



**AKTIVITAS EKSTRAK ETANOL 96% DAUN CINCAU HIJAU
(*Cyclea barbata* L. Miers) SEBAGAI PENGHAMBAT
PEMBENTUKAN BIOFILM *Escherichia coli***

SKRIPSI

Oleh

**Yulia Puspitasari
NIM 122010101006**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2015**



**AKTIVITAS EKSTRAK ETANOL 96% DAUN CINCAU HIJAU
(*Cyclea barbata* L. Miers) SEBAGAI PENGHAMBAT
PEMBENTUKAN BIOFILM *Escherichia coli***

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Kedokteran (S1)
dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran

Oleh
Yulia Puspitasari
NIM 122010101006

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2015**

PERSEMBAHAN

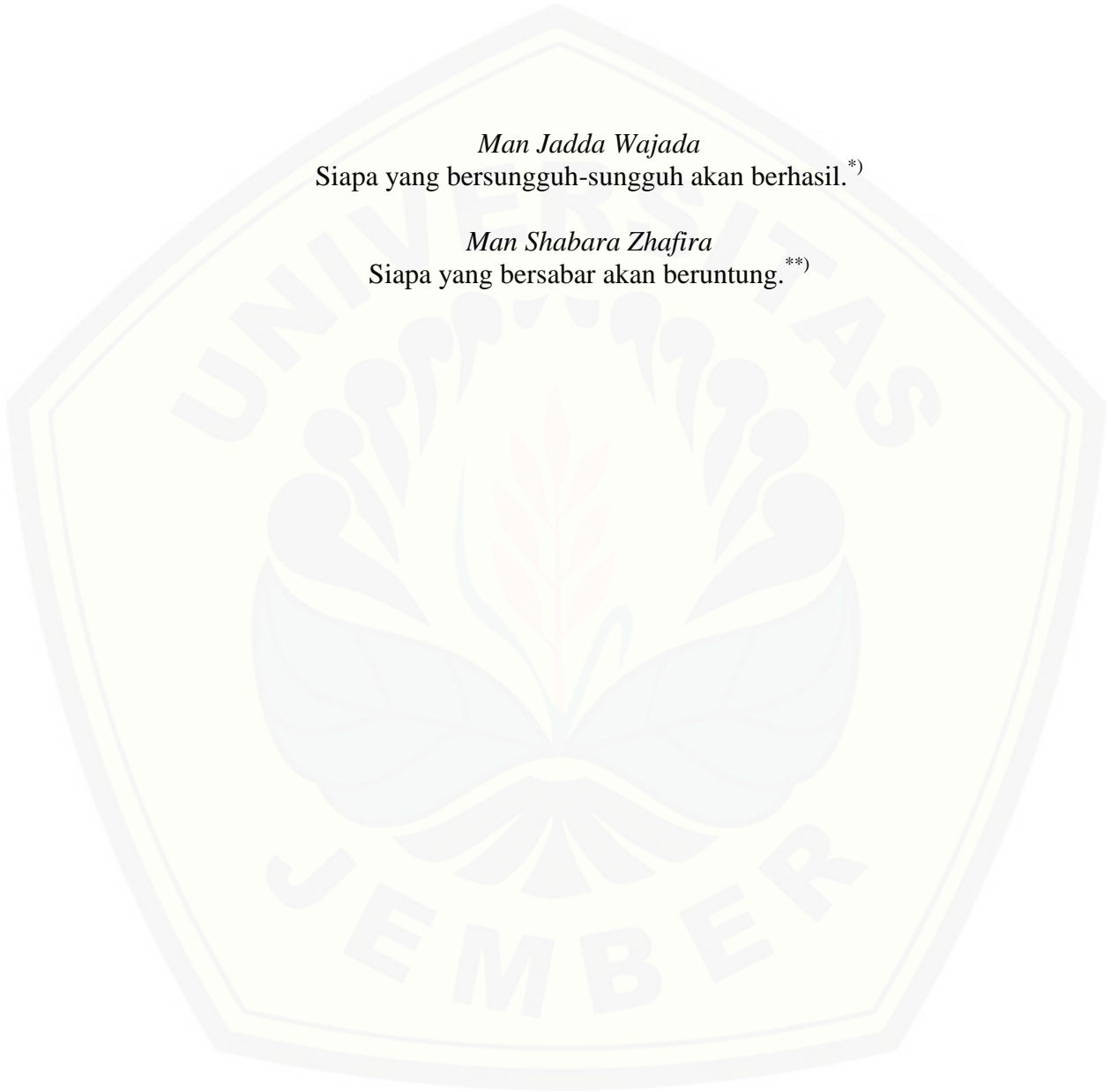
Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT dengan seluruh rahmat serta kasih sayang-Nya yang membuat saya tidak bisa berhenti mengucapkan syukur, atas ridho dan amanah-Nya sehingga saya berkesempatan untuk belajar ilmu yang luar biasa ini;
2. Nabi Muhammad SAW yang senantiasa menjadi panutan untuk kita semua;
3. Kedua orang tuaku tercinta, Papa Drs. H. Hamid Sudiono, M.Si dan Mama Hj. Roosye Christiana Dwiningtyas yang senantiasa memberikan waktu, doa, bimbingan, dukungan, kasih sayang, serta pengorbanan yang tiada terhingga sehingga saya sampai pada tahap ini;
4. Kakak saya tercinta Yuanita Auliasari, S.TP dan Diny Evitasari, S.P yang senantiasa memberikan motivasi dan semangat tiada henti;
5. Guru-guruku sejak taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi yang telah memberikan ilmu dan mendidiku dengan penuh kesabaran untuk menjadikanku sebagai manusia yang berilmu, bertakwa, dan bermanfaat;
6. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember atas seluruh kesempatan menimba ilmu yang berharga ini.

MOTTO

Man Jadda Wajada
Siapa yang bersungguh-sungguh akan berhasil.^{*)}

Man Shabara Zhafira
Siapa yang bersabar akan beruntung.^{**)}



^{*)} Fuadi, A. 2009. *Negeri 5 Menara*. Jakarta: PT. Gramedia Pustaka Utama.

^{**)} Fuadi, A. 2011. *Ranah 3 Warna*. Jakarta: PT. Gramedia Pustaka Utama.

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Yulia Puspitasari

NIM : 122010101006

menyatakan bahwa dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Aktivitas Ekstrak Etanol 96% Daun Cincau Hijau (*Cyclea barbata* L. Miers) sebagai Penghambat Pembentukan Biofilm *Escherichia coli*” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali dalam pengutipan substansi yang sudah disebutkan namanya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

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

Jember, 22 Desember 2015

Yang menyatakan,

Yulia Puspitasari

NIM 122010101006

SKRIPSI

**AKTIVITAS EKSTRAK ETANOL 96% DAUN CINCAU HIJAU
(*Cyclea barbata* L. Miers) SEBAGAI PENGHAMBAT
PEMBENTUKAN BIOFILM *Escherichia coli***

Oleh:

**Yulia Puspitasari
NIM 12201010106**

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : dr. Enny Suswati, M.Kes

Dosen Pembimbing Anggota : dr. Elly Nurus Sakinah, M.Si

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Aktivitas Ekstrak Etanol 96% Daun Cincau Hijau (*Cyclea barbata* L. Miers) sebagai Penghambat Pembentukan Biofilm *Escherichia coli*” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Selasa, 22 Desember 2015

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Tim Penguji:

Penguji I,

Dr. dr. Aris Prasetyo, M.Kes
NIP 196902031999031001

Penguji II,

dr. Dini Agustina, M. Biomed
NIP 198308012008122003

Penguji III,

dr. Enny Suswati, M.Kes
NIP 19700214 199903 2 001

Penguji IV,

dr. Elly Nurus Sakinah, M.Si
NIP 198409162008012012

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember

dr. Enny Suswati, M.Kes
NIP 19700214 199903 2 001

RINGKASAN

Aktivitas Ekstrak Etanol 96% Daun Cincau Hijau (*Cyclea Barbata L. Miers*) sebagai Penghambat Pembentukan Biofilm *Escherichia Coli*; Yulia Puspitasari; 122010101006; 2015; 45 halaman; Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Pembentukan biofilm *Escherichia coli* dapat meningkatkan virulensi bakteri serta meningkatkan resistensi terhadap antibakteri. Biofilm adalah matriks *Extracellular Polymeric Substances* (EPS) yang tumbuh diatas suatu permukaan dan menutupi mikroorganismenya. *E.coli* 0157:H7 merupakan bakteri pembentuk biofilm. Ekstrak etanol daun cincau hijau (*Cyclea barbata L. Miers*) mempunyai kandungan zat aktif tannin dan flavonoid yang mampu menghambat pembentukan biofilm dengan menghambat ekspresi gen *autoinducer* dan menghambat adhesi bakteri pada permukaan.

Daun cincau hijau merupakan tanaman jenis *Menispermaceae* yang telah lama digunakan sebagai obat herbal yang mempunyai manfaat sebagai antimikroba, antiinflamasi dan antipiretik. Penelitian terdahulu menunjukkan adanya efek antibakteri daun cincau hijau terhadap bakteri *E.coli*. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh penggunaan ekstrak etanol 96% daun cincau hijau sebagai salah satu alternatif penghambat pembentukan biofilm pada bakteri *E.coli*. Jenis penelitian ini adalah *Quasi Experimental Design* secara *in vitro* dengan desain penelitian eksperimental sederhana (*post test only control-group design*). Sampel yang digunakan yaitu *E.coli* 0157:H7 pembentuk biofilm. Perlakuan berupa penambahan ekstrak etanol daun cincau hijau dengan konsentrasi 0.29 mg/ml, 0.33 mg/ml, 0.40 mg/ml, 0.50 mg/ml, dan 0.67 mg/ml, kontrol positif dan kontrol negatif. Uji penghambatan pembentukan biofilm dilakukan menggunakan *microplate reader* dan diperoleh data kuantitatif berupa nilai absorbansi atau *Optical Density* pada panjang gelombang 570nm (OD_{570nm}). Proses ekstraksi daun cincau hijau menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%.

Pada penelitian ini didapatkan rerata pembentukan biofilm *E.coli* sebesar 0.202 pada kontrol negatif, 0.148 pada kontrol positif; 0.161, 0.142, 0.130, 0.116, 0.102 berturut-turut pada kelompok perlakuan P1, P2, P3, P4 dan P5. Data menunjukkan adanya penurunan pembentukan biofilm *E.coli* dengan penambahan ekstrak etanol daun cincau hijau pada P1-P5. Hasil uji normalitas dan homogenitas didapatkan nilai $p > 0.05$ pada semua kelompok perlakuan. Data dengan distribusi normal dan homogen kemudian dianalisis menggunakan *One Way Anova* dan didapatkan nilai p lebih besar dari 0.005 yang menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan.

Penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol 96% daun cincau hijau dapat menghambat pembentukan biofilm *E.coli*. Hasil uji LSD menunjukkan bahwa kontrol negatif mempunyai perbedaan signifikan dibandingkan semua kelompok perlakuan. Uji korelasi menunjukkan antar variabel mempunyai hubungan berbanding terbalik dengan kekuatan korelasi sangat kuat. Uji regresi didapatkan bahwa semakin besar konsentrasi ekstrak etanol daun cincau hijau maka semakin tinggi pula potensinya dalam menghambat pembentukan biofilm *E.coli* dengan pengaruh sebesar 90%.

