

**UJI EFEKTIVITAS EKSTRAK ETHANOL DAUN BELUNTAS
(*Pluchea Indica*) SEBAGAI ANTIMIKROBA TERHADAP
BAKTERI *Escherichia Coli* SECARA *IN VITRO***

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran Umum**



Oleh:

CYNTHIA DELLANAURA

09107104030

PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2012

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

**UJI EFEKTIVITAS EKSTRAK ETHANOL DAUN BELUNTAS (*Pluchea indica*)
SEBAGAI ANTIMIKROBA TERHADAP BAKTERI *Escherichia coli* SECARA
*IN VITRO***

Oleh:

Cynthia Dellanaura

NIM : 0910714030

Telah diuji pada:

Hari : Kamis

Tanggal : 27 Desember 2012

Dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji I

dr. Soemardini, M.Pd
NIP 110446417

Penguji II / Pembimbing I

Penguji III / Pembimbing II

dr.Aulia Abdul Hamid MBIomed, Sc Sp.M
NIP.19770601 200312 1 005

dr. Endang Asmaningsih, MS
NIP. 080943206

Mengetahui,

Ketua Jurusan Kedokteran

Prof. Dr. dr. Teguh W. Sardjono DTM& H, MSc, SpPark
19520410 198002 1 001

KATA PENGANTAR

Segala puji hanya bagi Allah SWT yang telah memberi petunjuk dan hidayah-Nya penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir yang berjudul "Ekstrak Etanol Daun Beluntas (*Pluchea Indica*) sebagai Antimikroba terhadap Bakteri *Escherichia coli* secara *in vitro*.

Ketertarikan penulis pada topik ini didasari oleh fakta bahwa bakteri *Escherichia coli* merupakan salah satu penyebab penyakit diare yang masih banyak terjadi di kalangan anak-anak maupun orang dewasa. Di sisi lain, telah ditemukan resistensi bakteri *Escherichia coli* terhadap beberapa jenis antibiotik sehingga diperlukan adanya bahan baru yang berpotensi untuk mencegah perluasan resistensi. Hal ini didukung dengan banyaknya tanaman beluntas yang hanya menjadi tanaman pagar biasa dan ternyata terdapat potensi antimikroba di dalam daun beluntas tersebut. Oleh karena itu, penulis menggunakan tanaman beluntas yang banyak tumbuh di daerah tropis seperti di Indonesia.

Dalam proses penulisan Tugas Akhir ini, penulis juga didukung oleh berbagai pihak. Melalui kesempatan ini, penulis ingin mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada :

1. Dr. dr. Karyono Mintaroem, SpPA., selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah memberikan penulis kesempatan untuk menuntut ilmu di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
2. dr. Aulia Abdul Hamid MBiomed, Sc Sp.M., selaku dosen pembimbing pertama yang telah banyak memberikan masukan dan dukungan sehingga Tugas Akhir ini dapat terselesaikan. Terima kasih juga untuk banyak nasihat, dorongan, dan semangat yang telah diberikan dengan kesabaran serta pengertiannya.

3. dr. Endang Asmaningsih, MS., selaku dosen pembimbing kedua yang telah memberikan masukan dan dukungan sehingga Tugas Akhir ini dapat terselesaikan dengan baik.
3. dr. Soemardini, MPd., selaku dosen penguji atas saran dan kritik yang telah diberikan sehingga dapat menyempurnakan Tugas Akhir ini.
4. Segenap anggota Tim Pengelola Tugas Akhir FKUB, dr. Soemardini, MPd. dan Dra. Sri Winarsih, Apt. Msi yang telah memberikan banyak informasi, bantuan, dan dukungan.
5. Yang terkasih dan tercinta, papa, mama, dan kakak - kakakku yang telah memberikan dukungan dan doa yang tidak pernah berhenti dalam bentuk moral maupun materi sehingga Tugas Akhir ini berjalan lancar.
6. Teman-teman jurusan Pendidikan Dokter angkatan 2009 khususnya PD-B 2009 atas persahabatannya selama ini.
7. Sahabat – sahabatku tersayang Dessy Rachmi Amelia, Dia Nuril Zakia Sany, Yosefin Budi Eka, Poppy Andiana, Latifah Rahmi PD-B 2009 atas dukungannya selama proses pembuatan Tugas Akhir ini.
8. Segenap staf Laboratorium Mikrobiologi, terutama Mas Slamet, Mas Hendri, Bu Yati, dan Bu Uci yang telah banyak memberikan informasi dan bantuan dalam proses penelitian Tugas Akhir ini.

Penulis menyadari bahwa penulisan ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, penulis menerima segala saran dan kritik yang membangun. Akhirnya, semoga Tugas Akhir ini dapat bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang, 27 November 2012

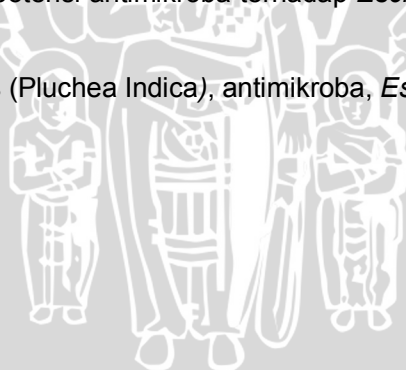
Penulis

ABSTRAK

Della, Cynthia. 2012. **Uji Efektivitas Ekstrak Ethanol Daun Beluntas (*Pluchea Indica*) sebagai Antimikroba terhadap Bakteri *Escherichia coli* secara *in Vitro***. Tugas akhir, Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing : (1) dr. Aulia Abdul Hamid, MBIomed Sc, Sp.M. (2) dr. Endang Asmaningsih, MS

Escherichia coli adalah salah satu patogen penyebab diare pada anak maupun dewasa. *Escherichia coli* cepat menjadi resisten terhadap banyak obat antimikroba sehingga menimbulkan masalah terapi yang sulit. Salah satu alternatif terapi adalah dengan bahan alami, yaitu daun beluntas (*Pluchea Indica*). Kandungan aktif daun beluntas yang diduga bermanfaat sebagai antimikroba adalah flavonoid, saponin, dan tanin. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi antimikroba ekstrak daun beluntas (*Pluchea Indica*) terhadap *Escherichia coli*. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris murni dengan *post test only control group design*, menggunakan metode dilusi tabung. Konsentrasi ekstrak daun beluntas yang digunakan yaitu 0%, 10%, 12,5%, 15%, 17,5%, 20%, 22,5% dan 25% dengan empat kali perulangan. Ekstrak daun beluntas (*Pluchea Indica*) secara signifikan dapat menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* ($p < 0,05$) dan terdapat hubungan antara peningkatan konsentrasi ekstrak daun beluntas dengan penurunan jumlah pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Dari studi ini didapatkan KHM sebesar 17,5% dan KBM 20% serta dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun beluntas (*Pluchea Indica*) memiliki potensi antimikroba terhadap *Escherichia coli* secara *in vitro*.

Kata kunci : daun beluntas (*Pluchea Indica*), antimikroba, *Escherichia coli*



ABSTRACT

Della, Cynthia. 2012. **Test the Effectiveness of Ethanol *Pluchea Indica* Leaf (*Pluchea Indica*) Extract as an Antimicrobial Againsts *Escherichia coli* In Vitro**. Final Assignment, Medical Program, Medical Faculty of Brawijaya University. Supervisors : (1) dr. Aulia Abdul Hamid, MBiomed Sc, Sp.M. (2) dr. Endang Asmaningsih, MS

Escherichia coli is one of the bacteria that cause diarrhea especially at children and adults. *Escherichia coli* is quickly becoming resistant to many antimicrobial drugs and lead to a difficult therapeutic problems. One natural alternative therapy that can be used is *Pluchea Indica* leaf (*Pluchea Indica*). The active compositions of *Pluchea Indica* leaf (*Pluchea Indica*) which allegedly useful as antimicrobial are flavonoid, saponin, and tannin. This study aims to determine the potentially of *Pluchea Indica* leaf (*Pluchea Indica*) extract on the growth of bacteria *Escherichia coli* in vitro. This study is an experimental research using post test only control group design, done by tube dilution method. Concentration of the extract used were 0%, 10%, 12,5%, 15%, 17,5%, 20%, 22,5% and 25% with four repetitions. The extract of *Pluchea Indica* leaf significantly inhibits the growth of *Escherichia coli* ($p < 0.05$) and so there is a relationship between the increasing concentrations of extract of *Pluchea Indica* leaf (*Pluchea Indica*) with a reduced number of bacteria growth of *Echerichia coli*. From these study, it was found that the MIC of 17,5% and MBC 20%. It can be concluded that extract of *Pluchea Indica* leaf (*Pluchea Indica*) has antimicrobial effects on *Escherichia coli* in vitro.

Keywords: *Pluchea Indica*, antimicrobial, *Escherichia coli*



DAFTAR ISI

	Halaman
Judul.....	i
Halaman Pengesahan.....	ii
Kata Pengantar.....	iii
Abstrak.....	v
Abstrack.....	vi
Daftar Isi.....	vii
Daftar Gambar.....	xii
Daftar Tabel.....	xiii
Daftar Lampiran.....	xiv
Daftar Singkatan.....	xv
BAB 1 Pendahuluan	
1.1.....	Latar
Belakang.....	1
1.2.....	Rumus
an Masalah.....	3
1.3.....	Tujuan
Penelitian.....	3
1.3.1 Tujuan Umum.....	3
1.3.2 Tujuan Khusus.....	3
1.4.....	Manfa
at Penelitian.....	4
1.4.1 Manfaat Akademis.....	4
1.4.2 Manfaat Praktis.....	4

BAB 2 Tinjauan Pustaka

2.1 Beluntas (<i>Pluchea Indica</i> Less).....	5
2.1.1 Asal Usul beluntas.....	5
2.1.2 Morfologi Beluntas.....	6
2.1.3 Klasifikasi Beluntas.....	8
2.1.4 Kandungan Aktif Beluntas dan Manfaatnya.....	9
Sebagai Tanaman Obat.....	9
2.1.4.1 Alkaloid.....	9
2.1.4.2 Flavonoid.....	14
2.1.4.3 Saponin.....	16
2.1.4.4 Tanin.....	17
2.2 <i>Escherichia Coli</i>	19
2.2.1 Epidemiologi.....	19
2.2.2 Morfologi dan Identifikasi.....	20
2.2.3 Ciri-Ciri Pertumbuhan.....	22
2.2.3.1 Media Eosin Methylene Blue.....	22
2.2.3.2 Media MacConkey Agar.....	23
2.2.3.3 Media MacConkey Broth.....	23
2.2.4 Manifestasi Klinis.....	24
2.2.5 Penentu Patogenesis.....	27
2.3 Cara Kerja Antibakteri.....	29
2.3.1 Menghambat Sintesis Dinding Sel.....	29
2.3.2 Merusak Membran Sel.....	29
2.3.3 Menghambat Sintesis Protein.....	30
2.3.4 Menghambat Sintesis Asam Nukleat.....	30

2.3.5 Antagonis Metabolit	30
2.4 Uji Kepekaan Terhadap Antibakteri <i>In Vitro</i>	31
2.4.1 Metode Dilusi Tabung	31
2.4.2 Metode Difusi Cakram	32

