



**AKTIVITAS EKSTRAK ETANOL DAUN CINCAU HIJAU
(*Cyclea barbata Miers*) SEBAGAI PENGHAMBAT
PEMBENTUKAN BIOFILM BAKTERI
*Salmonella typhi***

Skripsi

Oleh

**Dimes Atika Permanasari
NIM 122010101045**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2015**



**AKTIVITAS EKSTRAK ETANOL DAUN CINCAU HIJAU
(*Cyclea barbata Miers*) SEBAGAI PENGHAMBAT
PEMBENTUKAN BIOFILM BAKTERI
*Salmonella typhi***

SKRIPSI

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

Oleh

**Dimes Atika Permanasari
NIM 122010101045**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2015**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, taufiq dan hidayah-Nya kepada saya serta Nabi Muhammad SAW yang menjadi panutan dalam perbuatan;
2. Ibu Kadarwati dan Bapak Heru Suparman yaitu kedua orang tua saya, kakak-kakak saya Didit Mahar Susatyo dan Dira Indri Hapsari, serta keluarga besar tercinta yang selalu memeberikan dukungan, motivasi, nasihat dan kasih sayang serta tak lupa selalu mendoakan saya dalam setiap hal;
3. Guru-guru saya yang telah mendidik saya dengan penuh kesabaran mulai dari Taman Kanak-kanak hingga Perguruan Tinggi;
4. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

MOTTO

“Bertakwalah pada Allah, maka Allah akan mengajarimu. Sesungguhnya Allah
Maha Mengetahui segala sesuatu”

*(terjemahan surat Al-Baqarah, ayat 282)**

*) Kumayandi, Hengky. 2015. Kumpulan Motto Islami

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Dimes Atika Permanasari

NIM : 122010101045

Menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “ Aktivitas Ekstrak Etanol Daun Cincau Hijau (*Cyclea barbata Miers*) sebagai Penghambat Pembentukan Biofilm Bakteri *Salmonella typhi*” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali jika dalam pengutipan disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi mana pun, 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 ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 31 Desember 2015
Yang menyatakan,

Dimes Atika Permnasari
NIM 122010101045

SKRIPSI

**AKTIVITAS EKSTRAK ETANOL DAUN CINCAU HIJAU
(*Cyclea barbata Miers*) SEBAGAI PENGHAMBAT
PEMBENTUKAN BIOFILM BAKTERI
*Salmonella typhi***

Oleh

Dimes Atika Permanasari

NIM 122010101045

Pembimbing :

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

Dosen Pembimbing Anggota : dr. Ali Santosa, Sp.PD

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Aktivitas Ekstrak Etanol Daun Cincau Hijau (*Cyclea barbata* Miers) sebagai Penghambat Pembentukan Biofilm Bakteri *Salmonella typhi*” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Kedokteran Universitas Jember pada:

hari, tanggal : Kamis, 31 Desember 2015

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Tim Penguji

Penguji I,

Penguji II,

dr. Cicih Komariah, Sp.M
NIP. 19740928 200501 2 001

dr. Bagus Hermansyah, M.Biomed
NIP. 19830405 200812 1 001

Penguji III,

Penguji IV,

dr. Elly Nurus Sakinah, M.Si
NIP. 19840916 200801 2 003

dr. Ali Santosa, Sp.PD
NIP. 19590904 198701 1 001

Mengesahkan,

Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember

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

RINGKASAN

Aktivitas Ekstrak Etanol Daun Cincau Hijau (*Cyclea barbata* Miers) sebagai Penghambat Pembentukan Biofilm Bakteri *Salmonella typhi*; Dimes Atika Permanasari, 122010101045; 2015: 58 halaman; Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Infeksi bakteri *Salmonella typhi* penyebab demam tifoid merupakan salah satu kasus tertinggi bagi kesehatan khususnya di Indonesia. Kemungkinan faktor resiko dari lingkungan dan perilaku kebersihan yang rendah, maka didapatkan angka kejadian yang tinggi pada penyakit demam tifoid. WHO (*World Health Organisation*) memperkirakan terdapat sekitar 17 juta kasus per tahun dengan 600.000 kasus meninggal dunia dikarenakan demam tifoid (Depkes RI, 2013). Kontaminasi bakteri *S.typhi* merupakan penyebab gejala dari demam tifoid yang dapat dipengaruhi oleh bakteri *S.typhi strain DT 104* yang mampu membentuk biofilm sehingga dapat meningkatkan virulensi dan resistensi obat. Biofilm merupakan matriks yang terdiri dari *extracellular polysaccharides* berasal dari bakteri yang bereplikasi membentuk mikrokoloni yang melekat secara *irreversibel* pada permukaan epitel atau bahan abiotik. Mekanisme biofilm yang terbentuk oleh *S.typhi DT 104* dapat dihambat dari beberapa strategi intervensi yang mampu mengganggu dan mencegah terbentuknya biofilm. Beberapa contoh seperti disinfektan dan senyawa molekul alami yang dapat menghambat pembentukan biofilm. Kandungan zat aktif tannin dan flavonoid yang terdapat pada daun cincau hijau mampu menghambat pembentukan biofilm dengan menghambat ekspresi gen dan menghambat adhesi bakteri pada permukaan.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas ekstrak etanol daun cincau hijau sebagai penghambat pembentukan biofilm pada bakteri dan mengetahui hubungan konsentrasi ekstrak etanol dengan penghambatan pembentukan biofilm *S.typhi*. Jenis penelitian ini adalah *Quasy Eksperimental Design* dengan desain penelitian eksperimental sederhana (*post test only control-group design*). Variabel bebas pada penelitian ini menggunakan dosis ekstrak daun

cincau hijau yaitu 0.29 mg/ml; 0.33 mg/ml; 0.40 mg/ml; 0.50 mg/ml dan 0.67 mg/ml berturut-turut pada kelompok perlakuan P1, P2, P3, P4 dan P5. Variabel terikat adalah penghambatan biofilm bakteri *S.typhi DT 104*. Penelitian ini menggunakan 7 sampel dengan 5 dosis serial ekstrak daun cincau hijau, kontrol positif yaitu suspensi bakteri yang ditambahkan dengan H₂O₂ dan kontrol negatif yaitu suspensi bakteri yang ditambahkan dengan H₂O dengan 4 kali replikasi. Pada seluruh perlakuan diberikan sampel suspensi bakteri *S.typhi strain DT 104* yang dapat membentuk biofilm.. Uji penghambat pembentukan biofilm dilakukan menggunakan *microplate reader* dan diperoleh data berupa nilai absorbansi atau *Optical Density* pada panjang gelombang 570nm(OD_{570nm}).

Pada penelitian ini didapatkan rerata dari pembentukan biofilm *S.typhi* sebesar 0.198 pada kontrol negatif, 0.121 pada kontrol positif, 0.133, 0.1322, 0.131, 0.1295 dan 0.1292 untuk kelompok perlakuan P1-P5. Hasil tersebut menunjukkan adanya penurunan pembentukan biofilm *S.typhi* dengan penambahan dosis ekstrak etanol daun cincau hijau. Hasil uji normalitas nilai ($p>0,05$) pada semua kelompok perlakuan. Pada uji homogenitas didapatkan nilai $p=0,795$ menunjukkan bahwa data yang dimasukkan telah terdistribusi secara merata. Data dianalisis menggunakan *One Way Anova* dan didapatkan nilai $p=0,004$ yang menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol. Uji LSD didapatkan seluruh kelompok mempunyai perbedaan signifikan terhadap kontrol negatif. Hasil uji korelasi menghasilkan nilai $p=0,011$, sedangkan pada Uji Regresi didapatkan persamaan $y = -0,010x + 0,178$ dengan pengaruh sebesar 26 %.

Kesimpulan penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun cincau hijau dapat menghambat pembentukan biofilm pada bakteri *S.typhi* secara *in vitro* dan terdapat hubungan antara konsentrasi ekstrak daun cincau hijau dengan penghambatan pembentukan biofilm dengan arah korelasi negatif yaitu semakin besar konsentrasi ekstrak etanol daun cincau hijau maka semakin tinggi penghambatan pembentukan biofilm pada bakteri.

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT. karena atas rahmat dan ridha-Nya, penulis dapat menyelesaikan skripsi ini dengan tepat waktu. Tak lupa sholawat serta salam penulis haturkan kepada Nabi Muhammad SAW beserta keluarga dan sahabat, semoga selalu dapat menuntun penulis pada kesempatan yang lain.

Skripsi ini disusun untuk memenuhi tugas akhir yang merupakan salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Kedokteran Universitas Jember, dengan judul “Aktivitas Ekstrak Etanol Daun Cincau Hijau (*Cyclea barbata* Miers) sebagai Penghambat Pembentukan Biofilm Bakteri *Salmonella typhi*”. Untuk menyelesaikan skripsi ini, penulis mendapatkan tuntunan, bantuan dan kerjasama dari berbagai pihak, Dalam kesempatan ini penulis menyampaikan terimakasih kepada :

1. 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;
2. dr. Elly Nurus Sakinah, M.Si, selaku Dosen Pembimbing I dan dr. Ali Santosa, Sp.PD selaku Dosen Pembimbing II yang telah banyak membantu dan meluangkan waktu, pikiran, serta perhatiannya untuk membimbing penulisan skripsi ini;
3. dr. Ancah Caesarina M, Ph.D, selaku koordinator KTI yang telah menyetujui penyusunan skripsi ini;
4. dr. Cicih Komariah, Sp.M, selaku tim penguji I dan dr. Bagus Hermansyah, M.Biomed selaku tim penguji II yang telah meluangkan waktu untuk menguji skripsi ini;
5. Kedua orang tua yang saya cintai, sayangi dan saya banggakan, Bapak Heru Suparman dan Ibu Kadarwati yang selalu mendoakan, melimpahkan kasih sayang, mendukung pencapaian cita-cita, memberikan nasihat baik dan selalu memberikan motivasi penulis kearah yang lebih baik;
6. Kakak saya Didit Mahar Susatyo dan Dira Indri Hapsari yang selalu memberikan doa dan dukungan kepada penulis;

7. Seluruh keluarga besar dari Ibu dan Bapak yang selalu mendoakan dan memberikan semangat;
8. Teman-teman angkatan 2012 yang selalu saling mendukung, mendoakan, memberikan semangat demi mendapatkan gelar sarjana kedokteran;
9. Seluruh civitas Fakultas Kedokteran Universitas Jember yang membantu dalam urusan skripsi ini;
10. Analis Laboratorium Mikrobiologi dan Biomol Fakultas Kedokteran Universitas Jember, serta Analis Laboratorium Biologi Fakultas Farmasi Universitas Jember yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan skripsi ini;
11. Semua pihak yang telah membantu dan mendukung baik secara langsung maupun tidak langsung hingga terselesaikan skripsi ini dengan baik.

