



Jurnal Teknologi Laboratorium

www.teknolojijournal.com

CONTENT
JURNAL TEKNOLOGI LABORATORIUM
Vol 7 No 2 (2018)

Antibiotic Resistant and Plasmid Conjugative Study of Salmonella typhi

Waleed Haji Saeed Akreyi, Samira Younis Yousif, Mahde Assafi

38 - 45

Antibacterial Activity of Karika Dieng Peels Againsts Shigella flexneri and Escherichia coli

Dhiah Novalina, Sugiyarto Sugiyarto, Ari Susilowati

53-60

Potential of Carica Pubescens Leaf Extract as Alternative Antidiare Bacteria for Vibrio cholerae and Shigella dysenteriae

Tri Dyah Astuti, Wahid Syamsul Hadi

61-69

Development of Ovgall Preparation as Clinical Sample for Detection of Salmonella typhi with Real-time PCR Method

Annisa Pratiwi Gunawan, Ai Djuminar, Ernawati Ernawati, Lidya Chaidir

70 -77

The Presence of Methanol in Alcoholic Beverages Analyzed Using Qualitative Method

Diah Navianti, Muhammad Ihsan Tarmizi, Sinta Nur Holifah

46 - 52



Antibiotic resistant and plasmid conjugative study of *Salmonella typhi*

Waleed Haji Saeed Akreyi¹, Samira Younis Yousif^{2a}, Mahde Saleh Assafi^{1b*}

¹ Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Duhok, Duhok, Kurdistan Region, Iraq

² Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Zakho, Zakho, Kurdistan Region, Iraq

^a Email address: samira.yousif@yahoo.com

^b Email address: mahdy.assafi@yahoo.co.uk

HIGHLIGHTS

All antibiotic markers were transferred from *S. typhi* to *E. coli* HB 101 with a conjugation frequency of (0.38×10^{-5}) .

ARTICLE INFO

Article history

Received date : June 14th, 2018

Revised date : July 09th, 2018

Accepted date : August 08th, 2018

Keywords:

Plasmid profile
Salmonella Typhi
 Multidrug resistance
 Iraq

ABSTRACT

The emergence of multi-drug resistant (MDR) bacteria has endangered the efficacy of antibiotics treatment of pathogenic bacteria worldwide. The aim of this research was to investigate the incidence of *Salmonella enterica* serovar Typhi in Duhok city, Iraq. Specimens of blood and stool were recruited from 267 patients. *S. Typhi* isolates were diagnosed depending on morphology, biochemical and serological tests. *S. Typhi* isolates were tested for their antibiotic resistance. Multi-drug resistant *S. Typhi* isolates were conjugated with *E. coli* HB101. The plasmid profile of transconjugants was investigated. 15/267 (5.6%) *S. Typhi* isolates were identified. Based on their biochemical tests, *S. Typhi* isolates were categorized into two biotypes (I, 26.66% and II, 73.33%). Four resistance patterns were observed. The resistant pattern to ampicillin and tetracycline was the higher (46.6%). Conjugation experiment showed that all antibiotic markers were transferred from *S. Typhi* to *E. coli* HB101 with a conjugation frequency of (0.38×10^{-5}) . 13.3% of the *S. Typhi* isolates were multi-drug-resistant and had two small plasmids. Transconjugants *E. coli* acquired the resistance from the multi-drug resistant *S. Typhi*. Antibiotics treatment of the pathogens could be hindered by the constant rise of multi-drug-resistant. Further studies are needed to study the mobile genetic elements and their contribution in antibiotics resistance.

Copyright ©2018 Jurnal Teknologi Laboratorium.

All rights reserved

*Corresponding Author:

Mahde Saleh Assafi,
 Department of Biology, Faculty of Sciences, University of
 Duhok, Zakho, Kurdistan Region, Iraq.
 Email: mahdy.assafi@yahoo.co.uk



1. INTRODUCTION

Salmonella enterica serovar Typhi causes nearly 27 million typhoid cases and about 600 thousands deaths yearly, commonly in developing countries.¹ Antibiotics treatment of the pathogens could be hindered by the constant rise of multi-drug-resistant (MDR) pathogens.^{2,3,4} Several mechanisms are exist to confer *Salmonella* strains to multi-drug resistance (MDR) such as increased mutation rate as a stress response, transfer copies of DNA that codes for a mechanism of resistance to other bacteria by plasmids, decreased cell wall permeability to antibiotics, enzymatic deactivation of antibiotics, efflux mechanisms to remove antibiotics and altered target sites of antibiotic.⁵ The multi-drug-resistant *S. Typhi* isolates harbored a transferable plasmid conferring resistance to specific antibiotics. Horizontal exchange of DNA material may occur through plasmids, bacteriophages, transposons and insertion sequences.⁶ One of the essential reasons to increase the resistance to multiple drug is the ability of mobile genetic elements to transfer the exogenous genes among bacteria conferring resistance to one or more antibiotics.⁷ The aim of this research was to investigate the incidence of *S. Typhi* in patients attending Akre general hospital, Duhok, Iraq. Additionally, to detect the antibiotic susceptibility profile of these isolates. Moreover, to investigate the plasmid profiles of different isolates which show different patterns of drug resistance and to study the role of transmissible plasmids in multidrug resistance.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Study design and sample collection

A total of 267 patients who fulfilled the inclusion criteria were studied. The inclusion criteria for the participants were: (a) patients above the age of 1 year; (b) Having both fever and diarrhea; (c) Not using antibiotics for two weeks before enrollment; (d) Willing to participate in the study.

A total of 267 specimens, either blood or stool, from patients who met the criteria, (214 blood and 53 stool) were collected from patients attending Akre general hospital, Duhok, Kurdistan region, Iraq from November 2011 to April 2012. Samples were directly sent to the laboratory, where the analysis was performed. Blood samples were cultivated on BHI broth (Oxoid, UK)⁸ while stool samples were cultured on selenite F broth (Oxoid, UK) then incubated for 18 h at 37°C. Then, the broth cultures were examined for significant growth. Next, a loopful from the broth culture was streaked on both MacConkey and *Salmonella Shigella* agar (Oxoid UK). If bacterial growth was observed, subcultures were prepared into nutrient agar plates and incubated for another 24 h. Isolates were characterized morphologically, gram stain and biochemical reactions.^{9,10} 0.5 ml of bacterial suspension was added to sterile tubes containing 0.5 ml glycerol mixed well, and stored at -20°C until use.

2.2 Antibiotic susceptibility test

S. Typhi isolates were tested against three different antibiotics (Bioanalyse, Turkey). Disk diffusion assay was utilized to test the antibiotic susceptibility according to Bauer *et al.* (1966).¹¹ Bacterial suspensions were prepared in 1.0 ml of sterile normal saline. Then, 0.5 ml of the suspension (OD 0.3 at 600nm) was prepared and spread on Muller-Hinton agar (Difco, USA). Antibiotic discs were placed on the inoculated plates and plates were incubated at 36°C for 18h. The diameter of inhibition zones were measured according to the recommendations of Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines.¹²

2.3 Bacterial conjugation

MDR *S. Typhi* isolates resistant to AMP, TET and CHL antibiotics was used as a donor and *Escherichia coli* HB101 (Rifampicin resistant) was used as a recipient. Bacterial conjugation was performed according to Buu-Hoi and Horodniceanu (1980).¹³ Donor and recipient strains were grown in 10 ml BHI broth separately and incubated at 37°C for 18h. Matings were done by mixing 1 ml of each of donor and recipient cells. Then, 0.2 ml of the mixture was placed directly on a sterile filter paper (0.45µm) and transferred on BHI agar and incubated at 28°C for 18h. The filter paper was washed with 0.5ml of BHI broth, then the bacterial suspension was diluted to 10⁻⁵, and 0.1 ml of each dilution was spread on BHI agar containing 30µg/ml Rifampicin to select transconjugants. Dilutions (10⁻⁵, 10⁻⁶, and 10⁻⁷) of the donor isolate culture were prepared and 0.1 ml was spread on BHI agar and incubated for 24h at 37°C. Then, the frequency of transfer was calculated (The frequency of transfer=No. of transconjugants/No. of donor cells).¹³

2.4 Genomic DNA extraction

Genomic and plasmid DNA extraction was performed according to Roeder and Broda (1987).¹⁴ Fifty (50) ml of bacterial culture in BHI broth was harvested for 10 min at 4000 rpm. The pellet was suspended in 3.5 ml of TE25S buffer (10.26 gm sucrose, 2.5ml of 1M Tris-HCL and 5ml of 0.5M EDTA were mixed and distilled water used to completed the volume to 100 ml) and 100µl (10 mg/ml) of lysozyme was added and incubated for 1h at 37°C. Then, 50µl proteinase K and 200 µl SDS (10%) was added and incubated at 55°C for 1h. 650 µl of NaCl and 650 µl of CTAB/NaCl (10 gm CTAB was added to 14 ml of heated 5M NaCl and the volume was completed to 100 ml with distilled water) were mixed to each tube and incubated for 10 minutes at 55°C and left at room temperature for 5 minutes. Equivalent size of Chloroform/Isoamyl alcohol (24:1) was added and shake gently for 30 minutes then centrifuged at 4000 rpm for 10 minutes (This step was repeated twice). The supernatant was moved to clean tubes and identical volume of chilly isopropanol was mixed. The tubes were covered with parafilm and mixed gently then kept at -20 °C for 30 minutes. Then the tubes centrifuged at 4000 rpm for 20 minutes. Next, 1 ml of 70% ethanol was used to wash the pellet and centrifuged at 8000 rpm for 5 minutes at 4°C. The pellet was drained on a filter paper for 30 minutes. The DNA pellet was dissolved in 300 µl TE buffer and stored at -20°C. The DNA was analyzed by 0.8% agarose gel electrophoresis.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 *Salmonella* Typhi isolation and identification

S. Typhi bacteria were diagnosed depending on morphological, serological and biochemical tests. Suspected *S. Typhi* colonies were further identified using API 20E system. Out of 267 (214 blood and 53 stool) tested specimens, only 15 (5.6%) isolates (4 from blood and 11 from stool) were characterized as *S. Typhi*. All these isolates were confirmed by API 20E system. These isolates were differentiated into two different biotypes according to their biochemical reactions. 4/15 (26.66%) isolates were belong to biotype group I, and 11/15 (73.33%) isolates were belong to biotype group II.

3.2 Antibiotic susceptibility test

All *S. Typhi* isolates were tested toward three different antibiotics (ampicillin, chloramphenicol and tetracycline). Results indicated that all isolates

were resistant to ampicillin. Additionally, 9/15 (60%) were resistant to tetracycline and 3/15 (20%) of the isolates were resistant to chloramphenicol.

3.3 Multidrug resistant *S. Typhi* isolates

Bacterial strains that were resistance to one antibiotic in three or more antimicrobial categories are assigned as multi-drug resistant.⁵ Results showed four patterns of antibiotic resistance *S. Typhi* isolates (Table 1). 2/15 (13.3%) *S. Typhi* isolates were identified as multi-drug resistant.

Table 1. Different patterns of antibiotic resistance *S. Typhi*.

Resistance pattern	No. of isolates (%)
AMP	5 (33.3%)
AMP, TET	7 (46.6%)
AMP, CHL	1 (6.6%)
AMP, TET, CHL	2 (13.3%)

3.4 Plasmid profile

To investigate the plasmid profiles of the MDR *S. Typhi*, DNA was extracted from the MDR isolates. Results showed that all these isolates harbor two small plasmid bands which appear almost at the same position on the gel (Figure 1).

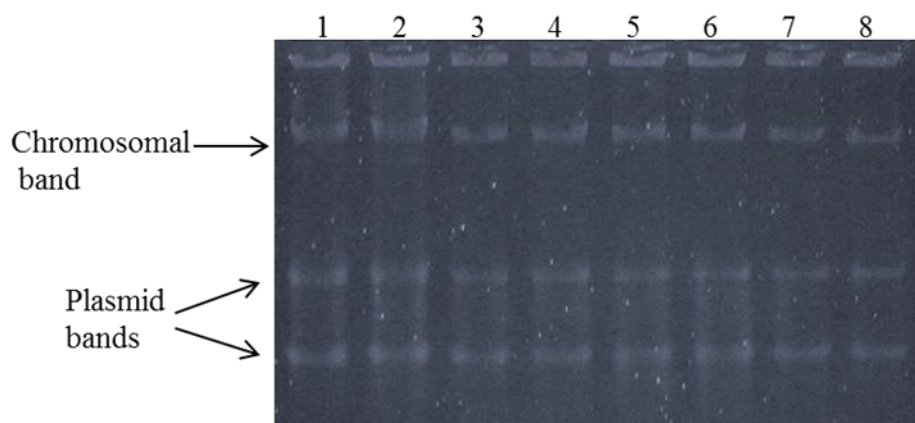


Figure 1. 0.8% gel electrophoresis at 70 Volt for 90 minutes shows the plasmid profile of eight different antibiotic resistances *S. Typhi* isolates

3.5 Conjugation

In order to investigate whether the MDR genes are harboured on transmissible plasmids, the MDR *S. Typhi* isolate resistant to AMP, TET and CHL antibiotics was utilized as a donor strain and a plasmidless rifampicin resistant *E. coli* HB101 was used as a recipient. Results showed that the antibiotic markers AMP and TET were transferred to the recipient strain rifampicin resistant *E. coli* HB101 (Figure 2). The frequency of transfer was calculated and it was 0.38×10^{-5} .

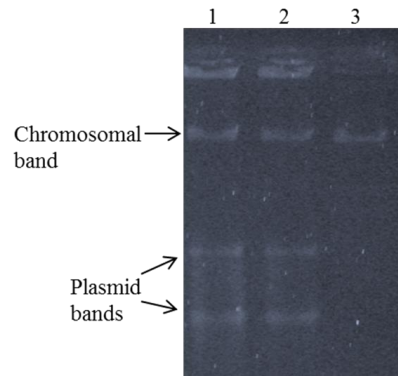


Figure 2. 0.8% agarose gel electrophoresis at 70 Volt for 90 minutes. Lane 1: Genomic DNA of donor strain of MDR *S. Typhi* resistant to (AMX, TET and CHL). Lane 2: Genomic DNA of transconjugant strain *E. coli* HB101 resistant to (AMX and TET). Lane 3: Genomic DNA of Plasmidless rifampicin resistant *E. coli* HB101. Conjugation frequency 0.39×10^{-5}

There are considerable increases of the incidence of human Salmonellosis and its severity.¹⁵ Results revealed that the incidence of *S. Typhi* amongst the 267 recruited patients was 5.6% (15/267). High incidences of typhoid fever were reported in different countries in Asia with difference in occurrence in many places in the same areas.^{16,17} According to the biochemical tests, the 15 *S. Typhi* isolates were classified into two different biotypes group I (4, 26.66%) and group II (11, 73.33%). These results were in agreement with other studies worldwide.^{18,19}

The resistance of *Salmonella* to a variety of antibiotics become a serious public health problem.²⁰ All *S. Typhi* isolates were resistant to ampicillin. This was in agreement with results of many studies in which the resistant was 100% to ampicillin.²¹ High resistance to β -lactam group of antibiotics is due to the ability of *S. Typhi* to produce β -lactamase enzymes.²² *S. Typhi* isolates were varied in their resistance against tetracycline and chloramphenicol. The alarming ability of the microbe to acquire persistent, high-level resistance to the clinically most relevant antibiotics is a major problem.^{23,24,25,26} The *S. typhi* showed different pattern of antibiotic resistance. These results were in agreement with other studies which show different patterns of MDR *Salmonella Typhi* toward different antibiotics.^{27,28}

The rise of multidrug-resistance *Salmonella Typhi* is because of the random use of antibiotics in the treatment of enteric fever.²⁹ AMP, CHL and TET resistance in *Salmonella Typhi* is often plasmid mediated.³⁰ *Salmonella enterica* plasmids are varying in size (2–200 kb). The antibiotic resistance is due to plasmids group of high molecular weight.³¹

The plasmid profiles of the MDR isolates showed that all isolates harbored two small plasmid bands. In *S. Typhi*, R-plasmid confer resistance to ampicillin, chloramphenicol, cotrimoxazole, and tetracyclin was reported to be transferable.³² Conjugation is a specific process usually mediated by conjugative plasmids that encode resistance in *Salmonella Typhi* and thus it plays role to the distribution of typhoid fever globally.³³

The phenotypic characterization of the conjugation experiments showed that the transconjugant *E. coli* HB101 acquired the resistance to AMP and TET antibiotics. Results from various studies revealed the transfer of MDR markers through conjugation experiment from *S. Typhi* to *E. coli*.³⁴ Mandal and his coworker showed the transfer of MDR markers to a plasmidless *E. coli* (C600) with a frequency of (0.39×10^{-5}) .³⁰

β -lactamase enzymes genes, found on the chromosome or on resistance

plasmids, are transferable among plasmids and chromosomal DNA of different bacteria.³⁵ Studies showed different plasmids that mediate resistance to antibiotics. In a study, different plasmids, IncHI2, IncI1 and IncHI2, were found to mediate resistance to ampicillin in *Salmonella*.³⁶ Another study supported the view that acquisition of IncFI plasmids conferred resistance to ampicillin, chloramphenicol and tetracycline.³⁷ Furthermore, plasmid pFPTB1 mediates resistance to tetracyclines and ampicillin in *Salmonella*.³⁸ Multidrug-resistant *S. Typhi* strains may harbor integrons that carry genes of about six antibiotic resistance.^{39,40}

4. CONCLUSION

In summary, only 2 out of 15 (13.3%) of *S. Typhi* isolates were Multi-drug resistant and harboured two small plasmids. The drug resistance markers for ampicillin and tetracycline were capable to transfer to *E. coli*. The treatment of infections could be hindered because of the distribution of *Salmonella* strains that are resistant to various antibiotics. Further studies are needed to identify the genes conferring to MDR carried by these plasmids and to investigate the pathogenicity islands and their contribution to virulence.