BAB 3 Kerangka Konsep dan Hipotesis Penelitian

3.1 Kerangka Konsep	33
3.2 Penjelasan Kerangka Konsep	34
3.3 Hipotesis Penelitian	34

BAB 4 Metode Penelitian

4.1 Rancangan Penelitian	35
4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian	35
4.2.1 Lokasi Penelitian	35
4.2.2 Waktu	35
4.3 Sampel Penelitian	35
4.4 Estimasi Jumlah Sampel Minimal	35
4.5 Variabel Penelitian	36
4.5.1 Variabel Bebas	36
4.5.2 Variabel Tergantung	36
4.6 Definisi Operasional	37
4.6.1 (KHM) Kadar Hambat Minimal	37
4.6.2 (KBM) Kadar Bunuh Minimal	37
4.6.3 <i>Original inoculum</i>	37
4.6.4 Kontrol Positif	37
4.6.5 Kontrol Negatif	38
4.6.6 Kadar Konsentrasi	38

4.6.7 Tingkat Kekeruhan	38
4.7 Alat dan Bahan Penelitian	38
4.7.1 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Daun Beluntas	38
4.7.1.1 Alat	38
4.7.1.2 Bahan	38
4.7.2 Alat dan Bahan untuk Kultur Bakteri	38
4.7.2.1 Alat	38
4.7.2.2 Bahan	39
4.7.3 Alat dan Bahan untuk Pewarnaan Gram	39
4.7.3.1 Alat	39
4.7.3.2 Bahan	39
4.7.4 Alat dan Bahan untuk Dilusi Tabung	39
4.7.4.1 Alat	39
4.7.4.2 Bahan	40
4.8 Prosedur Penelitian	40
4.8.1 Pembuatan Ekstrak Daun Beluntas	40
4.8.1.1 Proses Pengeringan	40
4.8.1.2 Proses Ekstraksi	41
4.8.1.3 Proses Evaporasi	41
4.8.2 Identifikasi <i>Escherichia coli</i>	42
4.8.2.1 Pewarnaan Gram	42
4.8.2.2 Microbat 12A/E-24E	42
4.8.2.3 Perbenihan	44
4.8.3 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji	44
4.8.4 Uji Sensitivitas Antimikroba	45



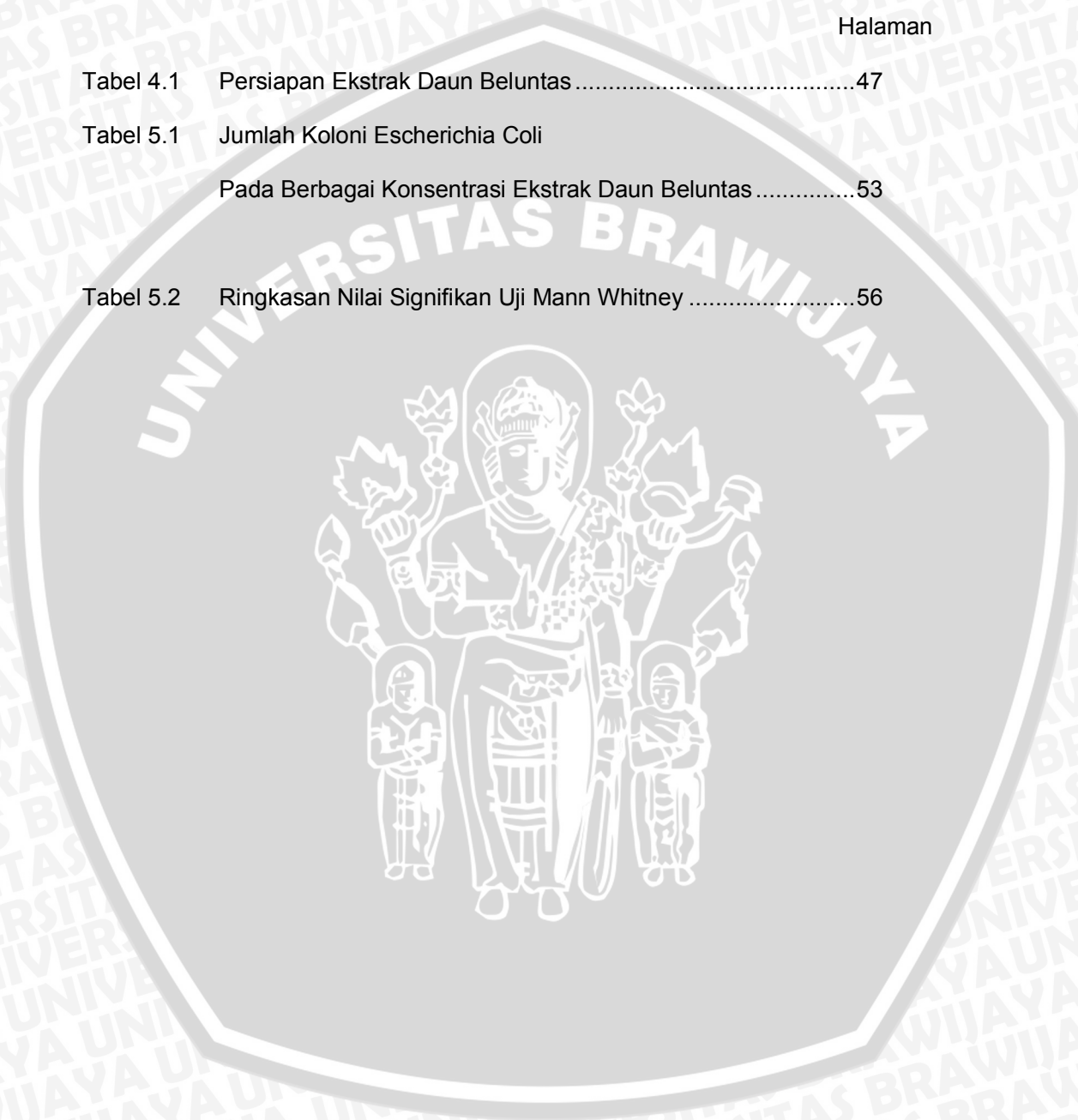
4.8.5 Alur Kerja Penelitian	48
4.9 Analisis Data	49
BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA	
5.1 Data Hasil Penelitian	50
5.1.1 Identifikasi Escherichia Coli	50
5.1.2 Hasil Penentuan KHM	51
5.1.3 Hasil Penentuan KBM	53
5.2 Analisa Data	55
BAB 6 PEMBAHASAN	
6.1 Pembahasan Hasil Penelitian	58
6.2 Implikasi Terhadap Bidang Kedokteran	61
6.3 Keterbatasan Penelitian	63
BAB 7 PENUTUP	
7.1 Kesimpulan	66
7.2 Saran	67
Daftar Pustaka	68
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	73
LAMPIRAN	74

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Batang Tanaman Beluntas	6
Gambar 2.2 Daun Tanaman Beluntas	7
Gambar 2.3 Bunga Tanaman Beluntas	8
Gambar 2.4 Koloni <i>Escherichia coli</i>	22
Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian	33
Gambar 4.1 Skema Alur Uji Antimikroba Ekstrak Daun Daun Beluntas terhadap <i>Escherichia Coli</i>	48
Gambar 5.1 <i>Escherichia Coli</i> Dengan Pengecatan Gram	50
Gambar 5.2 Hasil Scan Microbat Test	51
Gambar 5.3 Dilusi Tabung Dengan Beberapa Konsentrasi Ekstrak Daun Beluntas	52
Gambar 5.4 Hasil Streaking <i>Escherichia Coli</i> Pada Medium NAP	54
Gambar 5.5 Kurva Regresi Linier Jumlah Koloni	55

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 Persiapan Ekstrak Daun Beluntas	47
Tabel 5.1 Jumlah Koloni Escherichia Coli Pada Berbagai Konsentrasi Ekstrak Daun Beluntas	53
Tabel 5.2 Ringkasan Nilai Signifikan Uji Mann Whitney	56



DAFTAR SINGKATAN

EAEC : *Enterogregative Eschericia coli*

EHEC : *Enterohemorhigic Eschericia coli*

EIEC : *Enteroinvasive Eschericia coli*

EPEC : *Enterophatogenic Eschericia coli*

ETEC : *Enterotoxigenic Eschericia coli*

KBM : Kadar Bunuh Minimal

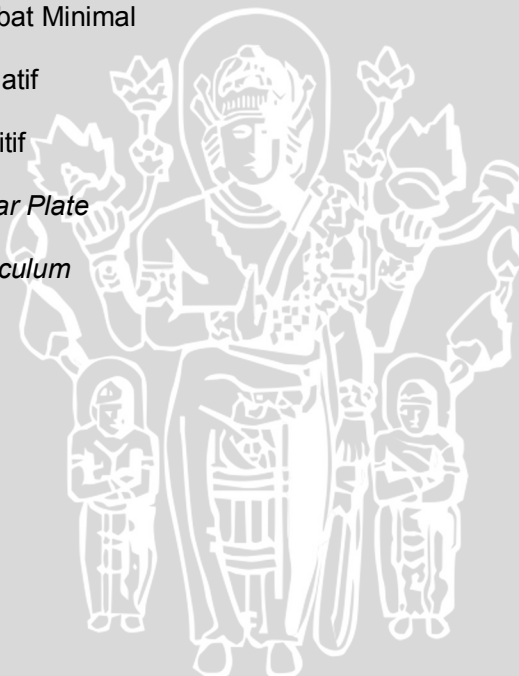
KHM : Kadar Hambat Minimal

KN : Kontrol Negatif

KP : Kontrol Positif

NAP : *Natrium Agar Plate*

OI : *Original Inoculum*



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Penelitian Pendahuluan	90
Lampiran 2. Kebun Pisang Sukoanyar, Wajak	91
Lampiran 3. Uji Normalitas dan Homogenitas	92
Lampiran 4. Uji Beda Non Parametrik Kruskal Wallis	94
Lampiran 5. Uji Multi Komparasi Non Parametrik Mann Whitney	95
Lampiran 6. Uji Korelasi Non Parametrik Spearman	103
Lampiran 7. Uji Regresi Linier	104



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Dewasa ini kita seringkali menjumpai penyakit yang disebabkan oleh infeksi bakteri. Penyakit-penyakit yang disebabkan oleh infeksi bakteri mudah sekali menular dari satu penderita ke orang lain yang sehat maupun yang sedang sakit. Penyakit infeksi masih menempati urutan teratas penyebab masalah kesehatan di negara-negara berkembang termasuk Indonesia. Infeksi merupakan masalah penting bagi dunia kesehatan karena angka morbiditas dan mortalitasnya masih terbilang tinggi. Dari sekian banyak penyakit infeksi, diare merupakan penyebab morbiditas dan mortalitas tinggi dikalangan semua usia pada negara-negara berkembang khususnya Asia Tenggara. Kasus diare mencapai 1 milyar dan mortalitas sebanyak 5 juta pertahun pada anak usia di bawah 5 tahun. Sebanyak 80% anak meninggal karena diare pada 2 tahun pertama usia mereka (Carlos and Saniel, 2006). Di Indonesia, angka mortalitas berkisar antara 1-18 per 1000 pada anak usia kurang dari lima tahun dan mortalitas tertinggi dilaporkan pada anak usia kurang dari satu tahun. Oleh sebab itu, kasus diare di Indonesia menempati urutan ketiga penyebab morbiditas dan mortalitas pada bayi dan balita (Lee *et al.*, 2007).