Penulis berharap semoga skripsi ini bermanfaat bagi semua pihak. Untuk itu, penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun demi tercapainya kesempurnaan dari skripsi ini. Jika terdapat kekurangan dalam pembuatan skripsi ini penulis mohon maaf. Terimakasih.

Jember, 31 Desember 2015

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN PEMBIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan.....	3
1.4 Manfaat.....	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 <i>Salmonella typhi</i>	5
2.1.1 Morfologi	5
2.1.2 Patogenesis	6
2.1.3 Gejala Klinik	7
2.1.4 Diagnosis	8
2.2 Biofilm	9
2.2.1 Struktur Biofilm.....	9
2.2.2 Mekanisme Biofilm Bakteri	9
2.2.3 Quorum Sensing	11

2.2.4 Fungsi Biofilm dan Peran terhadap Resistensi Bakteri.....	13
2.2.5 Biofilm Salmonella Typhi	13
2.2.6 Strategi Intervensi terhadap Biofilm	14
2.3 Cincau Hijau	15
2.3.1 Taksonomi	15
2.3.2 Morfologi.....	16
2.3.3 Penyebaran, Habitat dan Pemanenan	16
2.3.4 Kandungan Daun Cincau Hijau.....	17
2.3.5 Kegunaan Kandungan Daun Cincau Hijau.....	18
2.4 Uji Aktivitas <i>Biofilm</i> Bakteri.....	21
2.4.1 Microplate Reader.....	20
2.4.2 MCRA	21
2.5 Hidrogen Peroksida (H₂O₂).....	22
2.5.1 Struktur Hidrogen Peroksida	22
2.5.2 Hidrogen Peroksida sebagai Disinfektan.....	22
2.6 Kerangka Konseptual Penelitian	24
2.7 Hipotesis Penelitian	26
BAB 3. METODE PENELITIAN.....	27
3.1 Jenis Penelitian	27
3.2 Rancangan Penelitian.....	27
3.3 Sampel	28
3.4 Tempat dan Waktu Penelitian	29
3.5 Variabel Penelitian	29
3.6 Definisi Operasional	30
3.7 Alat dan Bahan	30
3.8 Prosedur Penelitian	31
3.8.1 Persiapan Alat.....	31
3.8.2 Pembuatan Ekstrak Daun Cincau	31
3.8.3 Pembuatan Larutan 0,5 Mc Farland.....	31
3.8.4 Pembuatan Konsentrasi Ekstrak.....	31
3.8.5 Pembuatan Suspensi Bakteri	32

3.8.6 Pengujian Penghambatan Biofilm <i>S.typhi</i>	32
3.9 Analisis Data	33
3.10 Alur Penelitian	34
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	35
4.1 Hasil Penelitian	35
4.2 Analisis Data	37
4.3 Pembahasan	39
BAB 5. KESIMPULAN.....	43
DAFTAR PUSTAKA	44
LAMPIRAN	51

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Salmonella typhi	6
Gambar 2.2 Mekanisme Biofilm	10
Gambar 2.3 Mekanisme Quorum Sensing	11
Gambar 2.4 Daun Cincau Hijau (Cyclea barbata Miers)	13
Gambar 2.5 Rantai Kimia Flavonoid	15
Gambar 2.6 Summary of the anti- <i>biofilm</i>	16
Gambar 2.7 Diameter zona hambat ekstrak daun cincau hijau	16
Gambar 2.8 Kerangka Konseptual	21
Gambar 3.1 Rancangan Penelitian	24
Gambar 3.2 Alur Penelitian	30
Gambar 4.1 Perlakuan metode <i>Microplate Titer Assay</i>	33
Gambar 4.2 Grafik Rata-rata dan Standar Deviasi Kelompok Perlakuan	34
Gambar 4.3 Grafik Regresi Penurunan Rata-rata Biofilm S.typhi	38

DAFTAR TABEL

		Halaman
Tabel 4.1	Hasil pengulangan kelompok perlakuan	34
Tabel 4.2	Hasil uji normalitas biofilm <i>Salmonella typhi</i>	36
Tabel 4.3	Hasil Uji LSD biofilm <i>Salmonella typhi</i>	37

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Analisis Data	48
B. Gambar Penelitian	53
C. Persetujuan Etik	57
D. Keterangan Identifikasi Tanaman	59

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Infeksi bakteri *Salmonella typhi* penyebab demam tifoid merupakan salah satu kasus tertinggi bagi kesehatan khususnya di Indonesia. Demam tifoid mempunyai faktor resiko yang disebabkan oleh lingkungan dan perilaku kebersihan yang rendah, maka didapatkan angka kejadian yang tinggi pada penyakit demam tifoid. WHO (*World Health Organisation*) memperkirakan terdapat sekitar 17 juta kasus per tahun dengan 600.000 kasus meninggal dunia dikarenakan demam tifoid (Depkes RI, 2013). Data dari Departemen Kesehatan pada tahun 2010, penderita demam tifoid dan paratifoid yang tercatat di Rumah Sakit sebanyak 41.081 kasus dan 279 pasien diantaranya telah meninggal.

Virulensi demam tifoid dapat meningkat jika terbentuknya biofilm yang berfungsi sebagai pertahanan bakteri *S.typhi*. Pada kejadian demam tifoid *S.typhi* dihubungkan dengan kemampuan bakteri tersebut membentuk biofilm yang dapat mengkontaminasi bahan abiotik seperti air dan bahan makanan. Proses kontaminasi tersebut disebabkan karena mutasi *STM4263* dan *gen yjcC* dalam bakteri *S.typhi* sehingga mengakibatkan peningkatan pembentukan biofilm pada bakteri tersebut (Kim, 2009).

Biofilm merupakan matriks *Ekstracellular Polimeric Substances* (EPS) yang berasal dari sekumpulan sel mikrobial yang melekat secara *irreversible* pada suatu permukaan. Secara umum pembentukan biofilm melalui lima tahapan, yaitu *attachement*, *cell-cell adhesion*, proliferasi sel bakteri, maturasi biofilm, dan dispersi (Ethan dan Daniel, 2011). Pembentukan biofilm melibatkan suatu proses yang disebut *quorum sensing*. *Quorum sensing* merupakan suatu proses komunikasi intraseluler dari mikroba yang bergantung pada perubahan sinyal kimia atau disebut juga dengan *autoinduser* (Lowery *et al*, 2013).

Mekanisme biofilm dapat terjadi saat bakteri mengkontaminasi bahan pangan seperti *stainles steel*, metal, kaca dan *polyvinyl chloride* , sehingga resiko

terkena dampak biofilm dari bakteri *S.typhi* semakin tinggi (Efstathios *et al.*, 2012). *S.typhi* merupakan bakteri pertama yang diketahui dapat mengkontaminasi makanan dan membentuk biofilm pada permukaan makanan (Shi dan Zhu, 2009). Pada penelitian sebelumnya menjelaskan bahwa pembentukan biofilm *S.typhi* dapat terjadi ketika bakteri mengkontaminasi produk buah yang masih segar (Patel dan Sharma, 2010). Hal tersebut disebabkan karena meningkatnya perilaku yang tidak higienis saat mengolah makanan (Silagyi *et al.*, 2009).

Beberapa laporan penelitian biofilm berperan pada munculnya resistensi terhadap produk antimikroba (Langsrud *et al.*, 2003). Dibuktikan dengan adanya penurunan penetrasi dari antimikroba untuk masuk ke bagian ribosom sel bakteri (Gunardi, 2014). Antimikroba untuk *S.typhi* yang bekerja pada ribosom sel bakteri, jika terdapat biofilm yang menyelubungi bakteri tersebut maka antimikroba tidak akan bisa masuk ke dalam ribosom dan tidak dapat berfungsi sebagai penghambat perkembangan bakteri. Data yang didapat dari penelitian sebelumnya menjelaskan bahwa *Salmonella Typhimurium* strain DT 104 telah dilaporkan dari berbagai negara di seluruh dunia bahwa strain bakteri tersebut menyebabkan penyebaran patogen dan resistensi bakteri lebih tinggi daripada strain *S.typhi* yang lainnya (Wasyl *et al.*, 2006)

Disinfektan dan senyawa molekul alami dapat menghambat perkembangan sel bakteri *S.typhi* yang dapat mengeluarkan sinyal kimia dari masing-masing gen bakteri. Adanya gangguan terhadap gen tersebut, maka bakteri tidak dapat berperan dalam pembentukan karakteristik biofilm menjadi lebih matang dan tidak terjadi aktivisasi peran biofilm (Gunardi, 2014).

Berdasarkan hasil penelitian ekstrak daun cincau hijau mempunyai efek antibakteri terhadap *Escerechia coli* dan *Salmonella typhi*, hal tersebut dibuktikan dengan terbentuknya zona hambat dari beberapa dosis ekstrak daun cincau (Asmardi *et al.*, 2014). Daun cincau hijau mengandung senyawa kimia seperti : alkaloid, saponin, flavonoid, klorofil dan karotenoid (Chalid, 2003). Berdasarkan sumber lain secara umum kandungan daun cincau hijau adalah karbohidrat, lemak, protein dan senyawa-senyawa lainnya seperti polifenol, flavonoid serta

mineral-mineral dan vitamin-vitamin, di antaranya Kalsium, Fosfor, vitamin A serta vitamin B (Djam'an, 2008).