PRAKATA

Puji syukur kehadiran Allah SWT, atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Aktivitas Ekstrak Etanol 96% Daun Cincau Hijau (*Cyclea barbata* L. Miers) sebagai Penghambat Pembentukan Biofilm *Escherichia coli*”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

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

1. Ayahanda Drs. H. Hamid Sudiono, M.Si dan ibunda Hj. Roosye Chistiana Dwiningtyas yang senantiasa mencurahkan doa, kasih sayang, waktu, materi, tenaga dan pikirannya untuk mendampingi dalam berbagai kondisi hingga saat ini. Terima kasih telah menjadi motivasi terbesar dalam hidupku;
2. Kakakku tercinta Yuanita Auliasari, S.TP dan Diny Evitasari, S.P, terima kasih atas waktu berbagi, semangat dan doa untukku;
3. dr. Enny Suswati, M.Kes., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember atas segala fasilitas dan kesempatan yang diberikan selama menempuh pendidikan kedokteran di Universitas Jember;
4. dr. Enny Suswati, M.Kes selaku Dosen Pembimbing Utama dan dr. Elly Nurus Sakinah, M.Si selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran, tenaga serta perhatiannya dalam memberikan bimbingan dan pengarahan dalam menyelesaikan penulisan skripsi ini;
5. Dr. dr. Aris Prasetyo, M.Kes selaku dosen penguji I dan dr. Dini Agustina, M.Biomed selaku dosen penguji II atas bimbingan dan masukannya;
6. Bapak Agus selaku dosen Lab. Biologi Fakultas Saintek Universitas Airlangga atas bantuan dan bimbingan yang telah diberikan selama proses penelitian;

7. Sahabat-sahabatku (Gita, Shinta, Laily, Dimes, Silvi, Ardi, Moli), terimakasih atas segala bantuan, dukungan, semangat dan doanya selama ini;
8. Guru-guru dan teman-temanku semenjak TK Pertiwi, SDN Jember Lor III, SMPN 2 Jember, SMAN 1 Jember hingga Almamaterku Fakultas Kedokteran Universitas Jember yang senantiasa mendidik dengan sabar dan mengisi kenangan masa-masa sekolah;
9. Saudaraku angkatan X TBM Vertex dan teman-teman seangkatan Panacea, terimakasih atas bantuan dan semangatnya;
10. Analis laboratorium (Mbak Lilik, Mbak Nuris) dan segenap pihak civitas akademika Fakultas Kedokteran Univeritas Jember atas bantuannya selama ini;
11. Jalu Handoko S.Si, terimakasih untuk waktu, semangat dan dukungan serta doa yang diberikan;
12. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu, terima kasih atas bantuan dan kerjasamanya.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran yang membangun dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 22 Desember 2015

Penulis

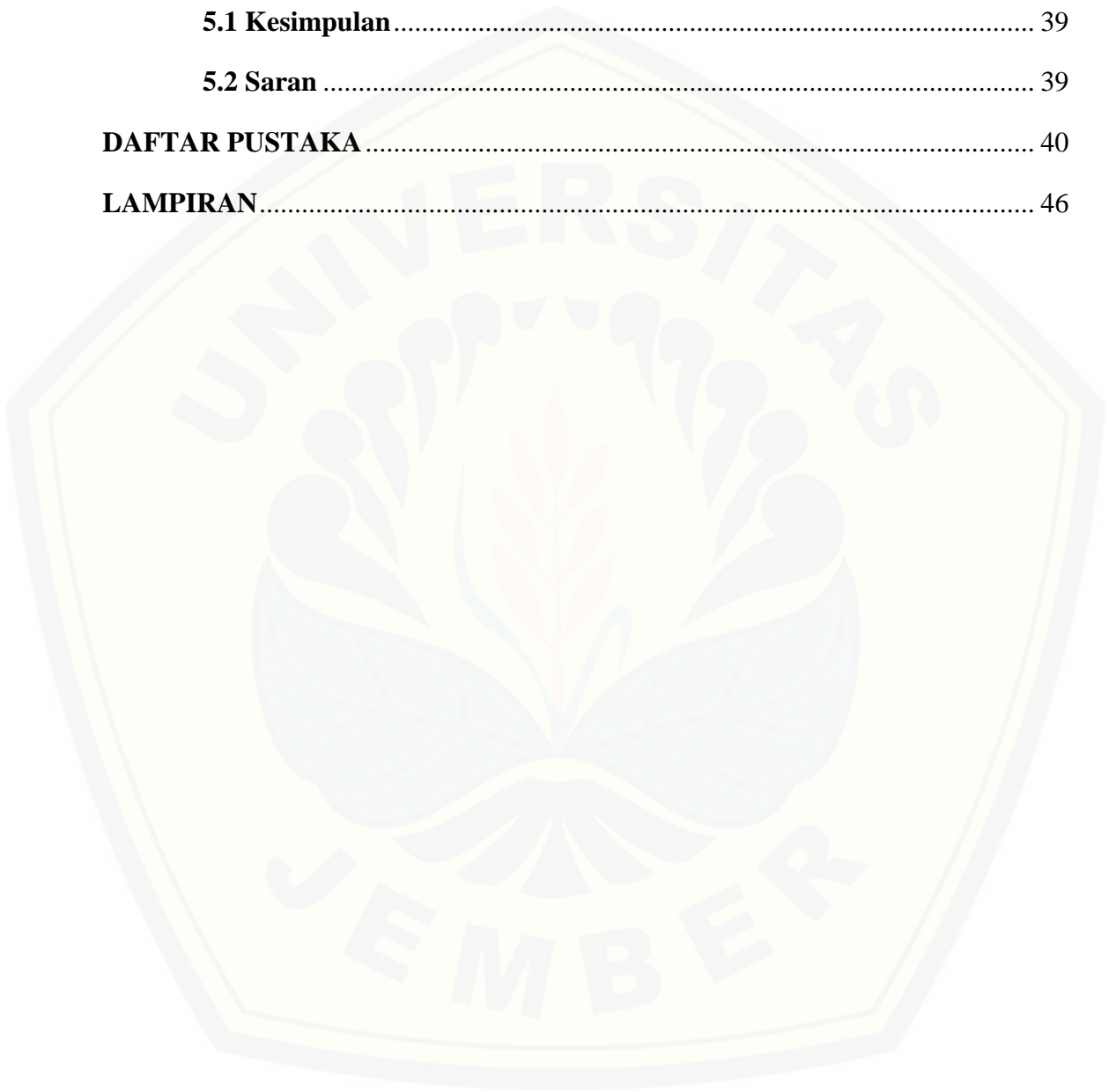
DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMBUTAN	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN BIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan	3
1.4 Manfaat	4
BAB 2. LANDASAN TEORI	5
2.1 <i>Escherichia coli</i>	5
2.1.1 Taksonomi	5

2.1.2 Morfologi	6
2.1.3 Struktur Antigenik	7
2.1.4 <i>E.coli</i> 0157:H7	7
2.2 Biofilm	8
2.2.1 Mekanisme Pembentukan Biofilm.....	9
2.2.2 Komposisi dan Struktur Biofilm.....	11
2.2.3 Fungsi Biofilm dan Peranannya terhadap Resistensi Bakteri	12
2.2.4 Pemeriksaan Biofilm.....	13
2.2.5 Strategi Intervensi terhadap Biofilm.....	13
2.3 Cincau Hijau	14
2.3.1 Taksonomi	14
2.3.2 Morfologi	15
2.3.3 Kandungan Daun Cincau Hijau	15
2.4 Metode Ekstraksi	17
2.4.1 Prinsip Proses Ekstraksi.....	19
2.4.2 Metode Ekstraksi Maserasi	19
2.5 Hidrogen Peroksida (H₂O₂)	20
2.6 Microplate Reader	20
2.7 Kerangka Konseptual Penelitian	22
2.8 Hipotesis Penelitian	23
BAB 3. METODE PENELITIAN	24
3.1 Jenis Penelitian	24
3.2 Rancangan Penelitian	24

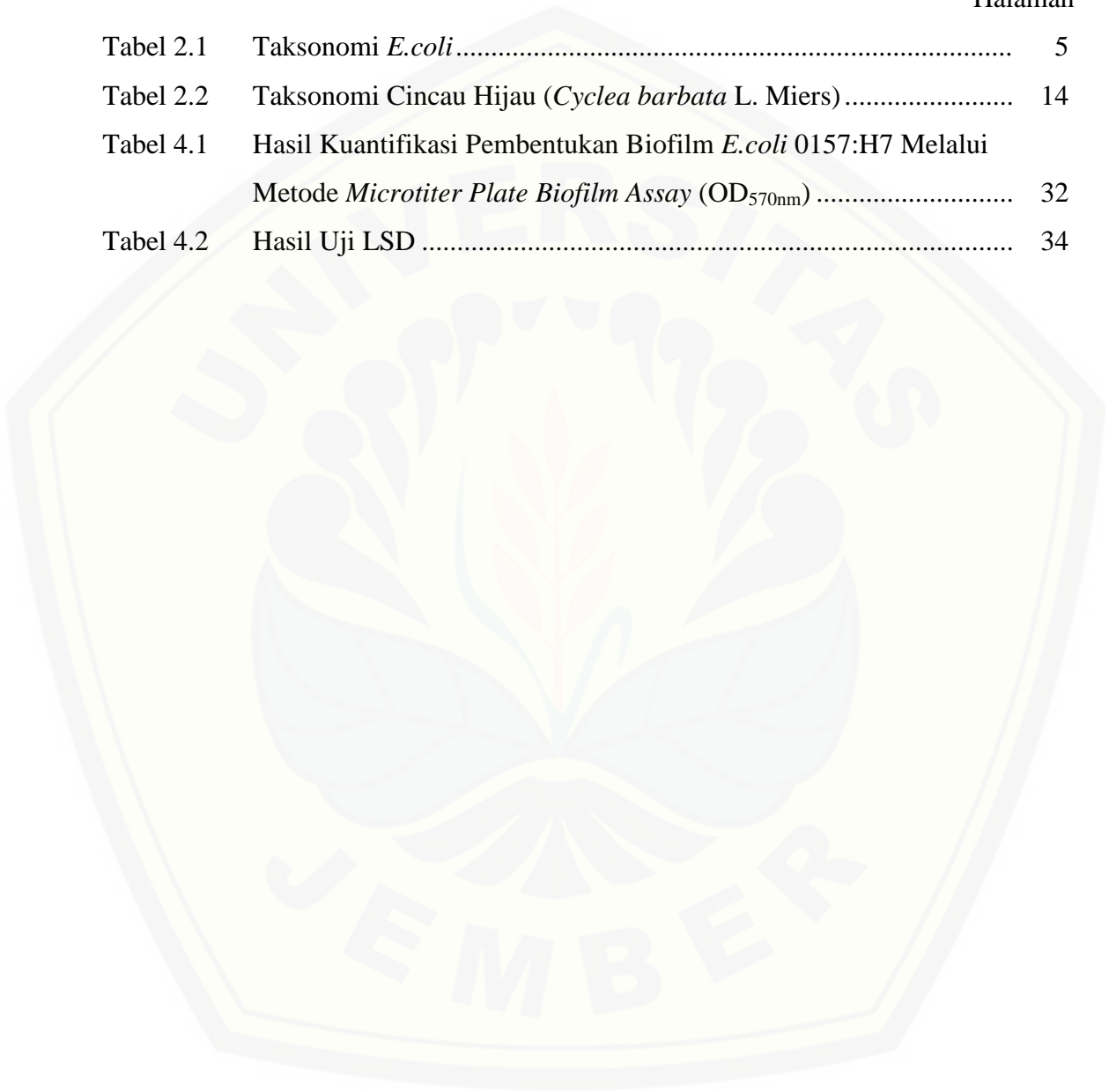
3.3 Sampel Penelitian	25
3.4 Tempat dan Waktu Penelitian	25
3.4.1 Tempat Penelitian	25
3.4.2 Waktu Penelitian.....	26
3.5 Variabel Penelitian	26
3.5.1 Variabel Bebas	26
3.5.2 Variabel Terikat	26
3.5.3 Variabel Terkendali	26
3.6 Definisi Operasional	26
3.7 Alat dan Bahan	27
3.7.1 Alat.....	27
3.7.2 Bahan	27
3.8 Prosedur Penelitian	27
3.8.1 Persiapan Alat	27
3.8.2 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Cincau Hijau	27
3.8.3 Pembuatan Suspensi <i>E.coli</i>	28
3.8.4 Pengujian Ekstrak Etanol 96% Daun Cincau Hijau Sebagai Penghambat Pembentukan Biofilm <i>E.Coli</i>	28
3.9 Alur Penelitian	30
3.10 Analisis Data	30
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	32
4.1 Hasil Penelitian	32
4.2 Analisis Data	33