Diare bisa disebabkan oleh bakteri, virus dan parasit melalui produksi toksin dan invasi jaringan oleh mikroorganismenya tersebut. Salah satu etiologi diare oleh bakteri adalah *Escherichia coli* (*E.coli*) yang merupakan flora normal saluran cerna manusia. *E.coli* termasuk dalam famili enterobacteriaceae genus *escherichia* yang memainkan peranan penting dalam penyakit gastrointestinal

(diare). *Escherichia coli* diklasifikasikan berdasarkan sifat karakteristik dari virulensinya, diantaranya adalah *Enteropatogenik E.coli* (EPEC) yang menyebabkan diare pada bayi baru lahir khususnya di negara-negara berkembang, *Enterotoxigenic E.coli* (ETEC) merupakan etiologi umum *travellers' diarrhea*, *Enterohemorrhgic E.coli* (EHEC), *Enteroinvasive E.coli* (EIEC) menyebabkan penyakit yang serupa dengan shigellosis dan *Enteroadgregative E.coli* (EAEC) penyebab diare akut dan kronis (Brooks *et al.*, 2004; Carlos and Saniel, 2006). Setiap kelompok tersebut dapat menyebabkan penyakit dengan mekanisme yang berbeda (Jawetz *et al.*, 2007). Definisi dari diare sendiri adalah frekuensi pengeluaran dan kekentalan feses yang tidak normal. Diare oleh *E.coli* biasanya terbagi menjadi tiga jenis, yaitu enteritis akut, *dysentery-like disease* (feses bercampur lendir dan darah), dan kolitis hemoragik atau *bloody diarrhea* (Dorland, 2002; Greenwood *et al.*, 1992).

Pengobatan diare baik oleh bakteri, virus, dan parasit dilakukan dengan pemberian antibiotik. Namun, saat ini resistensi mikroba terhadap antibiotik semakin meningkat. Banyak alasan yang dapat menimbulkan resistensi terhadap antibiotik, seperti pada mereka yang sering mengonsumsi antibiotik sebelumnya (konsumsi berlebihan), penggunaan dengan dosis yang tidak tepat atau tidak menyelesaikan pengobatan hingga tuntas. *E.coli* yang sebelumnya dikenal sebagai patogen yang sensitif terhadap antibiotik, mulai mengalami resistensi sejak lebih dari satu dekade ini (Kuntaman *et al.*, 2005).

Dengan adanya resistensi terhadap beberapa jenis antibiotik tertentu, angka morbiditas dan mortalitas juga turut meningkat. Menanggapi hal tersebut, maka perlu dikembangkan pengobatan alternatif tanpa menggunakan kandungan

kimiawi dalam antibiotik, tetapi memanfaatkan bahan aktif yang terkandung dalam

tanaman (bahan alam). Produk yang terbuat dari bahan-bahan alam ternyata telah menjadi alternatif utama dalam pengobatan berbagai penyakit dan sekitar 80% masyarakat di negara berkembang masih menggunakan obat-obat tradisional sebagai terapi (Verma and Singh, 2008).

Berdasarkan beberapa informasi diatas, maka dilakukan penelitian untuk mengetahui apakah ekstrak daun beluntas yang tumbuh di Indonesia memiliki efek antimikroba terhadap *Escherichia coli*. Sehingga nantinya dapat digunakan sebagai alternatif pengobatan untuk penyakit infeksi yang mudah dan aman yang ditimbulkan oleh bakteri *Escherichia coli*.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah ekstrak ethanol daun beluntas memiliki efek sebagai antimikroba terhadap bakteri *Escherichia coli* secara in vitro?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui ekstrak ethanol daun beluntas memiliki efek sebagai antimikroba terhadap bakteri *Escherichia coli* secara in vitro.

1.3.2 Tujuan Khusus

1.3.2.1 Untuk mengetahui Kadar Hambat Minimal (KHM) ekstrak ethanol daun beluntas terhadap bakteri *Escherichia coli*.

1.3.2.2 Untuk mengetahui Kadar Bunuh Minimal (KBM) ekstrak ethanol daun beluntas terhadap *Escherichia coli*.

1.3.2.3 Untuk mengetahui hubungan antara konsentrasi ekstrak ethanol daun beluntas dengan pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* secara in vitro.

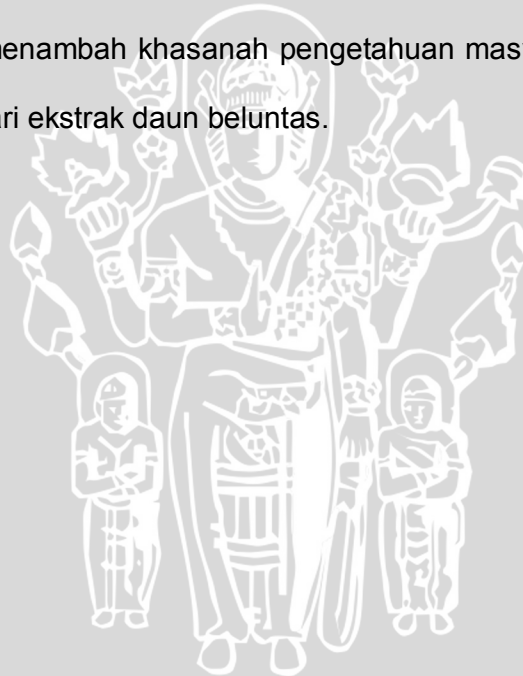
1.4 Manfaat

1.4.1 Akademis

Sebagai tambahan wawasan untuk lebih mendukung adanya perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi di bidang kedokteran terutama yg berhubungan dengan aspek mikrobiologi.

1.4.2 Praktis

Untuk menambah khasanah pengetahuan masyarakat tentang kegunaan dari ekstrak daun beluntas.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Beluntas (*Pluchea indica*)

2.1.1 Asal Usul Beluntas

Asal dan penyebaran geografis *Pluchea indica* diawali dari India ke Cina bagian selatan, melewati Indo-Cina, Thailand, Malaysia, Indonesia dan Filipina, ke Australia (termasuk pulau Christmas) dan Pulau pasifik (termasuk Hawaii) (Dalimartha, 2003).

Salah satu tanaman yang telah lama dikenal oleh masyarakat Indonesia sejak dahulu, yaitu tanaman beluntas (*Pluchea indica*) yang memiliki nama daerah: **beluntas** (Melayu), **baluntas**, **baruntas** (Sunda), **luntas** (Jawa), **baluntas** (Madura), **lamutasa** (Makasar), **lenabou** (Timor), sedangkan nama asing untuk tanaman beluntas adalah **Luan Yi** (Cina), **Phatpai** (Vietnam), dan **Marsh fleabane** (Inggris). Tanaman ini sering digunakan sebagai tanaman pagar di halaman rumah penduduk. Pada masyarakat daun beluntas secara tradisional digunakan sebagai penurun demam (*antipiretik*), meningkatkan nafsu makan (*stomakik*), peluruh keringat (*diaforetik*), dan penyegar (Dalimartha, 2003). Khasiat daun beluntas diduga diperoleh dari beberapa kandungan kimia seperti alkaloid, minyak atsiri, dan flavonoid (Traithip, 2005).

2.1.2 Morfologi Beluntas

Morfologi tanaman beluntas adalah sebagai berikut:

1. Habitus

Beluntas adalah tanaman semak, tumbuh tegak, umumnya tumbuhan ini ditanam sebagai tanaman pagar atau bahkan tumbuh liar. Tingginya dapat mencapai 2 m atau lebih. Beluntas dapat tumbuh di daerah kering pada tanah yang keras dan berbatu, pada daerah dataran rendah hingga dataran tinggi pada ketinggian 1000 meter dari permukaan laut, memerlukan cukup cahaya matahari atau sedikit naungan, dan perbanyakannya dapat dilakukan dengan setek batang pada batang yang cukup tua (Pujowati, 2006).

2. Batang

Batang berambut halus, berkayu, bulat, tegak, bercabang, masih muda ungu setelah tua putih kotor (Pujowati, 2006).



Gambar 2.1 Batang Beluntas

3. Daun

Daun bertangkai pendek atau daun duduk, letaknya berseling, bentuk bundar seperti telur sungsang, dan pangkal memita. Ujung daun bundar, tepi bergerigi sampai bergigi. Daun berwarna hijau terang dan berkelenjar.

Panjang daun 2,5-9 cm dan lebar 1-5,5 cm. Bila daun diremas, berbau harum (Dalimartha, 2005).



Gambar 2.2 Daun Beluntas

4. Bunga

Pembungaan terdiri dari banyak bongkol pada terminal hemisferikal atau gundungan aksiler (ketiak) atau ,malai, lebih atau kurang padat, lebar 2,5-12,5 cm; gagang pendek, daun pembalut 6-7-seriate, bagian luar bundar telur, berambut, bagian luar melanset, mengkilap, berambut getar di ujung, rontok bersama dengan buah longkah yang masak, bongkol hampir berbentuk tabung, persis 7 mm. Bentuk seluruh bunga tabung, bunga di tepi merupakan bunga betina, panjang mahkota 3,5-5 mm, bunga yang berada di tengah 2-6, biseksual tapi dengan sari yang fungsional, mahkota membenang, panjang 4-6 mm, bunganya mirip bungur (lilac) atau lembayung pucat, kepala sari 5; bakal buah terbenam, lengan tangkai putik panjang, masuk. Bunga majemuk, bentuk malai rata, mahkota lepas, putik bentuk jarum, panjang \pm 6 mm, hitam kecoklatan, kepala sari ungu, kepala putik dua, putih, putih kekuningan. Bunga keluar di ujung cabang dan di ketiak daun berbentuk bunga bonggol bergagang atau duduk, warna ungu (Pujowati, 2006).



Gambar 2.3 Bunga Beluntas

5. Buah

Buah beluntas kecil, keras berbentuk seperti gasing, warnanya coklat dengan sudut-sudut putih, dan lokos (gundul atau licin). Panjang buah 1 mm.

6. Biji

Kecil, coklat keputih-putihan.

7. Akar

Tunggang, bercabang, putih kotor (Pujowati, 2006).

2.1.3 Klasifikasi Beluntas

Berdasarkan kunci determinasi tumbuhan beluntas dikelompokkan seperti di bawah ini:

Kingdom : *Plantae*

Super Divisi : *Spermatophyta*

Divisi : *Magnoliophyta*

Kelas : *Magnoliopsida*

Sub Kelas : *Asteridae*

Ordo : Asterales

Famili : Asteraceae

Genus : Pluchea

Spesies : Pluchea indica

(Dalimartha, 2005)

2.1.4 Kandungan Aktif Beluntas

Beluntas secara luas telah dipercaya memiliki daya penyembuh. Meskipun seluruh bagian tanaman ini mulai dari akar, umbi, batang hingga daunnya berkhasiat, bagian yang paling banyak digunakan dalam pengobatan adalah daunnya.