Berdasarkan penelitian sebelumnya menjelaskan bahwa daun cincau hijau memiliki kandungan flavonoid yang dapat berperan sebagai penghambat pembentukan biofilm bakteri. Mekanisme kerja flavonoid yang dapat menghambat adhesi sel bakteri, baik perlekatan bakteri dengan permukaan substrat maupun perlekatan antar bakteri, dimana adhesi merupakan faktor utama dalam pembentukan biofilm (Loresta *et al*, 2012). Berdasarkan latar belakang di atas, penulis tertarik mengetahui, meneliti, dan menyusun skripsi dengan judul “Aktivitas Ekstrak Daun Cincau Hijau (*Cycle barbata Miers*) Ekstral Etanol sebagai Penghambatan Biofilm Bakteri *Salmonella typhi*”. Penelitian ini diharapkan memberikan manfaat pengetahuan kesehatan mengenai kandungan ekstrak daun cincau hijau sebagai senyawa penghambat Biofilm pada *Salmonella typhi*.

1.2 Rumusan Masalah

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

1. Apakah terdapat aktivitas ekstrak daun cincau hijau sebagai penghambat pembentukan biofilm bakteri *Salmonella typhi* secara in vitro?
2. Bagaimana hubungan antara dosis ekstrak etanol daun cincau hijau dengan efek penghambatan pembentukan biofilm bakteri *Salmonella typhi*?

1.3 Tujuan

Tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Mengetahui aktivitas ekstrak daun cincau hijau sebagai penghambat pembentukan biofilm bakteri *Salmonella typhi* secara in vitro.
2. Mengetahui hubungan ekstrak etanol daun cincau hijau sebagai penghambat biofilm pada bakteri *Salmonella typhi*.

1.4 Manfaat

Manfaat penelitian ini adalah sebagai berikut.

1.4.1 Manfaat Ilmiah

- a. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah tentang manfaat ekstrak etanol daun cincau hijau sebagai penghambat pembentukan biofilm bakteri *S.typhi*.
- b. Penelitian ini diharapkan dapat dijadikan acuan untuk penelitian selanjutnya tentang manfaat daun cincau hijau sebagai penghambat pembentukan biofilm bakteri *S.typhi* dengan metode lain.

1.4.2 Manfaat Praktis

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan wawasan dan informasi bagi masyarakat umum tentang salah satu manfaat daun cincau hijau sebagai penghambat pembentukan biofilm bakteri *S.typhi*.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

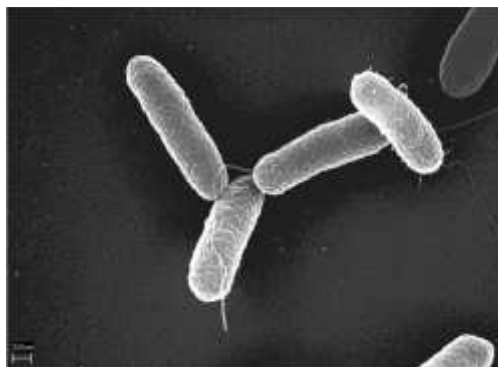
2.1 *Salmonella typhi*

Taksonomi pada bakteri *S.typhi* adalah sebagai berikut.

Phylum	: <i>Eubacteria</i>
Class	: <i>Prateobacteria</i>
Ordo	: <i>Eubacteriales</i>
Family	: <i>Enterobacteriaceae</i>
Genus	: <i>Salmonella</i>
Species	: <i>Salmonella enterica</i>
Subspesies	: <i>enteric (I)</i>
Serotipe	: <i>typhi</i>

2.1.1 Morfologi

Salmonella typhi merupakan bakteri batang Gram negatif yang tidak membentuk spora dan memiliki kapsul. Bakteri *S.typhi* bersifat fakultatif, dan sering disebut sebagai *facultative intra-cellular parasites*. Dinding selnya terdiri atas murein, lipoprotein, fosfolipid, protein, dan lipopolisakarida (LPS) yang tersusun berlapis-lapis (Dzen, 2003).



Gambar 2.1 *S.typhi* (Oxford, 2015)

Dari gambar 2.1 terlihat ukuran panjang bakteri tersebut bervariasi, sebagian besar memiliki *peritrichous flagella* yang berfungsi sebagai motilitas.

S.typhi mempunyai mekanisme dalam selnya sehingga dapat membentuk asam dan gas dari glukosa dan mannososa (Winn, 2006). Selain itu, *S.typhi* memiliki pertahanan hidup yang cukup kuat ketika dalam air yang membeku untuk waktu yang lama (Brooks, 2005).

S.typhi memiliki 3 antigen dalam tubuhnya, yaitu *antigen O*, *antigen H* dan *antigen Vi*. Sejumlah penelitian menunjukkan bahwa *antigen Vi* mempunyai sifat antiopsonik, antifagositik dan mengurangi sekresi *TNF* terhadap *S.typhi* oleh makrofag inang sehingga meningkatkan resistensi bakteri terhadap reaksi oksidatif (Wain, 2005). Berdasarkan ketiga antigen tersebut, antigen *Vi* lebih meningkatkan infektivitas dan keparahan penyakit dari *S.typhi*.

S.typhi dianggap sebagai salah satu zoonosis bawaan makanan yang paling penting bagi masalah kesehatan di masyarakat. *Salmonella enterica* subspecies serovar *S.typhimurium* merupakan salah satu serotipe *Salmonella* yang paling umum di seluruh dunia dan menjadi perhatian kesehatan manusia dan juga pada hewan. Sebagian besar dari jenis bakteri tersebut telah ditemukan dalam berbagai macam host dan ditandai dengan pola resistensi tertentu. Berbeda dengan *S.typhimurium* jenis lain, pada *S.typhi DT104* memiliki gen ketahanan pentaresistant atau resisten dengan antibiotik. Pada data yang didapatkan bahwa *S. Typhi DT104* dilaporkan dari berbagai negara di seluruh dunia dan tingginya tingkat homogenitas genetik ketahanan yang dimiliki oleh bakteri *S.typhi DT 104* (Wasy *et al*, 2006)

2.1.2 Patogenesis

Patogenesis pada *S.typhi* diawali dengan *adhesi* pada permukaan usus, tahap selanjutnya adalah menembus lamina propia dalam usus dan terfagosit oleh makrofag. *Salmonella* yang terfagosit menyebar ke ileum bagian distal dan kolon. Dengan reseptor (TLR) -5 dan TLR-4 / MD2 / CD-14, makrofag mengenali pola molekul patogen terkait seperti flagela dan lipopolisakarida pada bakteri, sehingga makrofag dan sel epitel usus menarik sel T dan neutrofil dengan interleukin. Hal tersebut menyebabkan peradangan dan menimbulkan infeksi pada usus (Raffatellu *et al*, 2006).

Berbeda dengan *S.nontyphoidal*, pada jenis tersebut penetrasi kedalam sistem host terutama melalui ileum distal. Bakteri Salmonella nontyphoidal memiliki ciri khusus yaitu *fimbriae* untuk beradhesi pada jaringan limfoid di ileum (*patch Peyer*). Kemudian bakteri yang telah beradhesi akan berproliferasi ke dalam sistem limfatik. Bakteri kemudian menginduksi makrofag pada sistem host untuk menarik lebih banyak makrofag, sehingga dapat menimbulkan infeksi (Raffatellu *et al*, 2006).

Setelah bakteri menginfeksi sistem limfatik, bakteri menyebar menginfeksi ke saluran toraks, jaringan retikuloendotelial hepar, limfa, sumsum tulang, dan kelenjar getah bening. Sifat bakteri tersebut yang menyebar pada seluruh aliran atau saluran pada tubuh, dapat menyebabkan gejala yang semakin serius atau gejala yang berkomplikasi (Parry *et al*, 2002). Pada penyebaran bakteri di seluruh aliran tubuh tersebut dimungkinkan adanya faktor mekanisme biofilm pada proses *dispersi* atau pelepasan plankton bakteri, sehingga dapat beradhesi pada permukaan lain dalam tubuh host.

2.1.3 Gejala Klinik

Orang dengan demam tifoid mengalami demam berkelanjutan setinggi 103° sampai 104° F (39° sampai 40° C). Gejala yang menyertai adalah merasa lemah, sakit perut, sakit kepala dan kehilangan nafsu makan. Gejala yang khas yang dapat timbul pada kasus demam tifoid adalah pasien memiliki ruam datar atau bintik-bintik berwarna merah yang disebut *Rose Spot* (Crump, 2014). Pada gejala yang timbul saat terinfeksi bakteri *S.typhi* memiliki masa tunas yang berlangsung antara 10 – 14 hari (Sudoyo, 2010).

Gejala lain yang sering didapatkan pada kasus demam tifoid adalah demam pada sore hari yang disertai dengan gejala klinis, seperti anoreksia, mialgia, nyeri abdomen, dan obstipasi. Pada pemeriksaan fisik dapat disertai dengan lidah kotor, nyeri tekan perut, dan *hepatosplenomegali* (Bhutta, 2006). Pada kasus anak yang terinfeksi bakteri tersebut disertai dengan gejala diare pada awal masa infeksi, kemudian dilanjutkan dengan gejala lain yaitu konstipasi. Konstipasi pada permulaan sering dijumpai pada orang dewasa ,namun telah

didapatkan data bahwa anak-anak dapat memiliki gejala konstipasi (Bhan *et al.*, 2005). Pada pemeriksaan fisik lain ditemukan bradikardi relatif saat demam tinggi yang dapat dijadikan indikator demam tifoid (Bhutta, 2006).

