namun kini muncul kesepakatan bahwa fluoroquinolon dapat digunakan pada anak untuk beberapa kasus seperti infeksi *Pseudomonas* pada pasien dengan fibrosis kistik (Katzung dkk., 2013). Pada anak dengan kistik fibrosis yang menggunakan ciprofloxacin menunjukkan gejala gangguan sendi yang *reversibel* (Goodman, 2008). Ciprofloxacin dapat meningkatkan risiko kristaluria bila terjadi alkalinisasi urin sehingga diperlukan konsumsi air putih yang cukup (Sukandar dkk., 2009).

Interaksi ciprofloxacin bersama analgetika non steroid dapat meningkatkan risiko kejang sedangkan bila diberikan bersama dengan opioid dapat menurunkan kadar ciprofloxacin pada plasma. Efek antikoagulan warfarin dan nikumolon serta efek antidiabetik dari sulfonilurea dapat ditingkatkan oleh ciprofloxacin. Preparat besi oral dan sukralfat mengurangi absorpsi ciprofloxacin. Penggunaan obat ini bersama urikosuria probenisisid dapat menurunkan sekresinya (Sukandar dkk., 2009).

2.3 *Shigella dysenteriae*

2.3.1 Morfologi dan Taksonomi

Shigella dysenteriae merupakan bakteri Gram negatif yang ramping, berbentuk batang, tidak berflagella, dan ukuran 0,5-0,7 μm x 2-3 μm . Sifat pertumbuhannya aerob dan fakultatif anaerob. pH pertumbuhan 6,4-7,8, suhu pertumbuhan optimum 37°C. Pada saat dikultur, koloni bakteri ini terlihat cembung, bundar, transparan, tepi berbatas tegas dan dapat mencapai diameter 2 mm selama 24 jam (Brooks dkk., 2013; Syahrurachman dkk., 2010).

Klasifikasi bakteri ini adalah sebagai berikut (Pratiwi, 2015):

Kingdom	: Prokaryota
Filum	: Bacteriophyta
Kelas	: Gammaproteobacteria
Ordo	: Eubacteriales
Famili	: Bacteriaceae
Genus	: <i>Shigella</i>
Spesies	: <i>Shigella dysenteriae</i>

2.3.2 Patogenitas

Shigella mampu menginvasi permukaan sel epitel kolon, jarang menembus sampai melewati pembuluh darah sehingga tidak ditemukan pada biakan darah. Bakteri ini lebih berbahaya daripada *Enterobacteriaceae* lain karena hanya dengan 10^3 organisme saja mampu menyebabkan penyakit (Sari, 2015).

Tempat perlekatan bakteri ada pada sel M di *Peyer Patches* kolon tetapi belum diketahui bagaimana bakteri non-motil tersebut dapat mencapai dan melekat pada sel M (Greenwood, 2007). Setelah menginvasi kolon, terjadilah perubahan permukaan mikrovili dari *brush border* yang menyebabkan pembentukan vesikel pada membran mukosa. Selanjutnya *S. dysenteriae* dapat menghancurkan vakuola fagositik intraselular, memasuki sitoplasma untuk memperbanyak diri dan menginvasi sel yang berdekatan. Kemampuan menginvasi sel epitel ini dihubungkan dengan adanya plasmid besar yang mampu mengenali

bagian luar membran protein seperti plasmid antigen invasi (*invasion plasmid antigen*)(Nafianti dkk., 2005).

Sel epitel akan mati dan terjadi ulserasi serta inflamasi mukosa, setelah itu akan terbentuk semakin banyak mikro abses pada epitel usus halus dan ileum terminal sehingga menyebabkan peradangan hebat, ulserasi permukaan, perdarahan dan pembentukan pseudomembran. Pseudomembran adalah kumpulan fibrin, leukosit, debris sel, membran mukosa yang mengalami nekrosis dan bakteri. Ketika proses invasi selesai, jaringan granulasi akan mengisi ulkus dan terbentuklah jaringan parut.

Shigella yang ada di dalam sel yang mengalami inflamasi tersebut akan menghasilkan 3 macam ekso-toksin yaitu neurotoksik, enterotoksik dan sitotoksik. Toksin yang terbentuk inilah yang menimbulkan berbagai gejala shigellosis, seperti demam, malaise, dan nyeri otot. Gejala lain yang ikut menyertai infeksi *S. dysenteriae* yaitu nyeri perut, *tenesmus ani*, dan tinja lembek bercampur pus, mukus atau darah.

Shigella dysenteriae tipe 1 menghasilkan suatu sitotoksin protein poten yang dikenal dengan toksin Shiga yang terdiri dari dua struktur sub unit, yaitu:

a. Subunit fungsional. Pada sitoplasma subunit fungsional akan mengkatalisasi dan menghidrolisis RNA 28S dari subunit 60S ribosom sehingga menyebabkan hambatan pada sintesis protein yang bersifat permanen. Hambatan tersebut tentu saja akan menyebabkan kematian sel.

b. Sub unit pengikat. Bagian sub unit pengikat merupakan suatu glikolipid Gb3 (globotriaosilseramid) yang berfungsi untuk mengikat reseptor seluler b spesifik pada membran sel sasaran. Pengikatan ini akan diikuti oleh pengaktifan mediator reseptor endositosis dari toksin yang dihasilkan (Nafianti dkk., 2005).

2.3.3 Resistensi

Terdapat berbagai laporan yang menyatakan resistensi antimikroba terhadap Shigella dapat dipindahkan dari Shigella ke *E.coli* dan sebaliknya melalui konjugasi. Resistensi dan virulensi Shigella terhadap antimikroba dipengaruhi oleh beberapa hal berikut ini (Nafianti dkk., 2005):

a. Ada tidaknya plasmid mempengaruhi virulensi bakteri karena plasmid berperan dalam mengenali sel epitel sehingga *Shigella* yang tidak mempunyai plasmid berarti tidak virulen.

b. Mutasi aktin intraselular (*IcsA*) akan menurunkan virulensi bakteri karena terjadi penurunan kemampuan bakteri untuk berpindah dan berkembang dalam intraselular.

c. *Shigella* merupakan bakteri yang berdiam dalam lapisan epitel dan mampu melindungi diri dari kontak dengan lingkungan dan tidak pernah menembus mukosa untuk menjadi infeksi sistemik. Sifat ini menyebabkan *Shigella* sulit diobati dan sering menimbulkan resistensi.

2.4 Uji Sensitivitas Antibiotik

2.4.1 Metode Difusi

Metode difusi terdiri atas tiga jenis yaitu metode silinder, metode sumur, dan metode *disk diffusion*. Metode sumur dilakukan dengan cara membuat lubang pada media yang telah ditumbuhi bakteri. Kemudian lubang diisi dengan antimikroba yang akan diuji. Metode *disk diffusion* dilakukan dengan cara menggunakan piringan yang telah berisi agen antimikroba, setelah itu diletakkan pada media yang sudah ditumbuhi bakteri sehingga antimikroba dapat berdifusi pada media tersebut. Metode silinder dilakukan dengan cara meletakkan silinder yang terbuat dari besi tahan karat dengan posisi tegak di atas media agar yang telah diinokulasi dengan bakteri. Selanjutnya tiap silinder diisi dengan larutan uji dan diinkubasi. Setelah diinkubasi, dilakukan pengamatan pada pertumbuhan bakteri dengan melihat ada tidaknya zona bening di sekeliling silinder (Prayoga, 2013).

2.4.2 Metode Dilusi

Metode dilusi terdiri atas 2 jenis yaitu metode dilusi cair (*broth dilution test*) dan metode dilusi padat (*solid dilution test*). Kedua metode ini hampir sama, hanya yang membedakan pada metode dilusi padat yaitu satu konsentrasi antimikroba yang diuji dapat digunakan untuk menguji beberapa mikroba uji lain.

Prinsip metode dilusi yaitu antimikroba diencerkan hingga didapatkan beberapa konsentrasi. Kemudian beberapa konsentrasi tersebut masing-masing ditambahkan suspensi bakteri uji dalam media cair. Selanjutnya, diinkubasi dan diamati adakah kekeruhan yang menunjukkan ada tidaknya pertumbuhan bakteri. Larutan uji senyawa antibakteri pada kadar terkecil tanpa ada pertumbuhan bakteri uji yang ditandai dengan jernihnya larutan tersebut ditetapkan sebagai kadar hambat minimum (KHM). Larutan yang ditetapkan sebagai KHM dikultur ulang pada media cair tanpa penambahan bakteri uji ataupun senyawa antimikroba lain, kemudian diinkubasi selama 18-24 jam. Media cair yang tetap terlihat jernih setelah diinkubasi ditetapkan sebagai kadar bunuh minimum (KBM) (Prayoga, 2013).