REFERENCES

1. Buckle GC, Walker CL, And Black RE. Typhoid Fever And Paratyphoid Fever: Systematic Review To Estimate Global Morbidity And Mortality For 2010. *J Glob Health*.2012;2:010401.
2. Mastroeni P And Menager N. Development Of Acquired Immunity To *Salmonella*. *J Med Microbiol*.2003;52:453-9.
3. Habeeb A, Hussein NR, Assafi MS, And Al-Dabbagh SA. Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus* Nasal Colonization Among Secondary School Students At Duhok City-Iraq. *J Microbiol Infect Dis*.2014;4:59-63.
4. Assafi MS, Mohammed RQ, And Hussein NR, Nasal Carriage Rates Of *Staphylococcus Aureus* And Ca-Methicillin Resistant *Staphylococcus Aureus* Among University Students. *Int. J. Microbiol. Res*.2015;5:123-7.
5. Yousefi-Mashouf R And Moshtaghi A, Frequency Of Typhoidal And Non-Typhoidal *Salmonella* Species And Detection Of Their Drugs Resistance Patterns. *J Res Health Sci*.2007;7:49-56.
6. Thomas CM And Nielsen KM, Mechanisms And Barriers To Horizontal Gene Transfer Between Bacteria. *Nat Rev Microbiol*.2005;3:711-21.
7. Mazel D, Dychinco B, Webb VA, And Davies J, Antibiotic Resistance In The Ecor Collection: Integrons And Identification Of A Novel Aad Gene. *Antimicrob Agents Chemother*.2000;44:1568-74.
8. Hall MM, Ilstrup DM, And Washington JA, 2nd, Comparison Of Three Blood Culture Media With Tryptic Soy Broth. *J Clin Microbiol*.1978;8:299-301.
9. Prescott LM, Harley JP, And Klein DA, Microbiology. 5th Ed. 2002, New York: Mcgraw–Hill Companies.
10. Gillespie SH And Hawkey PM, Principles And Practice Of Clinical Bacteriology 2nd Ed. 2006, Chichester: John Wiley & Sons.
11. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, And Turck M, Antibiotic Susceptibility Testing By A Standardized Single Disk Method. *Am J Clin Pathol*.1966;45.
12. Clsi, Clinical And Laboratory Standards Institutes (Clsi). Performance Standards For Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement. M100-S17. 2007;27.
13. Buu-Hoi A And Horodniceanu T, Conjugative Transfer of Multiple Antibiotic Resistance Markers In *Streptococcus Pneumoniae*. *J Bacteriol*.1980;143:313-20.
14. Raeder V And Broda P, Rapid Preparation of DNA From Filamentous Fungi *L.*

- Appl. Microbiol.*1985;1:17-20.
15. Edelstein M, Pimkin M, Dmitrachenko T, Et Al., Multiple Outbreaks of Nosocomial Salmonellosis In Russia And Belarus Caused By A Single Clone of *Salmonella Enterica* Serovar Typhimurium Producing An Extended-Spectrum Beta-Lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.*2004;48:2808-15.
 16. Ochiai RL, Acosta CJ, Danovaro-Holliday MC, et al., A Study of Typhoid Fever In Five Asian Countries: Disease Burden And Implications For Controls. *Bull World Health Organ.*2008;86:260-8.
 17. Basnyat B, Maskey AP, Zimmerman MD, And Murdoch DR, Enteric (Typhoid) Fever In Travelers. *Clin Infect Dis.*2005;41:1467-72.
 18. Sen B, Dutta S, Sur D, et al., Phage Typing, Biotyping & Antimicrobial Resistance Profile Of *Salmonella Enterica* Serotype Typhi From Kolkata. *Indian J Med Res.*2007;125:685-8.
 19. Iseri L, Bayraktar MR, Aktas E, And Durmaz R, Investigation of An Outbreak of *Salmonella Typhi* In Battalgazi District, Malatya-Turkey. *Braz J Microbiol.*2009;40:170-3.
 20. Cooke FJ And Wain J, The Emergence of Antibiotic Resistance in Typhoid Fever. *Travel Med Infect Dis.*2004;2:67-74.
 21. Misra RN, Bawa KS, Magu SK, Bhandari S, Nagendra A, And Menon PK, Outbreak of Multi-Drug Resistant *Salmonella Typhi* Enteric Fever In Mumbai Garrison. *Med J Armed Forces India.*2005;61:148-50.
 22. Baliga S, Drug Resistance In *Salmonella Typhi*: Tip of The Iceberg. *Online J Health Allied Scs* 2004;4.
 23. Alanis AJ, Resistance To Antibiotics: Are We In The Post-Antibiotic Era?, Arch Med Res , 2005, Vol. 36 (Pg. 697-705). *Arch Med Res.*2005;36:697-705.
 24. Assafi MS, Polse RF, Hussein NR, Haji AH, And Issa AR, The Prevalence of *S. Aureus* Nasal Colonisation And Its Antibiotic Sensitivity Pattern Amongst Primary School Pupils. *Science Journal Of University Of Zakho.*2017;5:7-10.
 25. Hussein NR, Assafi MS, And Ijaz T, Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Nasal Colonisation Amongst Healthcare Workers In Kurdistan Region, Iraq. *J Glob Antimicrob Resist.*2017;9:78-81.
 26. Hussein NR, Muhammed AH, Al-Dabbagh S, Abdulkareem WL, And Assafi MS, The Prevalence Of Usa 300 Ca-Mrsa In Kurdistan Region, Northern Iraq. *Int. J. Pure Appl. Sci. Technol.*2014;21:8-10.
 27. Mills-Robertson F, Addy ME, Mensah P, And Crupper SS, Molecular Characterization Of Antibiotic Resistance In Clinical *Salmonella Typhi* Isolated In Ghana. *Fems Microbiol Lett.*2002;215:249-53.
 28. Waldvogel FA And Pitton JS, Typhoid Fever Imported From Mexico To Switzerland. Studies On R Factor Mediated Chloramphenicol Resistance. *J Hyg (Lond).*1973;71:509-13.
 29. Mandal S, Mandal MD, And Pal NK, R-Factor In *Salmonella Enterica* Serovar Typhi: Transfer To And Acquisition From *Escherichia Coli*. *Jpn J Infect Dis.*2003;56:65-7.
 30. Mandal S, Mandal MD, And Pal NK, Plasmid-Encoded Multidrug Resistance Of *Salmonella Typhi* And Some Enteric Bacteria In And Around Kolkata, India: A Preliminary Study. *J Health Allied Scs.*2004;3:1-7.
 31. Rychlik I, Gregorova D, And Hradecka H, Distribution And Function Of Plasmids In *Salmonella Enterica*. *Vet Microbiol.*2006;112:1-10.
 32. Mandal S, Mandal MD, And Pal NK, Combination Effect Of Ciprofloxacin And Gentamicin Against Clinical Isolates of *Salmonella Enterica* Serovar Typhi With Reduced Susceptibility To Ciprofloxacin. *Jpn J Infect Dis.*2003;56:156-7.
 33. Lawley TD, Gilmour MW, Gunton JE, Standeven LJ, And Taylor DE, Functional And Mutational Analysis Of Conjugative Transfer Region 1 (Tra1) From The

- Inchi1 Plasmid R27. *J Bacteriol.*2002;184:2173-80.
34. Wain J, Diem NGA Lt, Kidgell C, et al., Molecular Analysis Of Inchi1 Antimicrobial Resistance Plasmids From Salmonella Serovar Typhi Strains Associated With Typhoid Fever. *Antimicrob Agents Chemother.*2003;47:2732-9.
 35. Bennett PM, Plasmid Encoded Antibiotic Resistance: Acquisition And Transfer Of Antibiotic Resistance Genes In Bacteria. *British Journal Of Pharmacology.*2008;153:S347–S357.
 36. Chen W, Fang T, Zhou X, Zhang D, Shi X, And Shi C, Inchi2 Plasmids Are Predominant In Antibiotic-Resistant Salmonella Isolates. *Front Microbiol.*2016;7:1566.
 37. Carattoli A, Plasmid-Mediated Antimicrobial Resistance In Salmonella Enterica. *Curr Issues Mol Biol.*2003;5:113-22.
 38. Pasquali F, Kehrenberg C, Manfreda G, And Schwarz S, Physical Linkage Of Tn3 And Part Of Tn1721 In A Tetracycline And Ampicillin Resistance Plasmid From Salmonella Typhimurium. *J Antimicrob Chemother.*2005;55:562-5.
 39. Krauland MG, Marsh JW, Paterson DL, And Harrison LH, Integron-Mediated Multidrug Resistance In A Global Collection Of Nontyphoidal *Salmonella Enterica* Isolates. *Emerg Infect Dis.*2009;15:388-96.
 40. Al-Sanouri TM, Paglietti B, Haddadin A, et al., Emergence Of Plasmid-Mediated Multidrug Resistance In Epidemic And Non-Epidemic Strains Of *Salmonella Enterica* Serotype Typhi From Jordan. *J Infect Dev Ctries.*2008;2:295-301.



Aktivitas antibakteri kulit buah karika dieng terhadap *Shigella flexneri* dan *Escherichia coli*

Antibacterial activity of karika dieng peels againts *Shigella flexneri* and *Escherichia coli*

Dhiah Novalina^{1a*}, Sugiyarto², Ari Susilowati²

¹ Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta, Indonesia

² Universitas Sebelas Maret Surakarta, Indonesia

^a Email: dhiah.novalina@gmail.com

HIGHLIGHTS

Ethyl acetat fraction with concentration of 50% showed the best antibacterial activity

ARTICLE INFO

Article history

Received date : July 27th, 2018

Revised date : October 28th, 2018

Accepted date : December 31st, 2018

Keywords:

Karika;
Peels;
Antibacterial

Kata Kunci:

Karika;
Kulit Buah;
Antibakteri;

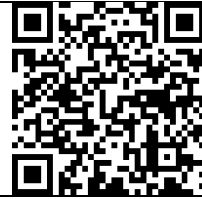
ABSTRACT / ABSTRAK

Karika is an endemic plant of Dieng Plateau. The leaf of Karika has been studied to have antibacterial activity against bacteria that cause diarrhea, while the peels are removed or used as a mixture of animal feed. This study aims to determine the antibacterial activity of Karika peels against bacteria that cause poisoning, *i.e* *Shigella flexneri* and *Escherichia coli*. The sample fractionated to obtain the fraction of n-hexane and ethyl acetate. The fractions were tested for their antibacterial activity against *Shigella flexneri* and *Escherichia coli* by the cup-plate method. The results showed that the ethyl acetate fraction (ethyl acetate 50%) had the highest inhibition on *Shigella flexneri* and *Escherichia coli* compared with another concentration. Based on the study can be concluded that the peels of Karikahas antibacterial activity against *Shigella flexneri* and *Escherichia coli*.

Karika merupakan tanaman endemik Dataran Tinggi Dieng. Daun Karika telah diteliti memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri penyebab diare, sedangkan kulit buah dibuang atau dijadikan campuran pakan ternak. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri kulit buah Karika terhadap bakteri penyebab keracunan, *Shigella flexneri* dan *Escherichia coli*. Sampel difraksinasi untuk memperoleh fraksi n-heksan dan etil asetat. Fraksi diuji aktivitas antibakteri nya terhadap bakteri *Shigella flexneri* dan *Escherichia coli* dengan metode sumuran. Hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi etil asetat dengan konsentrasi 50% memiliki daya hambat tertinggi terhadap *Shigella flexneri* dan *Escherichia coli* dibandingkan dengan konsentrasi lainnya. Berdasarkan hasil penelitian disimpulkan bahwa kulit buah Karika memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Shigella flexneri* dan *Escherichia coli*.

***Corresponding Author:**

Dhiah Novalina
Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta,
Jln. Ring Road Barat No. 63 Mlangi, Nogotirto, Gamping, Sleman
Yogyakarta, Indonesia.
Email: dhiah.novalina@gmail.com



1. PENDAHULUAN

Keracunan dapat berasal dari bahan makanan yang mengandung racun atau akibat bakteri pada makanan tersebut. Keracunan akibat bakteri disebabkan oleh ketidakhigienisan saat proses pengolahan makanan. Bakteri-bakteri yang dapat menyebabkan keracunan makanan antara lain: *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, *Salmonella sp*, *Campylobacter jejuni*, *Shigella sp* dan *Staphylococcus aureus*. Tingkat kontaminasi bervariasi hingga mencapai 24 – 48%.¹ Kontaminasi bakteri pada makanan dan minuman dapat menyebabkan berbagai macam penyakit.^{2,3} Penyakit-penyakit tersebut umumnya mudah menyerang orang yang mengalami penurunan daya tahan tubuh.⁴

Karika (*Carica pubescens*) merupakan tanaman endemik Dataran Tinggi Dieng, Wonosobo Jawa Tengah. *Carica pubescens* berkerabat dekat dengan *Carica papaya*. Ukuran buah Karika lebih kecil dibandingkan pepaya umumnya, bentuk buahnya bulat telur dengan berat 100 – 150 g, panjang 6 – 10 cm, dan diameter 3 – 5 cm. Buah Karika memiliki lima sudut yang memanjang dari ujung hingga pangkal buahnya. Kulit buah Karika berwarna kuning bila sudah masak, permukaannya licin, tebal dan bergetah.⁵ *Carica pubescens* digunakan sebagai bahan pembuatan selai dan minuman alkohol di Amerika Selatan. Buah yang masih muda dimanfaatkan sebagai obat penyakit cacing dan bahan kosmetik, setelah dikeringkan dan dibuat serbuk. Papain dalam Karika dapat digunakan dalam industri farmasi, makanan dan minuman. *Carica pubescens* dimanfaatkan sebagai sabun cuci pakaian di Hawaii. Di daerah Dieng, Karika dibiarkan terbuang dan jumlahnya melimpah.⁶

Belum ada penelitian tentang Karika di luar negeri, namun telah banyak penelitian tentang aktivitas antibakteri *Carica papaya* yang merupakan kerabat dekat Karika. Berdasarkan penelitian di luar negeri, kulit buah *Carica papaya* diketahui memiliki aktivitas antibakteri terhadap *C. diphtheria*, *S. pneumoniae*, *B. substilis*, *C. perfringens*.⁷ Pada penelitian lainnya *C. papaya* telah diteliti biji, daun dan akarnya memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. typhi*.^{8,9} Pada penelitian lainnya, *C. papaya* memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Enterococcus faecalis*.¹⁰

Di Indonesia sudah terdapat beberapa penelitian tentang Karika, misalnya aktivitas antibakteri daun Karika terhadap bakteri penyebab diare,¹¹ aktivitas antibakteri fraksi etil asetat ekstrak etanol daun Karika terhadap *Salmonella typhi* secara in vivo dan in vitro.¹² Pada penelitian lainnya, ekstrak etanol 70% kulit buah Karika tidak menunjukkan aktivitas antibakteri *Salmonella typhi*¹³ oleh sebab itu perlu dilakukan pengujian aktivitas antibakteri kulit Karika dengan kemurnian ekstrak yang lebih baik, yaitu berupa fraksi dari ekstrak sampel. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak kulit buah Karika terhadap *Shigella flexneri* dan *Escherichia coli* serta untuk mengetahui jenis fraksi terbaik dari ekstrak kulit buah Karika yang berpotensi sebagai antibakteri *Shigella flexneri* dan *Escherichia coli*.