2.1.4 Diagnosis

Diagnosis dini demam tifoid dan pemberian terapi harus dengan cepat dan tepat, sehingga mendapatkan hasil yang optimal dalam pemberian terapi. Pengetahuan mengenai gambaran klinis penyakit sangat penting untuk membantu mendeteksi dini penyakit ini. Berkaitan dengan deteksi dini, maka dibutuhkan pemeriksaan tambahan dari laboratorium untuk membantu menegakkan diagnosis (Zulkarnain, 2000).

Pemeriksaan laboratorium untuk menegakkan diagnosis penyakit ini antara lain pemeriksaan darah rutin, pemeriksaan bakteriologis dengan isolasi dan biakan kuman, pemeriksaan serologis, dan pemeriksaan kuman secara molekuler (Rachman, 2011). Kultur darah merupakan metode *gold standard* dengan hasil positif pada 60-80% dari pasien (Mehta, 2008). Dari penggunaan kultur darah yang rendah pada daerah endemik, menyebabkan sering terjadinya penggunaan antibiotik yang salah (Bhutta, 2006). Hal tersebut disimpulkan bahwa jika tidak melakukan tindakan cepat khususnya pada daerah yang endemik, maka penyebaran penyakit akan semakin tinggi di daerah tersebut. Seperti yang disebutkan diatas bahwa pemeriksaan laboratorium memiliki beberapa macam untuk mendeteksi adanya diagnosis positif dari pasien.

Beberapa pemeriksaan laboratorium yang paling sering digunakan adalah pemeriksaan serologis, diantaranya adalah pemeriksaan Widal dan pemeriksaan Tubex. Prinsip pemeriksaan Widal adalah reaksi aglutinasi antara antigen kuman *S.typhi* dengan antibodi yang disebut aglutinin. Prosedur kerja yang dimiliki pemeriksaan ini dipengaruhi oleh berbagai macam faktor, sehingga spesifitas dan sensitivitasnya hanya berkisar 60 – 80 % (Surya, 2007). Belum ada kesamaan pendapat tentang titer aglutinin yang bermakna untuk diagnosis demam tifoid hingga saat ini. Batas titer aglutinin yang sering digunakan hanya kesepakatan

saja, berlaku setempat, dan bahkan dapat berbeda di berbagai laboratorium (Sudoyo, 2010).

2.2 Biofilm

Biofilm merupakan matriks yang terdiri dari *extracellular polysaccharides* yang berasal dari kumpulan dari bakteri yang bereplikasi membentuk mikrokoloni melekat secara *irreversibel* pada permukaan epitel atau bahan abiotik (Williamson *et al*, 2012). Biofilm dapat terbentuk hampir pada semua bakteri, pada bakteri Gram positif maupun bakteri Gram negatif. Perbedaan jenis ataupun morfologi bakteri tersebut mempengaruhi kuat dan lemah pertahanan bakteri tergantung produksi substansi dari biofilm dan jenis bakteri yang dapat memproduksi biofilm.

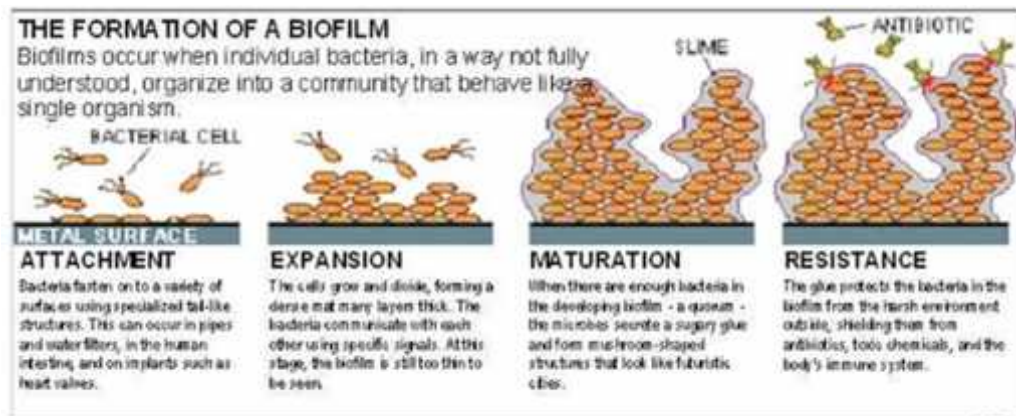
2.2.1 Struktur Biofilm

Struktur biofilm adalah substansi dasar pembentukan dari biofilm sehingga terjadi mekanisme quorum sensing, resistensi antimikroba, dan perlekatan yang dapat menerangkan interaksi fisiologis dari mikrokoloni dalam biofilm yang telah matang. Biofilm terdiri dari materi matriks (85% dari volume) dan kumpulan sel-sel bakteri (15% dari volume). *Extracellular Polymers Substance* (EPS) menyusun 50-90% karbon organik biofilm dan dapat dianggap sebagai material matrik yang utama. EPS bervariasi secara fisik dan kimia, tapi struktur utamanya terdiri dari polisakarida. EPS bersifat hidrofilik karena dapat mengikat air dalam jumlah yang banyak, dengan tingkat kelarutan yang berbeda-beda (Gunardi, 2014).

2.2.2 Mekanisme biofilm bakteri

Pembentukan biofilm memiliki proses perkembangan, proses tersebut terdiri dari 4 tahap. Dimulai dari beberapa bakteri hidup bebas (sel planktonik) yang melekat pada suatu permukaan (*adhesi*), kemudian memperbanyak diri (*proliferasi*), pematangan (*maturasi*) dan membentuk satu lapisan tipis (*monolayer*) biofilm. Tahap pertama, pembelahan akan berhenti selama beberapa

jam dan masa ini terjadi banyak perubahan pada sel planktonik, yang akan menghasilkan transisi sel planktonik menjadi sel dengan fenotip biofilm. Sel biofilm berbeda secara metabolik dan fisiologi dari sel planktoniknya. Biofilm akan menghasilkan *extracellular Polymeric Substance (EPS)* yang salah satu fungsinya untuk melekatkan bakteri yang telah bereplikasi dan membentuk mikrokoloni. Setelah produksi EPS dan mikrokoloni mengalami maturasi, maka terbentuklah *monolayer* yang dikenal sebagai *linking film* yaitu suatu substrat yang menjadi tempat sel bakteri melekat dan menjadi mikrokoloni. Sel bakteri akan terus tumbuh dan membentuk lapisan yang semakin menebal. Peningkatan penebalan lapisan menyebabkan bakteri berakumulasi memproduksi buangan yang bersifat toksik bagi host. Dari mekanisme biofilm tersebut, pada bakteri *S.typhi* disebabkan oleh proses mutasi *STM4263* dan *gen yjcC* (Kim *et al.*,2009).



Gambar 2.2 Mekanisme Biofilm (Ellen, 1999)

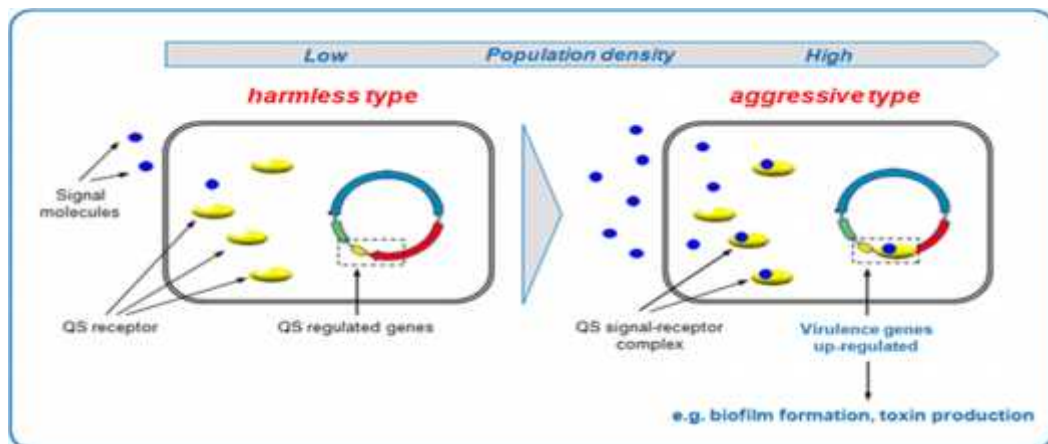
Pada gambar 2.2 pada tahap resistensi, lapisan pelindung bakteri akan menyebabkan antibiotik tidak dapat menembus untuk masuk kedalam ini bakteri, maka terjadilah resistensi antibiotik. Pada lapisan tersebut tidak hanya untuk melindungi dari antibiotik, tetapi dapat melindungi dari zat kimia lain dan sistem antibodi. Jika lapisan tersebut tidak hilang, maka proses sistem ketahanan tubuh juga tidak akan berfungsi.

Dalam perkembangannya, sel bakteri dalam matriks akan mengeluarkan sinyal kimia yang berperan dalam pembentukan karakteristik biofilm menjadi lebih *matur* dan meningkatnya koordinasi aktivitas biofilm (Gunardi, 2014). Aksi

dari sinyal ini merupakan suatu proses dari *quorum sensing* yaitu komunikasi antar sel dan kemampuan molekul untuk mencetuskan suatu aksi bergantung pada konsentrasi sinyal dalam lingkungan. Proses *quorum sensing* menyebabkan pengeluaran pili-pili pada bakteri sehingga bagian pili tersebut dapat mengeluarkan substansi yang disebut dengan EPS (*Extracellular Polymeric Substance*). Substansi inilah yang berfungsi untuk melindungi bakteri yang telah berkoloni atau membentuk kumpulan mikroorganisme.

2.2.3 Quorum Sensing

Beberapa bakteri mempunyai beberapa mekanisme virulensi ketika mereka berkembang di host, salah satunya adalah komunikasi antar sel sebagai proses pertahanan bakteri. Bakteri mengeluarkan komunikasi virulensi antar sel bakteri yang telah bereplikasi dalam sebuah proses yang disebut *quorum sensing* (QS). Hal ini terjadi karena terdapat reaksi silang sinyal molekul yang dihasilkan oleh masing-masing bakteri. Pada bakteri Gram negatif menghasilkan sinyal molekul lakton homoserine N-asil (AHLs) yang diproduksi oleh golongan LuxI dari AHL Sintase (Rasmussen *et al*, 2005).