Daun beluntas mengandung senyawa-senyawa aktif, yaitu saponin, polivenol, alkaloid, flavonoid, tannin (polifenolat), minyak atsiri (terpenoid) (Hariani 2006; Ardiansyah dkk, 2003). Sedangkan akarnya mengandung flavonoid dan tannin (Setiawan, 1999).

2.1.4.1 Alkaloid

Alkaloid adalah sebuah golongan senyawa basa berritrogen yang kebanyakan heterosiklik dan terdapat di tetumbuhan (tetapi ini tidak mengecualikan senyawa yang berasal dari hewan). Asam amino, peptida, protein, nukleotid, asam nukleik, gula amino dan antibiotik biasanya tidak digolongkan sebagai alkaloid. Dan dengan prinsip yang sama, senyawa netral yang secara biogenetik berhubungan dengan alkaloid termasuk digolongkan ini (Lanova, 2008).

Sifat-sifat alkaloid adalah:

1. Mengandung atom nitrogen yang umumnya berasal dari asam amino dan golongan heterogen
2. Umumnya berupa kristal atau serbuk amorf.
3. Alkaloid yang berbentuk cair yaitu konini, nikotin dan spartein
4. Dalam tumbuhan berada dalam bentuk bebas, dalam bentuk N-oksida atau dalam bentuk garamnya
5. Umumnya mempunyai rasa yang pahit
6. Sering beracun
7. Bersifat optis aktif dan berupa sistim siklik,
8. Alkaloid dalam bentuk bebas tidak larut dalam air, tetapi larut dalam kloroform, eter dan pelarut organik lainnya yang bersifat relative nonpolar
9. Alkaloid dalam bentuk garamnya mudah larut dalam air
10. Alkaloid bebas bersifat basa karena adanya pasangan elektron bebas pada atom N-nya
11. Biasanya banyak digunakan dibidang farmasi
12. Sampel yang mengandung alkaloid setelah drx akan berwarna merah.

Berdasarkan atas sifat kimiawinya, Kebanyakan alkaloid bersifat basa. Sifat tersebut tergantung pada adanya pasangan elektron pada nitrogen. Jika gugus fungsional yang berdekatan dengan nitrogen bersifat melepaskan elektron, sebagai contoh; gugus alkil, maka ketersediaan elektron pada nitrogen naik dan senyawa lebih bersifat basa. Hingga trietilamin lebih basa daripada dietilamin dan senyawa dietilamin lebih basa daripada etilamin. Sebaliknya, bila gugus fungsional yang berdekatan bersifat menarik elektron (contoh; gugus karbonil), maka ketersediaan pasangan elektron berkurang dan pengaruh yang

ditimbulkan alkaloid dapat bersifat netral atau bahkan sedikit asam. Contoh ; senyawa yang mengandung gugus amida.

Kebiasaan alkaloid menyebabkan senyawa tersebut sangat mudah mengalami dekomposisi, terutama oleh panas dan sinar dengan adanya oksigen. Hasil dari reaksi ini sering berupa N-oksida. Dekomposisi alkaloid selama atau setelah isolasi dapat menimbulkan berbagai persoalan jika penyimpanan berlangsung dalam waktu yang lama. Pembentukan garam dengan senyawa organik (tartarat, sitrat) atau anorganik (asam hidroklorida atau sulfat) sering mencegah dekomposisi. Itulah sebabnya dalam perdagangan alkaloid lazim berada dalam bentuk garamnya.

Pada bagian yang memaparkan sejarah alkaloid, jelas kiranya bahwa alkaloid sebagai kelompok senyawa, tidak diperoleh definisi tunggal tentang alkaloid. Sistem klasifikasi yang diterima, menurut Hegnauer, alkaloid dikelompokkan sebagai:

1. Alkaloid Sesungguhnya

Alkaloid sesungguhnya adalah racun, senyawa tersebut menunjukkan aktivitas fisiologi yang luas, hampir tanpa terkecuali bersifat basa, lazim mengandung nitrogen dalam cincin heterosiklik, diturunkan dari asam amino, biasanya terdapat "aturan" tersebut adalah kolkhisin dan asam aristolokhat yang bersifat bukan basa dan tidak memiliki cincin heterosiklik dan alkaloid quartener, yang bersifat agak asam daripada bersifat basa.

2. Protoalkaloid

Protoalkaloid merupakan amin yang relatif sederhana dimana nitrogen dan asam amino tidak terdapat dalam cincin heterosiklik. Protoalkaloid diperoleh berdasarkan biosintesis dari asam amino yang bersifat basa. Pengertian

"amin biologis" sering digunakan untuk kelompok ini. Contohnya *meskalin*, *ephedin*, dan *N,N-dimetiltriptamin*.

3. Pseudoalkaloid

Pseudoalkaloid tidak diturunkan dari prekursor asam amino. Senyawa biasanya bersifat basa. Ada dua seri alkaloid yang penting dalam khas ini, yaitu alkaloid steroidal, contoh: *konessin* dan *purin* (*kaffein*).

Berdasarkan atom nitrogennya, alkaloid dibedakan atas:

1. Alkaloid dengan atom nitrogen heterosiklik

Dimana atom nitrogen terletak pada cincin karbonnya. Yang termasuk pada golongan ini adalah :

a. Alkaloid Piridin-Piperidin

Mempunyai satu cincin karbon mengandung 1 atom nitrogen. Yang termasuk dalam kelas ini adalah *Conium maculatum* dari famili *Apiaceae* dan *Nicotiana tabacum* dari famili *Solanaceae*.

b. Alkaloid Tropan

Mengandung satu atom nitrogen dengan gugus metilnya (N-CH₃). Alkaloid ini dapat mempengaruhi sistem saraf pusat termasuk yang ada pada otak maupun sun-sum tulang belakang. Yang termasuk dalam kelas ini adalah *Atropa belladonna* yang digunakan sebagai tetes mata untuk melebarkan pupil mata, berasal dari famili *Solanaceae*, *Hyoscyamus niger*, *Dubuisia hopwoodii*, *Datura* dan *Brugmansia spp.*, *Mandragora officinarum*, Alkaloid Kokain dari *Erythroxylum coca* (famili *Erythroxylaceae*).

c. Alkaloid Quinolin

Mempunyai 2 cincin karbon dengan 1 atom nitrogen. Yang termasuk disini adalah *Cinchona ledgeriana* dari famili *Rubiaceae*, *alkaloid quinin* yang toxic terhadap *Plasmodium vivax*.

d. Alkaloid Isoquinolin

Mempunyai 2 cincin karbon mengandung 1 atom nitrogen. Banyak ditemukan pada famili *Fabaceae* termasuk *Lupines (Lupinus spp)*, *Spartium junceum*, *Cytisus scoparius* dan *Sophora secundiflora*.

e. Alkaloid Indol

Mempunyai 2 cincin karbon dengan 1 cincin indol . Ditemukan pada alkaloid ergine dan psilocybin, alkaloid reserpin dari *Rauvolfia serpentine*, alkaloid vinblastin dan vinkristin dari *Catharanthus roseus* famili *Apocynaceae* yang sangat efektif pada pengobatan kemoterapy untuk penyakit leukimia dan hodgkin.

f. Alkaloid Imidazol

Berupa cincin karbon mengandung 2 atom nitrogen. Alkaloid ini ditemukan pada famili *Rutaceae*, Contohnya *Jaborandi paragua*.

g. Alkaloid Lupinan

Mempunyai 2 cincin karbon dengan 1 atom N, alkaloid ini ditemukan pada *Lunpinus luteus* (famili *Leguminocaea*).

h. Alkaloid Steroid

Mengandung 2 cincin karbon dengan 1 atom nitrogen dan 1 rangka steroid yang mengandung 4 cincin karbon. Banyak ditemukan pada famili *Solanaceae*, *Zigadenus venenosus*.

i. Alkaloid Amina

Golongan ini tidak mengandung N heterosiklik. Banyak yang merupakan turunan sederhana dari feniletamin dan senyawa-senyawa turunan dari asam amino fenilalanin atau tirosin, alkaloid ini ditemukan pada tumbuhan *Ephedra sinica* (famili *Gnetaceae*)

j. Alkaloid Purin

Mempunyai 2 cincin karbon dengan 4 atom nitrogen. Banyak ditemukan pada kopi (*Coffea arabica*) famili *Rubiaceae*, dan teh (*Camellia sinensis*) dari famili *Theaceae*, *Ilex paraguariensis* dari famili *Aquifoliaceae*, *Paullonia cupana* dari famili *Sapindaceae*, *Cola nitida* dari famili *Sterculiaceae* dan *Theobroma cacao*.

2. Alkaloid tanpa atom nitrogen yang heterosilik.

Dimana atom nitrogen tidak terletak pada cincin karbon tetapi pada salah satu atom karbon pada rantai samping. Yang termasuk pada golongan ini adalah :

a. Alkaloid Efedrin (alkaloid amine)

Mengandung 1 atau lebih cincin karbon dengan atom Nitrogen pada salah satu atom karbon pada rantai samping. Termasuk *Mescaline* dari *Lophophora williamsii*, *Trichocereus pachanoi*, *Sophora secundiflora*, *Agave americana*, *Agave atrovirens*, *Ephedra sinica*, *Cholchicum autumnale*.

b. Alkaloid Capsaicin

Dari *Chile peppers*, genus *Capsicum*. Yaitu *Capsicum pubescens*, *Capsicum baccatum*, *Capsicum annum*, *Capsicum frutescens*, *Capsicum chinense*.

2.1.4.2 Flavonoid

Adalah suatu kelompok senyawa fenol yang terbanyak terdapat di alam. Senyawa-senyawa ini bertanggung jawab terhadap zat warna merah, ungu, biru, dan sebagian zat warna kuning dalam tumbuhan (Leny, 2006). Flavonoid dapat ditemukan dalam sel tumbuhan yang berfotosintesis, pada umumnya terdapat dalam buah-buahan, sayuran, kacang, biji-bijian, teh, dan madu. Fungsi flavonoid pada bunga untuk memberikan warna yang menarik, pada daun atau kulit buah sebagai pertahanan terhadap patogen seperti jamur dan sinar matahari. Senyawa ini juga berperan dalam fotosintesis, transfer energi, mengaktifkan hormon pertumbuhan dan meregulasi pertumbuhan tanaman (Tim and Andrew, 2005). Flavonoid terdiri atas 6 subfamili, antara lain: flavon, isoflavon, flavanon, flavonol, antosianin, dan *chalcone*, namun kandungan yang terbanyak dalam tumbuhan adalah isoflavon (Michalak, 2006).

Flavonoid dalam tumbuhan mempunyai empat fungsi :

- 1) Sebagai pigmen warna,
- 2) Fungsi fisiologi dan patologi
- 3) Aktivitas Farmakologi, dan
- 4) Flavonoid dalam makanan.

Aktivitas Farmakologi dianggap berasal dari rutin (glikosida flavonol) yang digunakan untuk menguatkan susunan kapiler, menurunkan permeabilitas dan fragilitas pembuluh darah, dll.

Flavonoid mempunyai macam efek, yaitu efek antitumor, anti HIV, immunostimulant, antioksidan, analgesik, antiradang (antiinflamasi), antivirus, antifungal, antidiare, antihepatotoksik, antihiperlikemik, dan sebagai vasodilator (de Padua *et al.*, 1999).