2. BAHAN DAN METODE PENELITIAN

2.1. Desain penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen dengan melakukan pengujian efektivitas antibakteri yang dimiliki oleh Karika dengan menggunakan rancangan acak lengkap dengan 6 kelompok perlakuan (fraksi n-heksan 50%, fraksi n-heksan 25%,

fraksi n-heksan 12,5%, fraksi etil asetat 50%, fraksi etil asetat 25%, fraksi etil asetat 12,5%), kontrol positif dan kontrol negatif. Pada masing-masing perlakuan dilakukan 5 kali pengulangan.

2.2. Lokasi penelitian

Sampel kulit buah Carica diperoleh dari Koperasi Serba Usaha Carica di kota Wonosobo. Selanjutnya preparasi sampel kulit buah Karika dilakukan di UPT Laboratorium Pusat Universitas Sebelas Maret. Tahap ekstraksi sampel dilakukan di B2P2TOOT Tawangmangu. Tahap fraksinasi ekstrak dan uji antibakteri dilakukan di UPT Laboratorium Pusat Universitas Sebelas Maret.

2.3. Bahan dan alat penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain: kulit buah *C. pubescens* yang diperoleh dari Koperasi Serba Usaha Carica di kota Wonosobo. Bahan yang digunakan untuk ekstraksi dan fraksinasi antara lain: n-heksan (Merck), etil asetat (Merck), etanol absolute (Merck). Bakteri uji yang digunakan adalah *Shigella flexneri* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* EPEC 0111 dari Balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta.

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain: ekstraktor Perkolasi (Iwaki), gelas beker (Iwaki), timbangan (AT4000 Mettler Toledo), oven (Memmert), *petri dish*, erlenmeyer (Iwaki), tabung reaksi (Iwaki), *waterbath* (Haake 15W), *Laminair Air Flow*, inkubator (P-Selecta), labu erlenmeyer (Iwaki), autoklaf (P-Selecta Presoclave 75), *VacumRotary Evaporator R-210* (Buchi Zwitserland), *Vortex Mixer (V-300)*, *UV-Visible Spectrofotometer (UV-160 1PC Shimadzu)*.

2.4. Koleksi/tahapan penelitian

2.4.1. Preparasi Sampel

Sampel berupa kulit buah Karika diperoleh dari usaha agribisnis Koperasi Serba Usaha (KSU Carica). Sampel kulit buah Karika dicuci bersih dan dikeringkan dalam oven pada suhu 37°C. Pengeringan kulit buah Karika dilakukan hingga beratnya konstan. Kulit buah Karika yang telah konstan beratnya, selanjutnya diblender hingga berbentuk serbuk.

2.4.2. Ekstraksi dan Fraksinasi

Serbuk kulit buah Karika diekstrak menggunakan metode perkolasi. Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi adalah etanol 70%. Filtrat yang diperoleh dari ekstraksi selanjutnya dievaporasi di atas *waterbath* hingga berbentuk pasta. Ekstrak yang telah berbentuk pasta selanjutnya difraksinasi dengan etil asetat dan n-heksan. Pada proses fraksinasi tersebut dihasilkan 2 fraksi, yaitu fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan. Fraksi etil asetat dan fraksi n-heksan dipekatkan dengan oven pada suhu 40°C hingga berbentuk pasta.⁹ Selanjutnya larutan dari fraksi etil asetat dan n-heksan tersebut digunakan untuk uji aktivitas antibakteri terhadap *Shigella flexneri* dan *Escherichia coli*.

2.4.3. Uji Aktivitas Antibakteri

Fraksi n-heksan dan etil asetat dari Kulit Karika diuji aktivitasnya terhadap bakteri *Shigella flexneri* dan *Escherichia coli* dengan metode *Cup-plate Method* berdasarkan metode yang direkomendasikan oleh *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*. Metode ini digunakan untuk menentukan diameter zona hambat oleh ekstrak terhadap bakteri yang diujikan.¹⁴ Inokulum bakteri yang telah disamakan dengan larutan standart *MacFarland* 0,5, dioleskan secara *swab* pada media MHA dengan *cotton bud* steril.¹⁵ Pada media tersebut dibuat 8 sumuran. Sumuran tersebut terdiri dari kontrol negatif, kontrol positif, perlakuan n heksan konsentrasi 50%, n-heksan konsentrasi 25% dan n-heksan konsentrasi 12,5%, etil asetat konsentrasi 50%, etil

asetat konsentrasi 25% dan etil asetat konsentrasi 12,5%. Pada kontrol negatif, sumuran diisi dengan larutan DMSO yang merupakan pelarut dari ekstrak. Pada kontrol positif digunakan *disk* antibiotik, dalam hal ini antibiotik ampisilin. Pada perlakuan konsentrasi, sumuran masing-masing diisi 40 μ L ekstrak (n-heksan dan etil asetat). Selanjutnya biakan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

Zona bening yang terbentuk di sekitar sumuran diukur diameternya dengan jangka sorong. Zona bening tersebut mengindikasikan bahwa senyawa kimia pada sampel Karika mampu menghambat bakteri yang diujikan.¹⁰ Data berupa diameter zona hambat sampel terhadap bakteri selanjutnya dianalisis secara statistik.

2.5. Analisis data

Data penelitian berupa diameter zona bening dianalisis secara statistik menggunakan *one way Anova*. Beda nyata antar perlakuan diuji menggunakan DMRT dengan signifikansi 99%.

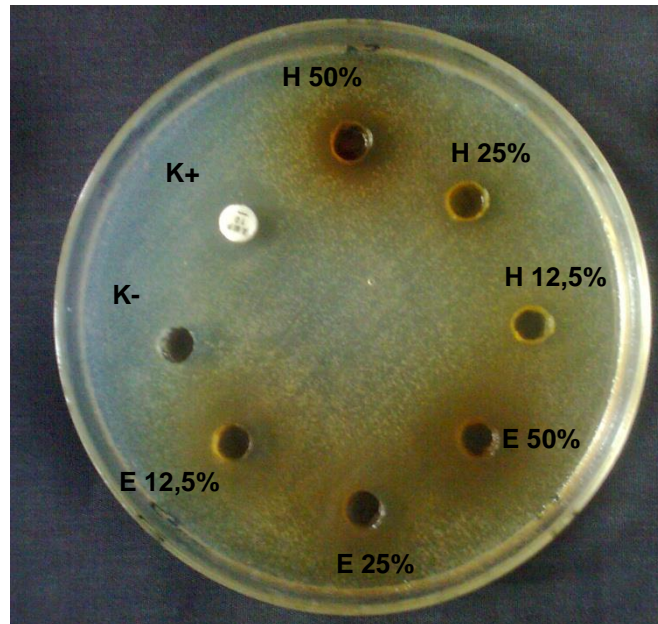
3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, diperoleh data kuantitatif berupa diameter zona hambat yang terbentuk akibat penghambatan ekstrak sampel kulit buah Karika terhadap bakteri uji. Kepekaan bakteri uji ditandai dengan besar diameter zona jernih yang terbentuk. Makin besar zona jernih makin peka bakteri uji terhadap senyawa antimikroba tersebut.¹⁶ Dari uji aktivitas antibakteri diperoleh data diameter zona hambat pada biakan bakteri seperti pada [tabel 1](#).

Tabel 1. Diameter Zona Hambat pada Biakan Bakteri Uji

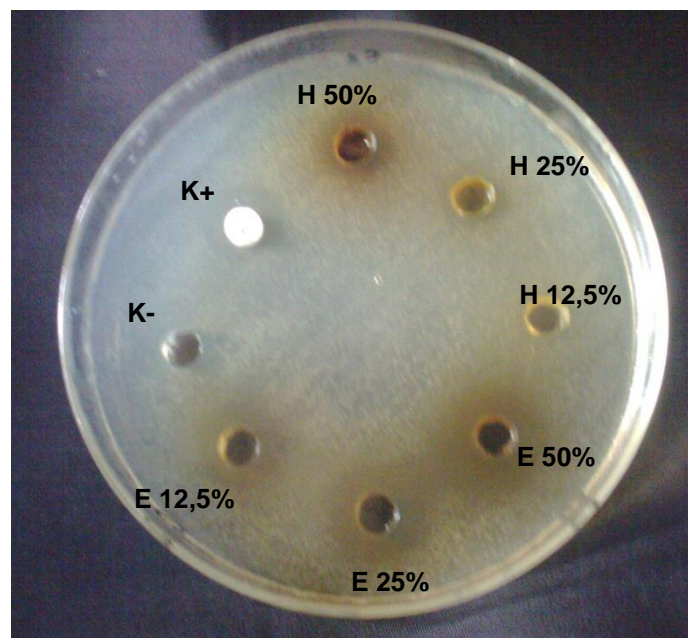
Jenis Fraksi	Diameter Zona Hambat (mm)	
	<i>S. flexneri</i>	<i>E. coli</i>
n-heksan 50%	8	0
n-heksan 25%	6	0
n-heksan 12,5%	4	0
Etil asetat 50%	13	13
Etil Asetat 25%	11	10
Etil asetat 12,5%	9	11
Kontrol negatif	0	0
Kontrol positif	17	18

Fraksi n-heksan memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. flexneri*, tetapi tidak memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* pada semua konsentrasi. Aktivitas penghambatan tertinggi fraksi n-heksan terhadap *S. flexneri* terjadi pada konsentrasi 50% sebesar 8 mm. Pada [Tabel 1](#), diketahui bahwa fraksi etil asetat memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. flexneri* dan *E. coli* pada semua konsentrasi. Fraksi etil asetat pada konsentrasi 50% memberikan daya hambat tertinggi terhadap *S. flexneri* dan *E. coli* sebesar 13 mm, selanjutnya daya hambat tertinggi kedua terhadap *S. flexneri* terjadi pada konsentrasi 25% dan yang memiliki daya hambat terendah terjadi pada konsentrasi 12,5%. Daya hambat tertinggi kedua terhadap *E. coli* terjadi pada konsentrasi 12,55, sedangkan daya hambat terendah terhadap *E. coli* terjadi pada konsentrasi 25%. Secara umum berdasarkan fraksinya, fraksi etil asetat (konsentrasi 50%, 25% dan 12,5%) menunjukkan daya hambat yang lebih baik dibandingkan dengan fraksi n-heksan (konsentrasi 50%, 25% dan 12,5%) terhadap bakteri yang diujikan. Hal tersebut ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambat pada fraksi etil asetat yang lebih besar dibandingkan dengan fraksi n-heksan.



Gambar 1. Zona Hambat Ekstrak Kulit Buah Karika pada Biakan *Shigella flexneri*
Sumber: Novalina (2013)

Pada penelitian ini juga digunakan antibiotik sebagai kontrol positif, yaitu ampicilin. Dari diameter zona hambatnya diketahui ekstrak kulit buah Karika belum mampu melampaui aktivitas ampicilin dalam menghambat *S. flexneri* dan *E. coli*. Namun perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang aktivitas antibakteri ekstrak kulit buah Karika pada konsentrasi 100% terhadap bakteri yang sama, agar bisa dilihat potensinya bila dibandingkan dengan antibiotik.



Gambar 2. Zona Hambat Kulit Buah Karika pada Biakan *Escherichia coli*
Sumber: Novalina (2013)

Diameter zona hambat pada masing-masing fraksi dianalisis menggunakan *one way Anova*. Berdasarkan analisis tersebut diketahui bahwa fraksi n-heksan dengan fraksi etil asetat memberikan pengaruh berbeda secara signifikan terhadap bakteri

yang diujikan pada ekstrak kulit buah Karika. Hal tersebut menunjukkan bahwa fraksi etil asetat memberikan daya hambat yang tinggi dibandingkan dengan fraksi n-heksan. Pada penelitian lainnya yang serupa, semua ekstrak etil asetat daun dan kulit batang tanaman mangrove menunjukkan daya hambat tertinggi dibandingkan ekstrak petroleum eter, kloroform, etanol dan air.¹⁷ Penelitian lain menyatakan bahwa ekstrak etil asetat memberikan penghambatan yang relatif tinggi dibandingkan dengan ekstrak n-heksan terhadap bakteri-bakteri penyebab diare yang diujikan.¹⁸ Pada penelitian lainnya, fraksi etil asetat *Satureja graeca* menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*.¹⁹ Pada penelitian terhadap *Tabebuia rosea* dan *Tarchonanthus camphoratus*, ekstrak dari fraksi etil asetat juga menunjukkan aktivitas antibakteri yang baik terhadap *Salmonella typhi*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*.^{20,21} Bahkan pada penelitian lainnya menyatakan fraksi etil asetat dari ko-kultur *Streptomyces* sp. berpotensi sebagai senyawa antimikrobia dan antikanker yang baik.²²

Hal ini terjadi berkaitan dengan sifat senyawa fitokimia yang diujikan dengan sifat struktur dinding sel bakteri. Senyawa fitokimia yang terekstrak ke dalam etil asetat bersifat semipolar. Senyawa semipolar tersebut memiliki afinitas yang lebih tinggi untuk berinteraksi dengan dinding sel bakteri yang tidak bersifat absolut hidrofobik dan absolut hidrofilik. Suatu senyawa yang memiliki polaritas optimum akan memiliki afinitas optimum.²³ Senyawa yang memiliki afinitas optimum akan memiliki afinitas antimikrobia yang optimum, karena untuk dapat berinteraksi antara senyawa antimikrobia dengan bakteri yang diujikan membutuhkan keseimbangan antara hidrofilik dan hidrofobik. Pengamatan di bawah mikroskop elektron aktivitas antibakteri fraksi etil asetat dari *Pseudomonas* sp. UJ-6 terhadap MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) ditemukan bahwa fraksi etil asetat dari *Pseudomonas* sp. UJ-6 mampu melisis dinding sel dari MRSA.²⁴ Selain itu pada penelitian lainnya, fraksi etil asetat biji teratai menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* dan *S. typhimurium* meski sudah diberikan perlakuan pemanasan.²⁵

4. SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian tersebut disimpulkan bahwa ekstrak kulit Karika memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Shigella flexneri* dan *Escherichia coli*. Fraksi etil asetat dari Karika memiliki daya hambat lebih tinggi daripada fraksi n-heksan. Saran bagi penelitian selanjutnya, perlu dilakukan uji aktivitas antibakteri serupa secara in vivo.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih disampaikan kepada Prof. Dr. Suranto, PhD, Dr. Edwi Mahajoeno, Staf Laboratorium Galenika B2P2TOOT Tawangmangu.

DAFTAR PUSTAKA

1. Pracoyo N. E., dan Parwati D. *Analisis Mikrobiologik Beberapa Jenis Makanan Jajanan (Moko) di DKI Jakarta*. Jakarta: Cermin Dunia Kedokteran; 2006.
2. Siagian A. *Mikroba Patogen pada Makanan dan Sumber Pencemarannya*. Medan: USU Digital Library; 2002.
3. Coleman ME, Marks HM, Golden NJ, Latimer HK. Discerning Strain Effects in Microbial Dose-Response Data. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 2004; 67: 667-85
4. Lesmana M. *Enterobacteriaceae: Salmonella & Shigella*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Trisakti; 2003.
5. Dewi SK. *Analisis Strategi Pengembangan Usaha Industri Kecil Olahan Carica*. Departemen Agribisnis Fakultas Ekonomi dan Manajemen. Institut Pertanian Bogor: Bogor; 2009.