Gambar 2.3 Mekanisme *Quorum Sensing*

(Sumber: Vasudevan, 2014)

Quorum Sensing merupakan komunikasi antar sel bakteri yang tergantung pada pertukaran sinyal kimia kecil yang disebut *autoinducer* (Collin *et al*, 2013). *Autoinducer* (AI) atau *pheromones* merupakan sinyal yang diekskresikan, diakumulasikan, yang selanjutnya diserap kembali oleh sel bakteri yang terlihat

pada gambar 2.3. Kompleks antara AI dengan protein sebagai pengatur pengaktivasi transkripsi akan mengaktifkan gen-gen penyandi tertentu, misalnya gen penyandi *bioluminescence*, pembentukan biofilm, faktor virulensi, antibiotik, simbiosis dan beberapa aktivitas bakteri yang lain (Chritianto, 2011).

Mekanisme *quorum sensing* pada bakteri Gram negatif diatur oleh tiga komponen penting, yaitu sintesis molekul sinyal atau sintesa AI, akumulasi molekul sinyal, dan pengenalan molekul sinyal. Pada proses setelah *quorum sensing* akan terbentuk pili-pili pada masing-masing bakteri yang telah bereplikasi sehingga dapat mengeluarkan EPS, dari substansi tersebut memiliki kandungan atau struktur yang berpengaruh dalam proses toksikasi dan fungsi dari perlindungan bakteri.

2.2.4 Fungsi Biofilm dan Peranannya terhadap Resistensi Bakteri

Terbentuknya biofilm berfungsi sebagai pertahanan dan peningkatan pertumbuhan bakteri (Mandigan, 2006). Hal tersebut didasari oleh empat fungsi biofilm.

a. Pertahanan

Biofilm berfungsi sebagai mekanisme pertahanan bagi bakteri dengan cara meningkatkan resistensi terhadap gaya fisik yang dapat menurunkan perkembangan sel-sel bakteri yang tidak menempel, fagositosis oleh sel imun dan penetrasi dari senyawa toksik bagi bakteri seperti antibiotik. Bakteri yang mempunyai biofilm lebih resisten 10-1.000 kali dibandingkan bila tidak mempunyai biofilm (Monroe, 2007)

b. Perlekatan

Adanya 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 *S.typhi* yang dapat bereplikasi, berkoloni dan membentuk biofilm yang dapat memfasilitasi komunikasi antar sel dengan molekul sinyal sebagai peningkatan peluang pertukaran materi genetik.

d. Cara hidup alami bakteri

Biofilm merupakan cara hidup alami bagi beberapa bakteri tertentu dengan alasan terbatasnya nutrisi ketika bakteri tidak dapat beradhesi.

2.2.5 Biofilm *Salmonella typhi*

Insiden dari kontaminasi makanan yang disebabkan bakteri *S.typhi* merupakan fokus utama pada negara industri. Telah diketahui bahwa *S.typhi* dapat mengkontaminasi produk segar dari segala pertanian dan peternakan yang diantaranya pupuk kompos, tanah, air dan kontak makanan. Sehingga faktor resiko kontaminasi terdapat pada bahan abiotik dan industri yang menyebabkan banyak kerugian dan masalah kesehatan (Pui *et al.*, 2011). Pada keadaan bahan abiotik yang terkontaminasi, sel-sel bakteri bertahan karena kemampuan mereka untuk menempel pada makanan. Setelah menempel atau beradhesi, sel-sel bakteri akan berkembang membentuk biofilm untuk perlindungan bakteri (Pui *et al.*, 2011). Kemampuan bakteri untuk menempel pada permukaan abiotik dan bentuk biofilm merupakan penyebab keprihatinan bagi banyak industri, termasuk produk makanan (Pui *et al.*, 2011). Penyebab adanya kontaminasi bakteri yang membentuk biofilm di bahan abiotik tersebut akan sangat beresiko jika berkontak langsung dengan manusia ataupun hewan yang dikonsumsi manusia. Resiko tersebut menyebabkan bakteri akan mudah untuk menginfeksi dan memperberat masa infeksi, sehingga perlunya sanitasi yang cukup untuk menurunkan resiko tersebut.

Sanitasi yang buruk dari permukaan makanan diyakini menjadi faktor yang berkontribusi penting dalam wabah makanan, terutama yang melibatkan *Listeria monocytogenes* dan *Salmonella*. Dengan demikian, biofilm yang terbentuk dalam makanan dan lingkungan pengolahan merupakan hal penting untuk masalah kesehatan, karena biofilm pada bakteri dapat bertindak sebagai sumber persisten kontaminasi mikroba yang dapat menyebabkan pembusukan makanan dan atau transmisi penyakit (Pui *et al.*, 2011). Proses tersebut

menyebabkan penyebaran penyakit yang semakin tinggi, karena produk makanan yang sangat mudah terkontaminasi jika sanitasi produk tersebut kurang diperhatikan.

2.2.6 Strategi Intervensi terhadap Biofilm

Untuk menghambat pembentukan biofilm diperlukan strategi intervensi yang mampu mengganggu atau mencegah terbentuknya biofilm ,antara lain;

- a. Melindungi permukaan dengan molekul yang menghambat perlekatan mikroba dan merusak matriks yang diproduksi, contohnya melapisi alat-alat medis dengan *chlorhexidin-silver sulfadizine*.
- b. Menghambat sinyal molekuler dengan mengganggu mekanisme gen dalam bakteri, sehingga pertumbuhan biofilm tidak terjadi.
- c. Menggunakan antibiotik atau disinfektan untuk menghambat strategi pertahanan biofilm
- d. Melalui mekanisme *self destruction*, misalnya *P. Fluorescent* akan menghasilkan lyase yang dapat menghancurkan matriks film berupa alginate pada lingkungan yang kekurangan oksigen, sehingga biofilm bakteri akan hancur.

Keempat strategi tersebut dimungkinkan akan mengganggu perkembangan sel bakteri yang dapat mengeluarkan sinyal kimia diproses dari masing-masing gen bakteri yang berperan dalam pembentukan karakteristik biofilm menjadi lebih matang dan koordinasi aktivitas biofilm (Gunardi, 2014).

2.3 Cincau Hijau

2.3.1 Taksonomi

Kerajaan	: Plantae
Superdivisi	: Spermatophyta
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Subkelas	: Magnoliidae

Bangsa : Ranunculales
Suku : Menispermaceae
Marga : Cyclea
Jenis : *Cyclea barbata* Miers
Sinonim : *Cyclea peltata* auct.non (Lamk) Hook.f 7 Thomson (De Padua, Bunyapraphatsara, dan Lemmens, 1999)



Gambar 2.4 Daun Cincau Hijau (*Cyclea barbata* Miers)
(Sumber: Redha, 2010)

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, lingkungan yang teduh, lembab dan berair tanah dangkal. 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). Masyarakat Jawa Tengah sebagian besar memilih untuk menanam tanaman tersebut karena terbilang mudah untuk dirawat pada daerah tersebut. Daun cincau hijau merupakan salah satu tanaman yang digemari masyarakat karena kegunaannya yang dapat dikonsumsi dan diolah dengan mudah.

2.3.2 Morfologi

Cyclea barbata Miers atau daun 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 *et al.*, 1999). Daun cincau hijau rambat tidak berbau, berlendir dan 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).

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 (Djam'an, 2008). Pada dasarnya cincau hijau memiliki banyak jenis yang membedakan mulai dari bentuk daun, batang dan sebagainya. Khususnya jenis daun cincau yang diteliti pada penelitian ini mempunyai ciri khusus yaitu daunnya yang tipis dan berbulu halus pada setiap permukaan daun yang dapat membedakan dengan jenis cincau hijau lainnya.

2.3.3 Penyebaran, Habitat dan Pemanenan

Cyclea Barbata Miers tumbuh besar di India , Myanmar, Indonesia, China, Thailand, pulau-pulau di paparan Sunda dan Pulau Jawa. Tumbuhan ini tumbuh di hutan, termasuk hutan jati dan hutan bambu, di padang rumput dengan vegetasi semak belukar, kadang di daerah berbatu kapur, dikultivasi dan hidup di daerah dataran tinggi (De Padua *et al.*, 1999).

2.3.4 Kandungan Daun Cincau Hijau

Secara umum kandungan daun cincau hijau adalah karbohidrat, lemak, protein dan senyawa-senyawa lainnya seperti polifenol, flavonoid serta mineral-mineral dan vitamin-vitamin, di antaranya kalsium, fosfor dan vitamin A serta

vitamin B28 (Djam'an, 2008). Sedangkan pada penelitian Zakaria dan Prangdimurti yang mendapatkan bahwa tanaman cincau hijau mengandung alkaloid 0,98% dan total fenol 2,21% (Chalid, 2003). Selain itu, daun cincau hijau juga mengandung alkaloid bisbenzilisokuinolin, seperti tetrandrin fangkinolin, berbamin, homoaromolin, sikleapeltin dan sikleabarbatin (De Padua *et al.*, 1999). Dari banyaknya kandungan inilah pada beberapa peneliti menggunakan sebagai bahan penelitian untuk pengobatan herbal.