4.3 Pembahasan.....	35
BAB 5. PENUTUP.....	39
5.1 Kesimpulan.....	39
5.2 Saran	39
DAFTAR PUSTAKA	40
LAMPIRAN.....	46



DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Taksonomi <i>E.coli</i>	5
Tabel 2.2 Taksonomi Cincau Hijau (<i>Cyclea barbata</i> L. Miers).....	14
Tabel 4.1 Hasil Kuantifikasi Pembentukan Biofilm <i>E.coli</i> 0157:H7 Melalui Metode <i>Microtiter Plate Biofilm Assay</i> (OD _{570nm})	32
Tabel 4.2 Hasil Uji LSD	34

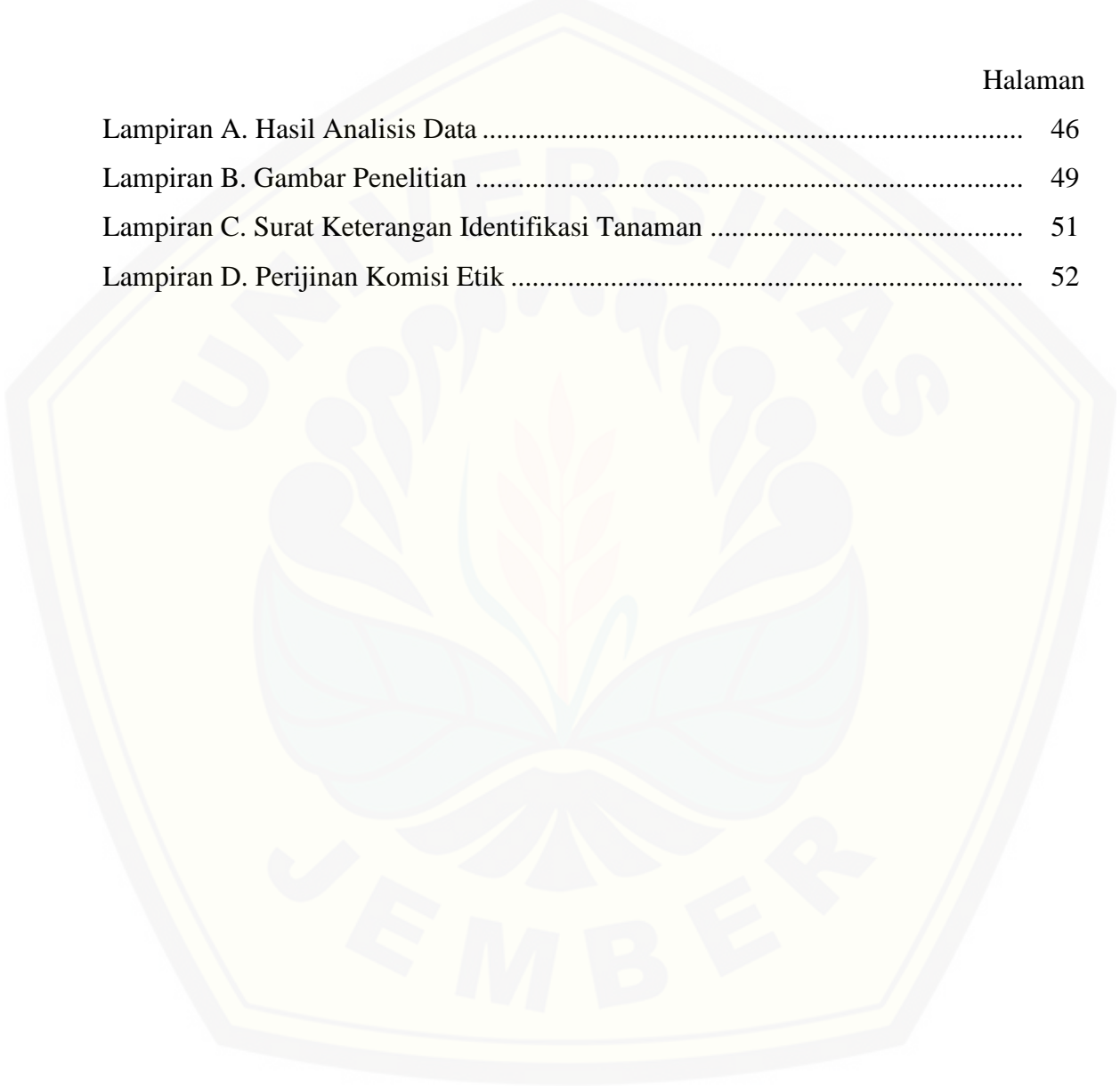


DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Morfologi <i>E.coli</i>	6
Gambar 2.2 Biofilm <i>E.coli</i> 0157:H7.....	9
Gambar 2.3 Proses pembentukan biofilm dan faktor pendukungnya.....	11
Gambar 2.4 Daun <i>Cyclea barbata</i> L. Miers	15
Gambar 2.5 Rantai kimia flavonoid.....	16
Gambar 2.6 Kerangka konseptual penelitian.....	22
Gambar 3.1 Skema rancangan penelitian	24
Gambar 3.2 Skema alur penelitian.....	30
Gambar 4.1 Grafik rerata pembentukan biofilm <i>E.coli</i> 0157:H7	33
Gambar 4.2 Hasil uji regresi.....	35

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran A. Hasil Analisis Data	46
Lampiran B. Gambar Penelitian	49
Lampiran C. Surat Keterangan Identifikasi Tanaman	51
Lampiran D. Perijinan Komisi Etik	52



BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kateterisasi uretra merupakan metode primer dekompresi kandung kemih, dan juga berfungsi sebagai alat diagnostik retensi urin akut (Curtis *et al.*, 2001). Selain untuk dekompresi kandung kemih, kateter juga digunakan untuk mengevaluasi jumlah urin yang keluar dan pada pasien inkontinensia urin (Dunn *et al.*, 2000). Kateter yang digunakan terlalu sering dan lama atau tidak sesuai indikasi akan meningkatkan risiko berbagai komplikasi seperti infeksi saluran kemih (ISK), hematuria dan perforasi kandung kemih (Semaradana, 2014).

Prevalensi ISK pada pasien yang memakai kateter yaitu 80%, dan 10% - 30% pasien tersebut akan mengalami bakteriuria (Dunn *et al.*, 2000). Jika tidak segera ditangani maka akan menimbulkan urosepsis bahkan kematian yang mencapai 9.000 kasus per tahun (Gould *et al.*, 2009). Pasien yang memakai kateter juga akan mempunyai risiko 3 kali lebih besar dirawat di rumah sakit lebih lama dan juga pemakaian antibiotik lebih lama, bahkan dilaporkan organisme penyebab ISK akibat kateterisasi adalah organisme yang telah resisten terhadap banyak antibiotik (Jacobsen, 2008). Bakteri-bakteri intestinal seperti *Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Enterococci*, dan *Proteus* adalah patogen umum saluran kemih yang dapat menyebabkan ISK akibat kateterisasi. Bakteri Gram negatif yang paling umum menyebabkan ISK akibat kateterisasi adalah *Escherichia coli* (*E.coli*) dengan presentase 80% (Hooton, 2009; Ratanabunjerdkul *et al.*, 2006).

Masuknya *E.coli* melalui kateter sangat berhubungan dengan pembentukan biofilm pada kateter (Trautner, 2004). Biofilm adalah matriks *Extracellular Polymeric Substances* (EPS) yang tumbuh diatas suatu permukaan dan menutupi mikroorganisme (Park *et al.*, 2014). Sel-sel bakteri dalam matriks akan mengeluarkan sinyal kimia yang berperan dalam pembentukan karakteristik biofilm menjadi lebih

matur (Gunardi, 2014). Biofilm ini berkembang dan tumbuh di dalam dan di luar kateter sehingga terlihat seperti membungkus kateter (Semaradana, 2014).

Manifestasi klinis dari infeksi oleh bakteri pembentuk biofilm adalah adanya resistensi terhadap pengobatan antibiotik. Terapi antibiotik pada umumnya hanya akan membunuh sel-sel bakteri planktonik sedangkan bentuk bakteri yang tersusun rapat dalam biofilm akan tetap hidup dan berkembang serta akan melepaskan bentuk sel-sel planktonik keluar dari formasi biofilm (Davey and O'toole, 2000; Melchior *et al.*, 2006).

Salah satu strategi intervensi biofilm adalah melindungi permukaan dengan molekul yang menghambat perlekatan mikroba dan merusak matriks yang diproduksi (Gunardi, 2014). Kurangnya teknik aseptik dalam kateterisasi atau dalam perawatan kateter menyebabkan bakteri non-intestinal dan bakteri eksogen seperti *Pseudomonas*, *Staphylococci*, *Acinetobacter* dapat juga mengakibatkan ISK akibat kateterisasi (Greene, 2008). Hidrogen peroksida (H_2O_2) sering digunakan dalam dunia kesehatan sebagai desinfektan karena tidak meninggalkan residu yang berbahaya (Setiawan, 2013). Namun, telah dilaporkan bahwa biofilm bakteri termasuk *E.coli* mempunyai kemampuan bertahan hidup setidaknya 90% terhadap H_2O_2 (Elkins, 1999).

Adanya resistensi bakteri terhadap antiseptik merupakan peluang besar ditemukannya senyawa antiseptik sebagai alternatif yang didapat dari keanekaragaman hayati. Salah satu tanaman yang dapat digunakan sebagai obat herbal adalah cincau hijau (*Cyclea barbata* L. Miers). Cincau hijau memiliki nilai ekonomis yang murah, mudah didapat dan digemari masyarakat.

Penelitian terdahulu menunjukkan cincau hijau digunakan masyarakat Indonesia sebagai salah satu bahan dalam mengobati berbagai macam penyakit (Ananta, 2000). Secara tradisional mempunyai manfaat sebagai obat penurun panas, radang lambung, penurun tekanan darah tinggi, disamping dapat memberikan efek psikologis kesehatan lainnya. Berdasarkan penelitian Chalid (2003), cincau hijau mengandung senyawa kimia seperti : flavonoid, tannin, alkaloid, saponin, klorofil dan

karotenoid. Penelitian Heyne ini diperkuat oleh penelitian Zakaria dan Prangdimurti (2000) yang mendapatkan bahwa cincau hijau mengandung alkaloid 0,98% dan total fenol 2,21%. Menurut Vikram, *et al.* (2010) dan Taganna, *et al.* (2011), senyawa flavonoid dan tannin dapat menghambat *quorum sensing* pada biofilm bakteri *E.coli* 0157:H7.

Hal ini menyebabkan penggunaan cincau hijau sebagai antiseptik banyak diteliti dan dikembangkan. Namun belum ada penelitian mengenai aktivitas ekstrak etanol 96% daun cincau hijau (*Cyclea barbata* L. Miers) sebagai penghambat pembentukan biofilm bakteri *E.coli*, sehingga penulis tertarik untuk melakukan penelitian dengan topik tersebut. Penelitian ini diharapkan memberi manfaat pengetahuan kesehatan bagi masyarakat serta memperoleh data ilmiah mengenai penggunaan ekstrak daun cincau hijau sebagai senyawa penghambat pembentukan biofilm pada bakteri *E.coli*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, rumusan masalah dari penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Apakah ekstrak etanol 96% daun cincau hijau dapat menghambat pembentukan biofilm bakteri *E.coli*?
2. Bagaimana hubungan antara ekstrak etanol 96% daun cincau hijau dengan penghambatan biofilm bakteri *E.coli*?