6. Hidayat S. *Prospek Pepaya Gunung (Carica pubescens Lenne & K. Koch) dari Sikunang, Pegunungan Dieng, Wonosobo*. UPT Balai Pengembangan Kebun Raya LIPI: Bogor; 2000.
7. Muhamad SAS, Jamilah B., Russly AR and Faridah A. In vitro antibacterial activities and composition of Carica papaya cv. Sekaki/ HongKong Peel Extracts. *International Food Research Journal*. 2017; 24(3): 976-984.
8. Nirosha N and Mangalanayaki R. Antibacterial Activity of Leaves and Stem Extract of Carica papaya L. *IJAPBC*. 2013; 2(3).
9. Peter JK, Kumar Y, Pandey P and Masih H. Antibacterial Activity of Seed and Leaf Extract of Carica papaya var Pusa Dwarf Linn. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. 2014; 9(2): 29-37.
10. Wilda Y, Satryani FM, Maemonah S, Badriyah, Christyaningsih J. The Inhibitory Effect of Carica papaya cv. Thailand Leaf Extract to the Growth of Enterococcus faecalis In Vitro. *Scholars Journal of Dental Sciences*. 2017; 4(6):262-266 .
11. Novalina Dhiah, Sugiyarto, Susilowati A. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Carica Pubescens Dari Dataran Tinggi Dieng Terhadap Bakteri Penyebab Diare. *El-Vivo*. 2013; 1(1): 1-12.
12. Alfiah I. *Aktivitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Daun Karika Terhadap Salmonella typhi secara in Silico dan in vitro*. Malang: Jurusan biologi Universitas islam negeri maulana malik ibrahim malang; 2016.
13. Putri GI dan Nurhayani. *Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol 70% Kulit Buah Carica (Carica pubescens) Terhadap Bakteri Salmonella typhi*. Universitas Muhammadiyah Surakarta: Surakarta; 2018.
14. Puspawati N. *Aktivitas Antimikrobia dan Profil Kromatografi Lapis Tipis dari Ekstrak Meniran Merah (Phyllanthus urinaria) dan Hasil Fraksinasinya terhadap Staphylococcus aureus ATCC 25923*. Program Pascasarjana Universitas Sebelas Maret: Surakarta; 2011.
15. Ahmed D, Waheed A, Chaudhary MA, Khan SR, Hannan A and Barkaat M. Nutritional and Antimicrobial Studies on Leaves and Fruit of Carissa opaca Stapf Ex Haines. *EJEAF Che.*, 2010; 9 (10): 1631-1640.
16. Kumala S, Shanny F dan Wahyudi P. Aktivitas Antimikroba Metabolit Bioaktif Mikroba Endofitik Tanaman Trengguli (Cassia fistula L.). *Jurnal Farmasi Indonesia*. 2006; 3(2): 97-102.
17. Abeyasinghe PD. Antibacterial Activity of some Medicinal Mangroves against Antibiotic Resistant Pathogenic Bacteria. *Indian J. Pharm. Sci.* 2010;72 (2): 167-172.
18. Fitriani Y, Astawan M, Soekarto SS, Wiryawan KG, Wresdiyati T, Khairina R. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Biji Teratai Terhadap Bakteri Patogen Penyebab Diare. *J. Teknologi dan Industri Pangan*. 2008;19(2).
19. Boutellaa S, Zellagui A, Baaziz N and Hallis Y. Assessment of Antimicrobial Activity of Ethyl Acetate and n-butanol Extracts from Satureja graeca L. growing in Algeria. *Der Pharmacia Lettre*. 2016; 8(19):462-465 .
20. Solomon S, Muruganantham N, Senthamilselvi MM. Antimicrobial Activity of Tabebuia rosea (bunga). *International Journal of Research and Development in Pharmacy and Life Sciences*. 2016; 5(2): 2018-2022.
21. Wetungu MW., Matasyoh JC, Kinyanjui T. Antimicrobial activity of solvent extracts from the leaves of Tarchonanthus camphoratus (Asteraceae). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2014; 3(1): 123-127.
22. Haque U, Rahman A, Haque A, Sarker AK, Islam AU. Antimicrobial and Anticancer Activities of Ethyl Acetate Extract of Co-culture of Streptomyces sp. ANAM-5 and AIAH-10 Isolated From Mangrove Forest of Sundarbans, Bangladesh. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 2016; 6(02):051-055.

23. Kanazawa A, Ikeda T and Endo T. A novel Approach to Mode of Action of Cationic Biocides Morphological Effect on Bacterial Activity. *J. Appl. Bacterial.* 1995; 78: 55-60.
24. Lee Dae-Sung, Sung-Hwan E, Jae-Young J, Young-Mo K, Myung-Suk L and Young-Man K. Antibacterial Activity of an Ethyl Acetate Extract of *Pseudomonas* sp. UJ-6 against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Fish Aquat Sci.* 2013;16 (2): 79-84.
25. Fitriah Y. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Biji Teratai (*Nymphaea pubescens* Willd) Akibat Pemanasan. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia.* 2011; 14(1): 43-48.



Potensi ekstrak daun *Carica pubescens* sebagai alternatif antidiare Bakteri *Vibrio cholerae* dan *Shigella dysenteriae*

Potential of *Carica pubescens* leaf extract as alternative antidiare Bacteria for *Vibrio cholerae* and *Shigella dysenteriae*

Tri Dyah Astuti^{1a*}, Wahid Syamsul Hadi^{1b}

¹ Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta, Indonesia

^aEmail address: tridyah@unisayogya.ac.id

^bEmail address : dokterwahid@yahoo.co.id

HIGHLIGHTS

Carica Pubescens leaf extract with a concentration of 100% has a wider microbial inhibitory power

ARTICLE INFO

Article history

Received date : August 06th, 2018

Revised date : September 28th, 2018

Accepted date : December 31st, 2018

Keywords:

Carica Pubescens
Vibrio cholerae
Shigella dysenteriae
In Vitro

Kata Kunci:

Carica Pubescens
Vibrio cholerae
Shigella dysenteriae
In Vitro

ABSTRACT / ABSTRAK

Acute diarrhea is one of the main causes of morbidity and mortality. A people are starting to choose traditional medicines for alternative therapy. Traditional medicines or herbal medicines are considered safer and do not have side effects such as chemical drugs. The purpose of this study was to determine the anti-diarrhea effect of *Carica pubescens* leaf extract on the bacteria *Vibrio cholerae* and *Shigella dysenteriae*. This study was conducted by testing the activity of *Vibrio cholerae* and *Shigella dysenteriae* bacteria on *Carica pubescens* leaf extract with a well method, which results can be seen from the formation of inhibitory zones. The data obtained were processed using Two Way ANOVA test statistics. The results showed that the leaves extract of *Carica Pubescens* concentration of 100% had the best therapeutic effect because it had the greatest inhibitory power on the bacteria *Vibrio cholerae* and *Shigella dysenteriae*.

Diare akut merupakan salah satu penyebab utama morbiditas dan mortalitas. Masyarakat mulai memilih obat tradisional atau obat herbal sebagai pengobatan alternatif. Obat tradisional atau obat herbal dinilai lebih aman dan tidak memberikan efek samping seperti obat kimia. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efek anti diare ekstrak daun *Carica pubescens* terhadap bakteri *Vibrio cholerae* dan *Shigella dysenteriae*. Penelitian ini dilakukan dengan menguji aktivitas bakteri *Vibrio cholerae* dan *Shigella dysenteriae* terhadap ekstrak daun *Carica pubescens* dengan metode sumuran yang hasilnya dapat dilihat dari terbentuknya zona hambat. Data yang diperoleh diolah menggunakan statistik uji Two Way ANOVA. Hasil penelitian menunjukkan ekstrak daun *Caricap pubescens* konsentrasi 100% mempunyai efek terapi terbaik karena mempunyai daya hambat terbesar terhadap bakteri *Vibrio cholerae* maupun *Shigella dysenteriae*.

***Corresponding Author:**

Tri Dyah Astuti
Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta,
Jln. Ring Road Barat No. 63 Mlangi, Nogotirto, Gamping, Sleman,
Yogyakarta, Indonesia.
Email: tridyah@unisayogya.ac.id



1. PENDAHULUAN

Penyakit diare merupakan penyakit endemis di Indonesia dan merupakan penyakit potensial terjadi Kejadian Luar Biasa (KLB) yang dapat disertai dengan kematian. Pada tahun 2017 terjadi 7.077.299 kasus diare yang tersebar di seluruh Indonesia. Provinsi Jawa Barat menempati kasus tertinggi penyakit diare sebanyak 1.297.021 dan disusul oleh Jawa Timur sekitar 1.060.910 kasus diare.¹

Diare akut merupakan salah satu penyebab utama morbiditas dan mortalitas pada anak di berbagai negara berkembang termasuk di Indonesia. Terdapat 60 juta diare akut setiap tahunnya di Indonesia, 1 - 5% diantaranya akan menjadi diare kronik dan bila sampai terjadi dehidrasi berat yang tidak segera ditangani 50-60% diantaranya dapat meninggal dunia.²

Diare akut infeksi diklasifikasikan secara klinis dan patofisiologis menjadi diare non inflamasi dan diare inflamasi. Diare inflamasi disebabkan invasi bakteri dan sitotoksin di kolon dengan manifestasi sindroma disentri dengan diare yang disertai lendir dan darah. Gejala klinis yang menyertai keluhan abdomen seperti mulas sampai nyeri seperti kolik, mual, muntah, demam, tenesmus, serta gejala dan tanda dehidrasi. Pada pemeriksaan tinja rutin secara makroskopis ditemukan lendir dan atau darah, serta mikroskopis ditemukan sel leukosit polimorfonuklear.³

Tingginya angka kesakitan diare tersebut dapat disebabkan karena *foodborne infection* dan *waterborn infection* oleh bakteri *Shigella* sp., *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Campylobacter jejuni* yang tergolong dalam bakteri invasif dan *Enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC), *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium prefringens*, *Vibrio cholerae* yang tergolong dalam bakteri non invasif.⁴

Shigella dysenteriae termasuk dalam kelompok bakteri gram negatif, tidak berkapsul dan tidak membentuk spora, aerob fakultatif, memfermentasi glukosa dengan membentuk asam tetapi jarang memproduksi gas.⁵ Penyakit yang disebabkan oleh *Shigella dysenteriae* adalah disentri basiler, yaitu suatu infeksi peradangan akut saluran pencernaan, dengan kondisi kronis meliputi diare, buang air besar berair yang disertai darah, lendir, dan nanah.⁶

Vibrio cholerae merupakan bakteri yang berbentuk batang bengkok seperti koma, gram negatif, tidak berspora, hidup secara aerob atau anaerob fakultatif, bergerak melalui flagel yang monotrik, tidak membentuk spora, dan pada biakan tua dapat menjadi berbentuk batang lurus.⁷ *Vibrio cholerae* Salah satu bakteri yang menyebabkan diare dan biasanya diare yang ditimbulkan disebut dengan diare kolera.⁸

Seiring berkembangnya pengetahuan terdapat peningkatan kecenderungan penggunaan obat tradisional sebagai alternatif pengobatan. Hal tersebut akibat kecenderungan masyarakat untuk menerapkan hidup sehat kembali ke alam atau sering disebut dengan "*back to nature*". Selain itu, didorong oleh sangat kecilnya efek samping obat tradisional serta harganya yang terjangkau oleh semua masyarakat.⁹

Tanaman yang berpotensi dijadikan sebagai sumber obat salah satunya adalah *Carica pubescens*. Tanaman ini merupakan tanaman lokal di dataran tinggi Dieng. Penduduk setempat menyebutnya dengan sebutan karika. Tanaman ini berkerabat dekat dengan pepaya pada umumnya (*Carica papaya*). Namun, mempunyai karakteristik yang berbeda. Bagian tanaman karika yang paling banyak dimanfaatkan adalah buahnya. Daun karika dapat menyembuhkan penyakit akibat cacing kremi, demam malaria, beri-beri, sariawan, sembelit, dan disentri amuba.¹⁰

Buah tanaman ini mengandung zat antioksidan yang mampu menangkal bahaya radikal bebas dan mengandung enzim pencernaan yang meningkatkan kerja alat pencernaan, absorpsi nutrisi, mengurangi stress pencernaan, menjaga pH, menjaga kesehatan usus serta menyeimbangkan enzim-enzim alami tubuh.¹¹

Berdasarkan hasil uji fitokimia daun *Carica pubescens* mengandung beberapa senyawa aktif seperti flavanoid, polifenol dan tanin, serta triterpenoid.¹² Selain kandungan tersebut daun *Carica pubescens* juga memiliki kandungan senyawa aktif cystein protease dan papain.¹³ Senyawa aktif lainnya yang terkandung dalam *Carica pubescens* adalah saponin triterpen¹⁴ serta kandungan antioksidan,¹⁵ sedangkan senyawa aktif pada daun *Carica pubescens* yang berpotensi sebagai antimikrobia, antara lain flavonoid, alkaloid, tanin dan fenol.¹⁶

Alkaloid merupakan golongan senyawa yang bersifat basa yang mengandung satu atau lebih atom nitrogen dalam bentuk gabungan sebagai bagian dari sistem siklik. Alkaloid biasanya tidak berwarna dan berbentuk kristal.¹⁷ Alkaloid merupakan senyawa nitrogen heterosiklik, diketahui memiliki aktivitas antimikrobia secara *in vivo*.¹⁸

Flavonoid merupakan salah satu kelompok senyawa metabolit sekunder yang paling banyak ditemukan dalam semua tumbuhan berpembuluh, zat warna dalam bunga-bunga, batang maupun daun-daunan. Flavonoid berperan sebagai antioksidan dengan cara mendonasikan atom hidrogennya dan berada dalam bentuk glukosida atau dalam bentuk bebas yang disebut aglikon.¹⁹ Secara *in vivo* flavonoid berfungsi sebagai antimikrobia dengan membentuk kompleks dengan protein ekstraseluler yang terdapat pada dinding sel bakteri, dimungkinkan hal tersebut menyebabkan rigiditas dari dinding sel mengalami penurunan. Sehingga mengakibatkan flavonoid mampu menerobos dinding sel.²⁰

Tanin merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder yang termasuk dalam golongan polifenol. 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.²¹ Senyawa fenolik merupakan senyawa yang penting karena merupakan kelas besar diantara senyawa-senyawa penyusun tanaman. Mekanisme antimikroba senyawa fenolik secara *in vivo* adalah dengan mengganggu kerja membran sitoplasma bakteri, termasuk diantaranya mengganggu transpor aktif dan kekuatan proton.²² Berdasarkan kandungan tersebut maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut potensi ekstrak daun *Carica pubescens* sebagai alternatif antidiare bakteri *Vibrio cholerae* dan *Shigella dysenteriae*, serta belum adanya penelitian yang secara khusus menggunakan Karika dari Wonosobo sebagai alternative antidiare menyebabkan penelitian ini perlu dilakukan.

2. BAHAN DAN METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen dengan menggunakan rancangan acak lengkap.

2.1 Bahan dan alat penelitian

Bahan yang digunakan adalah: ekstrak daun *Carica pubescens*, etanol 70%, aquadest, *Mueller Hinton Agar*, kertas cakram steril, kertas cakram antibiotik, NaCl fisiologis, dietil sulfoksida 5%, Brain Heart Infusion, bakteri *Vibrio cholerae* dan *Shigella dysenteriae*. Peralatan yang digunakan berupa peralatan untuk ekstraksi.

2.2 Tahap penelitian

2.2.1 Preparasi pembuatan ekstrak daun *Carica pubescens*

Daun *Carica pubescens* sebanyak 1 kg dipotong-potong kemudian dimasukkan kedalam binder pada suhu $\pm 45^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam. Daun yang sudah dibinder dihancurkan dengan blender sehingga menjadi serbuk daun carica yang halus. Serbuk daun carica selanjutnya dimasukkan dalam botol coklat sebanyak 200 g dan ditambah pelarut etanol 70% sebanyak 2L dan digojok selama 3 hari. Daun carica setelah digojok dilanjutkan dengan tahap penyaringan menggunakan vacuum dan kain flanel, hasil penyaringan dilanjutkan lagi dengan penyaringan menggunakan kertas saring. Hasil penyaringan dilanjutkan dengan vacuum evaporator untuk memisahkan etanol dengan ekstrak. Hasil ekstrak dilanjutkan lagi dengan dibinder selama 24 jam pada suhu 45°C untuk memekatkan hasil ekstraksi. Hasil ekstraksi selanjutnya dibuat konsentrasi 100%, 50%, 25%, dan 12.5%.