Di dalam flavonoid mengandung suatu senyawa fenol. Fenol merupakan suatu alkohol yang bersifat asam sehingga disebut juga asam karbolat yang berfungsi sebagai antibakteri dengan cara membentuk senyawa kompleks terhadap protein ekstraseluler yang mengganggu integritas membran sel bakteri. Senyawa flavonoid diduga mekanisme kerjanya adalah mendenaturasi protein sel bakteri dan merusak membran sel bakteri tanpa dapat diperbaiki lagi (Arsyi, 2008). Pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dapat terganggu disebabkan adanya suatu senyawa fenol yang terkandung dalam ekstrak etanol daun beluntas (Purnomo, 2001). Semakin lipofilik suatu flavonoid, maka semakin kuat daya rusak flavonoid tersebut terhadap membran sitoplasma kuman (Rahayu, 2000).

Mekanisme flavonoid, khususnya isoflavon sebagai antimikroba adalah dengan cara menurunkan kekentalan membran sel di dalam dan luar sehingga fungsi membran sitoplasma terganggu serta menghambat metabolisme energi yang mengakibatkan terganggunya sintesis DNA, RNA, protein, dan dinding sel. Semua mekanisme tersebut mengakibatkan matinya bakteri-bakteri patogen (Lewis, *et al.*, 1999; Tim and Andrew, 2005).

2.1.4.3 Saponin

Saponin adalah senyawa yang bersifat larut air. Senyawa ini terdiri dari kombinasi antara hidrofobik triterpene dengan glukosa hidrofilik sehingga mempunyai kemampuan sebagai deterjen. Sifat ini dapat merusak membran sel bakteri secara utuh (Harborne, 1996).

Sifat-sifat Saponin adalah: 1) Mempunyai rasa pahit, 2) Dalam larutan air membentuk busa yang stabil, 3) Menghemolisa eritrosit, 4) Merupakan racun kuat untuk ikan dan amfibi, 5) Membentuk persenyawaan dengan kolesterol dan

hidroksisteroid lainnya, 6) Sulit untuk dimurnikan dan diidentifikasi, 7) Berat molekul relatif tinggi, dan analisis hanya menghasilkan formula empiris yang mendekati (Cermin Dunia Kedokteran, 1989).

Berdasarkan atas sifat kimiawinya, saponin dapat dibagi dalam dua kelompok: 1) Steroids dengan 27 atom C, 2) Triterpenoids, dengan 30 atom C. Macam-macam saponin berbeda sekali komposisi kimiawinya, yaitu berbeda pada aglikon (sapogenin) dan juga karbohidratnya, sehingga tumbuh-tumbuhan tertentu dapat mempunyai macam-macam saponin yang berlainan, seperti:

- *Quillage saponin* : campuran dari 3 atau 4 saponin
- *Alfalfa saponin* : campuran dari paling sedikit 5 saponin
- *Soy bean saponin* : terdiri dari 5 fraksi yang berbeda dalam sapogenin, atau karbohidratnya, atau dalam kedua-duanya.

Ikan yang mati karena racun saponin, tidak toksik untuk manusia bila dimakan. Tidak toksiknya untuk manusia dapat diketahui dari minuman seperti bir yang busanya disebabkan oleh saponin (Cermin Dunia Kedokteran, 1989).

Senyawa saponin dapat bekerja sebagai antibakteri. Senyawa ini akan merusak membrane sitoplasma dan membunuh sel bakteri.

2.1.4.4 Tanin

Tanin merupakan salah satu senyawa kimiawi yang termasuk dalam golongan polifenol yang diduga dapat mengikat salah satu protein yang dimiliki oleh bakteri yaitu adhesin dan apabila hal ini terjadi maka dapat merusak ketersediaan reseptor pada permukaan sel bakteri. Tanin juga telah dibuktikan dapat membentuk kompleks senyawa yang irreversibel dengan prolin, suatu protein lengkap, yang mana ikatan ini mempunyai efek penghambatan sintesis protein untuk pembentukan dinding sel (Agnol *et.al.*, 2003).

Kandungan tanin sangat banyak pada kulit kayu, buah, daun, akar, dan kulit buah. Tanin didapat dalam bentuk amorf, kuning atau masa coklat seperti bubuk, serpihan, atau sponge. Tanin biasanya banyak ditemui di kulit kayu pada pohon, dan bertindak sebagai barier terhadap mikroorganisme seperti bakteri dan jamur, sehingga melindungi pohon itu. Tanin terdiri dari sembilan molekul *asam galat* dan molekul *glukosa*. Tanin juga dapat melindungi kulit dengan cara mengikat protein menjadi tahan terhadap enzim proteolitik (Nenden S *et.al.*, 2007).

Polifenol yang terdiri atas tanin, flavonoid dan asam fenolat merupakan komponen yang paling menonjol dalam kaitannya dengan aktivitas antibakteri. Tanin memiliki aktivitas antibakteri, secara garis besar mekanisme yang diperkirakan adalah sebagai berikut : toksisitas tanin dapat merusak membran sel bakteri, senyawa astringent tanin dapat menginduksi pembentukan kompleks senyawa ikatan terhadap enzim atau substrat bakteri dan pembentukan suatu kompleks ikatan tanin terhadap ion logam yang dapat menambah daya toksisitas tanin itu sendiri (Akiyama *et al.*, 2001; Alnicolsa, 2003).

Dalam dunia medis, tannin memiliki banyak manfaat diantaranya berperan dalam meringankan cedera oksidatif renal dan hepar (*arsenic-induced toxicity*, khususnya tannin yang terkandung dalam teh hijau), tannin, khususnya *condensed* tannin berperan dalam melawan penyakit infeksi yang disebabkan oleh mikroba/antimikroba (Min *et al.*, 2008; Chandronita *et al.*, 2010).

Tanin menyebabkan denaturasi protein dengan membentuk kompleks dengan protein melalui kekuatan nonspesifik seperti ikatan hidrogen dan efek hidrofobik, sebagaimana pembentukan ikatan kovalen, menginaktifkan adhesi

kuman (molekul untuk menempel pada sel inang), menstimulasi sel-sel fagosit yang berperan dalam respon imun selular (Asti, 2009)

Banyak aktivitas fisiologis manusia, seperti stimulasi sel-sel fagositik, peran pejamu dalam aktivitas tumor, dan sejumlah aktivitas anti infeksi telah ditetapkan untuk tanin. Salah satunya aksi molekul mereka adalah membentuk kompleks dengan protein melalui kekuatan nonspesifik seperti ikatan hidrogen dan efek hidrofobik sebagaimana pembentukan ikatan kovalen. Cara kerja anti bakteri mungkin juga berhubungan dengan kemampuan tanin untuk menginaktivasi adhesin bakteri (molekul untuk menempel pada sel inang) yang terdapat pada permukaan sel, enzim yang terikat pada membran sel, *protein transport cell envelope*. Tanin juga membentuk kompleks dengan polisakarida (Asti, 2009).

Sementara menurut Ajizah (2004), tanin diduga dapat mengkerutkan dinding sel atau membran sel sehingga mengganggu permeabilitas sel itu sendiri. Akibat terganggunya permeabilitas, sel tidak dapat melakukan aktivitas hidup sehingga pertumbuhannya terhambat atau bahkan mati. Polifenol yang terdiri atas tanin, flavonoid dan asam fenolat merupakan komponen yang paling menonjol dalam kaitannya dengan aktivitas antibakteri. Tanin mempunyai daya antibakteri dengan cara mempresipitasi protein, karena diduga tanin mempunyai efek yang sama dengan senyawa fenolik. Efek antibakteri tanin antara lain melalui: reaksi dengan membran sel, inaktivasi enzim, dan destruksi atau inaktivasi fungsi materi genetik.

2.2 *Escherichia coli*

2.2.1 Epidemiologi

Escherichia coli adalah bakteri yang bertempat tinggal sebagai normal flora di usus besar manusia, hewan, dan insekta. Selain tentunya dapat dengan mudah dijumpai di tanah, air, sampah (Dzen *dkk.*, 2003). Sehingga penyebaran dari bakteri ini sangat luas dan dapat dengan mudah sekali menular. *Escherichia coli* juga sering dimanfaatkan dalam bidang penelitian molekular sebagai vektor untuk menyisipkan gen-gen tertentu, terkait dengan pertumbuhan yang sangat cepat dan penanganannya yang relatif mudah.

E.coli adalah spesies bakteri yang sering diisolasi dari spesimen klinik, lebih sering digunakan sebagai objek dalam penelitian ilmiah dibandingkan dengan mikroorganisme lainnya, juga telah digunakan sebagai organisme indikator dalam menilai kualitas air. Organisme ini merupakan penghuni utama usus besar dan merupakan isolat penyebab utama infeksi saluran kemih dan luka infeksi, pneumonia, meningitis dan septicemia. Penelitian-penelitian baru menyatakan bahwa galur tertentu dari *E.coli* juga merupakan patogen intestinal dan menyebabkan berbagai penyakit gastrointestinal (Power *et al.*, 2005; Greenwood, 1992).

Menurut yalun (2008), kita mungkin banyak yang tidak tahu jika di usus besar manusia terkandung sejumlah *E. coli* yang berfungsi membusukkan sisa-sisa makanan. Dari sekian ratus strain *E. coli* yang teridentifikasi, hanya sebagian kecil bersifat pathogen, misalnya strain O157:H7. Bakteri yang namanya berasal dari sang penemu Theodor Escherich yang menemukannya di tahun 1885 ini merupakan jenis bakteri yang menjadi salah satu tulang punggung dunia bioteknologi. Hampir semua rekayasa genetika di dunia bioteknologi selalu

melibatkan *E. coli* akibat genetiknya yang sederhana dan mudah untuk direkayasa. Riset di *E. coli* menjadi model untuk aplikasi ke bakteri jenis lainnya. Bakteri ini juga merupakan media cloning yang paling sering dipakai. Teknik recombinant DNA tidak akan ada tanpa bantuan bakteri ini.

2.2.2 Morfologi dan identifikasi

Secara morfologi, bakteri ini berbentuk batang (basil), berukuran kecil (0,5x3,0mm), umumnya hidup pada rentang 20-40 derajat C, optimum pada 37 derajat C (Greenwood, 1992; Rahayu, 2000).

bersifat gram negatif dan tidak membentuk spora. Bersifat motil karena memiliki flagella yang peritrikus (terletak di seluruh permukaan tubuh), hal ini akan membedakan bakteri ini dengan bakteri dari keluarga *Pseudomonadaceae* dan *Vibrionaceae* yang memiliki flagella polar (Dzen dkk., 2003). Berdasarkan sifat-sifatnya bakteri *Escherichia coli* ini termasuk dalam keluarga *Enterobacteriaceae*.

Memiliki fimbria atau pili yang bertanggung jawab pada perlekatan antar bakteri, perlekatan antar sel hospes dan bakteriofaga. Dinding sel terdiri atas murein, lipoprotein, fosfolipid, protein, dan lipopolisakarida (LPS), semuanya tersusun menjadi lapisan-lapisan. Lapisan murein-lipoprotein merupakan 20% dari dinding sel dan bertanggung jawab pada rigiditas seluler. Sisanya 80% berkaitan dengan lipid dari lipoprotein untuk membentuk *lipid bilayer*. LPS mengandung rantai polisakarida khusus yang menentukan antigenitas dari berbagai spesies dan bertanggung jawab pada aktifitas endotoksik (Elena *et al.*, 2005; Dzen, dkk., 2003).