2.5 Kombinasi Obat

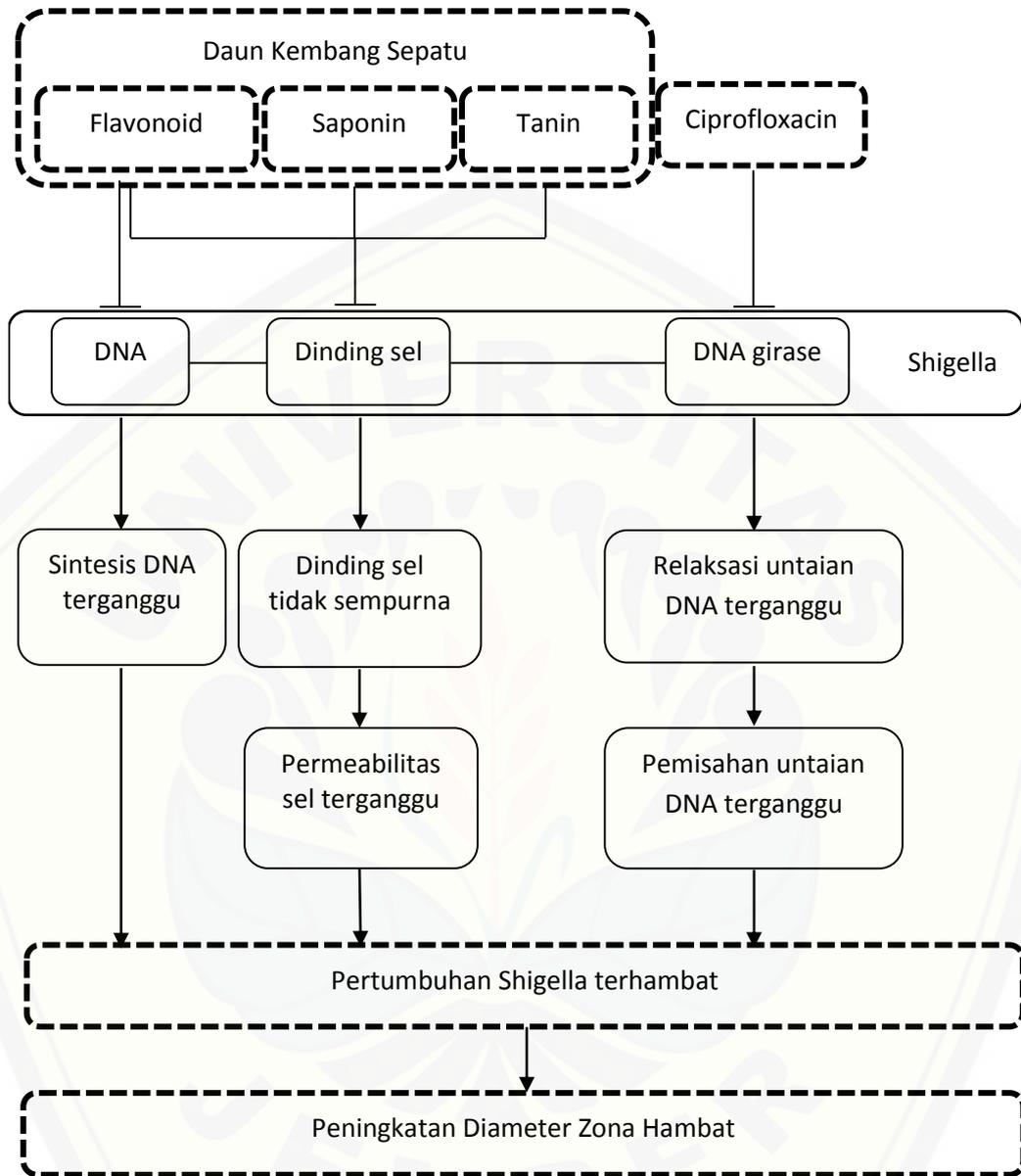
Tujuan terapi kombinasi antibiotik antara lain sebagai terapi empiris terhadap infeksi yang belum jelas kuman penyebabnya, untuk infeksi kuman multipel, untuk meningkatkan aktivitas antimikroba (efek sinergisme obat), dan untuk mencegah munculnya resistensi kuman. Penggunaan kombinasi obat bertujuan mampu mengenai banyak target, menyerang berbagai subpopulasi, atau berbagai penyakit. Penggunaan kombinasi obat dengan berbeda mekanisme atau aksi kerja dapat mempengaruhi secara langsung terhadap target utama atau penyakit dan mampu mengobati lebih efektif. Kombinasi obat yang baik dapat meningkatkan efikasi dari efek terapeutik, mampu menurunkan dosis obat namun kerjanya meningkatkan atau menjaga efek yang sama untuk mencegah toksisitas, meminimalisir atau memperlambat resistensi obat, dan mampu bekerja secara selektif target. Keuntungan pengobatan kombinasi inilah yang menyebabkan penggunaan kombinasi obat sering diterapkan secara luas dan menjadi pilihan terapi untuk mengobati berbagai penyakit mematikan seperti kanker dan penyakit infeksi termasuk AIDS (Chou, 2006).

Terdapat beberapa istilah dari kombinasi obat yaitu tentang sinergisme dan peningkatan obat (*enhancement*). Ketika obat A dan B dikombinasi namun kedua sifat obat berbeda (misal obat A antibiotik dan obat B non-antibiotik) sehingga

efek kombinasi kedua obat tersebut melebihi efek obat A maka kombinasi keduanya disebut peningkatan obat (*enhancement*). Ketika obat A dan B dikombinasi yang mana keduanya memiliki sifat yang sama (misal keduanya antibiotik) maka efek kombinasi kedua obat tersebut dinyatakan sebagai sinergis, aditif (konstan), atau antagonis. Suatu kombinasi obat disebut sinergis apabila kombinasi lebih dari satu obat tersebut memiliki target yang sama, secara aritmatik hubungan kombinasi obat A dan B disebut sinergis apabila $A+B=4$. Kombinasi adiktif apabila $A+B=2$ sedangkan kombinasi antagonis terjadi apabila $A+B \leq 1$ (Chou, 2006).

Suatu obat dikatakan sinergis jika kombinasi dua atau lebih antimikroba memiliki efek inhibisi (pemusnahan) yang lebih besar secara bermakna dibandingkan jika digunakan secara individual (tunggal). Terjadi antagonisme jika kombinasi dua atau lebih antimikroba memiliki efek inhibisi (pemusnahan) lebih rendah secara bermakna daripada ketika obat-obat tersebut digunakan secara individual (tunggal) (Katzung dkk., 2013).

2.6 Kerangka Konsep



Keterangan:

- : tidak diteliti
- - - : diteliti
- | : menghambat
- > : akibat

Gambar 2.3 Kerangka konsep penelitian

Struktur bakteri diantaranya terdiri atas dinding sel, DNA dan komponen lain seperti enzim (DNA girase dan topoisomerase IV). Ciprofloxacin sebagai antibiotik akan menghambat enzim yang dibutuhkan bakteri untuk proses transkripsi dan replikasi sel bakteri, sedangkan ekstrak daun kembang sepatu yang mengandung komponen senyawa flavonoid dapat bertindak sebagai antibakteri dengan cara menghambat sintesis asam nukleat dan merusak membran sel bakteri baik lapisan luar maupun dalam dengan cara melarutkan struktur lemaknya. Saponin dan tanin berkerja dengan mempengaruhi permeabilitas dinding sel sehingga aktivitas hidup bakteri terganggu.

2.7 Hipotesis Penelitian

Hipotesis pada penelitian ini yaitu terdapat efek pada pemberian kombinasi ekstrak metanol daun kembang sepatu (*Hibiscus rosasinensis* L.) dan ciprofloxacin terhadap pertumbuhan bakteri *S. dysenteriae*.

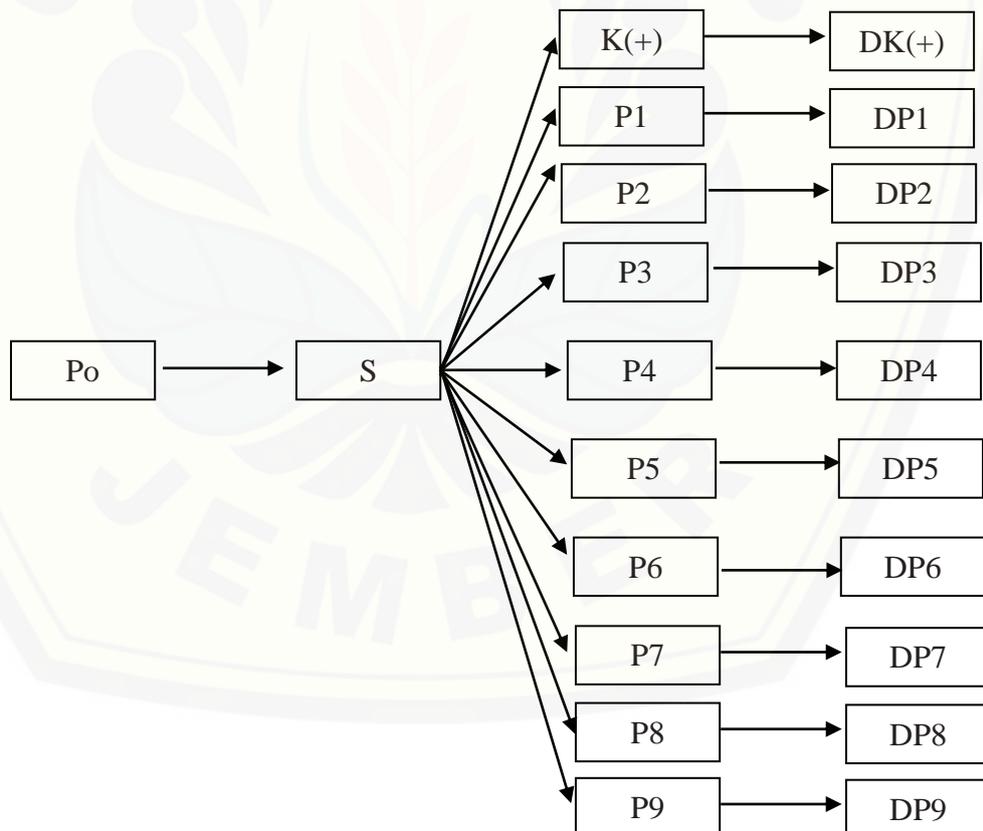
BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian semu (*quasi experimental design*) laboratorium. Hal tersebut dikarenakan perlakuan dan lokasi penelitian bertempat di laboratorium. Dalam penelitian ini tidak dilakukan randomisasi karena seluruh sampel telah homogen (Pratiknya, 2008).