2.2.2 Pembuatan Media dan Perbanyakkan Bakteri

Media *Brain Heart Infusion* digunakan untuk perbanyakkan bakteri, sedangkan media yang digunakan untuk pengujian aktivitas adalah media *Mueller Hinton Agar* (MHA). Sebanyak 6 g media BHIB dilarutkan ke dalam 200 ml akuades, dipanaskan hingga terlarut secara sempurna dan diatur pH nya pada kisaran $7,4 \pm 0,2$. Selanjutnya dituang dalam tabung reaksi. Sedangkan untuk media MHA, sebanyak 38 g media MHA dilarutkan dalam 1000 ml akuades, dipanaskan hingga terlarut secara sempurna dan pH diatur pada kisaran $7,4 \pm 0,2$. Selanjutnya media tersebut disterilkan menggunakan autoklaf pada tekanan 1,5 atm, suhu 121°C selama 15 menit. Setelah media disterilkan, selanjutnya media tersebut disimpan pada suhu 4°C dan siap digunakan.²³

2.2.3 Pembuatan Larutan Standart *McFarland* 0,5

Sebanyak 0,5 mL $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1,175 % ditambah dengan H_2SO_4 1% hingga volumenya 99,5 mL dan dihomogenkan. Kekeruhan dari larutan *McFarland* tersebut diperiksa dengan spektrofotometer dan diatur absorbansinya agar berada dalam kisaran 0,08-0,13 pada panjang gelombang 625 nm. Larutan tersebut disegel dan disimpan dalam ruang gelap pada suhu kamar. Sebelum digunakan, larutan tersebut dihomogenkan dengan menggunakan vortex. Larutan *McFarland* tersebut akan dijadikan sebagai standart kekeruhan bakteri yang akan diuji aktivitasnya.²⁴

2.2.4 Penyiapan suspensi bakteri *Vibrio cholerae* dan *Shigella dysenteriae*

BHI cair sebanyak 5 ml dimasukkan kedalam tabung reaksi ditambahkan dengan tiga ose biakan bakteri selanjutnya di vortex. Hasilnya dibandingkan dengan *McFarland* 0,5 dan diamati kekeruhan yang terjadi. Jika pada media BHI terlihat terlalu keruh dari *McFarland* maka ditambah lagi jumlah media BHI nya, jika kurang keruh maka ditambahkan lagi suspensi bakterinya.

2.2.5 Uji aktivitas antibakteri

Suspensi bakteri yang telah dibuat pada media BHI, dioleskan (swab) pada media MHA sampai rata menggunakan kapas lidi steril, selanjutnya dibuat sumuran dengan konsentrasi 12,5%, 25%, 50% dan 100%.²⁵ Dan dibuat kontrol positif berupa *disk* antibiotik serta kontrol negatif berupa pelarut ekstrak, yaitu *dimethyl sulfoxide* (DMSO). Selanjutnya biakan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C . Daerah bening di sekitar sumuran yang berisi larutan uji diukur diameternya dengan menggunakan jangka sorong. Daerah bening tersebut

mengindikasikan bahwa ekstrak memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri uji.²⁶

2.2.6 Analisis data

Diameter zona hambat ditunjukkan dengan adanya zona steril kemudian diukur menggunakan jangka sorong. Hasilnya kemudian dianalisis dengan uji *Kolmogorov-Smirnov* untuk melihat normalitas data. Kemudian dilanjutkan dengan uji ANOVA dua jalan karena ada dua faktor yang berpengaruh pada zona hambat. Dari uji ANOVA dua jalan dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Test* untuk menentukan perlakuan yang terbaik yang sebelumnya sudah dilakukan uji kesamaan varian dengan uji *Levene*. Jika uji variannya sama maka dilanjutkan lagi dengan uji *SNK (Uji Student Newman-Keuls)*.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Bakteri *Vibrio cholerae* dan *Shigella dysenteriae* diinokulasikan (*streak plate*) ke dalam media *Mueller Hinton Agar* (MHA) kemudian pada sumuran diisi dengan kertas cakram yang sudah direndam pada ekstrak daun *Carica pubescens* dengan konsentrasi 100%, 50%, 25% dan 12,5% dan *disk* antibiotik, kemudian dilanjutkan dengan inkubasi 37°C selama 24 jam. Hasil dari inokulasi adalah sebagai berikut

Tabel 1. Hasil pengamatan zona hambat pada media plate

Bakteri	Kosentasi (%)	Perlakuanke- (cm)		
		1	2	3
<i>Vibrio cholera</i>	100	2,5	2,6	2,5
	50	2,0	2,3	2,2
	25	1,9	1,9	2,0
	12,5	1,8	1,8	1,9
	Antibiotik	2,5	2,5	2,5
<i>Shigella dysenteriae</i>	100	1,4	1,3	1,3
	50	0,7	0,8	0,8
	25	0,6	0,7	0,7
	12,5	0,7	0,6	0,6
	Antibiotik	1,7	1,7	1,7

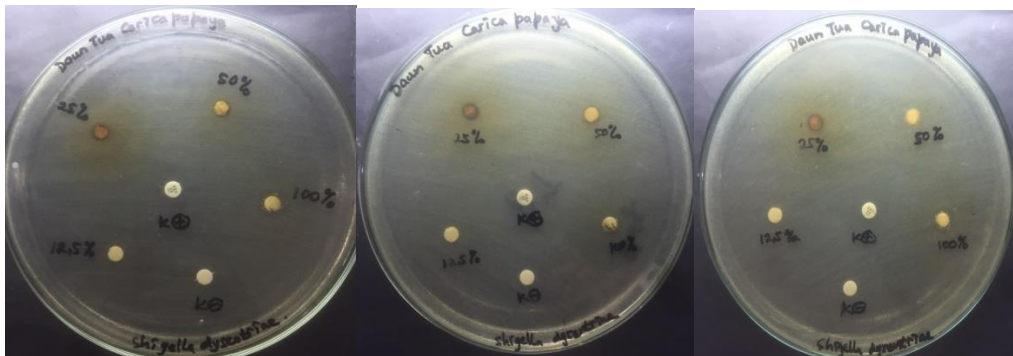
Dari tabel 1 terlihat ada perbedaan zona hambat pada konsentrasi ekstrak daun *Carica pubescens* dari konsentrasi 100%, 50%, 25%, dan 12,5%. Gambaran hasil penelitian dari zona hambat bakteri *Vibrio cholerae* dan *Shigela dysenteriae* dari tabel diatas dapat terlihat dari gambar 1 dan 2.



Gambar 1. Hasil uji aktivitas zona hambat ekstrak *Carica pubescens* terhadap bakteri *Vibrio cholerae*

Sumber: Data primer (2018)

Dari hasil sumuran diatas terlihat zona hambat terbaik yaitu pada kosentrasi 100% ekstrak daun *Carica pubescens*. Pada kosentrasi 100% ekstrak daun *Carica pubescens* menunjukkan hasil yang hampir sama dengan zona hambat antibiotik. Dari gambar tersebut juga terlihat semakin kecil kosentrasi ekstrak daun *Carica pubescens* semakin kecil zona hambat terhadap bakteri *Vibrio cholerae*.



Gambar 2. Hasil uji aktivitas zona hambat ekstrak *Carica pubescens* terhadap bakteri *Shigella dysenteriae*.

Sumber: Data primer (2018)

Dari hasil sumuran terlihat zona hambat terbaik yaitu pada kosentrasi 100% ekstrak daun *Carica pubescens*. Pada kosentrasi 100% ekstrak daun *Carica pubescens* menunjukkan zona hambat yang lebih luas dari pada kosentrasi ekstrak daun *Carica pubescens* yang 50%, 25%, dan 12,5% sehingga dapat disimpulkan bahwa semakin kecil kosentrasi ekstrak daun *Carica pubescens* semakin kecil zona hambat terhadap bakteri *Vibrio cholerae*.

Tabel 2. Uji Two Way ANOVA

Bakteri	Kosentrasi Ekstrak 12,5%	Kosentrasi Ekstrak 25%	Kosentrasi Ekstrak 50%	Kosentrasi Ekstrak 100%
<i>Shigella dysentri</i>	0,633	0,667	0,800	1,333
<i>Vibrio cholera</i>	1,833	1,867	2,167	2,533

Dari tabel 2 terlihat pada konsentasi 100% nilai rerata zona hambat *Shigella dysentri* (1,333) dan *Vibrio cholerae* lebih besar (2,533). Uji dilanjutkan dengan uji SNK (uji Student Newman-Keuls). Hasil uji disajikan sebagai berikut:

Tabel 3. Hasil Uji Student Newman-Keuls

Kosentrasi (%)	Jumlah	Perlakuan 1	Perlakuan 2	Perlakuan 3
12,5	6	1,233		
25	6	1,267		
50	6		1,483	
100	6			1,933
Signifikansi		0,555	1,000	1,000

Dari tabel 3 terlihat zona hambat akibat konsentasi ekstrak daun *Carica pubescens* 100% adalah yang terbesar dan berbeda signifikan dari konsentasi lainnya. Maka konsentasi 100% adalah paling efektif menghambat pertumbuhan bakteri *Shigella dysentri* dan *Vibrio cholerae*. Berdasarkan hasil zona hambat ekstrak daun

Carica pubescens mampu menghambat pertumbuhan bakteri penyebab diare *Shigella dysentri* dan *Vibrio cholerae*, selain itu ekstrak daun *Carica pubescens* juga mampu menghambat pertumbuhan bakteri penyebab diare lainnya seperti penelitian yang dilakukan oleh Novalina (2013) menyatakan ekstrak *Carica pubescens* mampu menghambat pertumbuhan bakteri karena terdapat kandungan tanin, alkaloid, fenol dan flavanoid.

Penelitian ini dengan penelitian yang dilakukan oleh Novalina (2013) memiliki persamaan pada variabel bebas yaitu menggunakan ekstrak daun *Carica pubescens* dengan konsentrasi 12,5%, 25%, dan 50% untuk menghambat bakteri gram negatif (*E. coli* dan *S. flexneri*) penyebab diare. Penelitian yang telah dilakukan menunjukkan hasil zona hambat yang berbeda, sesuai dengan pereaksi yang digunakan dalam ekstraksi daun *Carica pubescens*. Pereaksi yang digunakan pada penelitian sebelumnya menggunakan Fraksi etil asetat dan n-heksan sedangkan penelitian ini menggunakan etanol 70%. Hasil dari penelitian sebelumnya dengan menggunakan pereaksi n-heksan terhadap bakteri *S. flexneri* konsentrasi 12,5% zona hambat 0,6 cm, konsentrasi 25% zona hambat 1,7 cm, 50% zona hambat 1,2 cm. Bakteri *E. coli* konsentrasi 12,5% zona hambat 0,6 cm, konsentrasi 25% zona hambat 1,0 cm, 50% zona hambat 0,8 cm, sedangkan pada pereaksi etil asetat bakteri *S. flexneri* konsentrasi 12,5% zona hambat 2,2 cm, konsentrasi 25% zona hambat 2,5 cm, 50% zona hambat 2,9 cm. Bakteri *E. coli* konsentrasi 12,5% zona hambat 1,1 cm, konsentrasi 25% zona hambat 1,3 cm, 50% zona hambat 1,6 cm. Penelitian yang dilakukan peneliti menunjukkan hasil yang berbeda pada pereaksi etanol 70% terhadap bakteri *Shigella dysentri* konsentrasi 12,5% zona hambat 0,7 cm, konsentrasi 25% zona hambat 0,7 cm, 50% zona hambat 0,8 cm, 100% zona hambat 1,4 cm, sedangkan pada bakteri *Vibrio cholerae* konsentrasi 12,5% zona hambat 1,9 cm, konsentrasi 25% zona hambat 2,0 cm, 50% zona hambat 2,3 cm, 100% zona hambat 2,6 cm.

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak *Carica pubescens* dengan pereaksi dan konsentrasi yang berbeda memiliki efektivitas yang sama dalam menghambat pertumbuhan bakteri gram negatif penyebab diare.

4. SIMPULAN

Hasil uji potensi ekstrak daun *Carica pubescens* sebagai alternatif antidiare bakteri *Vibrio cholerae* dan *Shigella dysentriae* secara *in vitro* menunjukkan konsentrasi ekstrak daun *Carica pubescens* 100% memiliki zona hambat yang terbesar dan berbeda signifikan dari konsentrasi lainnya. Maka konsentrasi 100% adalah konsentrasi yang paling efektif menghambat pertumbuhan bakteri serta memiliki efek terapi terbaik bakteri *Shigella dysentri* maupun *Vibrio cholerae*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada DIKTI yang telah membiayai penelitian ini melalui hibah Penelitian Dosen Pemula. Terima kasih kepada Universitas 'Aisyiyah Yogyakarta dan teknisi laboratorium yang telah membantu peneliti dalam menyelesaikan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. *Profil Kesehatan Indonesia*. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia; 2017.
2. Daldiyono, Marcellus KS, PAPDI. *Diare Akut: Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*. 5th ed. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
3. Wilson WR, Drew WL, Henry NK. *Current Diagnosis and Treatment in Infectious*. New York: Lange Medical Books; 2003.

4. Sudoyo A, Setyohadi B, Alwi I. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*. 4th ed. Jakarta: Departemen IPD Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 2006.
5. Dewi N. Kemampuan Daya Hambat Ekstrak Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia*) terhadap Bakteri *Shigella dysenteriae*. *Sainmatika*. 2015;2(1):1-7.
6. Pelczar MJ, Chan CS. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. 1st ed. Jakarta; 1998.
7. Chomvarin C, Namwat W, Wongwajana S, Alam W, Thaew-Nonningiew K, Engchanil C. Application of duplex-PCR in rapid and reliable detection of toxigenic *Vibrio cholerae* in water samples in Thailand. *Gen Appl Microbiol*. 2007;53:229-237.
8. Soemarsono H. *Kolera: Dalam Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 1996.
9. Djauhariya E, Hernani. *Gulma Berkhasiat Obat*. Jakarta: Penebar Swadaya; 2004.
10. Hidayat S. Prospek Pepaya Gunung (*Carica pubescens* Lenne & K. Koch) dari Sikunang, Pegunungan Dieng, Wonosobo. In: *Menggali Potensi Dan Meningkatkan Prospek Tanaman Hortikultura Menjadi Ketahanan Pangan Dalam Rangka Hari Cinta Puspa Dan Satwa Nasional*. Bogor: UPT Balai Pengembangan Kebun Raya-LIPI; 2000.
11. Rock R. Product Review - Wild Mountain Papaya Extract. http://www.associatedcontent.com/article/1987516/product_review_wild_mountain_papaya.html.
12. Minarno B. Skrining Fitokimia dan Kandungan Total Flavonoid Pada Buah *Carica Pubescens* Lenne & K. Koch di Kawasan Bromo, Cangar, dan Dataran Tinggi Dieng. *Univ Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang*. 2015;5(2).
13. Ainun NL, N. Khoiri Ahmad. Identifikasi Senyawa Antidiabetes Secara in Silico pada *Carica Pubescens* Lenne & K. Koch. *Univ Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang*. 2016;5(4).
14. Minarno B. Analisis Kandungan Saponin Pada Daun dan Tangkai Daun *Carica Pubescens* Lenne & K. Koch. *Univ Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang*. 2016;5(4).
15. Laily AN, Suranto, Sugiyarto. Characteristics of *Carica pubescens* of Dieng Plateau, Central Java according to its Morphology, Antioxidant, and Protein Pattern. *Univ Sebel Maret Surakarta*. 2012;4(1):16-21.
16. Novalina D. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun *Carica Pubescens* dari Dataran Tinggi Dieng terhadap Bakteri Penyebab Penyakit Diare. *Tesis*. Universitas Sebelas Maret. 2013;1(1):1-12.
17. Fitriana S. Penapisan Fitokimia dan Uji Aktivitas Anthelmintik Ekstrak Daun Jarak (*Jatropha curcas* L.) terhadap Cacing *Ascaridia galli* secara in vitro. 2008.
18. Karou D. Antibacterial Activity of Alkaloids Arom *Sida Acuta*. *African J Biotechnol*. 2006;5(2):195-200.
19. Harborne JB. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan*. 2nd ed. Bandung: Institut Teknologi Bandung; 2006.
20. Fitrial Y, Astawan M, Soekarto SS, Wiryawan KG, Wresdiyati T, Khairina R. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Biji Teratai terhadap Bakteri Patogen Penyebab Diare. *J Teknol dan Ind Pangan*. 2008;19(2):158-164.
21. Sari FP, Sari SM. Ekstraksi Zat Aktif Antimikroba dari Tanaman Yodium (*Jatropha Multifida* Linn) sebagai Bahan Baku Alternatif Antibiotik Alami. 2011.
22. Harborne JB. *Metode Fitokimia, Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. 2nd ed. (Kosasih P, Iwang S, eds.). Institut Teknologi Bandung; 1987.
23. Kumar GVP, Subrahmanyam SN. Phytochemical Analysis, in-vitro Screening for Antimicrobial and Anthelmintic Activity of Combined Hydroalcoholic Seed Extracts of Four Selected Folklore Indian Medicinal Plants. *Sch Res Libr*.