Bakteri *Escherichia coli* termasuk bakteri yang berbentuk batang, gram negatif, fakultatif anaerob, dan tak mampu membentuk spora (Hendri, 2006).

Klasifikasi bakteri *Escherichia coli* adalah sebagai berikut:

Filum : *Proteobacteria*

Kelas : *Gamma Proteobacteria*

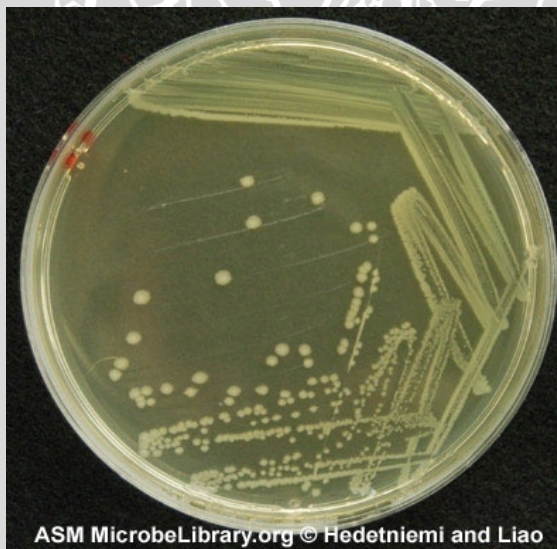
Ordo : *Enterobacteriales*

Familia : *Enterobacteriaceae*

Genus : *Escherichia*

Spesies : *Escherichia coli*

Bakteri gram negatif mengandung lipid, lemak, atau substansi seperti lemak dalam persentase lebih tinggi (11–12 %) daripada yang dikandung bakteri gram positif. Sedangkan struktur dinding sel bakteri gram negatif lebih tipis (10–15 nm) dan berlapis tiga (multi) dari pada struktur dinding sel bakteri gram positif. Lapisan peptidoglikan dinding sel bakteri gram negatif.



Gambar 2.4 *Escherichia coli* pada media Eosin Methylen Blue (EMB)
(Gunasekera and Paliy, 2007)

2.2.3 Ciri-Ciri Pertumbuhan

Escherichia coli merupakan bakteri fakultatif anaerob, kemoorganotropik, mempunyai tipe metabolisme fermentasi dan respirasi tetapi pertumbuhannya

paling sedikit banyak di bawah keadaan anaerob.pertumbuhan yang baik pada suhu optimal 37°C pada media yang mengandung 1% peptone sebagai sumber karbon dan nitrogen.

Escherichia coli merupakan bakteri gram negatif, berbentuk batang, uji indole positif dan mampu memfermentasi berbagai karbohidrat seperti glukosa, laktosa, manitol dan arabinosa.

2.2.3.1 Media Eosin Methylene Blue

Media ini mempunyai keistimewaan mengandung laktosa dan berfungsi untuk memilah bakteri yang memfermentasi laktosa seperti *Escherichia coli* dengan bakteri yang tidak memfermentasikan laktosa seperti *S. aureus*, *P. aeruginosa* dan *Salmonella*. Bakteri yang memfermentasi laktosa menghasilkan koloni dengan inti berwarna gelap dengan kilap logam, sedangkan bakteri lain yang dapat tumbuh koloninya tidak berwarna. Adanya eosin dan methylene blue membantu mempertajam perbedaan tersebut. Namun demikian jika media ini digunakan pada tahap awal, karena kuman lain juga tumbuh terutama *P.aeruginosa* dan *Salmonella sp* dapat menimbulkan keraguan. Bagaimanapun media ini sangat baik untuk mengkonfirmasi bahwa kontaminan tersebut adalah *Escherichia coli* (Dzen, dkk., 2003; Elbing and Brent, 2002).

2.2.3.2 Media MacConkey Agar

Media ini mempunyai keistimewaan memilah bakteri enterik gram negatif yang memfermentasi laktosa, karena media ini mengandung laktosa, *crystal violet* dan *neutral red bile salt*. Kemampuan *Escherichia coli* memfermentasi laktosa menyebabkan penurunan pH, sehingga mempermudah absorpsi *neutral red* untuk mengubah koloni menjadi merah bata dan *bile/* empedu diendapkan. Koloni lain (*S. aureus*, *P.aeruginosa* dan *Salmonella*), bila tumbuh tidak akan

berwarna karena tidak mampu memfermentasi laktosa. Bakteri lain yang dapat tumbuh pada

media ini antara lain *Enterobacter*; *Proteus*; *Salmonella*; *Shigella*, *Aerobacter*; *Enterococcus* (Brooks *et al.*, 2004)

2.2.3.3 Media MacConkey Broth,

Walaupun media tidak tercantum di FI-IV, sebenarnya media ini bermanfaat sekali dalam memilah *Escherichia coli* dari bakteri lain terutama *S. aureus*, *P. aeruginosa* dan *Salmonella*. Adanya Oxgall dalam media berperan dalam menghambat bakteri gram positif lain seperti *S. aureus*. Kandungan laktosa sangat penting untuk memilah *Escherichia coli* dari bakteri lain yang tidak memfermentasi laktosa, terutama *P. aeruginosa* dan *Salmonella*. Fermentasi laktosa oleh *Escherichia coli* menyebabkan pH turun. Kondisi asam akan menyebabkan *bromo cresol purple* (media berwarna ungu) berubah menjadi kuning (media berwarna kuning) dan adanya pembentukan gas yang dapat diamati pada tabung Durham. Sedangkan *Salmonella* dan *P. aeruginosa* tidak dapat mengubah warna media karena tidak memfermentasi laktosa, sedangkan bakteri lain yang mampu memfermetasi laktosa dan mempunyai ekspresi pada media seperti *Escherichia coli* adalah *Enterobacter aerogenes*. Adapun cara memilah *E. aerogenes* antara lain dengan reaksi indole. *Escherichia coli* mempunyai reaksi positif, sedang *Eaerogenes* bereaksi negatif. Dengan sifat tersebut media ini sangat baik untuk memilah *Escherichia coli* dari bakteri lain pada tahap awal terutama *P. aeruginosa*; *S. aureus* dan *Salmonella* (Suwandi, 1999).

2.2.4 Manifestasi Klinis

Bakteri *Escherichia coli* yang telah menginfeksi manusia dapat menimbulkan bermacam-macam gejala dan keluhan. Adapun beberapa manifestasi dari infeksi *Escherichia coli* yang paling sering dijumpai adalah:

1. Infeksi Saluran Kemih

Infeksi saluran kemih (ISK) adalah infeksi akibat berkembangbiaknya mikroorganisme didalam saluran kemih yang di dalam keadaan normal air kemih tidak mengandung bakteri. ISK paling banyak disebabkan oleh bakteri *Escherichia coli* dengan kejadian hampir 39,4%. (Samirah,2006). Wanita lebih sering terkena ISK karena perbedaan struktur anatomisnya, kematangan seksual, perubahan traktus urogenitalis selama kehamilan dan kelahiran, serta adanya tumor. Gejala-gejala ISK antara lain adalah poliuria, disuria, hematuria, dan piuria. Terjadinya gangguan ginjal berhubungan dengan *Escherichia coli* nefropatogenik yang memproduksi hemolisin, dan antigen K. Sedangkan pielonefritis berhubungan dengan adanya fimbria-P (Dzen dkk., 2003).

2. Diare

Diare adalah penyakit yang sering ditimbulkan oleh *Escherichia coli*. Diare didefinisikan sebagai buang air besar dengan feses yang tidak berbentuk atau cair dengan frekuensi lebih dari 3 kali dalam 24 jam (Zein, 2004). Secara garis besar ada 5 kelompok dari *Escherichia coli* yang dapat menyebabkan diare dengan gambaran klinisnya masing-masing. Berikut adalah kelompok-kelompok *Escherichia coli* yang berperan dalam diare:

a. *Escherichia coli* Enteropatogenik (EPEC)

Penyebab penting diare pada bayi, khususnya di negara berkembang. EPEC melekat pada sel mukosa yang kecil. Faktor yang diperantarai secara kromosom menimbulkan pelekatan yang kuat. Akibat dari infeksi EPEC adalah diare cair yang biasanya sembuh sendiri tetapi dapat juga kronik. Lamanya diare EPEC dapat diperpendek dengan pemberian antibiotik. Diare terjadi pada manusia, kelinci, anjing, kucing dan kuda. Seperti ETEC, EPEC juga menyebabkan diare tetapi mekanisme molekular dari kolonisasi dan etiologi adalah berbeda. EPEC sedikit fimbria, ST dan LT toksin, tetapi EPEC menggunakan adhesin yang dikenal sebagai intimin untuk mengikat inang sel usus. Sel EPEC invasive (jika memasuki sel inang) dan menyebabkan radang (Jawetz *et al.*, 2007)..

b. *Escherichia coli* Enterotoksigenik (ETEC)

Penyebab yang sering dari “diare wisatawan” dan sangat penting menyebabkan diare pada bayi di Negara berkembang. Faktor kolonisasi ETEC yang spesifik untuk menimbulkan pelekatan ETEC pada sel epitel usus kecil. Lumen usus terengang oleh cairan dan mengakibatkan hipermortilitas serta diare, dan berlangsung selama beberapa hari. Beberapa strain ETEC menghasilkan eksotosin tidak tahan panas. Profilaksis antibakteri dapat efektif tetapi bisa menimbulkan peningkatan resistensi antibiotic pada bakteri, mungkin sebaiknya tidak dianjurkan secara umum. Ketika timbul diare, pemberian antibiotic dapat secara efektif mempersingkat lamanya penyakit. Diare tanpa disertai demam ini terjadi pada manusia, babi, domba, kambing, kuda, anjing, dan sapi. ETEC menggunakan fimbrial adhesi (penonjolan dari dinding sel bakteri) untuk mengikat sel – sel enterocit di usus halus. ETEC dapat

memproduksi 2 proteinous enterotoksin: dua protein yang lebih besar, LT enterotoksin sama pada struktur dan fungsi toksin kolera hanya lebih kecil, ST enterotoksin menyebabkan akumulasi cGMP pada sel target dan elektrolit dan cairan sekresi berikutnya ke lumen usus. ETEC strains tidak invasive dan tidak tinggal pada lumen usus (Jawetz *et al.*, 2007)..

c. *Escherichia coli* Enterohemoragik (EHEC)

Menghasilkan verotoksin, dinamai sesuai efek sitotoksinya pada sel Vero, suatu sel hijau dari monyet hijau Afrika. Terdapat sedikitnya dua bentuk antigenic dari toksin. EHEC berhubungan dengan holitis hemoragik, bentuk diare yang berat dan dengan sindroma uremia hemolitik, suatu penyakit akibat gagal ginjal akut, anemia hemolitik mikroangiopatik, dan trombositopenia. Banyak kasus EHEC dapat dicegah dengan memasak daging sampai matang. Diare ini ditemukan pada manusia, sapi, dan kambing (Jawetz *et al.*, 2007). Kolitis hemoragik dan HUS merupakan komplikasi dari diare ringan yang pertama kali tampak pada anak-anak umur pra-sekolah dan penderita dewasa. Serotipe O157:H7 adalah penghasil utama verotoksin dan merupakan subtype yang paling sering ditemukan serta paling mudah diidentifikasi dari spesimen (Nelson, 2008; Philpot and Ebel, 2009).

d. *Escherichia coli* Enteroinvasif (EIEC)

Menyebabkan penyakit yang sangat mirip dengan shigellosis. Penyakit terjadi sangat mirip dengan shigellosis. Penyakit sering terjadi pada anak – anak di Negara berkembang dan para wisatawan yang menuju ke Negara tersebut. EIEC melakukan fermentasi laktosa dengan lambat dan tidak bergerak. EIEC menimbulkan penyakit melalui invasinya ke sel epitel mukosa usus. Diare ini ditemukan hanya pada manusia (Jawetz *et al.*, 2007).

e. *Escherichia coli* Enteroagregatif (EAEC)

Menyebabkan diare akut dan kronik pada masyarakat di negara berkembang. Bakteri ini ditandai dengan pola khas pelekatnya pada sel manusia. EAEC memproduksi hemolisin dan ST enterotoksin yang sama dengan ETEC (Triatmodjo,1992).