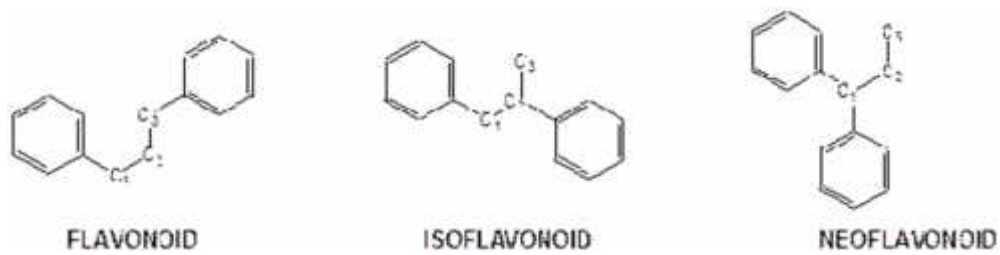
2.2.5 Kegunaan Kandungan Daun Cincau Hijau

a. 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. Selain untuk mencegah reaksi oksidasi, fungsi polifenol sebagai penangkap dan pengikat radikal bebas dari rusaknya ion-ion logam. Golongan kimia fenolik sangat mudah larut dalam air dan lemak serta dapat bereaksi dengan vitamin C dan vitamin E. Pada daun cincau hijau memiliki kandungan polifenol tidak cukup banyak daripada kandungan dari tanaman lainnya seperti daun kelor. Pada golongan fenolik ini mempunyai kelompok-kelompok yang terdiri dari asam-asam fenolat dan flavonoid (Djama'an, 2008).

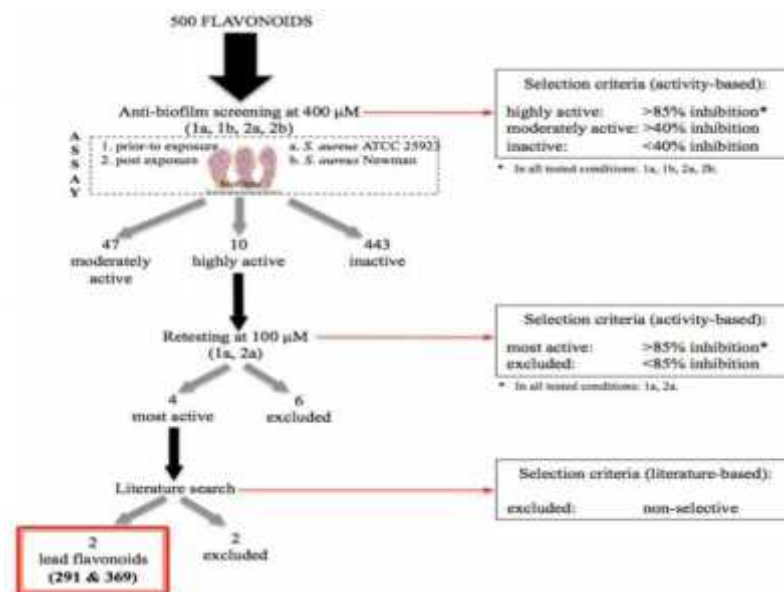
b. Flavonoid

Flavonoid merupakan salah satu kelompok senyawa metabolit sekunder yang paling banyak ditemukan di dalam jaringan tanaman. 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).



Gambar 2.5 Rantai Kimia Flavonoid

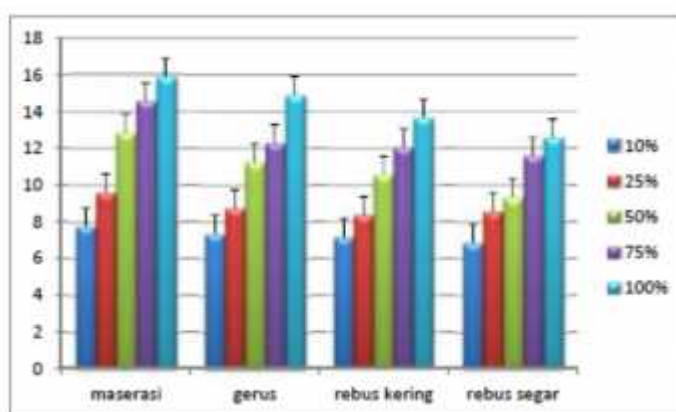
Pada gambar 2.5 flavonoid termasuk dalam golongan senyawa phenolik dengan struktur kimia C₆-C₃-C₆. Senyawa flavonoid mempunyai ikatan gula yang disebut aglikon yang berikatan dengan berbagai gula dan sangat mudah terhidrolisis atau mudah lepas dari gugus gulanya. Flavonoid merupakan antioksidan yang berpotensi untuk mencegah pembentukan radikal bebas. Selain itu flavonoid mempunyai peran sebagai anti bakteri dan anti viral (Djama'an, 2008).



Gambar 2.6. Mekanisme kerja flavonoid menghambat mekanisme biofilm pada bakteri. Sumber (Manner *et al.*, 2013)

Dari gambar 2.6 flavonoid dapat berfungsi sebagai *anti*-biofilm dengan kriteria penghambatan yang berbeda-beda. Flavonoid merupakan golongan terbesar senyawa fenol (Sjahid, 2008). Mekanisme kerja lainnya dengan cara mendenaturasi protein sel bakteri dan merusak membran sel tanpa dapat

diperbaiki lagi (Juliantina, 2008). Dari fungsinya sebagai denaturasi protein dan merusak membran sel bakteri, maka flavonoid juga dapat berperan dalam menghambat pembentukan biofilm dengan menghambat pembentukan biofilm dengan menghambat ekspresi gen *icaA* dan *icaD*. Mekanisme kerja flavonoid juga berfungsi sebagai antibakteri dengan cara membentuk senyawa kompleks terhadap protein ekstraseluler yang mengganggu keutuhan membran sel bakteri. (Lee *et al.*, 2013).



Gambar 2.7 Diameter zona hambat ekstrak daun cincau hijau (*Cyclea barbata* Miers) pada *S.typhi* (Asmardi *et al.*, 2014)

Grafik diatas menunjukkan kandungan dari ekstrak etanol dapat menjadi antibakteri yang dibuktikan dengan hasil metode zona hambat bakteri yang sebagian besar dipengaruhi oleh kandungan flavonoid. Perbedaan konsentrasi ekstrak dan metode ekstraksi dapat mempengaruhi besar penghambatan pembentukan bakteri pada hasil zona hambat bakteri *S.typhi*. Pada konsentrasi 100% dan menggunakan metode ekstraksi maserasi mendapatkan zona hambat yang lebih banyak daripada konsentrasi dan metode ekstraksi lainnya (Asmardi *et al.*,2014). Maka kandungan flavonoid pada daun cincau hijau pada konsentrasi yang lebih pekat dapat menjadi penghambat pembentukan biofilm.

2.4 Uji Aktivitas Biofilm Bakteri

2.4.1 Microplate Reader (Elisa Reader)

Microplate reader adalah spektrofotometer khusus yang disusun untuk membaca lempeng mikro (microplate) yang menggunakan prinsip spektrofotometri seperti metode konvensional, sehingga dapat menghasilkan peningkatan jumlah sampel yang dapat dianalisis (Heredia *et al.*, 2006). Perbedaan dengan spektrofotometer konvensional yang dapat membaca 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 menggunakan 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 pembacaan berkas cahaya ganda mengubahnya menjadi data atau interpretasi hasil pengujian yang disebut *Optical Density* (OD) (WHO, 2008).

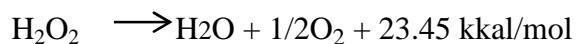
2.5.2 MCRA

Uji Screening Pembentukan Biofilm dengan *Media Modified Congo Red Agar* (MCRA). Media MCRA merupakan media yang digunakan untuk mengetahui kemampuan bakteri *S. aureus* dalam membentuk biofilm secara kualitatif. Media ini terdiri dari Blood Agar Base-2 (BAB-2) sebanyak 40 g, glukosa sebanyak 10 g dan Congo Red Dye (CRD) sebanyak 0,4 g dalam 1L aquades (Mariana *et al.*, 2009). Hasil positif ditandai dengan terbentuknya pigmen koloni hitam, sedangkan koloni berwarna merah merupakan biofilm negatif.

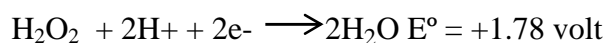
2.5 Hidrogen Peroksida (H₂O₂)

2.5.1 Struktur Hidrogen Peroksida

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). Hidrogen peroksida mempunyai struktur tidak berwarna, berbau menyengat dan larut dalam air. Pada produksi hidrogen peroksida, ditambahkan 20 bahan stabilizer kimia dengan maksud untuk menghambat laju dekomposisinya, termasuk dekomposisi yang terjadi selama dalam penyimpanan. Selain menghasilkan oksigen, reaksi dekomposisi hidrogen peroksida juga menghasilkan air dan panas. Reaksi dekomposisi eksotermis yang terjadi adalah sebagai berikut (Pelczar *et al.*, 2009):



Hidrogen peroksida merupakan pengoksidasi yang kuat dengan potensial reduksi (E_{o red}) = + 1,78 volt. Persamaan setengah sel dapat ditulis sebagai berikut (Dickson, 2000) :