3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini yaitu *post test only control group design*. Dalam penelitian ini sampel dibagi menjadi 1 kelompok kontrol dan 9 kelompok perlakuan. Rancangan penelitian ditunjukkan pada Gambar 3.1



Keterangan:

Po : Populasi

S : Sampel

- K(+): Kontrol positif dengan *S. dysenteriae* + ciprofloxacin 5 µg/5 µL
- P1: Perlakuan 1 *S. dysenteriae* + ciprofloxacin 5 µg/5 µL + ekstrak daun kembang sepatu 0,5 µg/mL
- P2: Perlakuan 2 *S. dysenteriae* + ciprofloxacin 5 µg/5 µL + ekstrak daun kembang sepatu 1 µg/mL
- P3: Perlakuan 3 *S. dysenteriae* + ciprofloxacin 5 µg/5 µL + ekstrak daun kembang sepatu 2 µg/mL
- P4: Perlakuan 4 *S. dysenteriae* + ciprofloxacin 5 µg/5 µL + ekstrak daun kembang sepatu 4 µg/mL
- P5: Perlakuan 5 *S. dysenteriae* + ciprofloxacin 5 µg/5 µL+ ekstrak daun kembang sepatu 8 µg/mL
- P6: Perlakuan 6 *S. dysenteriae* + ciprofloxacin 5 µg/5 µL+ ekstrak daun kembang sepatu 16 µg/mL
- P7: Perlakuan 7 *S. dysenteriae* + ciprofloxacin 5 µg/5 µL+ ekstrak daun kembang sepatu 32 µg/mL
- P8: Perlakuan 8 *S. dysenteriae* + ciprofloxacin 5 µg/5 µL+ ekstrak daun kembang sepatu 64 µg/mL
- P9: Perlakuan 9 *S. dysenteriae* + ciprofloxacin 5 µg/5 µL+ ekstrak daun kembang sepatu 128 µg/mL
- DK(-): Data Kontrol Negatif dengan *Shigella dysenteriae* + ciprofloxacin 5 µg/5 µL
- DP1: Data Perlakuan 1 *S. dysenteriae* + ciprofloxacin 5 µg/5 µL+ ekstrak daun kembang sepatu 0,5 µg/mL
- DP2: Data Perlakuan 2 *S. dysenteriae* + ciprofloxacin 5 µg/5 µL+ ekstrak daun kembang sepatu 1 µg/mL
- DP3: Data Perlakuan 3 *S. dysenteriae* + ciprofloxacin 5 µg/5 µL+ ekstrak daun kembang sepatu 2 µg/mL
- DP4: Data Perlakuan 4 *S. dysenteriae* + ciprofloxacin 5 µg/5 µL+ ekstrak daun kembang sepatu 4 µg/mL
- DP5: Data Perlakuan 5 *S. dysenteriae* + ciprofloxacin 5 µg/5 µL+ ekstrak daun kembang sepatu 8 µg/mL
- DP6: Data Perlakuan 6 *S. dysenteriae* + ciprofloxacin 5 µg/5 µL+ ekstrak daun kembang sepatu 16 µg/mL
- DP7: Data Perlakuan 7 *S. dysenteriae* + ciprofloxacin 5 µg/5 µL+ ekstrak daun kembang sepatu 32 µg/mL
- DP8: Data Perlakuan 8 *S. dysenteriae* + ciprofloxacin 5 µg/5 µL+ ekstrak daun kembang sepatu 64 µg/mL
- DP9: Data Perlakuan 9 *S. dysenteriae* + ciprofloxacin 5 µg/5 µL+ ekstrak daun kembang sepatu 128 µg/mL

Gambar 3.1 Rancangan penelitian

3.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini telah dikerjakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember, sedangkan ekstraksi dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember. Alokasi waktu yang dibutuhkan dari bulan Oktober-November 2017.

3.4 Ukuran Sampel

Sampel dalam penelitian ini yaitu suspensi bakteri *S. dysentriae* yang didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember dan sudah disesuaikan dengan larutan standar 0,5 Mc Farland (1×10^8 colony forming unit (CFU)/mL). Pada penelitian ini telah dilakukan penghitungan jumlah sampel sesuai dengan rumus Federer sebagai berikut (Hanifah, 2003):

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

$$(10-1)(r-1) \geq 15$$

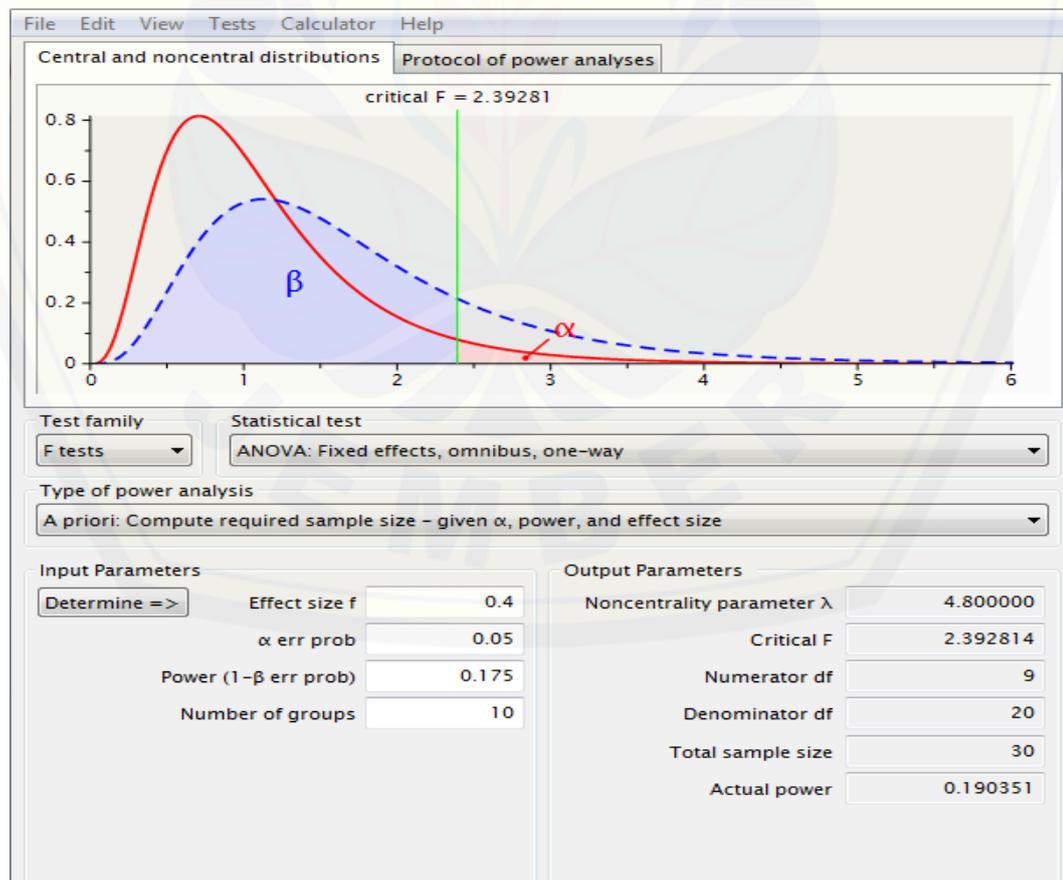
$$9(r-1) \geq 15$$

$$9r \geq 20$$

$$r \geq 2,67 \rightarrow 3 \text{ (Hasil pembulatan)}$$

Keterangan :
t: jumlah kelompok
r: jumlah sampel

Berdasarkan rumus diatas, penelitian dilakukan dengan jumlah 10 kelompok yang terdiri atas 9 kelompok perlakuan dan 1 kelompok kontrol sehingga total jumlah sampel yang dibutuhkan sebanyak 30 sampel.



Gambar 3.2 Jumlah total sampel dan *power analysis* berdasarkan G*Power

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu konsentrasi ekstrak metanol daun kembang sepatu (*Hibiscus rosasinensis* L.) dengan variasi konsentrasi yaitu 0,5 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL, 4 µg/mL, 8 µg/mL, 16 µg/mL, 32 µg/mL, 64 µg/mL, dan 128 µg/mL dan ciprofloxacin sebesar 5 µg/5 µL.

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu diameter zona hambat pada media *Mueller Hinton Agar* (MHA).

3.5.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol pada penelitian ini yaitu bakteri *S. dysenteriae*, media *Mueller Hinton Agar* (MHA), inkubator, suhu, waktu inkubasi, aquades steril, jenis daun kembang sepatu (*Hibiscus rosasinensis* L.) dan metode pengukuran diameter zona hambat.

3.6 Definisi Operasional

Definisi operasional digunakan untuk menjelaskan gambaran mengenai variabel dan skala pengukuran pada penelitian. Pada penelitian ini diberikan penjelasan operasional variabel penelitian sebagai berikut:

3.6.1 Ciprofloxacin

Antibiotik yang digunakan pada penelitian ini yaitu ciprofloxacin 500 mg berbentuk tablet produksi PT.Bernofarm. Pelarut yang cocok digunakan untuk melarutkan ciprofloxacin yaitu aquades (Cayman, 2016). Obat tersebut digerus terlebih dahulu dan dilarutkan menggunakan aquades kemudian dibuat konsentrasi 5 µg/5 µL yang disesuaikan dengan *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI) 2014. CLSI menyatakan bahwa potensi ciprofloxacin terhadap *S.dysenteriae* yaitu 5 µg/5 µL.

3.6.2 Ekstrak Daun Kembang Sepatu (*Hibiscus rosasinensis* L.)

Ekstrak daun kembang sepatu adalah hasil dari ekstraksi 500 gram simplisia daun kembang sepatu menggunakan metanol 80% dengan metode maserasi sehingga didapatkan ekstrak kental dengan satuan gram. Konsentrasi ekstrak yang digunakan yaitu 0,5 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL, 4 µg/mL, 8 µg/mL, 16 µg/mL, 32 µg/mL, 64 µg/mL, dan 128 µg/mL yang diperoleh dari penelitian sebelumnya.

3.6.3 Kombinasi Ekstrak Daun Kembang Sepatu dengan Ciprofloxacin

Kombinasi ekstrak daun kembang sepatu dan ciprofloxacin merupakan penggabungan antara ciprofloxacin konsentrasi 5 µg/5 µL sebanyak 50 µL dan 50 µL ekstrak daun kembang sepatu dengan serial konsentrasi 0,5 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL, 4 µg/mL, 8 µg/mL, 16 µg/mL, 32 µg/mL, 64 µg/mL, dan 128 µg/mL yang dilakukan dengan metode difusi sumuran.

3.6.4 Diameter Zona Hambat

Diameter zona hambat *S. dysenteriae* adalah daerah jernih disekitar sumuran pada media MHA yang menandakan terhambatnya pertumbuhan bakteri *S. dysenteriae*. Diameter zona hambat tersebut diukur menggunakan jangka sorong dengan satuan milimeter yang ditempelkan pada bagian bawah *plate*. Apabila zona yang terbentuk tidak berbentuk lingkaran maka diukur pada sisi-sisi yang berbeda dan diukur sebanyak 3 kali kemudian dihitung rata-ratanya (CLSI, 2014).