-
- 2013;5(1):168-176.
24. [European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing \(EUCAST\). Antimicrobial Susceptibility Testing: EUCAST Disk Diffusion Method.](#)
 25. Poeloengan M, Andriyani I, Komala, Hasnita M. Uji Antibakteri Ekstrak Etanol Kulit Batang Bungur (*Lagerstremia speciosa* Pers) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* Secara In Vitro. In: *Seminar Nasional Teknologi Perternakan Dan Veteriner*. Bogor: Central Library of Bogor Agricultural University; 2007.
 26. [Ahmed D, Waheed A, Chaudhary MA, Khan SR, Hannan A, Barkaat M. Nutritional and Antimicrobial Studies on Leaves and Fruit of *Carissa opaca* Stapf Ex Haines. *EJEAFChe*. 2010;9\(10\):1631-1640.](#)



Pengembangan prekultur *oxgall* sebagai sampel klinis untuk deteksi *Salmonella typhi* dengan metode real-time PCR

Development of oxgall preparation as clinical sample for detection of Salmonella typhi with real-time PCR method

Annisa Pratiwi Gunawan^{1a*}, Ai Djuminar¹, Ernawati², Lidya Chaidir³

¹ Jurusan Analis Kesehatan, Politeknik Kesehatan Kemenkes Bandung, Indonesia

² Departemen Patologi Klinik, Rumah Sakit Hasan Sadikin, Bandung, Indonesia

³ Pusat Studi TB HIV Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran Bandung, Indonesia

^aEmail address: annisapradiwi.gunawan@yahoo.co.id

HIGHLIGHTS

Real Time-PCR more than better used for a clinical sample and blood culture was better using oxgall.

ARTICLE INFO

Article history

Received date : February 14th, 2018

Revised date : March 27th, 2018

Accepted date : December 31st, 2018

Keywords:

Blood Culture
Real-time PCR,
Oxgall
Salmonella typhi
Typhoid fever

Kata Kunci:

Kultur Darah
Real-time PCR
Oxgall
Salmonella typhi
Demam Tifoid

ABSTRACT / ABSTRAK

Typhoid fever is a significant public health burden in low-income countries caused by *Salmonella enterica* serotype *typhi* (*S. typhi*). Clinical manifestations of typhoid fever are varied and non-specific, making the diagnosis difficult. Using oxgall for pre-incubation as a selective culture medium before amplification of Real-time PCR in whole blood produces a fast and sensitive diagnostic. The purpose of this study was to know the performance Real-time PCR for detection of oxgall-precultured *S. typhi*. Prior to the sample process, optimization method was performed to find out that the reagents were used for clinical specimens well. In the sample process, blood samples from 30 Widal-positive patients were collected for this study. Venous blood samples from typhoid fever patients were taken on the day for diagnosis; 5 ml for blood culture, and 5 ml for Real Time-PCR. The bacteria were grown in oxgall 10% (microbiological clinics laboratory standard) and incubated for 6 hours (37° C) before bacterial DNA was isolated for Real Time-PCR detection. The results showed that reagen of Real Time-PCR more better used for a clinical sample and blood culture was better using oxgall (positive blood culture results over 24 hours). This suggests that there is a need for further research on oxgall concentrations in Real Time-PCR and duration incubation for the selection of clinical samples.

Demam tifoid merupakan beban kesehatan masyarakat yang signifikan di negara berpenghasilan rendah yang disebabkan oleh *Salmonella enterica* serotype *typhi* (*S. typhi*). Manifestasi klinis demam tifoid bervariasi dan tidak spesifik, sehingga membuat diagnosis menjadi sulit. Dengan menggunakan *oxgall* pada darah sebagai pra-inkubasi untuk media kultur selektif sebelum dilakukan amplifikasi *Real-time* PCR, agar dapat menghasilkan diagnostik lebih cepat dan sensitif. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui kinerja *oxgall* untuk deteksi *Salmonella typhi* dengan

amplifikasi *Real-time* PCR. Sebelum proses pengambilan sampel, dilakukan optimasi untuk mengetahui reagen yang digunakan baik untuk spesimen klinis. Sampel darah diambil sebanyak 30 pasien dengan hasil tes Widal positif. Darah diambil pada hari diagnosis sebanyak 5 ml untuk kultur darah, dan 5 ml untuk *Real-time* PCR. Bakteri ditanam di *oxgall* 10% (standar mikrobiologi laboratorium klinik) dan diinkubasi selama 6 jam (37 ° C) sebelum DNA bakteri diisolasi untuk deteksi *Real-time* PCR. Hasil penelitian menunjukkan bahwa reagen *Real-time* PCR lebih baik sebagai sampel klinis untuk kultur darah dan reagen *oxgall* (hasil kultur darah positif lebih dari 24 jam) lebih untuk *Real-time* PCR. Hal ini menunjukkan bahwa harus ada penelitian lebih lanjut mengenai lama inkubasi dan konsentrasi *oxgall* untuk *Real-time* PCR dan pemilihan sampel klinis.

Copyright © 2018 Jurnal Teknologi Laboratorium.
All rights reserved

***Corresponding Author:**

Annisa Pratiwi Gunawan
Jurusan Analis Kesehatan Poltekkes Kemenkes Bandung,
Jln. Babakan Loa No. 10 A, Bandung, Indonesia.
Email: annisaprawati.gunawan@yahoo.co.id



1. PENDAHULUAN

Demam tifoid adalah penyakit sistemik yang disebabkan oleh *Salmonella enterica serovar typhi* (*S. typhi*) yang merupakan ancaman terhadap kesehatan masyarakat di banyak negara tropis dan berkembang.^{1,2} Diagnosis demam tifoid ditetapkan berdasarkan manifestasi klinis dan laboratorium. Manifestasi klinis demam tifoid bervariasi dan tidak spesifik, sehingga sulit untuk memprediksi penyakit berdasarkan gejala klinis saja.^{3,4}

Kultur darah adalah baku emas (*gold standard*) dalam pemeriksaan demam tifoid, namun metode ini memiliki sensitivitas yang rendah. Selanjutnya adanya antibiotik, dan volume sampel yang tidak mencukupi dapat mempengaruhi hasil kultur darah.^{4,5,6,7,8} Hal ini menyebabkan beberapa peneliti mulai menganjurkan penggunaan metode molekuler sebagai alternatif dalam mendiagnosis demam tifoid. *Real-time* PCR adalah teknik mengamplifikasi sekaligus menghitung jumlah target molekul DNA secara kuantitatif.^{9,10,11} *Real-time* PCR memiliki kelebihan berupa waktu prosesnya relatif lebih singkat, tidak karsinogenik, dan juga memiliki sensitivitas yang lebih baik dibandingkan dengan PCR konvensional. Dalam deteksi *Real-time* PCR juga tidak terpengaruh oleh penggunaan antibiotik dan memungkinkan pendeteksian target dapat dengan konsentrasi rendah. Kehadiran DNA dapat diamati pada grafik yang muncul sebagai hasil akumulasi fluoresensi probe (penanda).^{12,13,14,15,16} Berdasarkan proses *Real-time* PCR, optimasi *spike Real-time* PCR penting dilakukan untuk mengetahui reagen yang digunakan baik untuk spesimen klinis. Namun, jumlah bakteri yang terlalu rendah dalam darah pasien tifoid (diperkirakan rata-rata 0,3 CFU / mL darah) membuat *S. typhi* sulit untuk dideteksi dengan *Real-time* PCR.¹⁷ Saat ini telah dikembangkan penelitian metoda *blood culture*-PCR dengan menggabungkan *pre-incubation* singkat pada *oxgall* bersamaan dengan amplifikasi PCR dari *S. typhi*. Penggabungan *oxgall* sebagai media selektif *S. typhi* dengan metode PCR bertujuan untuk mengurangi waktu penyelesaian hasil diagnostic, selain itu diharapkan dapat meningkatkan sensitivitas yang lebih tinggi.^{18,19,20,21} Berdasarkan latar belakang tersebut tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui kinerja metode *oxgall-precultured Real-time*

PCR dalam mendeteksi *S. typhi* dari sampel klinis yang diperoleh dari Rumah Sakit Hasan Sadikin Bandung.

2. BAHAN DAN METODE

2.1. Desain penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah *cross sectional* dengan pemilihan sampel secara *consecutive sampling*. Jumlah sampel sebanyak 30 sampel pasien demam tifoid berdasarkan hasil uji Widal positif. Sampel darah diambil pada hari diagnosis sebanyak 10 mL (5 mL untuk Kultur darah ; 5 mL untuk *Real-time PCR*). Analisis data yang digunakan pada penelitian ini dengan Uji sensitivitas.

2.2. Lokasi penelitian

Penelitian dilakukan di RS Dustira, Laboratorium Pelayanan Jurusan Analis Kesehatan Politeknik Kesehatan Kemenkes Bandung (untuk pemeriksaan bakteriologis dan ekstraksi DNA) dan di Balai Laboratorium Kesehatan (untuk Proses *Real-time PCR*).

2.3. Populasi dan sampel penelitian

Populasi dan sampel yang digunakan adalah darah utuh dari pasien demam tifoid yang diperoleh dari RS Dustira yang telah memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Kriteria inklusi adalah pasien berjenis kelamin pria/wanita, berusia antara 18-60 tahun, dan telah terdiagnosis positif demam tifoid berdasarkan hasil widal positif. Pasien telah menderita demam tinggi kurang dari 1 minggu. Kriteria eksklusi adalah pasien yang didiagnosis bukan demam tifoid, dan pasien anak-anak.

2.4. Bahan dan alat penelitian

Sampel Darah (positif demam tifoid), KIT INSERT *G-Spin™ Total DNA Extraction*, kit *Real-time PCR gen invA Salmonella typhi* (NEXTM Diagnostic, Malaysia-Korea), *Oxgall 10 %*, Media SS, TSIA, Manitol, Pepton, Semi Solid, *Real-time PCR*,

2.5. Koleksi/tahapan penelitian

2.5.1. Optimasi Metode *Spike*

Sampel klinis darah orang sehat dibuat dengan dua perlakuan, yaitu darah tanpa proses *spike*, dan darah dengan proses *spike* dari isolat *S. typhi*, kemudian dilakukan proses seperti pada sampel terhadap kultur darah dan proses *Real-time PCR* dengan dan tanpa penambahan *oxgall*.

2.5.2. Proses Sampel

Sampel darah dari 30 pasien Widal-positif sebanyak 10 mL per pasien diambil pada hari diagnosis di mana 5 mL digunakan untuk kultur darah dan 5 mL untuk *Real-time PCR*. Dalam persiapan *oxgall pre-incubation*, sampel darah pasien sebanyak 5 mL dimasukkan pada media *oxgall 10%* (standar klinik laboratorium mikrobiologi), kemudian diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 6 jam, 12 jam, 24 jam. (Khusus untuk amplifikasi *Real time-PCR* proses pra inkubasi di inkubasi selama 6 jam).

Untuk uji kultur darah *S. typhi*, dilakukan isolasi kultur darah dengan cara sampel dari media *oxgall* yang telah diinkubasi diambil dengan menggunakan ose bulat, kemudian diisolasi pada media SSA (*Salmonella Shigela Agar*). Media yang berisi isolat bakteri diinkubasi selama 1 x 24 jam pada suhu 37°C dalam inkubator. Pertumbuhan pada media SSA diamati. Koloni *S. typhi* menunjukkan warna bening dan pada bagian tengah berwarna hitam. Kemudian untuk memastikan sampel tersebut merupakan koloni dari *S. typhi* dilakukan uji biokimia. Dari koloni-koloni yang tumbuh

dilakukan sederetan tes gula-gula yaitu TSIA, Manitol, Pepton dan Semi Solid, kemudian diinkubasi selama 1 x 24 jam pada suhu 37°C. Untuk uji *Real-time* PCR, dilakukan dua perlakuan, yaitu sampel darah dengan dan tanpa kombinasi dengan *oxgall*. Sebelum dilakukan proses *Real time*-PCR, dilakukan proses ekstraksi terlebih dahulu. Proses ekstraksi DNA dilakukan menurut panduan dalam KIT INSERT *G-Spin™ Total DNA Extraction*. Jenis primer yang digunakan adalah primer yang terdapat pada kit *Real-time* PCR gen *invA* *Salmonella typhi* (NEXTM Diagnostic, Malaysia-Korea). Kit ini menggunakan sepasang primer untuk *internal amplification control* (IAC) guna mendeteksi amplifikasi gen *invA* *Salmonella typhi*. Hasil *Real-time* PCR dengan sepasang primer tersebut yaitu gen target *invA* dan IAC memiliki *Tm* (*melting temperature*) yang berbeda. Pengujian *Real-time* PCR menggunakan mesin BIORAD iQ 5. Analisis data di sajikan dalam bentuk gambar hasil dari mesin BIORAD iQ 5.

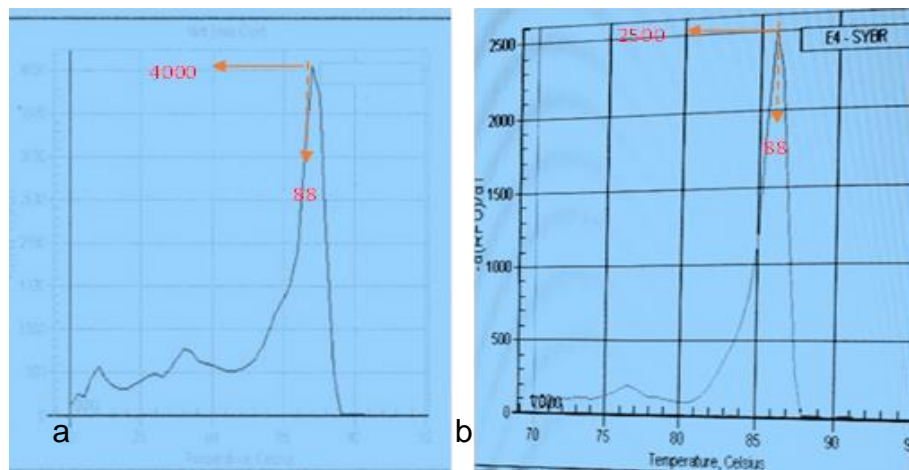
2.6. Analisis data

Data yang diperoleh dalam penelitian ini adalah data primer sebagai hasil dari kurva amplifikasi *Real-time* PCR dengan sampel sebelum dan setelah penanaman pada media *oxgall* dengan lama inkubasi selama 6 jam pada suhu 37°C, dan hasil kultur darah *S. typhi*.

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

3.1. Optimalisasi Metode *Spike*

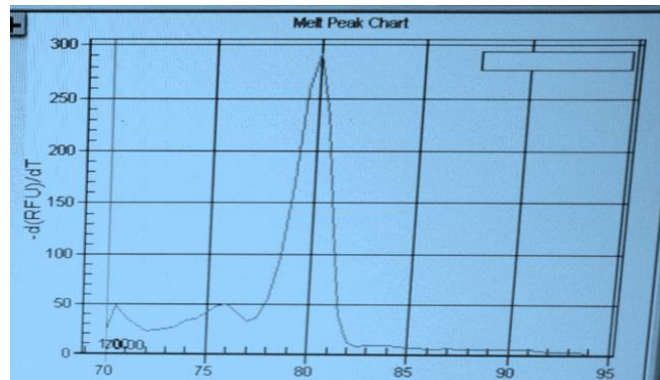
Hasil optimasi spesimen klinis *Real-time* PCR tanpa inkubasi *oxgall* dari kelompok darah pasien demam tifoid dengan proses *spike* menunjukkan hasil positif (**Gambar 1a**), sedangkan hasil *Real-time* PCR tanpa inkubasi di *oxgall* dari kelompok darah pasien demam tifoid tanpa proses *spike* menunjukkan hasil negatif (**Gambar 2**). Hasil optimasi spesimen klinis *Real-time* PCR dengan penambahan *oxgall* 10% diinkubasi selama 6 jam dari kelompok darah pasien demam tifoid dengan proses *spike* menunjukkan hasil negatif (**Gambar 1b**). Hasil kultur darah dari kelompok darah pasien demam tifoid dengan proses *spike* menunjukkan hasil positif pada 24 jam.