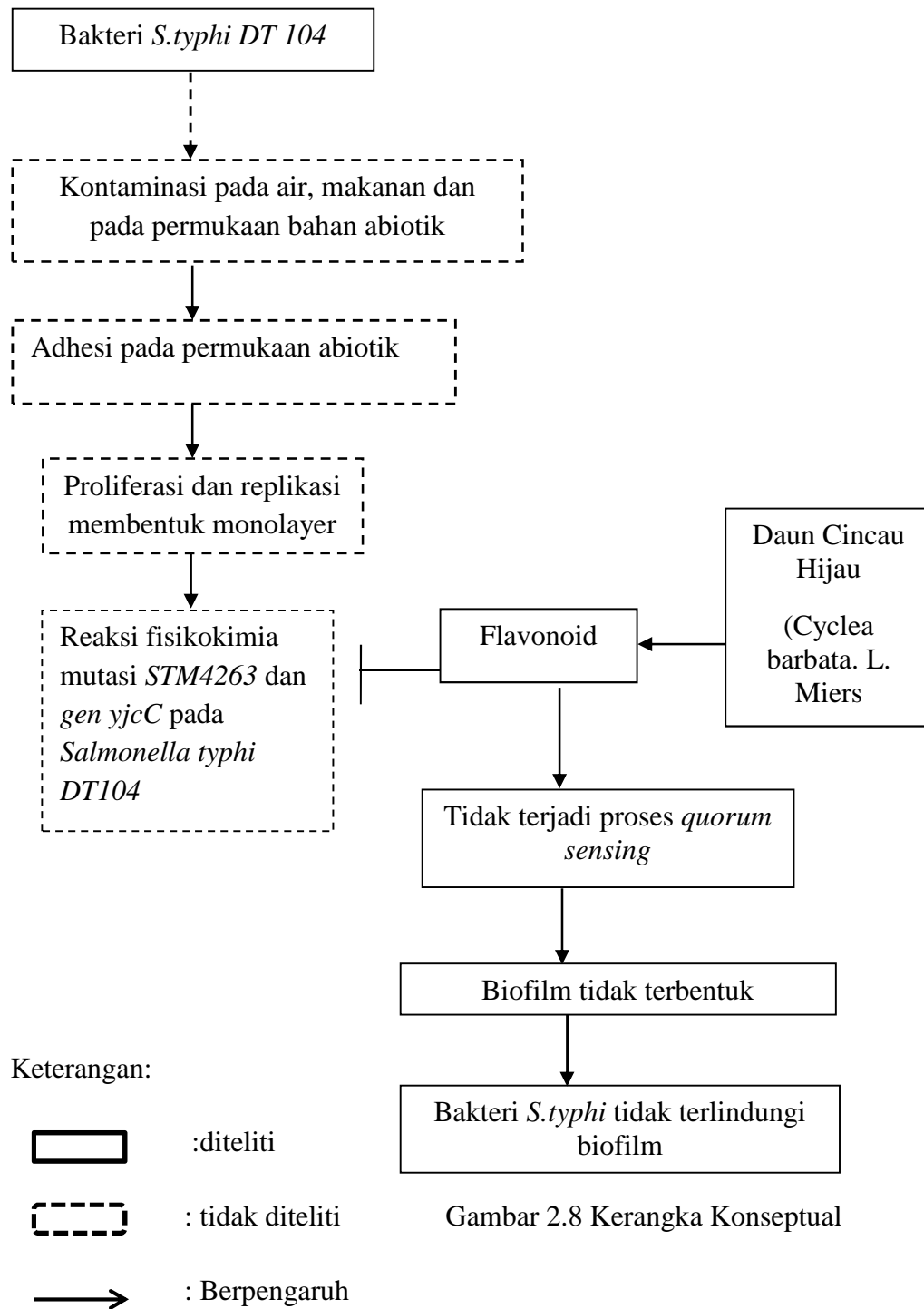


2.5.2 Hidrogen Peroksida sebagai Disinfektan

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 *et al.*, 2009). Hidrogen Peroksida merupakan senyawa pengoksidasi yang sering digunakan sebagai antimikroba. Senyawa ini diurai oleh enzim katalase menghasilkan oksigen aktif sebagai antiseptik (Ghanam *et al.*, 2012). Senyawa ini sering digunakan dalam dunia kesehatan sebagai disinfektan karena tidak meninggalkan residu berbahaya yang berfungsi sebagai antiseptik yang efektif dan bersifat nontoksik (Setiawan, 2013).

Bakteri dapat menghasilkan H_2O_2 yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri lainnya. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa kuman *Streptococcus pneumoniae* yang diisolasi dari nasofaring menghasilkan H_2O_2 diperantarai enzim piruvat oksidase dalam keadaan aerob. Produksi bakteri tersebut dapat membunuh dan menghambat pertumbuhan bakteri disekitarnya (Pericone *et al.*, 2000).

2.6 Kerangka Konseptual Penelitian



Gambar 2.8 Kerangka Konseptual

Proses terbentuknya biofilm pada *S.typhi* diawali dengan mengkontaminasi permukaan abiotik sebagai tempat perlekatan dan pembentukan biofilm. Mekanisme pembentukan biofilm dimulai dari beberapa bakteri hidup bebas (sel planktonik) yang melekat pada suatu permukaan (*adhesi*), kemudian memperbanyak diri (*proliferasi*), pematangan (*maturasi*) dan membentuk satu lapisan tipis (monolayer) biofilm. Dalam perkembangannya pada proses *proliferasi*, sel bakteri yang bereplikasi akan mengeluarkan sinyal kimia. Molekul sinyal yang disebut sebagai *quorum sensing* berperan dalam pembentukan karakteristik biofilm menjadi lebih matang dan koordinasi aktivitas biofilm. Hasil dari proses biofilm tersebut maka perlu proses yang memutuskan rantai pembentukan biofilm. Penelitian sebelumnya telah dikembangkan senyawa flavonoid yang terkandung dalam daun cincau hijau yang telah diekstrak dengan etanol dimana dalam regulasi tanin dan flavonoid dapat berperan dalam menghambat pembentukan biofilm dengan menghambat ekspresi gen *icaA* dan *icaD* pada bakteri Gram positif. Penghambatan ekspresi gen *ica* ini flavonoid dapat menghambat adhesi sel bakteri, baik perlekatan bakteri dengan permukaan substrat maupun perlekatan antar bakteri, dimana adhesi merupakan faktor utama dalam pembentukan biofilm. Pada bakteri *S.typhi* terjadi proses mutasi *STM4263* dan gen *yjcC* dalam bakteri yang mengakibatkan peningkatan pembentukan biofilm. Sehingga peran flavonoid dalam bakteri *S.typhi* dapat menghambat proses mutasi gen yang dapat menjadi faktor penyebab sinyal kimia antar sel atau *quorum sensing*. Jika tidak terjadinya proses *quorum sensing*, maka mekanisme biofilm tidak akan berkembang dan bakteri tidak memiliki perlindungan untuk ketahanan mikrokoloni.

2.8 Hipotesis Penelitian

Hipotesis dari penelitian ini adalah:

1. Terdapat aktivitas ekstrak etanol daun cincau hijau (*Cycle barbata Miers*) sebagai penghambat pembentukan biofilm bakteri *S.typhi* secara *in vitro*
2. Terdapat hubungan antara konsentrasi ekstrak etanol daun cincau hijau dengan penghambatan pembentukan biofilm *S.typhi*.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

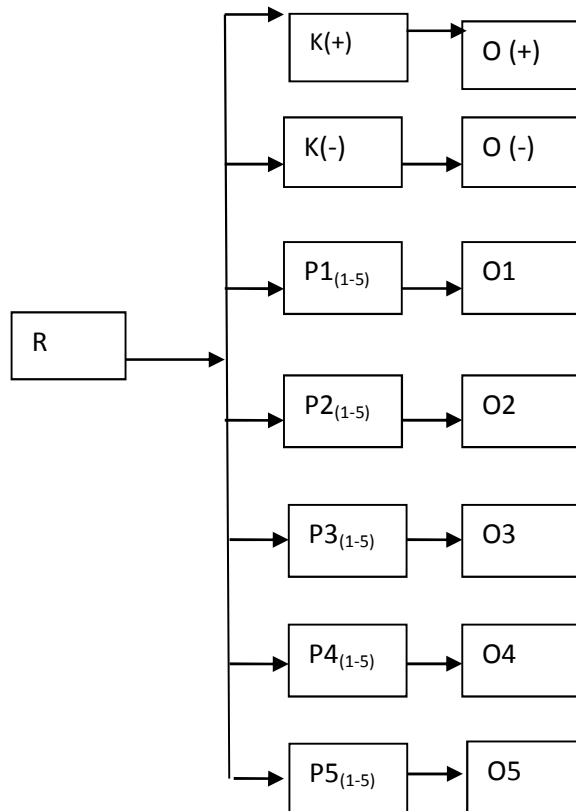
Penelitian ini menggunakan desain eksperimental kuasi (*quasi experimental design*) secara *in vitro*.

3.2 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan design studi rancangan acak lengkap atau *completely randomized design* yang merupakan model rancangan penelitian.

Keterangan :

- R : Bakteri *S.typhi*
- P (+) : Kelompok kontrol positif dengan H₂O₂ 6%
- P (-) : Kelompok kontrol negatif H₂O steril
- P (1) : Kelompok perlakuan 1 ekstrak etanol daun *C. barbata* dengan dosis 0,29 mg/ml
- P (2) : Kelompok perlakuan 1 ekstrak etanol daun *C. barbata* dengan dosis 0,33 mg/ml
- P (3) : Kelompok perlakuan 2 ekstrak etanol daun *C. barbata* dengan dosis 0,40 mg/ml
- P (4) : Kelompok perlakuan 3 ekstrak etanol daun *C. barbata* dengan dosis 0,50 mg/ml
- P (5) : Kelompok perlakuan 4 ekstrak etanol daun *C. barbata* dengan dosis 0,67 mg/ml
- O (+) : Observasi kelompok kontrol positif dengan H₂O₂ 6%
- O (-) : Observasi kelompok kontrol negatif dengan H₂O steril
- O (1) : Observasi kelompok perlakuan 1 ekstrak etanol daun *C. barbata* dengan dosis 0,29 mg/ml
- O (2) : Observasi kelompok perlakuan 1 ekstrak etanol daun *C. barbata* dengan dosis 0,33 mg/ml
- O (3) : Observasi kelompok perlakuan 2 ekstrak etanol daun *C. barbata* dengan dosis 0,40 mg/ml
- O (4) : Observasi kelompok perlakuan 3 ekstrak etanol daun *C. barbata* dengan dosis 0,50 mg/ml
- O (5) : Observasi kelompok perlakuan 4 ekstrak etanol daun *C. barbata* dengan dosis 0,67 mg/ml



Gambar 3.1 Rancangan Penelitian

3.3 Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah kuman *S.typhi* DT 104 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Jumlah pengulangan didasarkan pada perhitungan sebagai berikut (Perdhana, 2004)

$$(t-1)(r-1) > 15$$

$$(7-1)(r-1) > 15$$

$$7r-7-r+1 > 20$$

$$6r-6 > 15$$

$$6(r-1) > 15$$

$$2(r-1) > 5$$

$$R < 4$$

Keterangan:

p : jumlah perlakuan

q : jumlah kontrol

r : jumlah pengulangan

3.4 Tempat dan Waktu Penelitian

3.4.1 Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan di laboratorium Biologi Fakultas Farmasi Universitas Jember untuk melakukan ekstraksi daun cincau hijau. Perlakuan penelitian dan observasi hasil dilakukan di laboratorium Mikrobiologi dan Biomolekul Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