3.7 Alat dan Bahan Penelitian

3.7.1 Alat penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain:

- a. Alat untuk peremajaan bakteri yaitu *biosafety cabinet*.
- b. Alat untuk pengembangbiakan bakteri adalah cawan petri, ose, tabung reaksi, mikropipet, lidi kapas, mortar, spiritus, lampu Bunsen, korek api, dan inkubator.

- c. Alat untuk pengukuran sensitivitas bakteri adalah jangka sorong, penggaris, selotip, gunting, label, pelubang kertas, besi pelubang media MH, *microtiter plate* dan neraca.
- d. Alat untuk sterilisasi alat penelitian adalah sterilisator, oven, aluminium foil, dan autoklaf.
- e. Alat-alat lain: kertas saring, *beker glass*, *centrifuge*, vial, tabung reaksi, rak tabung reaksi, vortex, timbangan, inkubator, *rotary evaporator*, corong *Buchner*, *stopwatch*, dan tabung *Erlenmeyer*.

3.7.2 Bahan penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain:

- a. Bahan untuk pembuatan ekstrak daun kembang sepatu adalah daun kembang sepatu dan metanol 80%.
- b. Bahan untuk pelarut ekstrak kental adalah dimetil superoksida (DMSO) 100% yang kemudian diencerkan menjadi DMSO 10%.
- c. Bahan untuk kelompok kontrol negatif dan kelompok perlakuan adalah ciprofloxacin sediaan tablet. Sediaan tersebut dipilih untuk memudahkan peneliti dalam membuat konsentrasi 5 µg/mL dan disesuaikan dengan dosis terapi ciprofloxacin.
- d. Bahan untuk melarutkan ciprofloxacin adalah aquabides steril.
- e. Bahan untuk pembuatan media adalah serbuk *Nutrient Agar* (NA) dan serbuk *Mueller Hinton Agar* (MHA).

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Uji Kelayakan Etik

Mengirim berkas pengajuan persetujuan etik ke Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Surat persetujuan etik terlampir pada Lampiran 3.1.

3.8.2 Uji Determinasi

Daun kembang sepatu (*Hibiscus rosasinensis* L.) didapatkan dari pusat perkebunan dan perkembangbiakan tanaman kembang sepatu di Kota Batu, Malang, Jawa Timur. Uji determinasi dilakukan untuk mengetahui bahwa sampel yang diteliti memang merupakan daun dari tanaman kembang sepatu. Uji determinasi dilakukan di Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Jurusan Biologi Universitas Jember. Surat uji determinasi terlampir pada Lampiran 3.2.

3.8.3 Persiapan dan Pemakaian Alat Pelindung Diri (APD)

Alat perlindungan diri peneliti yang diperlukan terdiri atas jas lab, sarung tangan, dan masker untuk memastikan keamanan peneliti karena kontak dengan agen infeksius (Perwitasari dan Anwar, 2006). Serta semua tindakan yang kontak dengan bakteri dilakukan pada *biosafety cabinet* di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember. *Biosafety cabinet* yang tersedia menggunakan prinsip radiasi sinar ultraviolet sehingga sebelum digunakan oleh peneliti kabin tersebut dihidupkan terlebih dahulu selama 30 menit dengan tujuan agar kontaminan yang dapat mempengaruhi penelitian dapat disingkirkan.

3.8.4 Persiapan Alat Penelitian

Seluruh peralatan yang digunakan dicuci bersih terlebih dahulu kemudian dikeringkan dan dibungkus dengan kertas HVS bersih. Alat-alat yang terbuat dari kaca disterilkan dengan menggunakan oven pada suhu 180° selama 2 jam. Alat-alat logam disterilkan dengan cara dipijarkan menggunakan lampu spiritus, sedangkan untuk alat-alat yang tidak tahan pemanasan dengan suhu tinggi, disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C tekanan 2 atm selama 15 menit (Suswati dan Mufida, 2009; Nurfadillah, 2013).

3.8.5 Pembuatan Media *Nutrient Agar* (NA) dan Pemeliharaan Bakteri

Media dalam bentuk serbuk ditimbang sesuai dengan kebutuhan dan dilarutkan dalam aquades dan dilakukan proses pembuatan sesuai dengan

prosedur dalam kemasan. Kemudian media disterilkan di dalam autoklaf pada suhu 121° C selama 20 menit dan didinginkan sampai suhu 60° C. Selanjutnya media dituang ke dalam cawan petri (CLSI, 2014).

Bakteri induk *S. dysenteriae* diambil dengan menggunakan ose kemudian digoreskan pada media NA. Kemudian media diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Bakteri kemudian disimpan dalam suhu 4° C dan digunakan sebagai *stock culture* bakteri (Wafa, 2011).

3.8.6 Pembuatan Media *Mueller Hinton Agar* (MHA)

Media yang digunakan yaitu media MHA berbentuk serbuk yang selanjutnya disiapkan sesuai petunjuk yang ada pada kemasan. 3,4 gram agar *Mueller Hinton* dimasukkan dalam tabung *Erlenmeyer* kemudian ditambahkan 1 L aquades ke dalam tabung, dicampur dan diaduk merata. Selanjutnya dipanaskan sampai mendidih dan larut kemudian dimasukkan ke dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 30 menit. Setelah proses autoklaf, 20 mL larutan dalam tabung *Erlenmeyer* dituangkan ke dalam cawan petri steril hingga memadat selama 10 menit lalu dimasukkan ke dalam inkubator dengan suhu 37°C. Media yang telah jadi disimpan dengan suhu 2-8° C (CLSI, 2012). Kemudian media dilubangi menggunakan besi pelubang media untuk membentuk sumuran dengan banyaknya disesuaikan perlakuan dan tujuan peneliti. Diameter dari pelubang media disesuaikan dengan diameter *disk* (Prayoga, 2013).

3.8.7 Pembuatan Suspensi Bakteri

Suspensi *S. dysenteriae* dibuat dengan cara mengambil satu ose kuman dari media padat miring kemudian dimasukkan dan dihomogenkan ke dalam 5 mL *Aquadest steril* menggunakan vortex selama 30 detik. Suspensi kemudian disesuaikan dengan kekeruhan standar berkonsentrasi 0,5 Mc Farland (1×10^8 *colony forming unit* (CFU)/mL). Larutan 0,5 Mc. Farland adalah larutan kontrol yang dibuat dengan mencampurkan 0,5 mL BaCl₂ 0,048 M dan 99,5 mL H₂SO₄ 0,18 M, berfungsi sebagai standar untuk menetapkan kekeruhan suspensi bakteri dan setara dengan 1×10^8 CFU/mL. Penyesuaian suspensi bakteri dengan standar

dilakukan dengan cara membandingkan kekeruhannya dengan kertas berlatar putih yang memiliki garis hitam (CLSI, 2014).

3.8.8 Pembuatan Larutan Ekstrak Daun Kembang Sepatu

Eksraksi daun kembang sepatu menggunakan metode maserasi. Semua sampel daun masih dalam kondisi segar dicuci bersih menggunakan air mengalir sebanyak 3-4 kali agar kotoran yang menempel di daun tersingkir lalu ditiriskan. Kemudian daun dipotong dengan ukuran tertentu (± 5 cm) (Mariyani, 2016). Daun yang sudah dipotong-potong dikeringkan di tempat teduh (diangin-anginkan) hingga menjadi kering. Pengeringan dilakukan dalam waktu ± 10 hari dengan tidak menggunakan bantuan sinar matahari karena hal tersebut akan merusak kandungan dalam daun (Ghaffar, 2012).

Sebanyak 500 gr daun kembang sepatu yang sudah kering diblender hingga menjadi serbuk halus kemudian disimpan di tas polietilen untuk penggunaan selanjutnya. Simplisia tadi direndam selama 3 hari menggunakan metanol 80 % sebanyak 2 L (1:4) dengan sesekali diaduk (Patel, 2012; Kumari, 2015). Selama perendaman tutup bagian atas wadah dengan alumunium foil dengan rapat (Kairupan, 2014). Selanjutnya dilakukan penyaringan dengan kain flanel atau *Whatman filter paper*.

Masing-masing filtrat yang diperoleh kemudian diuapkan pelarutnya dengan *rotary evaporator* pada suhu antara 40° - 50° C dengan kecepatan putar 6 *rotation per minutes* (rpm) selama 3-4 jam (Nurlela, 2011; Kumari, 2015). Ekstrak yang sudah siap diuji disimpan dalam lemari es dengan suhu -4° C (Khan, 2014).

Masing-masing ekstrak dibuat 9 seri konsentrasi (0,5 μ g/mL, 1 μ g/mL, 2 μ g/mL, 4 μ g/mL, 8 μ g/mL, 16 μ g/mL, 32 μ g/mL, 64 μ g/mL, dan 128 μ g/mL) dengan menggunakan pelarut DMSO 10%. Ambil dan timbang 1 mg ekstrak kemudian ditambahkan 1 mL DMSO 10% sehingga menjadi larutan berkonsentrasi 1 mg/mL. Ambil 1 mL larutan berkonsentrasi 1 mg/mL tadi kemudian diencerkan dengan menambahkan 6, 8125 mL DMSO 10% sehingga diperoleh konsentrasi 128 μ g/mL. Ambil 1 mL larutan berkonsentrasi 128 μ g/mL tadi dan tambahkan 1 mL DMSO 10% sehingga didapatkan konsentrasi 64

$\mu\text{g/mL}$. Lakukan penambahan 1 mL pada tiap konsentrasi sebelumnya hingga didapatkan semua seri konsentrasi, sedangkan volume ekstrak yang diberikan pada tiap kelompok perlakuan yaitu sebanyak 50 μL /sumur.

3.8.9 Penilaian Derajat Keasaman (pH) Ekstrak Daun Kembang Sepatu

Setiap seri konsentrasi diukur derajat keasamannya menggunakan *pH Universal Test*. *pH stick* dicelupkan ke masing-masing konsentrasi perlakuan selama beberapa detik kemudian ditiriskan dan diangin-anginkan. Penilaian pH ditentukan dengan membandingkannya dengan standar pH yang ada pada kemasan. Penilaian pH bertujuan untuk mengetahui pengaruh derajat keasaman ekstrak terhadap hasil penelitian.