1.3 Tujuan

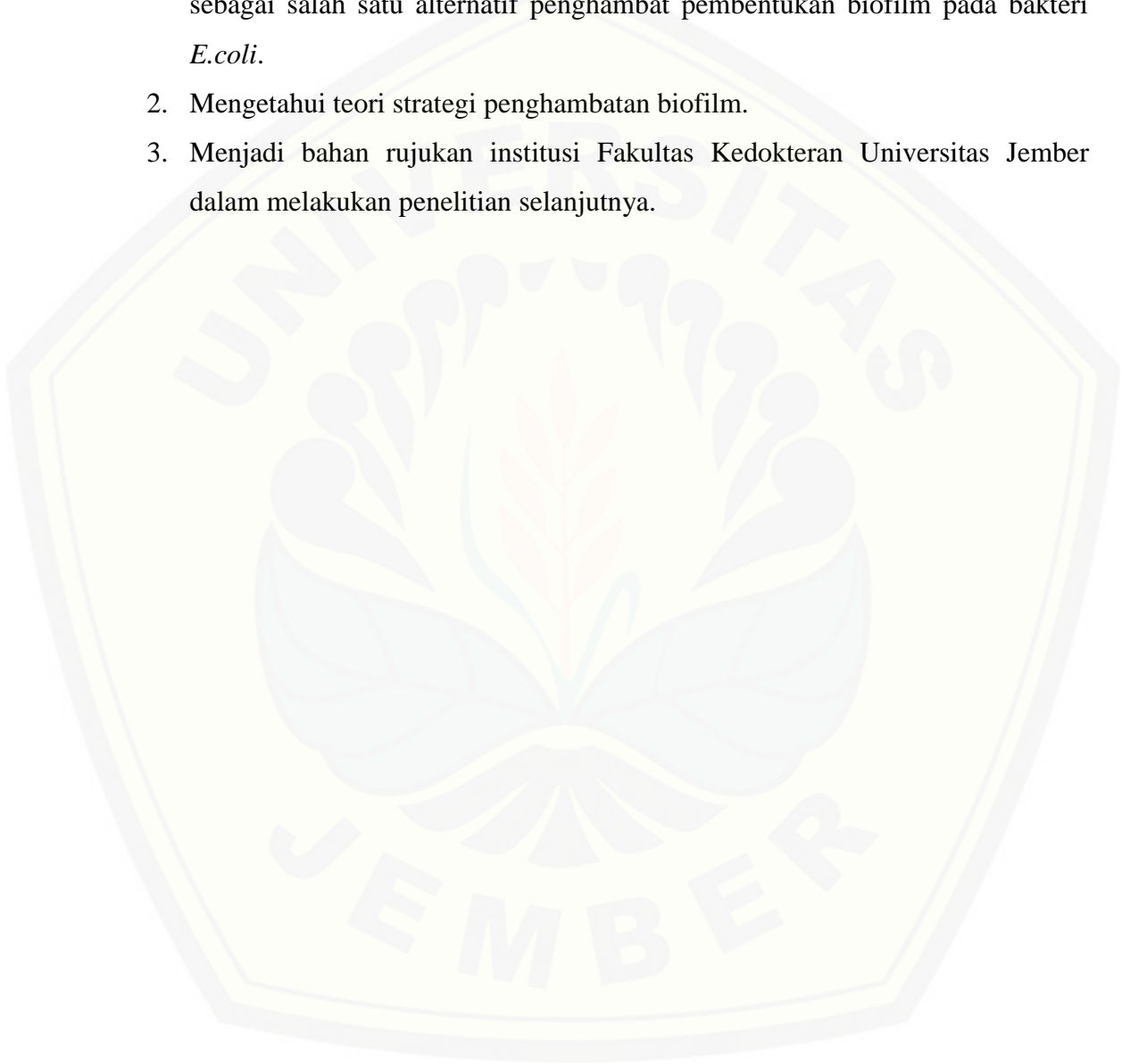
Tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Mengetahui aktivitas ekstrak etanol 96% daun cincau hijau sebagai penghambat pembentukan biofilm pada bakteri *E.coli*.
2. Mengetahui hubungan antara ekstrak etanol 96% daun cincau hijau dengan penghambatan pembentukan biofilm pada bakteri *E.coli*.

1.4 Manfaat

Manfaat penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Mengetahui pengaruh penggunaan ekstrak etanol 96% daun cincau hijau sebagai salah satu alternatif penghambat pembentukan biofilm pada bakteri *E.coli*.
2. Mengetahui teori strategi penghambatan biofilm.
3. Menjadi bahan rujukan institusi Fakultas Kedokteran Universitas Jember dalam melakukan penelitian selanjutnya.



BAB 2. LANDASAN TEORI

2.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli pertama kali diidentifikasi didalam flora usus dari bayi oleh seorang dokter anak dari German yang bernama Theodor Escherich (1885) yang kemudian menamai bakteri ini *Bacterium coli commune*. Nama *Escherichia* diberikan pada tahun 1920 sebagai penghargaan terhadap Theodor Escherich (Berg, 2004).

Pada manusia sehat, *E coli* merupakan bakteri Gram negatif dominan flora kolon manusia. Meskipun beberapa strain *E. coli* tidak berbahaya, namun beberapa dapat menimbulkan berbagai penyakit pada manusia. Tiga sindrom klinik yang dapat dihasilkan dari infeksi yaitu infeksi saluran kemih, diare dan sepsis/meningitis (Kaper *et al.*, 2004).

2.1.1 Taksonomi

Taksonomi *Escherichia coli* dapat dilihat pada Tabel 2.1

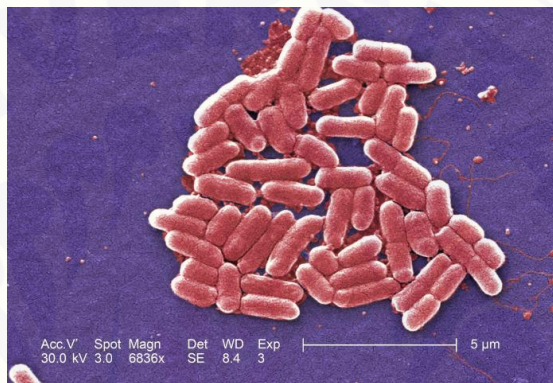
Tabel 2.1 Taksonomi *E.coli*

Klasifikasi bakteri <i>Escherichia coli</i>	
Domain	Bacteria
Kingdom	Monera
Divisi	Eubacteria
Kelas	Proteobacteria
Ordo	Enterobacteriales
Family	Enterobacteriaceae
Genus	<i>Escherichia</i>
Spesies	<i>Escherichia coli</i>

Sumber: Lerner *et al.*, (2003); NCBI (2010)

2.1.2 Morfologi

E. coli merupakan bakteri anaerobik fakultatif (Campbell *et al.*, 2002) berbentuk batang dan berukuran sangat kecil dengan panjang sekitar 2,2 μ m dan diameter 0,8 μ m. Bakteri ini tidak memiliki nukleus, organel terbungkus membran maupun sitoskeleton. Morfologi *E.coli* pada *Scanning Electron Microscope* (SEM) perbesaran 6835x dapat dilihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Morfologi *E.coli* dilihat dengan *Scanning Electron Microscope* (Sumber: CDC, 2006).

E. coli memiliki organel eksternal yakni vili yang merupakan filamen tipis untuk menangkap substrat spesifik dan flagela yang merupakan filamen tipis dan lebih panjang untuk berenang (Berg, 2004). Lapisan selubung sel yang terdapat di antara membran sitoplasma dan kapsul disebut dinding sel. Dinding sel pada bakteri Gram negatif terdiri dari peptidoglikan dan membran luar. Dinding sel berperan penting sebagai proteksi terhadap tekanan osmotik internal yang mencapai 5-20 atm dan juga berperan dalam pembelahan sel. Pada umumnya dinding sel bersifat permeabel non selektif (Brooks *et al.*, 2007). Namun, membran luar ekstrasit oplasmik bakteri Gram negatif (Fauci *et al.*, 2008) dapat menghambat perpindahan molekul-molekul yang berukuran besar (Brooks *et al.*, 2007). Membran luar ini merupakan suatu lipid bilayer dengan protein, lipoprotein dan polisakarida. Membran luar bakteri Gram negatif berhubungan dengan lingkungan termasuk pada pejamu

manusia. Variasi pada membran luar inilah yang menyebabkan terdapatnya perbedaan sifat patogenitas dan resistensi antimikroba (Fauci *et al.*, 2008).

2.1.3 Struktur Antigenik

E. coli memiliki 3 jenis antigen yaitu antigen somatik (antigen O) yang bersifat tahan panas, antigen permukaan (antigen K) yang tidak tahan panas, antigen flagel (antigen H). Antigen O yang merupakan bagian terluar dari lipolisakarida dinding sel dan terdiri atas unit polisakarida yang berulang. Antigen O tahan terhadap panas dan alkohol dan biasanya dideteksi dengan aglutinasi bakteri. Antibodi terhadap antigen O terutama IgM. Antigen K berada diluar antigen O. Antigen K dapat mengganggu aglutinasi melalui antiserum O dan dapat berhubungan dengan virulensi misalnya antigen K pada *E. Coli* menyebabkan pelekatan bakteri pada sel epitel sebelum invasi ke saluran cerna atau saluran kemih. Sedangkan antigen H terletak pada flagel dan didenaturasi atau dirusak oleh panas atau alkohol. Antigen H dipertahankan dengan memberikan formalin pada varian bakteri yang bergerak seperti pada *E. Coli* (Brooks *et al.*, 2007).

2.1.4 *E.coli* 0157:H7

E.coli 0157:H7 merupakan bakteri Gram-negatif patogenik. Di Negara Amerika Serikat dan beberapa Negara maju lainnya, organisme ini dikenal sebagai bakteri utama penyebab penyakit infeksi yang penularannya melalui makanan. Beberapa studi terdahulu melaporkan bahwa *E.coli* 0157:H7 mampu membentuk biofilm di berbagai permukaan abiotik, tumbuh-tumbuhan serta industri makanan (Trémoulet, 2002).

E.coli 0157:H7 telah diteliti sebelumnya untuk mengetahui beberapa protein yang berperan pada pembentukan biofilm. Terdapat 14 protein meningkat dan 3 lainnya menurun pada biofilm. Dari 17 protein yang ada, 10 diantaranya diidentifikasi melalui laser spektrometri dan dapat dikategorikan menjadi empat kelompok berdasarkan fungsinya:

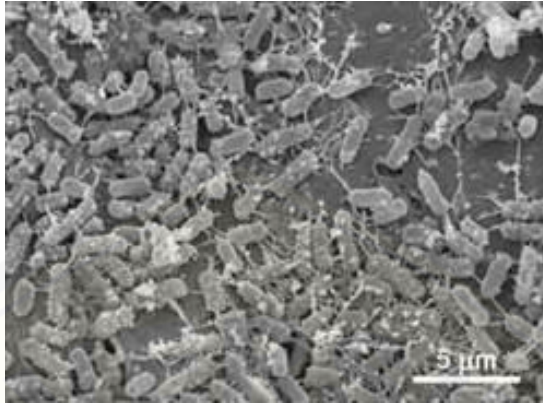
1. Protein metabolisme umum (*malate dehydrogenase, thiamine-phosphate pyrophosphorylase*)
2. Glukosa dan asam amino transporter (*d-ribose-binding periplasmic protein, d-galactose-binding protein*)
3. Protein regulator (protein DNA)
4. Tiga protein lainnya yang fungsinya belum diketahui.

Hal ini menunjukkan *E.coli* 0157:H7 mengubah ekspresi dari beberapa protein dalam proses pembentukan biofilm (Trémoulet, 2002).

2.2 Biofilm

Biofilm adalah matriks *Extracellular Polymeric Substances* (EPS) yang tumbuh di atas suatu permukaan dan menutupi mikroorganisme (Park *et al*, 2014). Pembentukan biofilm membutuhkan waktu yang sangat cepat meliputi perlekatan mikroorganisme pada suatu permukaan, pembentukan biofilm, dan diikuti dengan pematangan dari biofilm tersebut (Masak *et al*, 2014).

Pada awalnya terbentuk satu lapis (*monolayer*) biofilm yang sangat tipis yang melingkupi mikrokoloni bakteri (Wei dan Za, 2013). Matriks lambat laun akan mengalami maturasi dan semakin membesar. Matriks matur akan mengeluarkan beberapa sel bakteri untuk membentuk biofilm yang baru dan mengulangi proses pembentukan biofilm sehingga terbentuk biofilm yang baru (Mann dan Wozniak, 2012). Biofilm *E.coli* dapat dilihat pada Gambar 2.3.