Gambar 1. Hasil Optimalisasi *Spike* *Real-Time* PCR *Whole Blood*. (a) *Real-Time* PCR *Whole Blood* Dengan Proses *Spike* Yang Diberi *Oxgall* Dengan Inkubasi 6 Jam.; (b) *Real-time* PCR *Whole Blood* Dengan Proses *Spike* Tanpa *Oxgall*.

3.2. Pengolahan Sampel

Hasil sampel klinis menunjukkan dari 30 sampel positif widal hanya ada 1 sampel positif kultur darah. Hasil metode *Real-time* PCR dengan dan tanpa penambahan *Oxgall* 10% menunjukkan tidak ada hasil yang positif (gambar 2).



Gambar 2. *Real-time* PCR *Whole Blood* Dengan dan Tanpa Penambahan *Oxgall*, Hasil DNA *Salmonella* Negative.

Metode *spike* merupakan metode penambahan isolat DNA *S. typhi* pada sampel. Proses *Real-time* PCR menggunakan primer dari kit RT-PCR gen *invA* *Salmonella typhi* (NEXTM Diagnostic, Malaysia-Korea), menunjukkan 2 puncak spesifik yang dihasilkan untuk *Internal Amplification Control* (IAC) dengan $T_m = 78-80$ dan DNA *S. typhi* dengan $T_m = 87-89$. T_m (*Melting Temperature*) menunjukkan isolat *S. typhi* secara spesifik. Dalam hasil optimasi dengan metode *spike* menunjukkan bahwa DNA yang berasal dari spesimen *whole blood* dengan proses *spike* yang diinkubasi dengan *oxgall* selama 6 jam teramplifikasi lebih baik dari *whole blood* dengan proses *spike* tanpa penambahan *oxgall*. Terlihat hasil positif dari hasil amplifikasi yang meningkat dengan adanya penambahan *oxgall* yang diinkubasi selama 6 jam (Gambar 1a; 1b). Hasil negatif pada perlakuan sampel tanpa proses *spike* menunjukkan adanya kontrol negatif serta tidak adanya kontaminasi dalam proses ekstraksi sampai dengan proses *Real-time* PCR. Hal ini menunjukkan bahwa reagen kit ini sangat baik digunakan untuk spesimen bahan klinis *whole blood* pasien demam tifoid.

Berdasarkan hasil penelitian responden yang mengalami demam lebih dari 8 hari sebanyak 73,3%. Keberadaan *S. typhi* dalam darah akan menurun pada minggu pertama. Rata-rata orang Indonesia yang pergi ke rumah sakit mengalami demam lebih dari 4-5 hari atau pada saat infeksi sekunder, sehingga sulit mendeteksi *S. typhi* dalam darah.^{22,23} Hasil leukosit pada karakteristik subjek penelitian menunjukkan bahwa 50% leukosit pasien normal, ini menunjukkan infeksi *S. typhi* tidak ada atau tubuh sudah mengalami perbaikan, karena hampir semua subjek penelitian telah diberi antibiotik. Pemeriksaan widal berdasarkan hasil karakteristik subjek pasien yaitu hasil positif terdapat pada 30 subjek penelitian (100%), namun pemeriksaan widal bukan menjadi acuan diagnosis demam tifoid dalam penelitian ini karena memiliki sensitivitas yang rendah.²⁴

Pemeriksaan kultur darah pada subjek penelitian diperoleh dengan hasil kultur positif hanya 1 pasien (3,3%) dan hasil kultur negatif adalah 29 pasien (96,7%). Hasil ini sesuai dengan penelitian Stella (2015)⁵ dan Lalith (2012)⁴, melaporkan bahwa distribusi kultur positif di bawah 20%. Hal ini disebabkan tingginya penggunaan antibiotik di daerah endemik yang menyebabkan sensitivitas kultur darah menjadi lebih rendah (10-20%). Selain itu, volume darah kurang yang bisa menyebabkan hasil kultur darah lebih rendah (standar 10-15 mL).^{4,5,6,7,8,24}

Berdasarkan hasil optimasi *Internal Amplification Control* (IAC) dengan $T_m = 78-80$ dan DNA *S. typhi* dengan $T_m = 87-89$ didapatkan hasil *Real-time* PCR dengan dan tanpa *oxgall* adalah negatif. Hasil konsentrasi batas limit deteksi dalam optimasi *Real-time* PCR adalah 10^4 CFU/mL.²⁵ Hasil negatif menunjukkan kemungkinan *Salmonella typhi* dalam *whole blood* kurang dari 10^4 CFU/mL. Selain itu konsentrasi *oxgall* yang digunakan dalam penelitian adalah 10%, ini sesuai dengan prosedur standar laboratorium pelayanan di rumah sakit dan laboratorium mikrobiologi. Dalam penelitian ini, *whole blood* diinkubasi dengan *oxgall* selama 6 jam. Hasil negatif kemungkinan disebabkan karena *Salmonella typhi* belum cukup bereplikasi sampai batas limit deteksi, sehingga perlu tambahan waktu inkubasi untuk *Salmonella typhi* bereplikasi dalam *oxgall*.

Penelitian ini diharapkan dapat mengembangkan metode *Real-time* PCR pada *S. typhi* dari sampel darah. Namun sebelum kit ini dapat dipasarkan dan dapat digunakan di laboratorium pelayanan ataupun di laboratorium pendidikan dan penelitian, diperlukan percobaan pemeriksaan demam tifoid dari berbagai sampel selain darah. Hal ini disebabkan karena pasien demam tifoid di Indonesia kebanyakan bersifat *carier* dan waktu pemeriksaan demam tifoid memiliki demam lebih dari 7 hari, sehingga *S. typhi* di dalam darah sudah sedikit, maka disarankan menggunakan spesimen lain seperti urine dan feses untuk melihat spesimen yang teramplifikasi lebih baik, sehingga hasil lebih obyektif dan dapat memberi kesimpulan yang lebih komplit serta meningkatkan keberhasilan deteksi demam tifoid dengan sensitivitas yang tinggi dengan metode *Real time*-PCR.

4. SIMPULAN

Hasil optimasi reagen menunjukkan bahwa reagen yang digunakan sangat baik untuk sampel klinis. Pemeriksaan kultur darah untuk diagnosis demam tifoid tidak bisa diganti dengan pemeriksaan *Real-Time* PCR. Untuk meningkatkan hasil *Real-Time* PCR *Salmonella typhi* perlu dilakukan penelitian lanjutan, dengan mengoptimalkan konsentrasi *oxgall* dan waktu inkubasi di media *oxgall* serta pemilihan sampel klinis dalam mendiagnosis demam tifoid yang menggunakan *Real-Time* PCR.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih banyak kepada semua pihak yang telah membantu pada penelitian ini. Utamanya kepada Tim *Typhoid Fever Study* Fakultas Kedokteran Unpad (Dr. Bachtu Alisjahbana, Mandala Aji), MDx Biotechnology Sdn. Bhd., Kuala Lumpur, Malaysia atas bantuan kit REAL TIME PCR, RS Dustira (*Tuanku Yusuf Tarigan*) atas bantuannya dalam pengambilan sampel, dan Dosen Poltekkes Kemenkes Bandung Jurusan Analisis Kesehatan (Dr. Ani Riyani M.Kes dan Iis Kurniati, S.Pd., M.Kes).

DAFTAR PUSTAKA

1. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. *Sistematika Pedoman Pengendalian Penyakit Demam Tifoid*. Jakarta: Direktorat Jendral Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan; 2013.
2. World Health Organization. *Background Document: The Diagnosis, Treatment and Prevention of Typhoid Fever*. Geneva: World Health Organization; 2003.
3. Wain J, Hosoglu S. The laboratory diagnosis of enteric fever Review Article The laboratory diagnosis of enteric fever. 2008;(February):10-15. doi:10.3855/jidc.155.
4. Lalith PM, Kumar V, Chanpheaktra N, et al. Typhoid Fever Among Hospitalized Febrile Children in Siem Reap, Cambodia. *J J Trop Pediatr*. 2012;58(1).
5. Stella IS, Bamidele M, Fowora M, Helen T, Emmanuel. Application of A Point-of-Care Test for The Serodiagnosis of Typhoid Fever in Nigeria and The Need for

6. Improved Diagnostics. *J Infect Dev Ctries*. 2011;5(7):520-526.
6. Kundu R, Ganguly N, Ghosh TK, Yewale VN, Shah RC, Shah NK. IAP Task Force Report: Diagnosis of Enteric Fever in Children. *Indian Pediatr*. 2006;43(10):875–883.
7. Wain J, Pham VB, Ha V, et al. Quantitation of Bacteria in Bone Marrow from Patients with Typhoid Fever: Relationship Between Counts and Clinical Features. *J Clin Microbiol*. 2001;39(4):1571-1576. doi:0.1128/JCM.39.4.1571–1576.2001.
8. Wain J, Diep TS, Bay PVB, et al. Specimens and Culture Media for The Laboratory Diagnosis of Typhoid Fever. *J Infect Dev Ctries*. 2008;2(6):469-474. doi:10.3855/jidc.164.
9. Hatta M, Smits HL. Detection of Salmonella Typhi by Nested Polymerase Chain Reaction in Blood, Urine, and Stools Samples. *Am J Trop Med Hyg*. 2007;76(1):39-143. doi:10.4269/ajtmh.2007.76.139.
10. Ambati SR, Nath G, Das BK. Diagnosis of Typhoid Fever by Polymerase Chain Reaction. *Indian J Pediatr*. 2007;74(10):909-913.
11. Dorak TM. *Real-Time PCR*. Newcastle: Taylor and Francis Group; 2006.
12. Julie L, Edwards K, Saunders N. *Current Technology and Applications Real-Time PCR*. Norfolk: Caister Academic Press; 2009.
13. Ibrahim WA, El-Ghany WA, Nasef SA, Hatem M. Comparative Study On The Use Of Real Time Polymerasechain Reaction (Real-time PCR) And Standard Isolation Techniques For The Detection Of Salmonellae In Broiler Chicks. *Int J Vet Sci Med*. 2014;2(1):67-71.
14. Siregar TH, Elliman J, Owens L. Development Of Real Time Polymerase Chain Reaction for Detection Salmonella Typhimurium and Salmonella enteritidis in Fish. *Squalen*. 2012;7(2):51-58.
15. Mufty MM. Application of A Real-time qPCR Method for Detection of Salmonella sp. in Shrimp and Scallop and Its Partial Validation. 2008.
16. Fatimi H. *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Palembang: Program Studi Ilmu Biomedik, Program Pasca Sarjana, Universitas Brawijaya; 2010.
17. Zhou L, Jones C, Gibani MM, et al. Development and Evaluation of a Blood Culture PCR Assay for Rapid Detection of Salmonella Paratyphi A in Clinical Samples. *PLoS One*. 2016. doi:10.1371/journal.pone.0150576.
18. Coleman W, Buxton BH. The Bacteriology of The Blood in Convalescence from Typhoid Fever with A Theory of The Pathogenesis of The Disease. *J Med Res*. 1909;21(1):83-93.
19. Kaye D, Palmieri M, Rocha H. Effect of Bile on the Action of Blood Against Salmonella. *J Bacteriol*. 1966;91(3):945-952.
20. Zhou L, Pollard AJ. A Novel Method of Selective Removal of Human DNA Improves PCR Sensitivity for Detection of Salmonella Typhi in Blood Samples. *BioMed Cent Infect Dis*. 2012. doi:10.1186/1471-2334-12-164.
21. Prakash P, Mishra P, Singh AK, Gulati AK, Nath G. Evaluation of Nested PCR in Diagnosis of Typhoid Fever. *J Clin Microbiol*. 2005;43(1):431-432. doi:0.1128/JCM.43.1.431-432.2005.
22. Konemann EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 1997.
23. Bhan MK, Bahl R, Bhatnagar S. Typhoid and Paratyphoid Fever. *Lancet*. 2005;749-762. doi:10.1016/S0140-6736(05)67181-4.
24. Andualem G, Abebe T, Kebede N, Gebre-Selassie S, Mihret A, Alemayehu H. A Comparative Study of Widal Test with Blood Culture in The Diagnosis of Typhoid Fever in Febrile Patients. *BioMed Cent Res Notes*. 2014. doi:10.1186/1756-0500-7-653.
25. Ernawati. Perbandingan positività pemeriksaan Real-time PCR (REAL TIME PCR)

Gen *invA* *Salmonella typhi* Dari Bahan Biologis Tersimpan Buffycoat dengan Pemeriksaan Kultur dari Sampel Darah Segar untuk Mediagnosis Demam Tifoid. 2016.



The presence of methanol in alcoholic beverages analyzed using qualitative method

Diah Navianti^{1a*}, Muhammad Ihsan Tarmizi¹, Sinta Nur Holifah²

¹ Medical Laboratory Technology, Poltekkes Kemenkes Palembang, Indonesia

² The Indonesian Red cross Society Palembang – South Sumatera, Indonesia

^a Email address: dnaviantidiah9@gmail.com

HIGHLIGHTS

Methanol was still present in alcoholic drinks sold in markets

ARTICLE INFO

Article history

Received date : January 25th, 2018

Revised date : March 21st, 2018

Accepted date : Mei 03rd, 2018

Keywords:

Alcoholic beverage

Chromotropic acid

Methanol

ABSTRACT

An alcoholic beverage contains ethyl alcohol or ethanol (C₂H₅OH) that is produced from fermentation or distillation of sugars. In many cases, either producers or consumers add ethanol with denaturated alcohol containing methanol (CH₃OH) as an additive. Methanol can cause blindness and induce comas, and it is deadly in high doses. This study aimed at investigating the presence of methanol or methyl alcohol in alcoholic beverages sold in Palembang, Indonesia. Seventeen samples collected from small shops and supermarkets were taken by accidental sampling. A chromotropic acid method was used to examine the presence of methanol. The results showed that there were 18% of samples was positive, and 82% was negative. Based on alcohol content, the research showed that all (100%) samples of group A were negative; 33% of group B was positive, and 33% of group C was positive. The study indicated that methanol was still present in alcoholic drinks sold in markets. The government should inform society that denaturated alcohol contains methanol and, therefore, should not be feasible to consume.

Corresponding Author:

Diah Navianti

Jurusan Analis Kesehatan Poltekkes Kemenkes Palembang,

Jln. Sukabangun 1 kecamatan sukarama KM 6,5, Palembang, Sumatera Selatan, Indonesia.

Email: dnaviantidiah9@gmail.com



1. INTRODUCTION

Indonesia is a country which is rich in both its natural resources and ethnics. Every ethnic has its own culture which is different from one to another. One of the cultures taken as a habit from years ago is the habit of drinking alcohol. A long time ago, the habit of drinking alcohol had become a trend for people in Indonesia. It was usually served as a welcome drink in a palace banquet or served in annual parties such as those after a big harvest.^{1,2} Nowadays, in some regions of Indonesia alcoholic drink is not only consumed at certain moments such as dinner or harvesting but also consumed after social functions or after wedding parties.¹

Based on the presidential regulation number 74 the Year 2013, alcoholic beverage is a drink that contains ethyl alcohol or ethanol (C₂H₅OH) which is processed from agricultural products containing carbohydrate using either fermentation with distillation or fermentation without distillation.^{1,2} In The process is selling and consuming, some of the sellers and consumers mix their alcoholic drinks with other

liquid. Another kind of alcohol which is freely sold in pharmacies and chemical stores is added to increase the quantity or volume but not the alcohol content. The level of alcohol is not changed. In Indonesia, this process of addition is called as "oplosan".