3.8.10 Pembuatan *Stock Solution* Ciprofloxacin

Aquades steril diperlukan dalam pembuatan *stock solution* ciprofloxacin sebagai pelarut. Berdasarkan CLSI, dalam satu *disk* (daya serap sebesar 5 μL) ciprofloxacin dosis potensinya 5 μg untuk menghambat pertumbuhan bakteri *S.dysenteriae* sehingga pada penelitian dilakukan pengenceran untuk mendapatkan konsentrasi ciprofloxacin 5 $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$ dengan volume yang dimasukkan ke dalam tiap sumuran sebanyak 50 μL . Ciprofloxacin 500 mg tablet digerus menjadi serbuk lalu ditimbang sebanyak 10 mg dan dilarutkan dengan aquades steril sebanyak 10 mL sehingga konsentrasinya menjadi 1 mg/mL yang setara dengan 5 $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$. Kemudian diambil 50 μL dari konsentrasi tersebut lalu dimasukkan pada *microtiter plate* untuk dicampur dengan 50 μL ekstrak dengan cara *pipetting* agar kombinasi keduanya menjadi homogen.

3.8.11 Metode Difusi Sumuran

Uji kombinasi ciprofloxacin dan ekstrak daun kembang sepatu dilakukan dengan metode difusi sumuran. Lidi kapas dicelupkan pada suspensi bakteri hingga seluruh bagian kapas tercelup kemudian kapas tersebut ditiriskan dengan cara menekannya ke dinding dalam tabung suspensi agar media cair tidak ikut terbawa. Selanjutnya lidi kapas diusap pada seluruh permukaan media MHA

secara merata. Kemudian media didiamkan 3-5 menit pada suhu ruang supaya kering dan bakteri menempel pada permukaan media (Fitrah dkk., 2013).

Kemudian dibuat sumuran dengan besi pelubang media dan dilakukan pelabelan di bagian bawah *plate* sesuai jumlah kelompok. Ciprofloxacin sebanyak 50 μ L dengan konsentrasi 5 μ g/5 μ L dimasukkan pada *well* A1-H2 di *microtiter plate*. Kemudian 50 μ L ekstrak daun kembang sepatu dengan berbagai konsentrasi dimasukkan pada *well* yang sudah berisi ciprofloxacin tadi secara berurutan lalu dilakukan *pipetting* agar kedua larutan tercampur merata. Selanjutnya media diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Diameter zona hambat yang terbentuk di sekitar sumuran setelah 24 jam diamati dengan menggunakan jangka sorong. Proses memasukkan ciprofloxacin dan ekstrak ke dalam sumur dilakukan di *biosafety cabinet* untuk meminimalisir kontaminasi (CLSI, 2014).

3.8.12 Pengukuran Diameter Zona Hambat

Parameter yang diukur yaitu diameter zona hambat berwarna jernih pada media yang menandakan terjadinya penghambatan terhadap pertumbuhan *S.dysentriae* dalam satuan milimeter (mm) dengan menggunakan bantuan jangka sorong. Pengukuran jangka sorong pada *plate* dilakukan dengan menempelkan jangka sorong pada bagian bawah *plate*. Jika zona hambat berbentuk lonjong, maka pengukuran dilakukan pada diameter pendek dan diameter panjang, kemudian keduanya ditambahkan dan dibagi 2 (Prayoga, 2013).

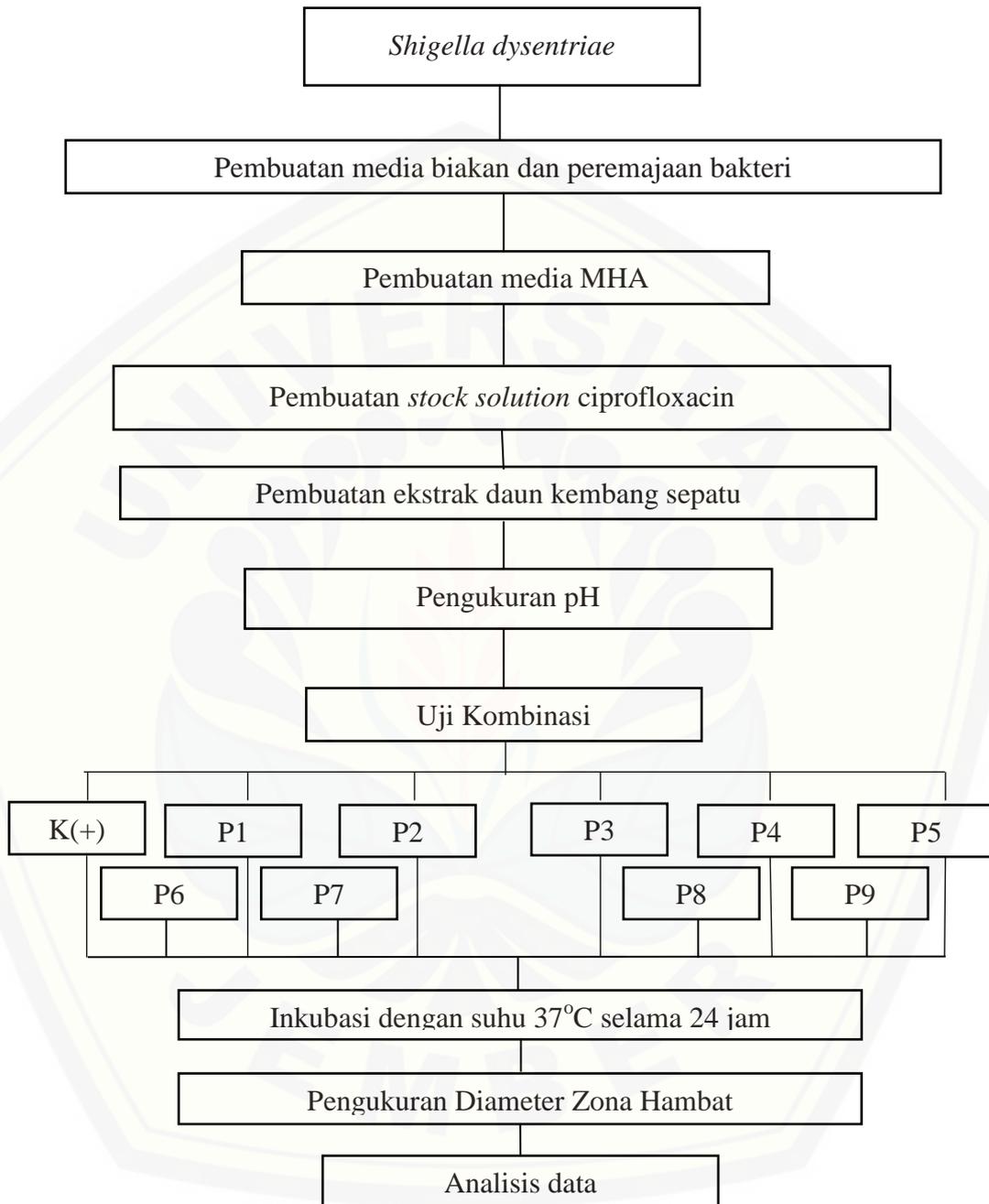
3.8.13 Pengelolaan Limbah Penelitian

Sisa sampel dan media yang telah digunakan pada penelitian di masukkan ke dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit agar bakteri mati. Semua alat yang telah digunakan dicuci bersih, dikeringkan dan disimpan kembali. Limbah cair tidak terkontaminasi dikumpulkan dan dibuang di saluran air. Limbah padat dibuang di RSUD Dr. Soebandi untuk dihancurkan dengan insenerator.

3.9 Analisis Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini berupa data kuantitatif yaitu diameter zona hambat yang kemudian dianalisis secara komputerisasi menggunakan perangkat lunak berupa program statistik. Sampel yang digunakan kurang dari 50 sehingga digunakan uji normalitas *Shapiro-Wilk* untuk mengetahui data tersebut terdistribusi normal atau tidak. Apabila nilai $p > 0,05$ maka data tersebut terdistribusi normal dan berlaku sebaliknya. Kemudian analisis data dilanjutkan dengan uji *Lavene* untuk mengetahui distribusi data yang dibandingkan mempunyai varian yang sama atau tidak (homogenitas). Apabila nilai $p > 0,05$ maka data tersebut homogen. Apabila data yang didapat terdistribusi normal dan homogen maka dilakukan analisis dengan uji parametrik *One Way ANOVA*. Uji *One Way ANOVA* digunakan untuk membandingkan lebih dari 2 kelompok yang tidak berpasangan. Apabila hasilnya signifikan dilakukan uji *Post Hoc* dengan metode *Least Significance Different* (LSD) (Dahlan, 2014).

3.10 Alur Penelitian



Gambar 3.3 Alur penelitian

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan didapatkan kesimpulan bahwa kombinasi ekstrak daun kembang sepatu dengan konsentrasi 0,5 µg/mL, 1 µg/mL, 2 µg/mL, 4 µg/mL, 8 µg/mL, 16 µg/mL, 32 µg/mL, 64 µg/mL, 128 µg/mL dan ciprofloxacin sebesar 5 µg/5µL dapat menghambat pertumbuhan *Shigella dysenteriae* secara *in vitro* namun diameter zona hambat yang terbentuk lebih kecil daripada ciprofloxacin secara tunggal.

5.2 Saran

Dari penelitian yang telah dilakukan, peneliti menyarankan beberapa hal sebagai berikut :

- a. Perlu dilakukan penelitian dengan menggunakan dosis ekstrak daun kembang sepatu yang lebih besar untuk mengetahui efek kombinasi ciprofloxacin dan ekstrak daun kembang sepatu dalam menghambat *S.dysenteriae*.
- b. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan berbagai antibiotik yang berbeda.
- c. Perlu dilakukan penelitian dengan menggunakan dua jenis sampel bakteri yang berbeda yaitu bakteri gram negatif dan positif.