Gambar 2.2 Biofilm *E.coli* 0157:H7 dilihat dengan mikroskop elektron
(Sumber: Bassam, 2009)

2.2.1 Mekanisme Pembentukan Biofilm

Pembentukan biofilm dimulai dari beberapa bakteri yang hidup bebas (sel planktonik) melekat pada suatu permukaan, kemudian memperbanyak diri dan membentuk satu lapisan tipis (monolayer) biofilm. Biofilm akan menghasilkan EPS yang akan melekatkan mereka pada suatu permukaan dan melekatkan satu sama lain untuk membentuk suatu mikrokoloni. (Gunardi, 2014).

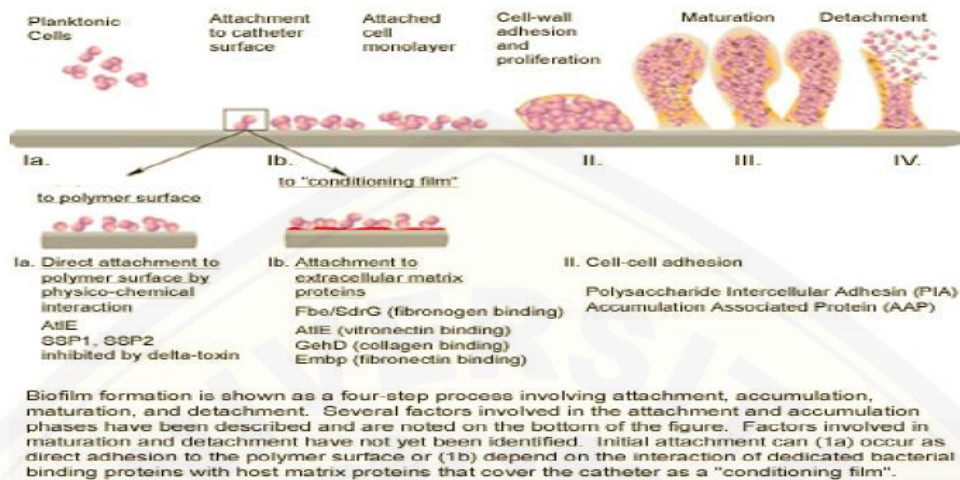
Biofilm mempunyai peranan penting pada kasus ISK yang disebabkan pemakaian kateter. Proses pertama pembentukan biofilm adalah pengendapan lapisan kondisional pada permukaan kateter ketika kateter dimasukkan. Lapisan kondisional ini terbentuk dari protein, elektrolit dan molekul organik lain yang berasal dari urin. Bakteri melekat pada lapisan kondisional ini dan terus bertumbuh sehingga bisa menutupi sebagian atau bahkan total permukaan kateter di bawahnya. Bakteri *sessile* atau bakteri yang melekat juga memproduksi matriks polisakarida ekstraseluler yang membentuk struktur arsitektural biofilm, menyebabkan biofilm dapat menetralkan sifat *anti-adhesive* dari kateter (Trautner, 2004). Bakteri dan matriks tersebut juga membentuk pilar-pilar tebal yang dipisahkan oleh ruangan berisi air (*fluid-filled spaces*). Ruangan tersebut berfungsi sebagai hantaran untuk mengirimkan nutrisi dan sinyal kimia antar bakteri (Semaradana, 2014). Pada bakteri Gram negatif seperti

E.coli, molekul sinyal yang utama adalah komponen yang disebut homoserin lakton yang berfungsi sebagai agen kemostatik untuk mengumpulkan sel-sel yang berdekatan (melalui mekanisme *quorum sensing*) dan membentuk biofilm (Madigan *et al.*, 2006). Jika kondisi lingkungan tidak mendukung biofilm seperti kekurangan nutrisi atau terlalu banyaknya bakteri, maka organisme *sessile* akan lepas dan menjadi organisme *free-floating* atau disebut planktonik. Planktonik di urin akan menimbulkan ISK simtomatis (Semaradana, 2014).

Secara ringkas, Monroe (2007) merangkum lima tahapan pembentukan biofilm yaitu;

- i. Pelekatan awal: mikroba melekat pada permukaan suatu benda dan dapat diperantarai oleh fli (rambut halus sel)
- ii. Pelekatan permanen: mikroba melekat dengan bantuan eksopolisakarida (EPS)
- iii. Maturasi I: proses pematangan biofilm tahap awal.
- iv. Maturasi II: proses pematangan biofilm tahap akhir, mikrob siap untuk menyebar.
- v. Dispersi: Sebagian bakteri akan menyebar dan berkolonisasi di tempat lain.

Pembentukan dari biofilm ini tergantung dari konsentrasi nutrisi yang tersedia dan diatur oleh suatu zat kimia kompleks yang dikeluarkan oleh sel sebagai komunikasi antar sel. Proses pembentukan biofilm dan faktor-faktor pendukungnya dapat dilihat pada Gambar 2.4.



Gambar 2.3 Proses pembentukan biofilm dan faktor-faktor pendukungnya (Sumber: Gunardi, 2014)

2.2.2 Komposisi dan Struktur Biofilm

Komposisi biofilm terdiri dari sel-sel mikroorganisme, produk ekstraseluler, detritus, polisakarida sebagai bahan pelekat, dan air adalah bahan penyusun utama biofilm dengan kandungan hingga 97% (Zhang *et al.*, 1998). Polisakarida (polimer dari monosakarida atau gula sederhana) yang diproduksi oleh mikroba untuk membentuk biofilm termasuk eksopolisakarida (EPS) yaitu polisakarida yang dikeluarkan dari dalam sel (Sutherland, 2001). EPS bersifat hidrofilik karena dapat mengikat air dalam jumlah yang banyak, dengan tingkat kelarutan yang berbeda-beda (Gunardi, 2014). EPS bervariasi secara komposisi, sifat fisik dan kimia. Beberapa adalah makromolekul yang bersifat netral, namun mayoritas bermuatan karena keberadaan asam uronat (Asam D-glukuronat), Asam D-galakturonat, dan Asam D-manuroniak (Sutherland, 1990).

Beberapa contoh EPS adalah asam kolanat yang diproduksi oleh *Escherichia coli*, xanthan gum yang diproduksi oleh *Xanthomonas campestris*, alginat oleh *P. aeruginosa*, dan galaktoglukan oleh *Vibrio cholerae* (Prigent *et al.*, 1999). Bahan-

bahan penyusun biofilm yang lain contohnya adalah protein, lipid, dan lektin (Sutherland, 2001).

2.2.3 Fungsi Biofilm dan Peranannya terhadap Resistensi Bakteri

Alasan bakteri membentuk biofilm adalah karena daya tahan hidup meningkat dan pertumbuhan menjadi lebih baik (Madigan, 2006). Setidaknya ada empat alasan yang mendasari hal tersebut:

a. Pertahanan

Biofilm berfungsi sebagai mekanisme pertahanan bagi bakteri dengan cara meningkatkan resistensi terhadap gaya fisik yang dapat menyapu bersih sel-sel yang tidak menempel, fagositosis oleh sel-sel sistem imun (kekebalan) tubuh, dan penetrasi dari senyawa beracun seperti antibiotik. Bakteri di dalam biofilm lebih resisten 10-1.000 kali dibandingkan bila tidak di dalam biofilm (Monroe, 2007).

Manifestasi klinis dari infeksi oleh bakteri pembentuk biofilm adalah adanya resistensi terhadap pengobatan antibiotik. Terapi antibiotik pada umumnya hanya akan membunuh sel-sel bakteri planktonik sedangkan bentuk bakteri yang tersusun rapat dalam biofilm akan tetap hidup dan berkembang serta akan melepaskan bentuk sel-sel planktonik keluar dari formasi biofilm (Davey and O'toole, 2000; Melchior *et al.*, 2006)

b. Perlekatan

Dengan menggunakan biofilm, bakteri dapat melekat pada permukaan yang kaya akan nutrisi seperti jaringan sel hewan, atau permukaan substrat pada sistem yang mengalir contohnya permukaan batu di dalam aliran air.

c. Kolonisasi

Pembentukan biofilm membantu sel-sel bakteri untuk hidup berdekatan dan membentuk koloni. Contohnya adalah *E.coli* yang berkoloni dengan biofilm sehingga memfasilitasi komunikasi antar sel dengan molekul sinyal, dan meningkatkan peluang pertukaran materi genetik.

d. Cara hidup alami bakteri

Di alam, biofilm adalah cara hidup alami bagi beberapa bakteri tertentu dengan alasan terbatasnya nutrisi, tidak seperti medium buatan yang kaya akan nutrisi bagi bakteri.

2.2.4 Pemeriksaan Biofilm

Pemeriksaan biofilm dapat dilakukan dengan tiga cara yaitu;

- a. *Microplate Reader* dapat memeriksa biofilm dengan membaca absorbant pada panjang gelombang tertentu (Setiawan, 2013).
- b. Mikroskop elektron dapat memeriksa biofilm pada alat-alat medik dan pada infeksi manusia. Pada awalnya, mikroskop elektron ini merupakan alat yang penting dalam mempelajari biofilm.
- c. *Concofocal Laser Scanning Microscope* (CLSM) dengan fluoresen antisera dan fluoresen in situ hibridisasi, sehingga organisme yang spesifik dan untuk mengidentifikasi dalam komunitas campuran kuman (Gunardi, 2014).

2.2.5 Strategi Intervensi terhadap Biofilm

Untuk menghambat pembentukan biofilm diperlukan strategi intervensi yang mampu mengganggu atau mencegah terbentuknya biofilm yaitu;

- a. Melindungi permukaan dengan molekul yang menghambat perlekatan mikroba dan merusak matriks yang diproduksi, contohnya melapisi alat-alat medik dengan *chlorhexidin-silver sulfadiazine*.
- b. Menghambat sel-sel *signaling* sehingga mengganggu pertumbuhan biofilm
- c. Menggunakan antibiotika atau desinfektan untuk menghambat strategi pertahanan biofilm, contohnya kombinasi fosfomisin dan ofloksasin.
- d. Menghambat gen-gen yang berperan dalam pembentukan biofilm dan gen yang mengatur sel-sel persister.
- e. Melalui mekanisme *self destruction* misalnya *P. fluorescent* akan menghasilkan lyase yang dapat menghancurkan matriks filmnya berupa alginate pada

lingkungan yang kekurangan oksigen. Hal ini mungkin terjadi untuk menjaga ketersediaan nutrisi bagi biofilm. Proses biofilm *self destruction* ini mungkin diperankan oleh gen-gen tertentu. Diharapkan dengan mengetahui gen-gen tersebut, dapat digunakan untuk eradikasi biofilm (Gunardi, 2014).

2.3 Cincau Hijau

2.3.1 Taksonomi

Taksonomi Cincau Hijau (*Cyclea barbata* L. Miers) dapat dilihat pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2 Taksonomi Cincau Hijau (*Cyclea barbata* L. Miers)

Klasifikasi Cincau Hijau (<i>Cyclea barbata</i> L. Miers)	
Kerajaan	Plantae
Superdivisi	Spermatophyta
Divisi	Magnoliophyta
Kelas	Magnoliopsida
Subkelas	Magnoliidae
Bangsa	Ranunculales
Suku	Menispermaceae
Marga	<i>Cyclea</i>
Jenis	<i>Cyclea barbata</i> (L.) Miers

Sumber: Nurlela (2015)

Tanaman ini berasal dari Asia Tenggara, termasuk tanaman rambat dari famili sirawan-sirawan (*Menispermae*), sering ditemukan tumbuh sebagai tanaman liar, tetapi ada juga yang sengaja dibudidayakan di pekarangan rumah. Tumbuh subur di tanah yang gembur dengan pH 5,5-6,5 dengan lingkungan teduh, lembab dan berair tanah dangkal. Batang tanaman ini bulat, berdiameter ± 1 cm dan merambat kearah kanan pada pohon inang serta tinggi/panjang $\pm 5-16$ m. Bentuk daunnya seperti perisai atau jantung, berwarna hijau, bagian pangkalnya berlekuk dan bagian tengah melebar

serta ujungnya meruncing. Tanaman ini berkembang subur di dataran di bawah ketinggian ± 800 m di atas permukaan laut. Cara pengembangbiakan tanaman rambat ini bisa dilakukan dengan cara generatif yaitu dengan biji, bisa pula dengan cara vegetatif yaitu dengan stek batang maupun tunas akarnya (Djama'an, 2008).