Oplosan drink is highly fatal for humans if consumed. At the beginning of 2014, in Surabaya, 11 people were found dead after consuming oplosan drinks. Three people were also killed in Gresik, and 15 were found dead in Kabupaten Mojokerto. Also, three people in Buleleng dan Bali and four other in Kayuagung, Kabupaten Ogan Komering Ilir, South Sumatra were also reported dead. One man in Kelurahan Kedaton was also reported in critical condition after consuming oplosan drinks. The people were reported dead after having a party of alcoholic drinks in a social function near their house.¹ From the cases previously mentioned above, it is known that the consumers mix their alcoholic drinks with alcohol for industry (petrochemical) for economical reason. The price of fermented alcohol is far more expensive than that of petrochemical one. Because of that, some drinking industries and manufacturers replace fermented alcohol with petrochemical one as a basic ingredient in the production of alcoholic drinks. However, most people commonly do not know that industrial alcohol (petrochemical) or technical alcohol they use to dilute their drinks has been denatured with benzene and methanol purposively to make them toxic. This is called denatured alcohol. The information about whether the content of alcohol is denatured or not is not stated on its label. Furthermore, the price is very low if compared with fermented one and freely sold. That is why it is easy to get in pharmacies and chemical stores.¹

This study also collected some samples of alcohol 70%, technical alcohol, and alcohol p.a. which were freely sold in pharmacies and chemical store. The study found that the presence of methanol in alcohol 70 and technical alcohol was positive, but that in alcohol p.a (absolute alcohol) was negative.

Methanol is the simplest part of alcohol. It is liquid, colourless, volatile, and flammable. Furthermore, it is toxic and has distinctive odour. It is usually used for industrial purposes. In industries, methanol is commonly used in paints, adhesive, a foam of cushions, synthetic textile, recycled plastics, and fuel. Methanol is highly toxic to humans. If absorbed, 10 ml of methanol can cause permanent blindness, and 30 ml can lead to death although the literature says that the lethal dose is 100 – 125 ml.^{3,4} When methanol is ingested, it is directly absorbed and distributed throughout the body. Methanol is metabolized in the liver by alcohol dehydrogenase forming formaldehyde, and by aldehyde, dehydrogenase formaldehyde is converted into formic acid. Both metabolites, especially formic acid, can lead to metabolic acidosis and permanent blindness.^{3,4,5}

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Research Design

The research design was a cross-sectional study in which to investigate the presence of methanol in alcoholic beverages sold in Palembang, Indonesia.

2.2. Research Location

This cross-sectional study was conducted in July 2015. The samples of this study were collected from two points of sale (small shops and supermarkets) in Palembang, Indonesia has taken using accidental sampling technique.⁶

2.3. Population and Sample Size

All members of the population in this study were taken as samples. The total population of alcoholic beverages which were sold in small shops and supermarkets was 17 bottles. Therefore, all 17 bottles of them were taken as samples.

2.4. Data Collection

Primary data used and analyzed in this study were collected using the following procedures:

- a. Laboratory tests. This was used to examine the presence of methanol in samples using chromotropic acid as a qualitative test method.
- b. Observation. Through this procedure, supporting data related to samples, i.e. alcohol content, price, points of sale, and packaging characteristic were recorded in a checklist.

2.5. Principle

The principle of methanol examination is a qualitative analysis with an indirect method which is based on the oxidation reaction of methanol by potassium permanganate which produces formaldehyde compound. Formaldehyde reacted with the chromotropic acid in concentrate sulfuric acid forming violet compound.⁷

2.6. Interpretation

The results of qualitative analysis on the presence of methanol in samples were interpreted as follows:

Positive (+) = violet color appears in test tube.

Negative (-) = no violet colour appears in a test tube.

2.7. The procedure of Methanol Analysis

Take 50 mL of sample in an Erlenmeyer flask. Acidify the sample with H₃PO₄. Distil slowly into a volumetric flask. Pipette into a test tube five millilitres of chromotropic acid 0.5% in H₂SO₄ 60%, and add one mL distillate slowly and stir the mixture while adding the distillate. Put the test tube in a water bath for 15 minutes and observe the colour changes. The colour of light violet through dark violet indicates the presence of HCHO.⁷

2.8. Data Analyses

The obtained raw data were then coded and transformed into certain categories. After that, the data were computed and analyzed statistically both in a univariate and bivariate analysis using computer software. In univariate analysis, each variable was described individually. Using bivariate analysis, then, the dependent variable (the presence of methanol) was described based on independent variables (alcohol content, price, points of sale, and packaging characteristic).⁶

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. The Presence of Methanol in Alcoholic Beverages

Based on the laboratory analysis, it was found that 3 (18%) samples were positive and 14 (82%) samples were negative containing methanol. For more details, the results of analysis on the presence of methanol in samples can be seen in [Table 1](#).

Table 1. Frequency Distribution of Methanol in Alcoholic Beverages

Methanol	Frequency	Percentage (%)
Positive	3	18
Negative	14	82
Total	17	100

Based on the research, the presence of methanol in samples showed that 3 (18%) samples were positive and 14 (82%) samples were negative. Positive results were found in liquors branded A, B, and C. The result of this study was similar to the findings of Forensic Laboratory of East-Java Regional Police. They found methanol in the evidences they got from binge drinking in Lawang, Kabupaten Malang. The level of methanol in the evidences was 8.3% and that of ethanol was 19.29%. There were 10 found dead from this case.¹

There are still many other cases of toxicity as a result of consuming methanol-adulterated or methanol-contaminated drinks. In order to get more financial profit, the sellers or consumers add their alcoholic drinks (fermented alcohol).² with other alcohol that they buy in pharmacies or chemical stores in order to increase the volume and effect add other. People do not know that alcohol they buy in pharmacies or chemical stores has been denatured with benzene or methanol to make it toxic and harmful to consume. The alcohol they get from those places is called denatured alcohol. The process of adding alcoholic drinks with others is well known as *oplosan*. The police can not do much to cope with this problem because denatured alcohol itself is legal to sell in markets.⁸

Methanol causes highly toxic effects in humans. If absorbed, the use of 10 ml absolute methanol will destroy visual nerves and can lead to a permanent blindness, and the use of 30 ml can lead to death although the lethal dose is usually in 100-125 ml.^{2,3} In our body, methanol will be metabolized in liver by alcohol dehydrogenase (DHA) into formaldehyde and later on by formaldehyde dehydrogenase (FDH) converted into formic acid. Both results of metabolism (especially formic acid) are very toxic for our body.⁹

In the cases of methanol poisoning, formaldehyde cannot be detected in victim's body liquid because formaldehyde is quickly converted into formic acid (in 1-2 minutes). Twenty hours later, formic acid is oxidized by 10-formyl tetrahydrofolate synthetase (F-THF-S) into carbon dioxide compound and water. So, the level of formic acid in body liquid can correlate to methanol poisoning. The symptoms of methanol poisoning mainly depend on the amount of methanol ingested.⁹

3.2. The Presence of Methanol in Alcoholic Drinks Based on Alcohol Content

After analysing the presence of methanol qualitatively, the analysis continued on analysing the presence of methanol based on the amount of alcohol in samples. The presence of methanol based on the alcohol content is presented in [Table 2](#).

Table 2. Frequency Distribution of Methanol in Alcoholic Drinks Based on Alcohol Content

No.	Alcohol Content (Group)	Methanol				Total (N)	
		Positive	(%)	Negative	(%)	Sample	(%)
1.	A (1%-5%)	0	0	8	100	8	100
2.	B (5%-20%)	2	33	4	67	6	100
3.	C (20%-50%)	1	33	2	67	3	100
	Total	3	18	14	82	17	100

Based on [Table 2](#), it is known that from 8 samples of group A, all (100%) were negative; from 6 samples of group B, 2 (33%) were positive and 4 (67%) were negative; and from 3 samples of group C, 1 (33%) was positive and 2 (67%) were negative. The presence of methanol based on alcohol content found that all (100%)

samples of group A were negative, 33% of group B was positive, and 33% of group C was positive. The result of this study supported the cause of deaths of alcohol poisoning occurred in Kayu Agung, Ogan Ilir, South Sumatra. The other related cases were also found in other regions such as Kecamatan Kota Baru and Kecamatan Cikampek, Kabupaten Karawang. The liquors they 'oplos' were from branded ones.

Poisoning from consuming beverages containing low alcohol belonging to group A (1% - 5%) is rarely to find. Because alcohol drinks of group A is prepared by fermentation, the effects are only causing relaxation and lessening stress, inhibiting concentration, and slowing reflect. The fermentation can be done in a short time (1-2 weeks) to produce ethanol in the level of 3–8%. On the contrary, those of group B (5% - 20%) and group C (20 % - 50%) are prepared by distillation. Therefore, it needs longer time (months even years) to reach those levels. The level of ethanol obtained from this process is only 7-13%. Instead of long process and complicated way to prepare distilled alcohol, the sellers and consumers use denatured one as an alternative. Denatured alcohol is cheap and easy to find. Furthermore, by mixing with denatured ones, the level of alcohol can be adjusted and the effects as they want can be got. So, it can be said that most alcohol poisonings are mainly caused by consuming beverages containing high amount of alcohol (group B and C) which is contaminated by methanol. ^{4,10}

3.3. The Presence of Methanol in Alcoholic Beverages Based on Price

The next analysis of this study was on the presence of methanol in alcoholic beverages based on the price. The presence of methanol based on price can be seen in [Table 3](#).

Table 3. Frequency Distribution of Methanol in Alcoholic Beverages Based on Price

No.	Price (IDR)	Methanol				Total	
		Positive	(%)	Negative	(%)	Sample	(%)
1.	15,000 – 25,000	3	20	12	80	15	100
2.	25,000 – 30,000	0	0	2	100	2	100
Total		3	18	14	82	17	100

Based on [Table 3](#), it is known that from 15 samples of 15,000–25.000 IDR, 3 (20%) were positive and 12 (80%) were negative. Meanwhile, from 2 samples of 25,000–30,000 IDR, all (100%) were negative. The presence of methanol based on price found that 20% of samples of 15,000–25,000 IDR was positive and all (100%) samples of 25,000–30,000 IDR were negative. The result of this study supported the cause of poisoning in which the victims only thought of cheap price without considering the lethal effect from the drinks they consume. The price of alcoholic drinks produced from pure fermentation is not cheap if compared with those that consumers get from illegal points of sale. For example, *JD* is sold for 500,000 IDR per bottle while fake *JD* is sold at a price of 100,000 IDR.

The price of *oplosan* drinks is usually not until hundreds thousands rupiah because the content is not pure ethanol from fermentation. Most sellers and consumers frequently use concentrated alcohol that is easy to find in chemical stores or pharmacies. These alcohols are sold at very cheap price compared with fermented one.

3.4. The Presence of Methanol in Alcoholic Drinks Based on Points of Sale

The analysis continued on the presence of methanol in alcoholic beverages based on points of sale. Points of sale were also assumed to have contribution to the

presence of methanol in alcoholic beverages. The presence of methanol based on points of sale is presented in [Table 4](#).

Table 4. Frequency Distribution of Methanol in Alcoholic Beverages Based on Points of Sale

No.	Points of Sale	Methanol				Total	
		Positive	(%)	Negative	(%)	Sample	(%)
1.	Small shops	3	23	10	77	13	100
2.	Supermarkets	0	0	4	100	4	100
	Total	3	18	14	82	17	100

Based on [Table 4](#), it is known that from 13 samples collected from small shops on the streets, 3 (23%) samples were positive and 10 (77%) samples were negative. Meanwhile, from 4 samples taken from supermarkets, all (100%) were found negative. The presence of methanol based on alcohol content found that from 13 samples collected from small shops on the streets, 3 (23%) samples were positive and 10 (77%) samples were negative. Meanwhile, from 4 samples taken from supermarkets, all (100%) were found negative. The result of this study supported the causes of many alcohol poisonings among society after they consumed those got from small shops. The sellers did not have any legal permission to sell this liquor and they did not have any trainings on how to dilute alcohol without causing any lethal effects.⁸

Based on presidential regulation number 74/2013 on the controlling and monitoring of production, distribution, and selling of alcoholic beverages, alcoholic beverages can only be sold with legal permission from Ministry of Trade. Regarding this regulation, alcoholic drinks group A, B, and C can only be sold in hotels, bars, restaurants, duty-free shops, and other certain points of sale that have been approved by local government and have met standard requirements as regulated by tourism offices. Furthermore, this also regulates that these points of sale may not be located near places of worship, educational institutions, and hospitals. Apart from these points of sale, only alcoholic drinks group A can be sold.⁸

From the research observation, it was found that many sellers of liquor did not have permission to legalize their jobs. In addition, they sold any groups of alcohol freely without considering whether they were legal or not to sell in their places. They also did not care about negative effects coming from these illegal practices. The lack of monitoring and controlling from the police and local government could also contribute to these problems.^{5,8}

3.5. The Presence of Methanol in Alcoholic Beverages Based on Packaging Characteristics

The analysis continued on the presence of methanol in alcoholic beverages based on packaging characteristics. Packaging characteristics were also assumed to have contribution to the presence of methanol in alcoholic beverages. The presence of methanol based on packaging characteristics is presented in [Table 5](#).

Table 5. Frequency Distribution of Methanol in Alcoholic Beverages Based on Packaging Characteristics

No.	Packaging Characteristic	Methanol				Total	
		Positive	(%)	Negative	(%)	Sample	(%)
1.	Appropriate	3	21	11	79	14	100
2.	Inappropriate	0	0	4	100	4	100
	Total	3	18	14	82	17	100

Based on Table 5, it is known that from 14 samples with appropriate packaging, 3 (21%) were found positive and 11 (79%) were found negative. Meanwhile, 4 samples with inappropriate packaging were found all negative.

The presence of methanol based on packaging characteristic found that from 14 samples with appropriate packaging, 3 (21%) were positive and 11 (79%) were negative. Meanwhile, 4 samples with inappropriate packaging were all negative, from the results above, 3 samples with appropriate packaging were positive methanol. This could happen because either the sellers or consumers made use of used bottles of softdrinks or alcoholic drinks as the alcohol containers. These bottles were cleaned, washed without destroying the label, dried, refilled, and labelled with fake ones. This is one of the ways that the sellers use to trick the consumers, government or police. However, we can differentiate whether it is an *oplosan* or not by checking the information on its label such as production date, expiry date, BPOM registration, seal, and price.⁸

4. CONCLUSIONS

Methanol has been found in "oplosan" beverages sold and has exceeded the threshold. Require optimal supervision from various parties concerned to supervise the circulation of "oplosan" drinks containing methanol above the threshold.

ACKNOWLEDGEMENT

We would like to thank to all faculty members of Medical Laboratory Science of Poltekkes Kemenkes Palembang and all those who had contributed to to this research.

References

1. Surya online, *Miras oplosan pembawa maut (positif mengandung etanol dan metanol)*. 2014.
2. Lachenmeier, P. T. H. Anh, S. Popova, and J. Rehm, "The quality of alcohol products in Vietnam and its implications for public health," *Int. J. Environ. Res. Public Health*, vol. 6, no. 8, pp. 2090–2101, 2009.
3. Barile, *Clinical Toxicology Principles and Mechanisms*. London, new york, Washington, D.C: The taylor & Francis e-library, 2005.
4. Kraut A, Jeffrey ; Kurtz, "Toxic Alcohol Ingestions: Clinical Features, Diagnosis, and Management," *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, 2008.
5. Shalini Rehm, Jürgen ; Kailasapillai, "A systematic review of the epidemiology of unrecorded alcohol consumption and the chemical composition of unrecorded alcohol," *wiley online Libr.*, 2014.
6. Kuzma, *Basic Statistics for the health sciences*. California: Mayfield Publishing Company, 1984.
7. Flanagan, R.A. Braithwaite, S.S. Brown, B. Widdop, "Analytical_Toxicology.Pdf." world health organization, Geneva, 1995.

8. BadanPOM, "TOPIK SAJIAN UTAMA : Menilik Regulasi Minuman Beralkohol di Indonesia," vol. 15, no. 3, 2014.
9. WHO, *Biological monitoring of chemical exposure in the workplace*, Volume 2. geneva: Finnish institute of occupational health, 1996.
10. Álvarez-ainza, H. González-ríos, A. González-león, Á. J. Ojeda-contreras, A. I. Valenzuela-quintanar, and E. Acedo-félix, "Quantification of Mayor Volatile Compounds from Artisanal Agave Distilled : Bacanora," *Am. J. Anal. Chem.*, vol. 2013, no. November, pp. 683–688, 2013.