DAFTAR PUSTAKA

- Adwan, G., dan M. Mhanna. 2008. Synergistic effects of plant extracts and antibiotics on *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical specimens. *Middle-East Journal of Scientific Research*. 3(3): 134-139.
- Agarwal, S., dan R. Prakash. 2014. Evaluation of antibacterial activity of Hibiscus rosa-sinensis flower extract against *E. coli* and *B. subtilis*. *Biological Forum*. 6(2):194-196.
- Ajizah, A. 2004. Sensitivitas *Salmonella typhimurium* Terhadap Ekstrak Daun *Psidium Guajava* L. *Skripsi*. Banjarmasin: Universitas Lambung Mangkurat.
- Al-Alak, S. K., R. M. S. AL-Oqaili, dan B. B. M. N. Abd-Alkhalik. 2015. Antibacterial activity of *Hibiscus rosasinensis* extract and synergistic effect with amoxicillin against some human pathogens. *American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics*. 3(1): 20-27.
- Ayu, D. P. 2013. Aktivitas Antibakteri Kombinasi Ekstrak Etanol Daun Jambu Monyet (*Anacardium occidentale* L.) Dan Vankomisin Terhadap *Staphylococcus aureus* Dan *Staphylococcus epidermidis*. *Skripsi*. Surakarta: Universitas Muhammadiyah.
- Badan Pusat Statistik. 2013. *Survei Demografi Dan Kesehatan Indonesia Tahun 2012*. Agustus. Jakarta: BPS Kementrian Kesehatan.
- Brooks, G. F., C. Carrol, J. S. Butel, S. A. Morse, dan T. A. Mietzer. 2013. *Mikrobiologi Kedokteran Jawetz, Melnick, Dan Adelberg*. Edisi 26. USA: Mc Graw Hill Lange.
- Cayman Chemical Company. 2016. *Product Information Ciprofloxacin (hydrochloride)*. USA: Cayman Chemical Company.
- Center for Disease Control and Prevention. 2017. *Infectious Diseases Related to Travel: Shigellosis*. USA: CDC.
- Chou, Ting-Chao. 2006. Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. *Pharmacol Rev* 58(3): 621-681.
- Chung, K. T., T. Y. Wong, C. Wei, Y. W. Huang, dan Y. Lin. Tannins and human health. *Review* 38(6):421-464.
- Chusnie, T. P. T., dan A. J. Lamb. 2005. Review antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 26: 343-356.

- CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute). 2012. *Performance Standart For Antimicrobial Susceptibility Testing; Approved Standard Eleventh Edition*. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standard Institute Consensus Process.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standart Institute). 2014. *Performance Standart For Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Fourth Informational Supplement*. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standard Institute Consensus Process.
- Dalhoff, A. 2012. Global Fluoroquinolone Resistance Epidemiology and Implications for Clinical Use. *Review Article Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. 20(12): 1-37.
- Falah, A. 2017. Aktivitas Antibakteri Fraksi N-Heksana Biji Bunga Matahari (*Helianthus annuus* L.) Terhadap Pertumbuhan *Salmonella typhi* Secara *In Vitro*. *Skripsi*. Jember: Fakultas Kedokteran Universitas Negeri Jember.
- Fathurrachman, D. A. 2014. Pengaruh Konsentrasi Pelarut Terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona Muricata* Linn) Dengan Metode Perendaman Radikal Bebas DPPH. *Skripsi*. Jakarta: Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Syarif Hidayatullah.
- Fitrah, I. D., Darmawi, dan Rasmaidar. 2013. Isolasi *Pasteurella* pada kuda dan sensitivitasnya terhadap antibiotik. *Jurnal Medika Veterinaria*.7(2): 121-125.
- Fitriati, S. 2012. Aktivitas Antibakteri Kombinasi Ekstrak Etanol Kulit Buah Delima (*Punica granatum* L.) dan Siprofloksasin Terhadap *Pseudomonas aeruginosa* Sensitif Dan Multiresisten Antibiotik. *Skripsi*. Surakarta: Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Goodman, L. S., dan A. Gilman. 2011. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Twelefh Edition. USA: The McGraw-Hill Companies Inc.
- Ghaffar, F. R. A., dan I. A. El-Elaimy. 2012. *In vitro*, antioxidant and scavenging activities of *Hibiscus rosa sinensis* crude extract. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2(1): 51-58.
- Greenwood, D., R. Slack, J.Pautherer, dan M. Barer. 2007. *Medical Microbiology*. Seventh Edition. USA: Elsevier.
- Hajar, S. 2011. Studi Variasi Morfologi Dan Anatomi Daun, Serta Jumlah Kromosom *Hibiscus rosasinensis* L. Di Kampus Universitas Indonesia

Depok. *Skripsi*. Depok: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

Haris, T. A., dan S., Mas'ud. 2009. Pengelolaan Cendawan *Aspergillus flavus* Pada Jagung. *Prosiding Seminar Nasional Serealia*. Balai Penelitian Tanaman: 445-449.

Kairupan, C. P., Fatmawati, dan W. A. Lolo. 2014. Uji daya hambat ekstra etanol daun kembang sepatu (*Hibiscus rosasinensi* L.) terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. *Jurnal Ilmiah Farmasi*. 3(2): 93-98.

Katzung, B. G., S. B. Masters, dan A. J. Trevor. 2013. *Farmakologi Dasar Dan Klinik*. Edisi 12. Jakarta: EGC.

Khan, Z. A., S. A. R. Naqvi¹, A. Mukhtar, Z. Hussain, S. A. Shahzad, A. Mansha, M. Ahmad, A. F. Zahoor, I. H. Bukhari, M. R. S. A. Janjua, N. M. M. Yar. 2014. Antioxidant and antibacterial activities of *Hibiscus Rosa-sinensis* Linn flower extracts. *Journal of Pharmacologic and Science*. 27(3): 469-474.

Kumari, O. I., N. B. Rao, K. Reddy. 2015. Phyto-chemical analysis and antimicrobial activity of *Hibiscus rosa-sinensis*. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*. 4(5): 766-771.

Latifah. 2015. Identifikasi Senyawa Golongan Flavonoid dan Uji Antioksidan pada Ekstrak Rimpang Kencur *Kaempferia galanga* L. dengan Metode DPPH (1,1-Difenil-2-Pikrilhidrazil). *Skripsi*. Malang: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Maulan Malik Ibrahim Malang.

Liu, M., J. Lu, P. Mueller, L. Tumbull, C. M. Burke, R. C. Schlothauer, D. A. Carter, C. B. Whitchurch, dan E. J. Harry. 2015. Antibiotic-specific differences in response of *Staphylococcus aureus* to treatment with antibiotic combined with manuka honey. *Frontiers in microbiology*. 5(779): 1-9.

Malangi, L. P., M. S. Sangi, dan J. J. E. Paendong. 2012. Penentuan kandungan tanin dan uji aktivitas antioksidan ekstrak biji buah alpukat (*Persea americana mill.*). *Jurnal MIPA*. 1(1): 5-10.

Mariyani. 2016. Uji Aktivitas Antifungi Ekstrak Etanol Bunga Sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis* L.), Bunga Waru (*Hibiscus tiliaceus* L.), Dan Bunga Sepatu Kuncup (*Malvaviscus arboreus* Cav.) Terhadap *Candida albicans*. *Skripsi*. Surakarta: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sebelas Maret.

Markham. 1988. *Cara Identifikasi Flavonoid*. Bandung: Penerbit ITB.

- Milla, K. I. E. 2015. Efek Penambahan Vitamin C Terhadap Aktivitas Ciprofloxacin Dalam Penghambatan Pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* Secara *In Vitro*. *Skripsi*. Jember: Fakultas Kedokteran Universitas Negeri Jember.
- Nafianti, S., dan A. B. Sinuhaji. 2005. Resisten Trimetoprim-Sulfametoksazol terhadap Shigellosis. *Sari Pediatri*. 7(1): 39-44.
- Nugraha, S. A. 2016. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun *Mirabilis Jalapa* Terhadap Pertumbuhan Koloni *Shigella dysenteriae* Secara *In Vitro*. *Skripsi*. Jember: Universitas Negeri Jember.
- Nurfadillah. 2013. Uji Bioaktifitas Antibakteri Ekstrak dan Fraksi dari Kepulauan Spermonde Kota Makassar. *Skripsi*. Makassar: Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan Universitas Hassanudin.
- Nurhayati, S., S. Matsjeh, C. Anwar, dan T. J. Raharjo. 2010. Indikator titrasi asam-basa dari ekstrak bunga sepatu (*Hibiscus rosa sinensis* L.). *Jurnal Agritech UGM*. 30(3): 178-183.
- Nurlela. 2011. Ekstraksi Dan Uji Stabilitas Zat Warna Alami Dari Bunga Kembang Sepatu (*Hibiscus rosasinensi* L.) Dan Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Skripsi*. Jakarta: Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Syarif Hidayatullah.
- Ngajow, M., J. Abidjulua, dan V. S. Kamu. Pengaruh antibakteri ekstrak kulit batang matoa (*Pometia pinnata*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*. *Jurnal Mipa Unsrat Online*. 2(2): 128-132.
- Ocampo, P. S., V. Lázár, B. Papp, M. Arnoldini, P. Wiesch, R. Busa-Fekete, G. Fekete, C. Pál, M. Ackermann, dan S. Bonhoeffer. 2014. Antagonism between bacteriostatic and bactericidal antibiotics is prevalent. *AAC* 58(8): 4573-4582.
- Octarina, N. A. 2010. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa*) Terhadap *Escherichia coli* Secara *In Vitro*. *Skripsi*. Jember: Universitas Negeri Jember.
- Pal, N. 2015. Antibacterial activity of *Hibiscus rosa sinensis* and *Calendula officinalis* flowers extract against various pathogen. *International Journal of Scientific Research in Biological Sciences*. 2(3): 5-8.
- Paul, A. C., B. Karpagam, dan N. Krishnaveni. 2016. Phytochemical screening and antibacterial evaluation of the aqueous extracts of *Hibiscus rosasinensis* leaves against *Aeromonas hydrophila*. *International Journal of Advanced Science and Research*. 1(8): 21-23.