Gambar 2.4 Daun *Cyclea barbata* L. Miers
(Sumber: Redha, 2010)

2.3.2 Morfologi

Cyclea barbata L. Miers atau cincau hijau merupakan tanaman merambat berkayu sepanjang 8 m, akar berdaging tebal dan panjang, coklat pucat di bagian luar dan keputihan atau kekuningan di bagian dalam (De Padua, Bunyapraphatsara, dan Lemmens, 1999). Daun cincau hijau rambat tidak berbau, tidak berasa, tetapi berlendir. Helai daunnya berwarna hijau kecoklatan dan berbentuk jantung. Panjangnya 5,5 cm sampai 9 cm, sedangkan lebarnya 5,5 cm sampai 9,5 cm. Ujung daun runcing, tepinya tidak rata, berambut halus, dan ujung pangkalnya tumpul. Tangkai daun memiliki panjang 2,5 cm sampai 4,5 cm (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1989).

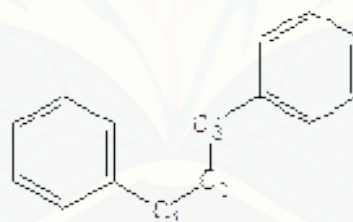
2.3.3 Kandungan Daun Cincau Hijau

Secara umum kandungan daun cincau hijau adalah karbohidrat, lemak, protein dan senyawa-senyawa lainnya seperti polifenol, tannin, flavonoid serta mineral-

mineral dan vitamin-vitamin, di antaranya kalsium, fosfor dan vitamin A serta vitamin B28 (Djam'an, 2008). Ekstrak daun cincau hijau memiliki aktivitas antibakteri ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambat terhadap bakteri *E.coli* (Asmardi, 2014). Berdasarkan penelitian penelitian Zakaria dan Prangdimurti yang mendapatkan bahwa tanaman cincau hijau mengandung alkaloid 0,98% dan total fenol 2,21% (Chalid, 2003). Berikut beberapa senyawa yang terdapat pada cincau hijau beserta kegunaannya:

a. Flavonoid

Flavonoid merupakan salah satu kelompok senyawa metabolit sekunder yang paling banyak ditemukan di dalam jaringan tanaman. Flavonoid termasuk dalam golongan senyawa fenolik dengan struktur kimia C₆-C₃-C₆. Kerangka flavonoid terdiri atas satu cincin aromatik A, satu cincin aromatik B, dan cincin tengah berupa heterosiklik yang mengandung oksigen dan bentuk teroksidasi cincin ini dijadikan dasar pembagian flavonoid ke dalam sub-sub kelompoknya. Sistem penomoran digunakan untuk membedakan posisi karbon di sekitar molekulnya (Redha,2010).



FLAVONOID

Gambar 2.5 Rantai Kimia Flavonoid
(Sumber: Redha, 2010)

Flavanoid merupakan senyawa polar yang umumnya mudah larut dalam pelarut polar seperti etanol, menthanol, butanol, aseton, dan lain-lain. Flavanoid dalam tumbuhan terikat pada gula sebagai glikosida dan aglikon flavanoid, gula yang terikat pada flavonoid mudah larut dalam air (Harborne,1996).

Flavonoid merupakan antioksidan yang potensial untuk mencegah pembentukan radikal bebas. Flavonoid mempunyai sifat efektif menghambat pertumbuhan virus, bakteri, dan jamur. Mekanisme kerja flavonoid dengan kecenderungan mengikat protein, sehingga mengganggu proses metabolisme (Ganiswara, 1995). Penelitian Vikram, *et al.* (2010) dan Taganna, *et al.* (2011) menunjukkan bahwa flavonoid dan tannin dapat menghambat *quorum sensing* pada bakteri *E.coli* 0157:H7.

b. Polifenol

Polifenol merupakan senyawa turunan fenol yang mempunyai aktivitas sebagai antioksidan. Antioksidan fenolik biasanya digunakan untuk mencegah kerusakan akibat reaksi oksidasi pada makanan, kosmetik dan farmasi serta plastik. Fungsi polifenol sebagai penangkap dan pengikat radikal bebas dari rusaknya ion-ion logam. Kelompok tersebut sangat mudah larut dalam air dan lemak serta dapat bereaksi dengan vitamin C dan vitamin E. Kelompok-kelompok senyawa fenolik terdiri dari asam-asam fenolat dan flavonoid (Djama'an, 2008).

c. Tannin

Tannin terdapat luas dalam tumbuhan berpembuluh. Tannin dapat bereaksi dengan protein membentuk kopolimer yang tidak larut dalam air. Tannin dipercaya sebagai pengobatan nyeri perut (Siregar, 2011).

Tannin dapat merusak membran sel bakteri, mengkerutkan dinding sel atau membran sel sehingga mengganggu permeabilitas sel itu sendiri. Akibat terganggunya permeabilitas, sel tidak dapat melakukan aktivitas hidup sehingga pertumbuhannya terhambat bahkan mati. Selain itu tannin juga mempunyai daya antibakteri dengan cara mempresipitasi protein.

2.4 Metode Ekstraksi

Ekstraksi adalah suatu proses pemisahan dari bahan padat maupun cair dengan bantuan pelarut. Proses ekstraksi merupakan langkah utama dalam penelitian tanaman obat, karena proses ini adalah langkah awal dari proses isolasi dan purifikasi

konstituen pada tanaman tersebut (Abdel, 2011). Ekstraksi adalah kegiatan penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak larut dengan pelarut cair. Ekstraksi adalah penyarian zat-zat berkhasiat atau zat-zat aktif dari bagian tanaman obat, hewan dan beberapa jenis ikan termasuk biota laut. Zat-zat aktif terdapat di dalam sel, namun sel tanaman dan hewan berbeda demikian pula ketebalannya, sehingga diperlukan metode ekstraksi dengan pelarut tertentu dalam mengekstraksinya (Harbone, 1987).

Tujuan ekstraksi bahan alam adalah untuk menarik komponen kimia yang terdapat pada bahan alam. Ekstraksi ini didasarkan pada prinsip perpindahan massa komponen zat ke dalam pelarut, perpindahan mulai terjadi pada lapisan antarmuka kemudian berdifusi masuk ke dalam pelarut (Harborne, 1996). Berikut adalah metode yang umum digunakan (Darwis, 2000):

- a. Maserasi. Maserasi merupakan proses perendaman sampel dengan pelarut organik yang digunakan pada temperatur ruangan (29°C). Proses ini menguntungkan karena perendaman dalam waktu tertentu akan memecah dinding dan membran sel, sehingga senyawa metabolit dapat keluar.
- b. Perkolasi. Merupakan proses melewati pelarut organik pada sampel sehingga pelarut akan membawa senyawa organik bersama-sama pelarut.
- c. Metode Soklet. Menggunakan soklet dengan pemanasan dan pelarut akan dapat dihemat karena terjadinya sirkulasi pelarut yang selalu membasahi sampel. Cocok untuk senyawa yang tidak terpengaruh panas.
- d. Destilasi Uap. Proses destilasi lebih banyak digunakan untuk senyawa organik yang tahan pada suhu yang cukup tinggi, yang lebih tinggi dari titik didih pelarut yang digunakan.
- e. Pengempasan. Metode ini lebih banyak digunakan dalam proses industri pada isolasi *Crude Palm Oil* (CPO) dari buah kelapa sawit dan isolasi katekin dari gambir.

2.4.1 Prinsip Proses Ekstraksi

Ekstrak herbal didefinisikan sebagai senyawa dan/atau campuran senyawa yang diperoleh dari tanaman segar atau kering, atau bagian tanaman, seperti daun, bunga, biji, akar serta kulit, dengan prosedur ekstraksi berbeda (Soni et al., 2010). Pada umumnya tanaman tersebut mengandung zat fitokimia berkonsentrasi tinggi dengan sifat antioksidan, seperti polifenol, vitamin C, vitamin E, betakaroten (diubah tubuh menjadi vitamin A). Ekstraksi fitokimia bahan tanaman merupakan langkah penting sebelum dilakukan proses selanjutnya (Novak et al., 2008).

Firdaus *et al.*, (2010) menyelidiki bahwa teknik ekstraksi konvensional yang digunakan selama bertahun-tahun yang lalu membutuhkan banyak waktu dan pelarut, sehingga memiliki tingkat efisiensi yang rendah (Soni *et al.*, 2010). Kebanyakan produk alam yang tidak stabil secara thermal akan terdegradasi dengan menggunakan teknik ini, karena berdasarkan pada pemilihan jenis pelarut yang tepat serta penggunaan sejumlah panas dan/atau agitasi untuk meningkatkan kelarutan dan laju perpindahan massa-nya. Teknik yang biasa digunakan adalah maserasi, perkolasi, hidrodistilasi dan soxhlet (Péres, 2006).

2.4.2 Metode Ekstraksi Maserasi

Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur kamar. Maserasi bertujuan untuk menarik zat-zat berkhasiat yang tahan pemanasan maupun yang tidak tahan pemanasan. Secara teknologi maserasi termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan (Depkes RI, 2000). Cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif yang akan larut, karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dan di luar sel maka larutan terpekat didesak keluar.

Maserasi merupakan cara yang sederhana, maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam pelarut. Senyawa aktif yang terdapat dalam berbagai simplisia dapat digolongkan ke dalam golongan minyak atsiri, alkaloid,

flavonoid, dan lain-lain. Dengan diketahuinya senyawa aktif yang dikandung simplisia akan mempermudah pemilihan pelarut dan cara ekstraksi yang tepat.

2.5 Hidrogen Peroksida (H₂O₂)

Hidrogen peroksida dengan rumus kimia H₂O₂ ditemukan oleh Louis Jacques Thenard di tahun 1818. Senyawa ini merupakan bahan kimia anorganik yang memiliki sifat oksidator kuat. Bahan baku pembuatan hidrogen peroksida adalah gas hidrogen (H₂) dan gas oksigen (O₂) (Patnaik, 2002). Hidrogen peroksida tidak berwarna, berbau menyengat, dan larut dalam air. Hidrogen peroksida adalah senyawa pengoksidasi yang sering digunakan sebagai antimikroba. Senyawa ini diurai oleh enzim katalase menghasilkan oksigen yang aktif sebagai antiseptik (Ghanem *et al.*, 2012). Selain menghasilkan oksigen, reaksi dekomposisi hidrogen peroksida juga menghasilkan air dan panas. Reaksi dekomposisi eksotermis yang terjadi adalah sebagai berikut (Pelczar dan Chan, 2009):



Hidrogen peroksida sering digunakan dalam dunia kesehatan sebagai desinfektan karena tidak meninggalkan residu yang berbahaya. Hidrogen peroksida merupakan antiseptik yang efektif dan nontoksik (Setiawan, 2013).

Hidrogen peroksida (H₂O₂) mudah terurai membentuk air (H₂O) dan oksigen (O₂). Adanya ion-ion logam dalam sitoplasma sel mikroorganisme dapat menyebabkan terbentuknya radikal superoksida (O₂⁻) yang akan bereaksi dengan gugus bermuatan negatif dalam protein dan menginaktifkan sistem enzim (Pelczar dan Chan, 2009).