3.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian akan 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 yaitu 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 Aktivitas Penghambatan Pembentukan Biofilm *Salmonella typhi*

3.5.3 Variabel Terkendali dalam penelitian ini adalah :

- a. Pembuatan biakan bakteri *S.typhi* DT 104, pembuatan ekstrak daun cincau hijau, inkubator, H₂O₂ dan aquades steril.
- b. Suhu pengeraman (inkubasi) *S.typhi* 370C selama 24 jam.
- c. Metode pengamatan pada *Microplate Reader*.
- d. Prosedur penelitian

3.6 Definisi Operasional

Definisi operasional pada penelitian ini adalah:

- a. Ekstrak daun cincau hijau merupakan hasil ekstraksi 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.
- b. *S.typhi DT104* adalah bakteri Gram negatif yang bersifat patogen pada manusia yang telah dikembangbiakkan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember.
- c. *Biofilm* merupakan matriks yang terdiri dari *extracellular polysaccharides* berasal dari kumpulan dari bakteri yang bereplikasi yang melekat secara *irreversibel* pada permukaan epitel atau bahan abiotik (Williamson *et al*, 2012).
- 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 yang digunakan adalah *microplate reader*, *microplate flexible U-bottom PVC 96-well*, *rotary vacuum evaporator*, oven dan cawan petri.

3.7.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah suspensi *S.typhi DT 104*, *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 Daun Cincau Hijau

Daun cincau hijau sebanyak 176 mg yang sudah dikeringkan dan dihaluskan diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan etil asetat 96% atau etanol 96% sebanyak 1000 mL (1 : 10) selama 24 jam pada suhu kamar, filtrat diperoleh dengan penyaringan. Filtrat disatukan kemudian dipekatkan dengan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 50° C sampai diperoleh filtrat yang kental kemudian dikeringkan dengan proses *freeze drier* untuk menghilangkan sisa pelarut yang masih ada. Ekstrak kemudian disterilisasi dengan menggunakan oven pada suhu 80° C, 1 jam selama 3 hari.

3.8.3 Pembuatan Larutan 0,5 Mc Farland

Standar *Mc Farland* dibuat dengan cara mencampur 9,95 ml asam sulphur 1%. Kemudian tabung disegel dan digunakan untuk perbandingan suspensi bakteri dengan standar.

3.8.4 Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Etanol Daun Cincau Hijau

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.

3.8.5 Pembuatan Suspensi Bakteri

Suspensi bakteri *S.typhi* strain *DT104* didapat dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang yang telah memperoleh sertifikat ATCC (*The American Type Culture Collection*). Suspensi tersebut dikultur pada media NA selama 24 jam pada suhu 37⁰ C kemudian dibandingkan dengan Standar Mc Farland V (15×10^8 CFU/mL) dan diencerkan dengan akuades steril menjadi 1.5×10^5 CFU/ml.

3.8.6 Pengujian Penghambatan Pembentukan *Biofilm S.typhi*

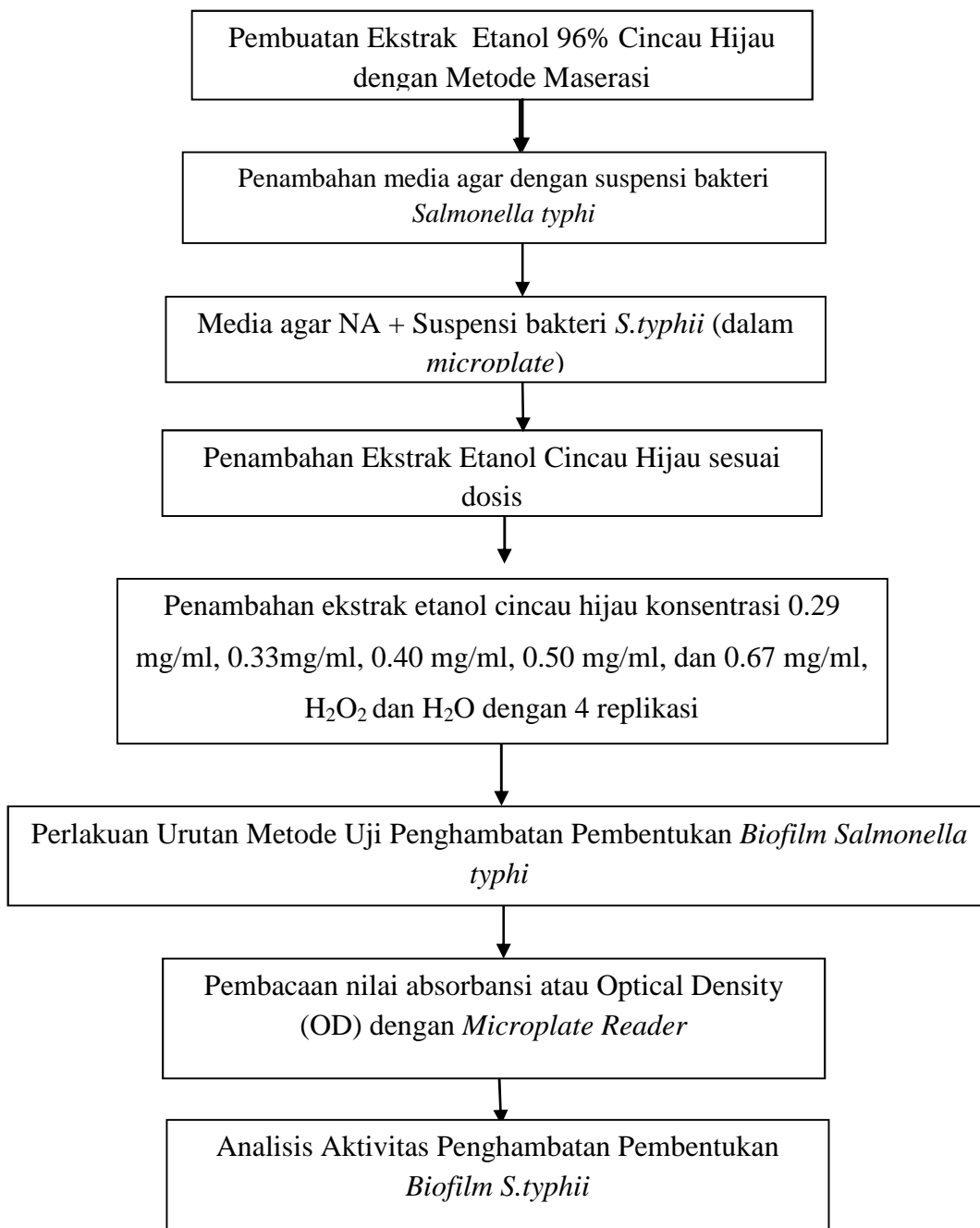
Pengujian pembentukan biofilm dilakukan secara *in vitro* menggunakan metode *Microtiter Plate Biofilm Assay* pada *microplate flexible U-bottom PVC 96-well* (Chamdit dan Siripermpool, 2012). Seri dosis ekstrak etanol cincau hijau konsentrasi 0.29 mg/ml, 0.33 mg/ml, 0.40 mg/ml, 0.50 mg/ml, dan 0.67 mg/ml, H₂O₂ dan H₂O. H₂O₂ berfungsi sebagai kontrol negatif dan H₂O sebagai kontrol positif. Suspensi *S.typhi* di biakan pada media *Mueller Hinton Broth* (MHB) selama 24 jam pada suhu 37⁰ C lalu dibandingkan dengan Standar Mc Farland V (15×10^8 CFU/mL) dan kemudian diencerkan dengan akuades steril menjadi 1.5×10^5 CFU/ml. Ekstrak etanol 96% daun *C.barbata* di encerkan dengan DMSO dengan konsentrasi 0.29 mg/ml; 0.33 mg/ml; 0.40 mg/ml; 0.50 mg/ml; 0.67 mg/ml lalu dimasukkan kedalam microplate sebanyak 100 µl/well .Kemudian tambahkan suspensi *S.typhi* sebanyak 10µL/well setelah itu, inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. *Microplate* dicuci dengan *Phospat Buffer Saline* (PBS) steril sebanyak tiga kali. Ditambahkan 200µL metanol dan diamkan selama 15 menit, kemudian dibuang dan dikeringkan. Tambahkan 200µL kristal violet 2% dan diamkan selama lima menit. Cuci *microplate* dengan PBS dan tambahkan 200µL asam asetat glasial 33%. Pengamatan dilakukan dengan *microplate* reader pada panjang gelombang 570nm. Hasil pembacaan merupakan nilai absorbansi atau *Optical Density* (OD) yang menggambarkan kuantitas pembentukan biofilm. Kontrol negatif yang digunakan adalah suspensi *S.typhi* ditambahkan dengan H₂O, sedangkan kontrol positif suspensi *S.typhi* ditambahkan dengan H₂O₂ sebanyak

100 μ l. Kemudian dibaca dengan *microplate reader* dengan hasil pembacaan *Optical Density* (OD).

3.9 Analisis Data

Data yang diperoleh merupakan data kuantitatif berupa nilai absorbansi atau *Optical Density* yang kemudian dianalisis menggunakan uji *One Way Anova* dengan pemilihan uji LSD untuk mencari uji beda antar kelompok perlakuan dengan kelompok kontrol. Dilanjutkan dengan uji korelasi-regresi untuk mengetahui hubungan konsentrasi ekstrak etanol daun cincau hijau dengan penghambatan pembentukan biofilm bakteri *S.typhi*.

3.10 Alur Penelitian



Gambar 3.2 Alur Penelitian