- Perwitasari, D., dan A. Anwar. 2006. Tingkat Risiko Pemakaian Alat Pelindung Diri Dan Higiene Petugas Di Laboratorium Klinik RSUPN Ciptomangunkusumo. *Jurnal Ekologi Kesehatan*. 5(1): 380-384.
- Pratiknya, A. W. 2008. *Dasar-Dasar Metodologi Penelitian Kedokteran Dan Kesehatan*. Edisi 1. Jakarta: Raja Grafindo Persada.
- Pratiwi, A. E. 2015. Isolasi, Seleksi, Dan Uji Aktivitas Antibakteri Mikroba Endofit Dari Daun Tanaman *Garcinia bethami pierre* Terhadap *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Eschericia coli*, *Shigella dysentriae*, Dan *Salmonella typhimurium*. *Skripsi*. Jakarta: UIN Syarif Hidayatullah.
- Prayoga, E. 2013. Perbandingan Efek Ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L.) Dengan Metode Difusi Disk Dan Difusi Sumuran Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus*. *Skripsi*. Jakarta: UIN Syarif Hidayatullah.
- Rao, K. N. V., K. Geetha, M. A. Raja, dan D. Banji. 2014. Quality control study and standardization of *Hibiscus rosasinensis* L. flowers and leaves as per WHO guidelines. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 3(4): 29-37.
- Rathi, S. G., R. Patel Kanu, dan H. Bashkar Vaidhun. Isolation of herbal plants: antifungal and antibacterial activities. *Journal of Pharmaceutical Science and Bioscientific Research*. 2(1): 25-29.
- Redha, A. 2010. Flavonoid: struktur, sifat antioksidatif dan peranannya dalam sistem biologis. *Jurnal Belian*. 9(2): 196-202.
- Rohyani, I. S. dan E. A. Suripto. 2015. Kandungan fitokimia beberapa jenis tumbuhan lokal yang sering dimanfaatkan sebagai bahan baku obat di Pulau Lombok. *Jurnal Ilmiah*. 1(2): 388-391.
- Sani, R. W. M. 2015. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Tempuyung (*Sonchus arvensis* L.) Terhadap Bakteri *Propionibacterium acnes* Secara *In Vitro*. *Skripsi*. Jember: Fakultas Kedokteran Universitas Negeri Jember.
- Sari, M. 2015. Uji Bakteriologis Dan Resistensi Antibiotik Terhadap Bakteri *Escherichia coli* Dan *Shigella dysentriae* Pada Makanan Gado-Gado Di Kantin UIN Syarif Hidayatullah Jakarta. *Skripsi*. Jakarta: Fakultas Kedokteran UIN Syarif Hidayatullah.
- Sudewi, S., dan W. A. Lolo. 2016. Kombinasi ekstrak buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) dan daun sirsak (*Annona muricata* L.) dalam menghambat

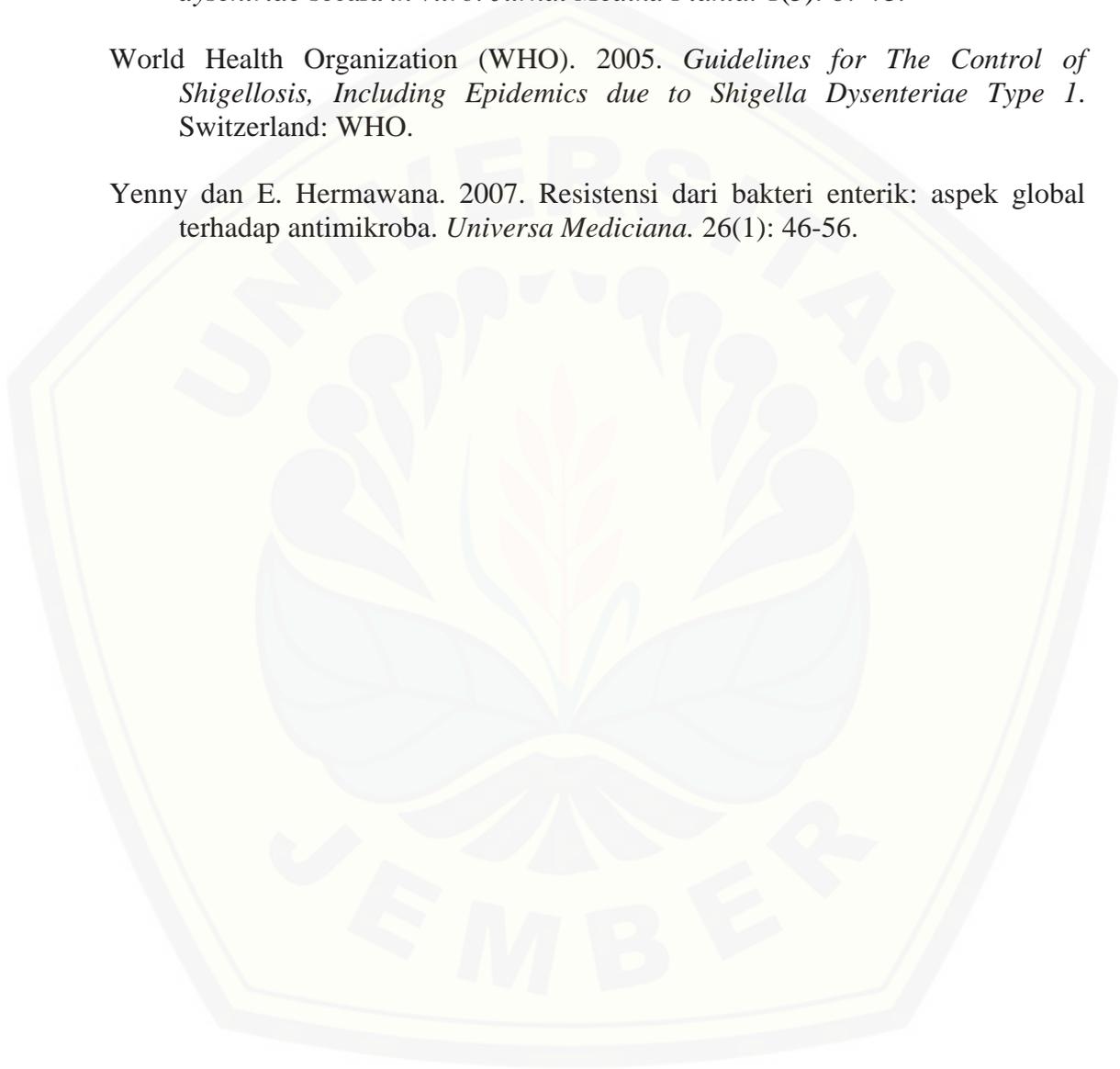
- bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Kartika Jurnal Ilmiah Farmasi* 4(2): 36-42.
- Suharto, M. A. G., H. J. Edy, dan Jovie M. Dumanauw. 2015. Isolasi dan identifikasi senyawa saponin dari ekstrak batang pisang ambon (*Musa paradisiaca* var. *Sapientum* L.). *Artikel Ilmiah*. 86-92.
- Sukandar, E. Y., R. Andrajati, J. I. Sigit, I. K. Adnyana, A. A. P. Setiadi, dan Kusnandar. 2009. *Iso Farmakoterapi*. Jakarta: PT. ISFI Penerbitan.
- Suswati, E., dan Mufida, D. 2009. *Petunjuk Praktikum Mikrobiologi Kedokteran dan Kesehatan*. Jember: Universitas Jember.
- Syahrurachman, A., A. Chatim, A. Soebandrio, A. Kurniawati, dan A. U. S. Santoso. 2010. *Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran*. Edisi Revisi. Jakarta: Binarupa Aksara.
- Talukder, K. A., B. K. Khajanchi, M. A. Islam, D. K. Dutta, Z. Islam, A. Safa, G. Y. Khan, K. Alam, M. A. Hossain, S. Malla, S. K. Niyogi, M. Rahman, H. Watanabe, G. B. Nair, dan D. A. Sack. 2004. Genetic relatedness of ciprofloxacin-resistant *Shigella dysenteriae* type 1 strains isolated in south Asia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 54: 730-734.
- Tiwari, U., P. Yadav, dan D. Nigam. 2105. Study on phytochemical screening and antibacterial potential of methanolic flower and leaf extracts of *Hibiscus rosasinensis*. *International Journal of Innovative and Applied Research*. 3(6): 9-14.
- Udo, I. J., M. G. Ben, C. U. Etuk, dan A. I. Tiomthy. 2016. Phytochemical, proximate and antibacterial properties of *Hibiscus Rosa-Sinensis* L. Leaf. *Journal of Medicinal Plants Studies*. 4(5): 193-195.
- Ustundag, O. G. dan G. Mazza. 2007. Saponin: properties, applications, and processing. *Critical Review in Food Science and Nutrition*. 47: 231-258.
- Voss-Rech, D., C. S. Klein, V. H. Techio, G. N. Scheuermann, G. Rech, dan L. Fiorentin . 2011. Antibacterial activity of vegetal extracts against serovars of *Salmonella*. *Ciencia Rural* 41 (2), 314-320
- Wafa, N. I. 2011. Uji aktivitas antibakteri fraksi air daun gambir (*Uncaria gambbir roxb*) dengan mikrodilusi dan analisis komponen penyusunnya. *Skripsi*. Bogor: Departemen Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor.

Waji, R. A., dan A. Sugrani. 2009. *Makalah Kimia Organik Bahan Alam Flavonoid (Quercitin)*. Makassar: Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanudin.

Wulandari, P., E. Suswati, Misnawi, dan A. Rianul. 2012. Efek antibakteri ekstrak etanol biji kakao (*Theobroma cacao*) terhadap pertumbuhan *Shigella dysenteriae* secara *in vitro*. *Jurnal Medika Planta*. 1(5): 67-75.

World Health Organization (WHO). 2005. *Guidelines for The Control of Shigellosis, Including Epidemics due to Shigella Dysenteriae Type 1*. Switzerland: WHO.

Yenny dan E. Hermawana. 2007. Resistensi dari bakteri enterik: aspek global terhadap antimikroba. *Universa Mediciana*. 26(1): 46-56.