2.6 Microplate Reader

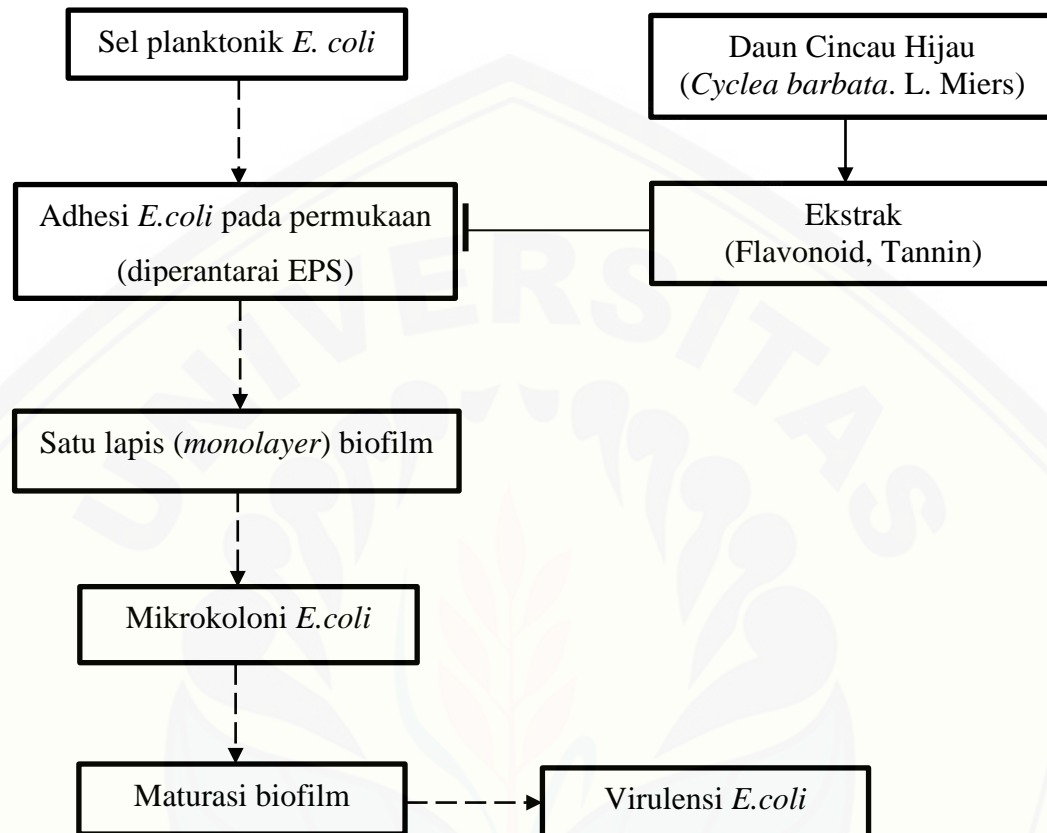
Microplate reader adalah spektrofotometer khusus yang disusun untuk membaca lempeng mikro (*microplate*). *Microplate reader* menggunakan prinsip spektrofotometri yang sama seperti metode konvensional, tetapi dapat menghasilkan peningkatan jumlah sampel yang dapat dianalisis (Heredia, 2006). Perbedaan dengan

spektrofotometer konvensional yang memfasilitasi pembacaan pada berbagai panjang gelombang, *microplate reader* memiliki filter atau kisi-kisi difraksi yang membatasi rentang panjang gelombang yang digunakan dalam ELISA, umumnya antara 400 sampai 750 nm. Beberapa *microplate reader* bekerja dalam rentang ultraviolet dan melakukan analisis antara 340-700 nm. Sistem optik yang dimanfaatkan oleh banyak produsen menggunakan serat optik untuk menyuplai cahaya untuk sumur lempeng mikro yang berisi sampel. Berkas cahaya yang melewati sampel memiliki diameter yang berkisar antara 1 sampai 3 mm. Suatu sistem deteksi mendeteksi cahaya yang berasal dari sampel, menguatkan sinyal dan menentukan absorbansi sampel. Selanjutnya suatu sistem pembacaan mengubahnya menjadi data yang memungkinkan interpretasi hasil pengujian. Saat ini beberapa *microplate reader* menggunakan sistem berkas cahaya ganda (World Health Organization, 2008).

Metode *microtiter plate* adalah teknik yang paling sering digunakan untuk menilai kuantitatif pembentukan biofilm. Teknik ini melibatkan melekatkan film bakteri dengan metanol, pewarnaan dengan Kristal violet, melepaskan pewarna terikat dengan asam asetat glasial 33% dan mengukur densitas optik (OD) dengan panjang gelombang 570nm menggunakan pembaca enzim *immunosorbent*. Pewarnaan Kristal Violet telah banyak dimodifikasi untuk meningkatkan akurasi dan untuk memungkinkan kuantifikasi biofilm di seluruh sumuran *well*. Kristal violet adalah pewarna dasar yang mengikat molekul bermuatan negatif dan polisakarida dalam matriks ekstraseluler (Li *et al.*, 2003)

Metode *Microtiter plate* adalah metode pemeriksaan biofilm yang efektif karena lebih banyak bakteri yang menempel pada dinding sumuran, juga tampaknya penggunaan asam asetat glasial sebagai dekolorisasi menjadi nilai lebih dari teknik ini (Stepanović, 2000).

2.7 Kerangka Konseptual Penelitian



Keterangan:

- : diteliti
- - -→ : tidak diteliti
- |— : menghambat

Gambar 2.6 Kerangka Konseptual Penelitian

Bakteri *E.coli* membentuk biofilm sebagai perlindungan bakteri dari lingkungan yang buruk dan mempermudah perlekatan bakteri dengan permukaan media yang kaya akan nutrisi. Biofilm akan menghasilkan EPS yang akan melekatkan satu sama lain untuk membentuk suatu mikrokoloni. Biofilm memiliki satu lapis (*monolayer*) biofilm yang menyebabkan antibiotik sulit berdifusi sehingga mudah

untuk mengalami resistensi. Ekstrak etanol daun cincau hijau dapat digunakan sebagai penghambat pembentukan biofilm dengan cara merusak matriks biofilm dan mengganggu sel *signaling*. Flavonoid, tannin dan alkaloid pada daun cincau hijau mempunyai manfaat sebagai antimikroba, antiinflamasi dan antioksidan. Fungsi flavonoid dalam daun cincau hijau adalah sebagai penghambat pembentukan biofilm dengan cara merubah potensial dari membran permukaan sehingga akan terjadi perubahan permeabilitas membran. Flavonoid dan tannin merupakan golongan polifenol yang dapat berperan dalam menghambat pembentukan biofilm dengan cara mereduksi sifat hidrofobik bakteri yang menjadi faktor penting dalam adhesi sel bakteri ke substrat (Jagani *et al.*, 2008 ; Okada *et al.*, 2008). Selain itu, biofilm dapat dihambat dengan menghambat sel-sel *signaling* sehingga mengganggu pertumbuhan biofilm (Gunardi, 2014). Molekul sinyal *E.coli* yang utama adalah *homoserin lakton* yang berfungsi sebagai agen kemostatik untuk mengumpulkan sel-sel yang berdekatan (melalui mekanisme *quorum sensing*) dan membentuk biofilm (Madigan *et al.*, 2006). Setelah biofilm tidak terbentuk, maka sel bakteri akan hidup bebas tanpa dilindungi biofilm sehingga dapat dengan mudah dieradikasi oleh antibiotik.

2.8 Hipotesis Penelitian

Hipotesis dari penelitian ini adalah:

- a. Ekstrak etanol daun cincau hijau (*Cyclea barbata* L. Miers) dapat menghambat pembentukan biofilm bakteri *E.coli*.
- b. Terdapat hubungan antara ekstrak etanol daun cincau hijau (*Cyclea barbata* L. Miers) dengan penghambatan pembentukan biofilm bakteri *E.coli*.

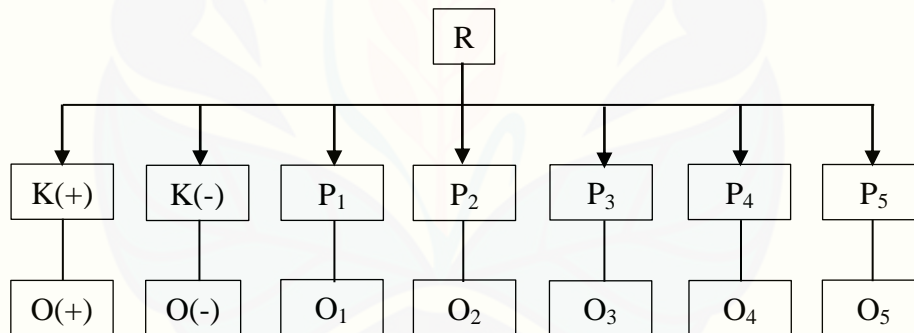
BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental semu (*Quasi Experimental Design*) secara *in vitro* dengan desain penelitian eksperimental sederhana (*post test only control-group design*).

3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian eksperimental laboratoris ini menggunakan tujuh kelompok sampel yang terdiri dari lima kelompok perlakuan, kontrol positif dan kontrol negatif. Rancangan penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1 di bawah ini.



Keterangan :

- R : Biakan bakteri *E.coli* 0157:H7
- K(+): Kelompok Kontrol Positif dengan H₂O₂
- K(-): Kelompok Kontrol Negatif tanpa penambahan ekstrak
- P₁ : Kelompok perlakuan dengan ekstrak konsentrasi 0.29 mg/ml
- P₂ : Kelompok perlakuan dengan ekstrak konsentrasi 0.33 mg/ml
- P₃ : Kelompok perlakuan dengan ekstrak konsentrasi 0.40 mg/ml
- P₄ : Kelompok perlakuan dengan ekstrak konsentrasi 0.50 mg/ml
- P₅ : Kelompok perlakuan dengan ekstrak konsentrasi 0.67 mg/ml
- O(+): Observasi kelompok kontrol positif
- O(-): Observasi kelompok kontrol negatif
- O₁₋₅ : Observasi kelompok perlakuan 1-5

Gambar 3.1 Skema rancangan penelitian

3.3 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah bakteri *E.coli* 0157:H7 pembentuk biofilm yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang kemudian dilakukan pembiakan bakteri di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Jumlah sampel diperhitungkan dengan Rumus Federer sebagai berikut:

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

$$(7-1)(r-1) \geq 15$$

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

$$2(r-1) \geq 5$$

$$2r-2 \geq 5$$

$$2r \geq 7$$

$$r \geq 4$$

Keterangan:

t : jumlah perlakuan

r : jumlah pengulangan

3.4 Tempat dan Waktu Penelitian

3.4.1 Tempat Penelitian

Uji pembentukan biofilm *E.coli* 0157:H7 dilakukan di Laboratorium Biologi Fakultas Saintek Universitas Airlangga. Tempat pembuatan media pembiakan bakteri *E.coli* 0157:H7 di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember dan pembuatan ekstrak etanol 96% daun cincau hijau dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember. Pengamatan aktivitas biofilm dilaksanakan di Laboratorium Biomolekul Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

3.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Oktober sampai November 2015.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol daun cincau hijau 0,29 mg/ml; 0,33 mg/ml; 0,40 mg/ml; 0,50 mg/ml; dan 0,67 mg/ml.

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah OD_{570nm} biofilm *E.coli*.

3.5.3 Variabel Terkendali

- Pembuatan biakan bakteri *E.coli* 0157:H7, pembuatan ekstrak daun cincau hijau, inkubator, H_2O_2 dan aquades steril.
- Suhu pengeraman (inkubasi) *E.coli* 37^0C selama 24 jam.
- Metode pengamatan pada *Microplate Reader*.
- Prosedur penelitian

3.6 Definisi Operasional

Definisi operasional pada penelitian ini adalah:

- Ekstrak daun cincau hijau hasil ekstraksi daun cincau hijau dengan menggunakan pelarut etanol 96%. Ekstrak didapatkan dari 2 kg daun cincau hijau kering yang kemudian dilakukan ekstraksi maserasi dengan dilarutkan dalam pelarut etanol 96% 1000mL. Ekstrak lalu ditimbang secara manual untuk mendapatkan konsentrasi yang diinginkan.
- E.coli* 0157:H7 adalah bakteri Gram negatif yang didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- Biofilm adalah matriks *Extracellular Polymeric Substances* (EPS) yang tumbuh diatas suatu permukaan dan menutupi mikroorganisme (Park *et al*, 2014)

- d. Penghambatan pembentukan biofilm secara kuantitatif dilihat melalui *microplate reader* dengan adanya penurunan nilai absorbansi atau *Optical Density* (OD) pada panjang gelombang 570nm (Loresta *et al.*, 2014).

3.7 Alat dan Bahan

3.7.1 Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini sterilisator, inkubator, pipet mikro, vakum rotary (rotavapor), maserasi, centrifuge, saringan, *microplate reader*, neraca analitik, penangas air.

3.7.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah suspensi *E.coli* 0157:H7, *microplate flexible U-bottom PVC 96-well*, aquades steril, *Mueller Hinton Broth* (MHB), H₂O₂, ekstrak etanol 96% daun cincau hijau, larutan DMSO.