3. Sepsis

Terjadi bila pertahanan hospes tidak adekuat, *Escherichia coli* kemudian bisa masuk peredaran darah dan menyebabkan sepsis. Bayi-bayi yang baru lahir sangat peka terhadap sepsis karena *Escherichia coli* karena mereka tidak memiliki antibody IgM. Sepsis juga bisa terjadi sebagai efek sekunder dari ISK (Dzen dkk., 2003).

4. Meningitis

Escherichia coli merupakan penyebab utama meningitis pada bayi, disamping streptokokus grup B. Hampir 75% *Escherichia coli* dari kasus meningitis memiliki antigen K1. Antigen ini bisa bereaksi silang dengan polisakarida kapsuler grup B dari *Neisseria meningitidis* (Dzen dkk., 2003)

2.2.5 Penentu Patogenisitas

Escherichia coli terdiri atas beragam grup mikroorganisme yang dapat menginfeksi berbagai sistem hospes dan memproduksi sejumlah besar faktor virulensi mulai bentuk structural sampai toksin yang diekskresikan. Kepentingan relatif dari faktor-faktor ini tidak hanya pada genetik galur tertentu tetapi juga pada tempat infeksi dan kondisi hospesnya.

1. Faktor Permukaan

Sekitar 80% *E.coli* yang diisolasi dari penderita meningitis memproduksi kapsul asam polisialat (antigen K1). Kapsul K1 memiliki keunikan diantara

antigen kapsuler *E.coli*, karena kapsul ini tahan terhadap proses pembunuhan baik oleh neutrofil maupun serum normal manusia. Kapsul K1 juga bisa membantu kelangsungan hidup mikroorganisme dalam darah dan cairan spinal neonatus karena kemiripannya dengan bentuk embrionik asam polisialat dari *neural cell adhesion molecule* (NCAM).

E.coli memproduksi berbagai macam fimbria, yang dibagi menjadi dua kelompok, yaitu *mannose resistant fimbriae* dan *mannose sensitive fimbriae*. Fimbria I (sensitif manosa) disebut juga common pili karena ditemukan pada hampir semua *E.coli*, fimbria ini berperan penting pada kolonisasi dengan mengikatkan diri pada mukosa usus besar, *buccal cavity* dan vagina. Pada *mannose resistant fimbriae*, faktor-faktor perlekatan yang terlibat di permukaan lebih kompleks (adhesin), disebut fimbria tipe P karena mampu melekat pada *human P blood group antigens*.

Mannose-resistant-fimbriae dan adhesin adalah faktor perlekatan penting pada infeksi intestinal yang disebabkan *E.coli*. Fimbria CFA1 dan CFA2 menunjukkan fungsi yang sama pada ETEC, EPEC, EAEC, sedangkan VTEC memproduksi adhesin non-fimbrial. Beberapa adhesin ini merupakan protein permukaan bakteri (Oyofu *et al.*, 2001).

2. Enterotoksin

Salah satu mekanisme patogenik *E.coli* dalam menyebabkan penyakit gastrointestinal adalah dengan memproduksi berbagai macam enterotoksin, organ sasarannya adalah usus kecil, dan hasilnya berupa diare sebagai akibat pengeluaran cairan dan elektrolit. Kemampuan produksi toksin bergantung oleh adanya plasmid yang menyandi produksi toksin. Plasmid tertentu akan memproduksi *heat-labile enterotoxin* (LT) yang mirip dengan enterotoksin *Vibrio*

cholera. Selain itu, *E.coli* juga memproduksi enterotoksin yang tahan panas (ST-I dan ST-II). ST-I berikatan kuat dengan reseptor intestinal spesifik kemudian mengaktifkan guanilatsiklase pada sel mukosa intestinal, menyebabkan respon sekresi terutama menghambat absorpsi Na dan Cl oleh membran *brush border*. Mekanisme ST-II masih belum diketahui, tapi tidak melibatkan produksi siklik nukleotida (Mittehuemer *et al.*, 2010)

3. Verotoksin (shigalike toxin)

Escherichia coli yang diinfeksi oleh bakteriofaga dapat memproduksi sitotoksin yang disebut verotoksin. Disebut verotoksin karena efek sitotoksiknya yang menetap pada kultur sel dari jaringan Vero, yaitu suatu lapisan sel yang berasal dari sel ginjal kera. Ada 2 jenis verotoksin yaitu VT-1 dan VT-2. Keduanya menghambat sintesis protein pada sel eukariotik. Toksin ini berhubungan dengan tiga sindroma pada manusia yaitu diare, kolitis hemoragik, dan hemolytic uremic syndrome (HUS) (Dzen *dkk.*, 2003; Kappeli *et al.*, 2011).

2.3 Cara Kerja Antibakteri

2.3.1 Menghambat Sintesa Dinding Sel

Dasar toksisitas selektif dari golongan antimikroba ini terletak pada perbedaan struktur dinding sel prokariot yang terdiri atas peptidoglikan, sedangkan pada sel eukariot tidak memiliki peptidoglikan sehingga golongan obat ini relatif aman sebagai obat antibakteri tetapi tidak mempunyai pengaruh terhadap fungi, parasit, maupun sel hospes. Obat antimikroba yang menghambat pembentukan dinding sel efektif pada saat bakteri sedang aktif membelah (Dzen *et al.*, 2003).

2.3.2 Merusak Membran Sel

Membran sel adalah lapisan tipis yang terletak di sebelah dalam dinding sel, tersusun oleh 60 % protein dan 40 % lipid yang umumnya berupa fosfolipid. Membran sel merupakan barier yang fungsinya mengatur keluar masuknya bahan-bahan dari dalam sel atau dari luar sel dan hanya bahan-bahan tertentu saja yang dapat melewatinya. Rusaknya membran sel dapat menyebabkan metabolit penting di dalam sel lolos keluar sel dengan akibat kematian sel. Sebagai contoh, antimikroba yang merusak membran sel adalah polimiksin-B, golongan poliene (amfoterisin-B), golongan azol (klotrimazol, mikonazol, ketokonazol, itrakonazol) (Dzen *et al.*, 2003).

2.3.3 Menghambat Sintesa Protein

Dasar toksisitas selektif dari antimikroba yang menghambat sintesis protein adalah struktur ribosom sel prokariot (ribosom 70S) berbeda dengan sel eukariot (ribosom 80S). Namun demikian, perlu diingat bahwa mitokondria sel eukariot berisi ribosom 70S.

Ribosom 70S bakteri tersusun dari unit 50S dan 30S. Antimikroba yang berkerja pada unit ribosom 50S adalah kloramfenikol dan linkomisin dengan cara menghambat perpanjangan rantai polipeptida, serta eritromisin yang mekanisme kerjanya mencegah perjalanan ribosom di sepanjang mRNA. Antimikroba yang bekerja pada unit ribosom 30S adalah streptomisin dengan cara mengubah bentuk ribosom sehingga bentuk kodon juga berubah, mengakibatkan *misreading* oleh antikodon pada tRNA. Tetrasiklin bekerja pada unit ribosom 30S dengan cara mengganggu perlekatan tRNA pada kompleks mRNA-ribosom (Dzen *et al.*, 2003).

2.3.4 Menghambat Sintesa Asam Nukleat

Antimikroba ini dapat bekerja dengan cara menghambat sintesis mRNA pada proses transkripsi misalnya rifampisin atau menghambat replikasi DNA pada proses pembelahan sel. Rifampisin bekerja dengan cara mengikat kuat enzim *DNA-dependent RNA polymerase*. Setiap zat yang mengganggu sintesa ini akan mempengaruhi seluruh fase pertumbuhan dan metabolisme sel bakteri (Dzen *et al.*, 2003).

2.3.5 Antagonis Metabolit

Aktivitas enzim seringkali dihambat oleh senyawa yang mempunyai struktur mirip dengan substrat asalnya. Senyawa penghambat ini bergabung dengan enzim sedemikian rupa sehingga dapat mencegah reaksi enzim dengan substrat dan reaksi enzim dengan substrat dan reaksi – reaksi katalitik. Kebanyakan senyawa penghambat tersebut bersifat analog dengan faktor – faktor pertumbuhan bakteri, misalnya vitamin, asam amino, purin, dan pirimidin. Senyawa penghambat seperti ini disebut senyawa anti metabolit yang cara kerjanya adalah dengan menghambat secara kompetitif terhadap sintesis metabolit esensial (Dzen *et al.*, 2003).

2.4 Uji Kepekaan terhadap Antibakteri *In Vitro*

Uji kepekaan bakteri terhadap obat-obatan secara *in vitro* bertujuan untuk mengetahui obat antimikroba yang masih dapat digunakan untuk mengatasi infeksi oleh mikroba tersebut. Uji kepekaan terhadap obat antimikroba pada dasarnya dapat dilakukan melalui dua cara yaitu, metode dilusi tabung dan metode difusi cakram (Dzen *et al.*, 2003).

2.4.1 Metode Dilusi Tabung

Prinsip metode dilusi tabung adalah menggunakan satu seri tabung reaksi yang diisi media cair dan sejumlah tertentu mikroba yang diuji. Kemudian masing-masing tabung diisi dengan obat yang telah diencerkan secara serial. Selanjutnya, seri tabung diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam dan diamati terjadinya kekeruhan pada tabung. Konsentrasi terendah obat pada tabung yang ditunjukkan dengan hasil biakan yang mulai tampak jernih (tidak ada pertumbuhan mikroba) adalah KHM dari obat. Selanjutnya biakan dari semua tabung yang jernih diinokulasikan pada media agar padat, diinkubasikan dan keesokan harinya diamati ada tidaknya koloni yang tumbuh. Konsentrasi terendah obat pada biakan ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan koloni mikroba adalah KBM dari obat terhadap bakteri uji. Untuk menentukan KHM obat dapat juga dengan cara menggunakan medium agar padat yang disebut dengan metode *E test* (Dzen *et al.*, 2003).