Lampiran 3.1 Surat Persetujuan Etik



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER

KOMISI ETIK PENELITIAN

Jl. Kalimantan 37 Kampus Bumi Tegal Boto Telp/Fax (0331) 337877 Jember 68121 – Email :
fk_unej@telkom.net

KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK

ETHICAL APPROVA

Nomor : 1.165 /H25.1.11/KE/2017

Komisi Etik, Fakultas Kedokteran Universitas Jember dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul :

The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Jember University, With regards of the protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the proposal entitled :

**EFEK KOMBINASI EKSTRAK DAUN KEMBANG SEPATU (*Hibiscus rosasinensis L.*)
DAN CIPROFLOXACIN TERHADAP *Shigella dysenteriae* SECARA IN VITRO**

Nama Peneliti Utama : Billy Jusup Kurniawan
Name of the principal investigator

NIM : 142010101052

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember
Name of institution

Dan telah menyetujui protokol tersebut diatas.
And approved the above mentioned proposal.

Jember, 20 Oktober 2017
Ketua Komisi Etik Penelitian

Rizki Riyanti, Sp.PK

Lampiran 3.2 Surat Uji Determinasi



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS JEMBER
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
Jln. Kalimantan 37KampusTegalbotoKotakPos 159 Jember 68121
Telp. (0331) 334293 Fax (0331) 330225

SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI

No. 12 /2017

Ketua Laboratorium Botani Jurusan Biologi dengan ini menerangkan bahwa material tanaman yang dibawa oleh:

Nama : Billy Jusup Kurniawan
NIP/NIM/NIK : 142010101052
Institusiasal : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Pada tanggal 30 September 2017, berdasarkan buku Flora of Java, karangan C.A. Backer dan Bakuhuizen van den Brink Jr. adalah :

No.	Genus	Species	Family
1.	Hibiscus	<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> L.	Malvaceae

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya

Jember, 02 Oktober 2017

Ketua Laboratorium Botani

Dra. Dwi Setyati, M.Si.

NIP. 196404171991032001

Determined by Dra. Dwi Setyati, M.Si

Lampiran 4.1 Dokumentasi Penelitian



Hasil penyaringan (filtrat)



Serbuk daun kembang sepatu



Proses evaporasi



Larutan kelompok perlakuan



Penimbangan ekstrak



Hasil pengukuran pH

Lampiran 4.2 Hasil Uji Normalitas *Shapiro Wilk*

		Tests of Normality					
		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Kelompok	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Diameter	P1	.274	3	.	.945	3	.546
	P2	.184	3	.	.999	3	.927
	P3	.356	3	.	.818	3	.157
	P4	.276	3	.	.942	3	.537
	P5	.225	3	.	.984	3	.756
	P6	.211	3	.	.991	3	.817
	P7	.335	3	.	.858	3	.263
	P8	.225	3	.	.984	3	.756
	P9	.239	3	.	.975	3	.698
	K(+)	.257	3	.	.961	3	.620

a. Lilliefors Significance Correction

Lampiran 4.3 Hasil Uji Homogenitas Levene

Test of Homogeneity of Variances

Diameter

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.978	9	20	.098

Lampiran 4.4 Hasil Uji Komparatif One Way ANOVA

ANOVA

Diameter

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	97.935	9	10.882	513.933	.000
Within Groups	.423	20	.021		
Total	98.359	29			

Lampiran 4.5 Hasil Uji LSD

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Diameter

LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
P1	P2	-.33000 [*]	.11881	.012	-.5778	-.0822
	P3	-.55333 [*]	.11881	.000	-.8012	-.3055
	P4	-.93333 [*]	.11881	.000	-1.1812	-.6855
	P5	-1.00667 [*]	.11881	.000	-1.2545	-.7588
	P6	-1.35000 [*]	.11881	.000	-1.5978	-1.1022
	P7	-1.89000 [*]	.11881	.000	-2.1378	-1.6422
	P8	-2.31000 [*]	.11881	.000	-2.5578	-2.0622
	P9	-3.03667 [*]	.11881	.000	-3.2845	-2.7888
	K(+)	-6.52333 [*]	.11881	.000	-6.7712	-6.2755
P2	P1	.33000 [*]	.11881	.012	.0822	.5778
	P3	-.22333	.11881	.075	-.4712	.0245
	P4	-.60333 [*]	.11881	.000	-.8512	-.3555
	P5	-.67667 [*]	.11881	.000	-.9245	-.4288
	P6	-1.02000 [*]	.11881	.000	-1.2678	-.7722
	P7	-1.56000 [*]	.11881	.000	-1.8078	-1.3122
	P8	-1.98000 [*]	.11881	.000	-2.2278	-1.7322
	P9	-2.70667 [*]	.11881	.000	-2.9545	-2.4588
	K(+)	-6.19333 [*]	.11881	.000	-6.4412	-5.9455
P3	P1	.55333 [*]	.11881	.000	.3055	.8012
	P2	.22333	.11881	.075	-.0245	.4712
	P4	-.38000 [*]	.11881	.005	-.6278	-.1322
	P5	-.45333 [*]	.11881	.001	-.7012	-.2055
	P6	-.79667 [*]	.11881	.000	-1.0445	-.5488
	P7	-1.33667 [*]	.11881	.000	-1.5845	-1.0888
	P8	-1.75667 [*]	.11881	.000	-2.0045	-1.5088
	P9	-2.48333 [*]	.11881	.000	-2.7312	-2.2355
	K(+)	-5.97000 [*]	.11881	.000	-6.2178	-5.7222
P4	P1	.93333 [*]	.11881	.000	.6855	1.1812
	P2	.60333 [*]	.11881	.000	.3555	.8512

	P3	.38000 [*]	.11881	.005	.1322	.6278
	P5	-.07333	.11881	.544	-.3212	.1745
	P6	-.41667 [*]	.11881	.002	-.6645	-.1688
	P7	-.95667 [*]	.11881	.000	-1.2045	-.7088
	P8	-1.37667 [*]	.11881	.000	-1.6245	-1.1288
	P9	-2.10333 [*]	.11881	.000	-2.3512	-1.8555
	K(+)	-5.59000 [*]	.11881	.000	-5.8378	-5.3422
P5	P1	1.00667 [*]	.11881	.000	.7588	1.2545
	P2	.67667 [*]	.11881	.000	.4288	.9245
	P3	.45333 [*]	.11881	.001	.2055	.7012
	P4	.07333	.11881	.544	-.1745	.3212
	P6	-.34333 [*]	.11881	.009	-.5912	-.0955
	P7	-.88333 [*]	.11881	.000	-1.1312	-.6355
	P8	-1.30333 [*]	.11881	.000	-1.5512	-1.0555
	P9	-2.03000 [*]	.11881	.000	-2.2778	-1.7822
	K(+)	-5.51667 [*]	.11881	.000	-5.7645	-5.2688
P6	P1	1.35000 [*]	.11881	.000	1.1022	1.5978
	P2	1.02000 [*]	.11881	.000	.7722	1.2678
	P3	.79667 [*]	.11881	.000	.5488	1.0445
	P4	.41667 [*]	.11881	.002	.1688	.6645
	P5	.34333 [*]	.11881	.009	.0955	.5912
	P7	-.54000 [*]	.11881	.000	-.7878	-.2922
	P8	-.96000 [*]	.11881	.000	-1.2078	-.7122
	P9	-1.68667 [*]	.11881	.000	-1.9345	-1.4388
	K(+)	-5.17333 [*]	.11881	.000	-5.4212	-4.9255
P7	P1	1.89000 [*]	.11881	.000	1.6422	2.1378
	P2	1.56000 [*]	.11881	.000	1.3122	1.8078
	P3	1.33667 [*]	.11881	.000	1.0888	1.5845
	P4	.95667 [*]	.11881	.000	.7088	1.2045
	P5	.88333 [*]	.11881	.000	.6355	1.1312
	P6	.54000 [*]	.11881	.000	.2922	.7878
	P8	-.42000 [*]	.11881	.002	-.6678	-.1722
	P9	-1.14667 [*]	.11881	.000	-1.3945	-.8988
	K(+)	-4.63333 [*]	.11881	.000	-4.8812	-4.3855
P8	P1	2.31000 [*]	.11881	.000	2.0622	2.5578
	P2	1.98000 [*]	.11881	.000	1.7322	2.2278
	P3	1.75667 [*]	.11881	.000	1.5088	2.0045

	P4	1.37667 [*]	.11881	.000	1.1288	1.6245
	P5	1.30333 [*]	.11881	.000	1.0555	1.5512
	P6	.96000 [*]	.11881	.000	.7122	1.2078
	P7	.42000 [*]	.11881	.002	.1722	.6678
	P9	-.72667 [*]	.11881	.000	-.9745	-.4788
	K(+)	-4.21333 [*]	.11881	.000	-4.4612	-3.9655
P9	P1	3.03667 [*]	.11881	.000	2.7888	3.2845
	P2	2.70667 [*]	.11881	.000	2.4588	2.9545
	P3	2.48333 [*]	.11881	.000	2.2355	2.7312
	P4	2.10333 [*]	.11881	.000	1.8555	2.3512
	P5	2.03000 [*]	.11881	.000	1.7822	2.2778
	P6	1.68667 [*]	.11881	.000	1.4388	1.9345
	P7	1.14667 [*]	.11881	.000	.8988	1.3945
	P8	.72667 [*]	.11881	.000	.4788	.9745
	K(+)	-3.48667 [*]	.11881	.000	-3.7345	-3.2388
K(+)	P1	6.52333 [*]	.11881	.000	6.2755	6.7712
	P2	6.19333 [*]	.11881	.000	5.9455	6.4412
	P3	5.97000 [*]	.11881	.000	5.7222	6.2178
	P4	5.59000 [*]	.11881	.000	5.3422	5.8378
	P5	5.51667 [*]	.11881	.000	5.2688	5.7645
	P6	5.17333 [*]	.11881	.000	4.9255	5.4212
	P7	4.63333 [*]	.11881	.000	4.3855	4.8812
	P8	4.21333 [*]	.11881	.000	3.9655	4.4612
	P9	3.48667 [*]	.11881	.000	3.2388	3.7345