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Persiapan Alat

Semua alat yang akan digunakan dalam penelitian ini disterilkan dalam sterilisator panas kering selama 15 menit dengan suhu 110⁰C terlebih dahulu. Setelah itu bahan media disterilkan dalam autoklaf selama 20 menit dengan suhu 121⁰C (Suswati dan Mufida, 2009).

3.8.2 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Cincau Hijau

Bubuk kering halus daun cincau hijau sebanyak 176 gram diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan etanol 96% sebanyak 1000 mL selama 24 jam pada suhu kamar, filtrat diperoleh dengan penyaringan. Filtrat disatukan kemudian dipekatan dengan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 50⁰C sampai diperoleh filtrat yang kental. Konsentrasi ekstrak etanol 96% daun cincau hijau didapatkan dengan cara menimbang ekstrak cincau hijau. Sebanyak lima kelompok masing-masing ditimbang

2 mg ekstrak cincau hijau lalu ditambahkan pelarut DMSO sesuai konsentrasi yang telah ditentukan yaitu 0.29 mg/ml, 0.33 mg/ml, 0.40 mg/ml, 0.50 mg/ml, dan 0.67 mg/ml.

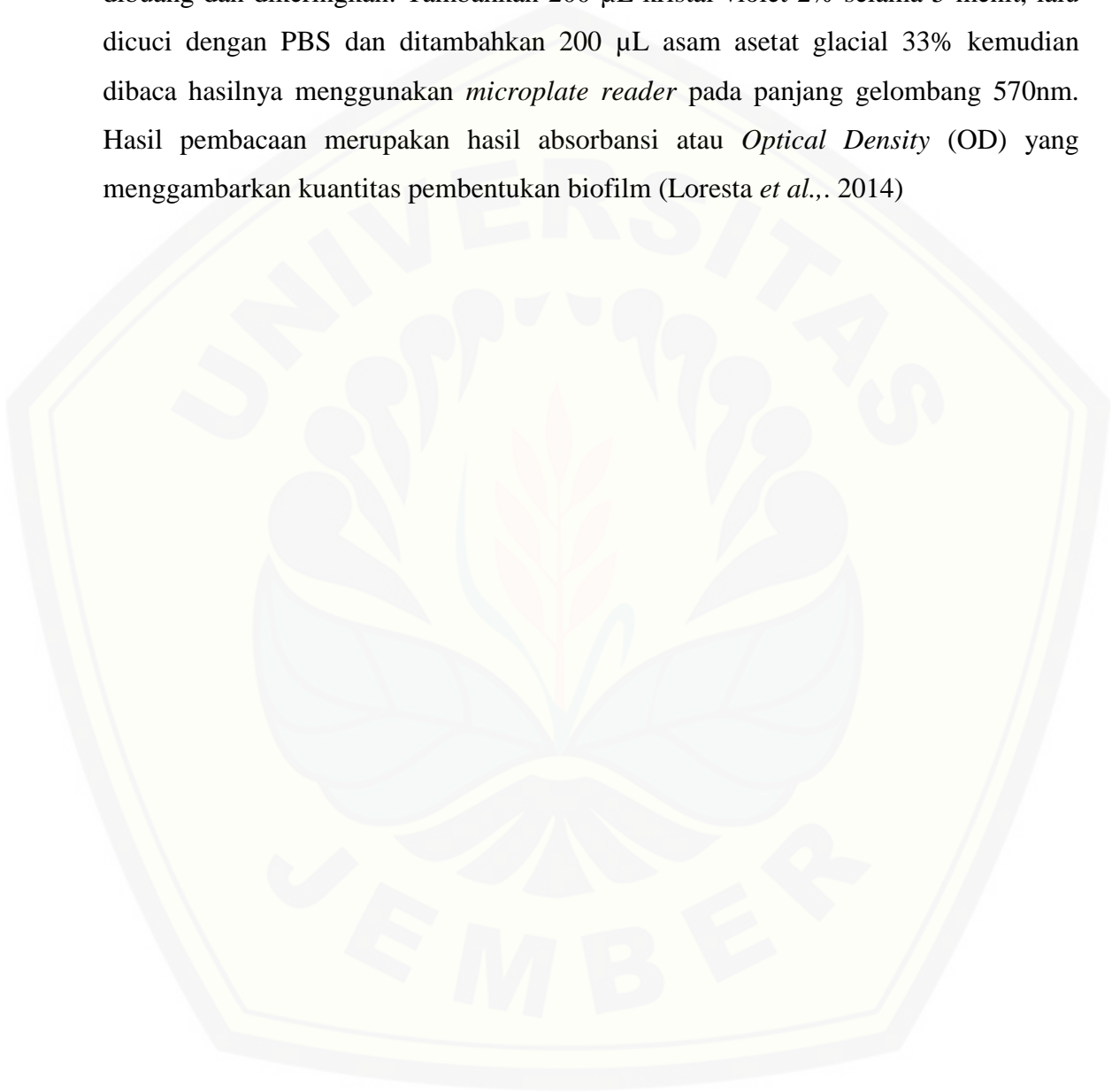
3.8.3 Pembuatan Suspensi *E.coli*

Suspensi bakteri *E.coli* 0157:H7 didapat dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Suspensi tersebut dikultur pada media NA selama 24 jam pada suhu 37⁰ C. Setelah 24 jam suspensi kuman yang telah diinkubasi disesuaikan dengan standar larutan 0,5 Mc Farland (1x10⁸ CFU/ml) dengan menambah aquades steril. Standar *Mc Farland* dibuat dengan cara mencampur 9,95 ml asam sulphur 1%. Kemudian tabung disegel dan digunakan untuk perbandingan suspensi bakteri dengan standard (Suswati dan Mufida, 2009).

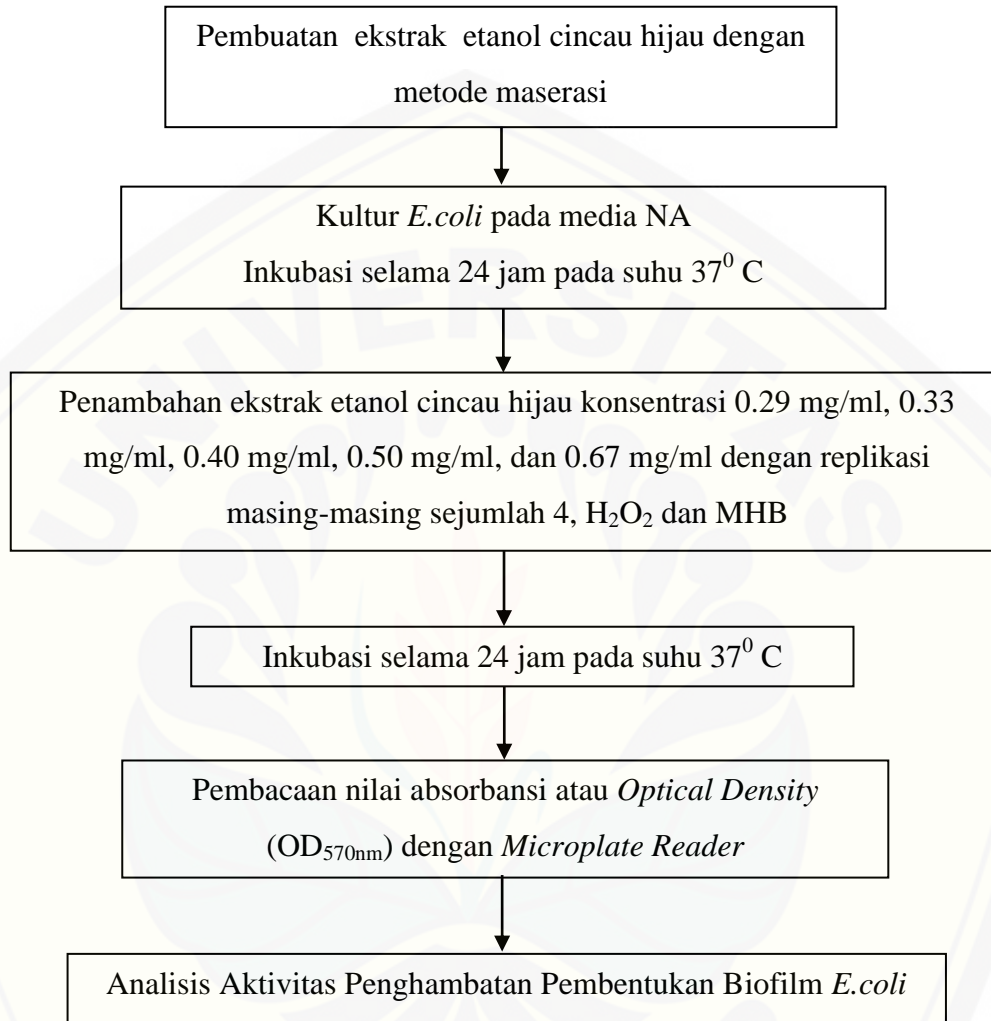
3.8.4 Pengujian Ekstrak Etanol 96% Daun Cincau Hijau Sebagai Penghambat Pembentukan Biofilm *E.Coli*

Pengujian pembentukan biofilm dilakukan secara *in vitro* dengan menggunakan *microplate flexible U-bottom PVC 96-well* (Chamdit dan Siripermpool, 2012). Kelompok perlakuan pada penelitian ini berupa konsentrasi ekstrak etanol cincau hijau 0.29 mg/ml, 0.33 mg/ml, 0.40 mg/ml, 0.50 mg/ml, dan 0.67 mg/ml, H₂O₂ dan MHB. H₂O₂ berfungsi sebagai desinfektan pada kelompok kontrol positif dan MHB sebagai kontrol negatif. Suspensi *E.coli* 0157:H7 dibiakkan pada media NA selama 24 jam pada suhu 37⁰ C lalu dibandingkan dengan Standar Mc Farland V (15 x 10⁸ CFU/mL) dan kemudian diencerkan dengan akuades steril menjadi 1.5 x 10⁵ CFU/ml. Ekstrak etanol 96% daun *C.barbata* ditambahkan dengan DMSO sehingga didapatkan konsentrasi 0.29 mg/ml, 0.33 mg/ml, 0.40 mg/ml, 0.50 mg/ml, dan 0.67 mg/ml. Sebanyak 50 µL MHB dimasukkan ke dalam microplate 96-well. Kemudian tambahkan 10 µL suspensi bakteri *E.coli* 0157:H7. Tiap konsentrasi ekstrak yang telah dibuat lalu dimasukkan kedalam microplate sebanyak 100 µl/well. Kontrol positif ditambahkan H₂O₂ 6% sebanyak 100 µL. Kemudian *microplate* diinkubasi

pada 37°C selama 24 jam. *Microplate* dicuci dengan *Phospat Buffer Saline* (PBS) steril sebanyak tiga kali. Tambahkan 200 µL methanol selama 15 menit kemudian dibuang dan dikeringkan. Tambahkan 200 µL kristal violet 2% selama 5 menit, lalu dicuci dengan PBS dan ditambahkan 200 µL asam asetat glacial 33% kemudian dibaca hasilnya menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 570nm. Hasil pembacaan merupakan hasil absorbansi atau *Optical Density* (OD) yang menggambarkan kuantitas pembentukan biofilm (Loresta *et al.*, 2014)



3.9 Alur Penelitian



Gambar 3.2 Skema Alur Penelitian

3.10 Analisis Data

Data yang diperoleh merupakan data kuantitatif berupa nilai absorbansi atau *Optical Density* (OD_{570nm}) yang kemudian dianalisis menggunakan uji *One Way Anova* ($\alpha = 0,05$). Untuk melakukan uji *Anova*, harus dipenuhi beberapa asumsi, yaitu: sampel berasal dari kelompok yang independen, varian antar kelompok harus homogen dan data masing-masing kelompok berdistribusi normal. Dilakukan uji

LSD untuk mencari uji beda antar variabel. Hubungan antar variabel diperoleh dengan uji korelasi dan untuk mengetahui besar efek antar variabel dilakukan uji regresi.