2.4.2 Metode Difusi Cakram

Tes ini dikerjakan dengan menggunakan cahaya kerta saring yang mengandung bahan anti mikroba yang telah ditentukan kadarnya. Cakram kemudian ditempatkan pada media padat yang telah diberi bakteri uji. Setelah diinkubasi, diameter are hambatan dihitung sebagai daya hambat obat terhadap bakteri uji. Area hambatan yang terbentuk ditunjukkan sebagai daerah yang tidak memperlihatkan adanya pertumbuhan bakteri disekitar cakram kertas saring (Brooks *et al.*, 2004).

Untuk mengevaluasi hasil uji kepekaan tersebut (apakah isolate mikroba sensitif atau resisten terhadap obat), dapat dilakukan dua cara seperti cara Kirby Bauer dan cara Joan-Stokes (Dzen *et al.*, 2003).

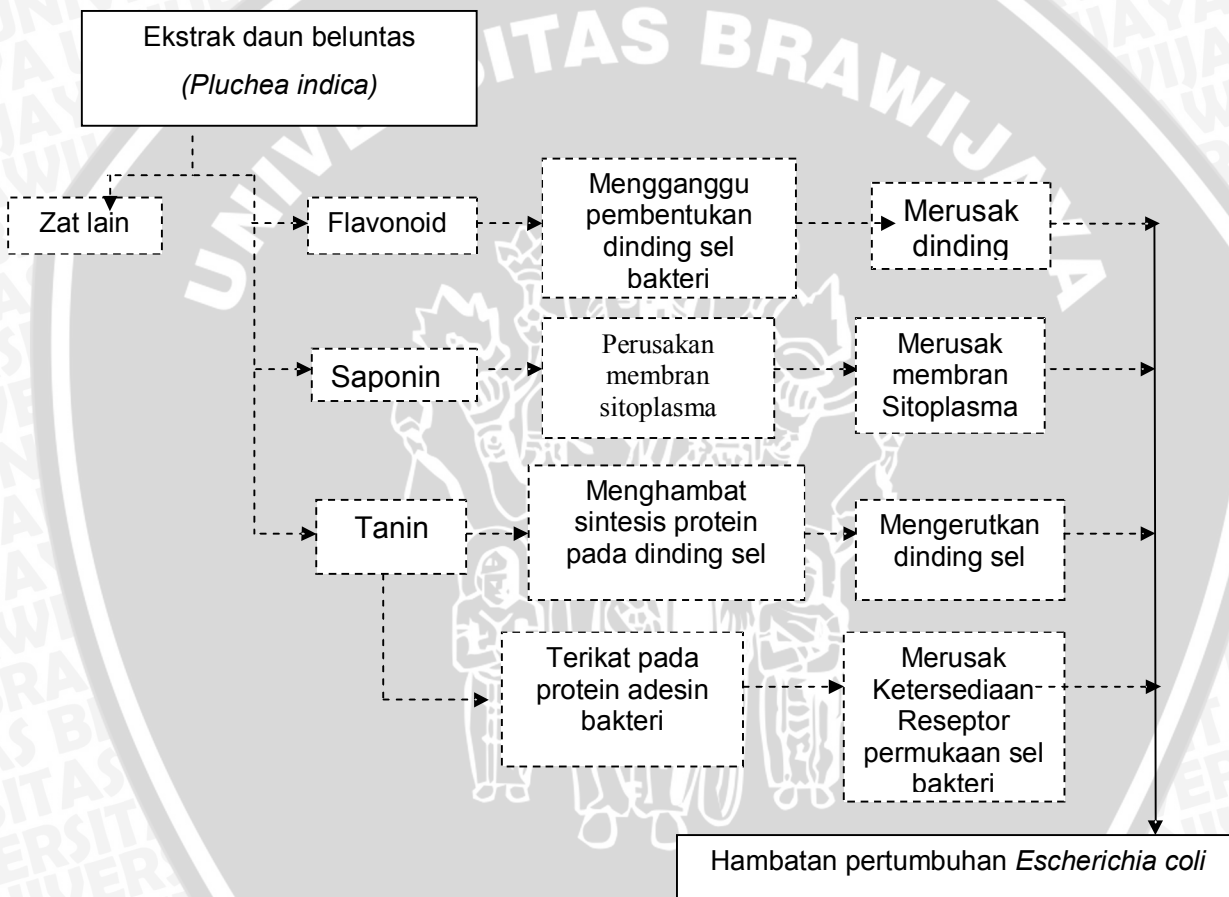
- a. Cara Kirby Bauer, yaitu dengan cara membandingkan diameter dari area jernih (zona hambat) disekitar cakram dengan tabel standart yang dibuat oleh NCCLS (*National Comitte for Clinical Laboratory Standart*). Dengan table NCCLS ini dapat diketahui kriteria sensitif, sensitif intermediate dan resisten.
- b. Cara Joan-Stokes, yaitu dengan cara membandingkan radius zona hambatan yang terjadi antara bakteri kontrol yang sudah diketahui kepekaannya terhadap obat tersebut dengan isolat bakteri yang diuji. Pada cara Joan-Stokes, prosedur uji kepekaan untuk bakteri control dan bakteri uji dilakukan bersama-sama dalam satu piring agar (Dzen *et al.*, 2003).



BAB 3

KERANGKA KONSEP dan HIPOTESIS PENELITIAN

3.1. Kerangka konsep



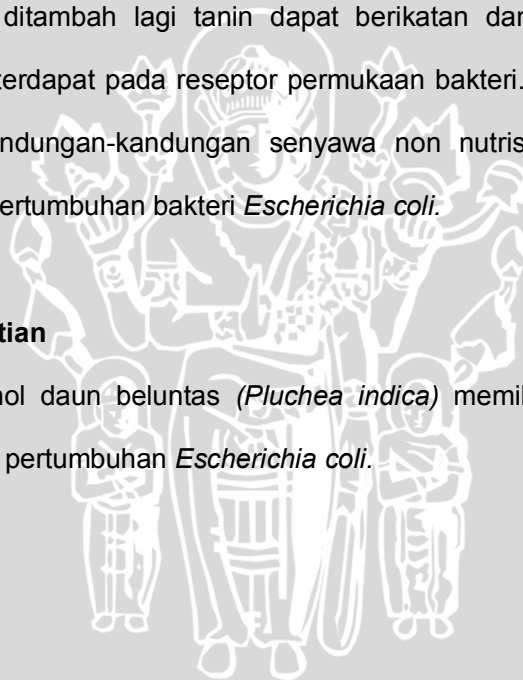
Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

3.2 Penjelasan Kerangka Konsep

Daun beluntas mengandung senyawa non nutrisi. Senyawa non nutrisi yang dikandung berupa flavonoid, saponin, dan tannin. Senyawa non nutrisi tersebut merupakan suatu zat aktif yang memiliki efek antibakteri. Mekanisme antibakteri flavonoid berkaitan dengan kemampuan flavonoid untuk mengganggu proses pembentukan dinding sel bakteri. Saponin bekerja dengan mekanisme menghancurkan membran sitoplasma bakteri. Sedangkan tanin memiliki efek yang hampir sama dengan flavonoid, yaitu mengganggu proses pembentukan dinding sel bakteri, ditambah lagi tanin dapat berikatan dan menginaktivasi protein adhesin yang terdapat pada reseptor permukaan bakteri. Sehingga, daun beluntas dengan kandungan-kandungan senyawa non nutrisinya diharapkan dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.

3.3 Hipotesis Penelitian

Ekstrak ethanol daun beluntas (*Pluchea indica*) memiliki efek sebagai antimikroba terhadap pertumbuhan *Escherichia coli*.



BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Dalam penelitian ini penulis menggunakan metode penelitian eksperimental dengan *post control group design* dengan metode dilusi tabung (*tube dilution test*). Untuk menguji efek ekstrak daun beluntas sebagai antibakteri terhadap *Escherichia coli* secara *in vitro*. Metode dilusi tabung meliputi dua tahap, yaitu tahap pengujian bahan pada MH (*Muller Hinton*) broth untuk menentukan KHM dan tahap *streaking* pada media NAP (*Nutrient Agar Plate*) untuk menentukan KBM.

4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

4.2.1 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.2.2 Waktu

Penelitian ini dilaksanakan antara bulan Juni – Agustus 2012.

4.3 Sampel Penelitian

Pada penelitian ini digunakan sampel berupa bakteri *Escherichia coli* yang didapatkan dari Laboratorium Fakultas Kedokteran Brawijaya dan ekstrak daun beluntas yang dibeli dari tempat pembenihan di Splendid, Malang .

4.4 Estimasi Jumlah Sampel Minimal

Sampel dalam penelitian ini adalah isolat bakteri *Escherichia coli* di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Jumlah

perlakuan yang diberikan ada enam, yaitu satu kontrol bakteri dan lima macam konsentrasi ekstrak daun beluntas. Jumlah pengulangan yang dilakukan dapat diketahui dengan rumus sebagai berikut (Lukito, 1998).

$$p(n-1) \geq 15$$

$$5(n-1) \geq 15$$

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$N \geq 4$$

Keterangan :

p = besar sampel

n = jumlah perlakuan

Berdasarkan perhitungan di atas maka jumlah pengulangan yang diperlukan dalam penelitian ini paling sedikit adalah 4.

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak daun beluntas yang dibuat dengan konsentrasi kadar ekstrak antara lain: 0%, 10%, 12.5%, 15%, 17.5%, 20%, 22.5%, 25% berdasarkan eksplorasi awal atau penelitian pendahuluan.

4.5.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah tingkat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dengan melihat kekeruhan pada tabung untuk menentukan KHM dan jumlah koloni *Escherichia coli* pada media agar padat (NAP) untuk menentukan KBM.

4.6. Definisi Operasional

Ekstrak daun beluntas adalah kadar atau konsentrasi daun beluntas yang telah dikeringkan, setelah itu dilakukan dengan cara ekstraksi maserasi dan evaporasi (pemisahan zat-zat aktif dengan pelarutnya) menggunakan ethanol 96%.

4.6.1 KHM (Kadar Hambat Minimal) adalah konsentrasi minimal larutan ekstrak daun beluntas yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Hal ini ditandai dengan tidak adanya kekeruhan pada larutan yang berisi ekstrak daun beluntas dan suspensi bakteri tersebut dalam tabung setelah diinkubasikan selama 18-24 jam. Definisi ini tidak berlaku jika ada tabung reaksi antara bahan aktif ekstrak dengan media *Nutrient Broth* yang menyebabkan kekeruhan pada seluruh tabung (Dzen dkk., 2003)

4.6.2 KBM (Kadar Bunuh Minimal) adalah konsentrasi minimal larutan ekstrak daun beluntas yang mampu membunuh pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Hal ini ditandai oleh jumlah koloni pada medium agar padat (NAP) yang telah dilakukan streaking dengan satu ose larutan ekstrak daun beluntas yang telah diberi bakteri uji tersebut, dengan jumlah koloni kurang dari 0,1% *original inoculums* (OI) (Dzen dkk., 2003).

4.6.3 *Original inoculum* adalah inokulum bakteri dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml yang diinokulasikan pada media agar padat sebelum diinkubasi, dan digunakan untuk mencari kategori KBM.

4.6.4 Kontrol positif adalah ekstrak daun beluntas murni yang tidak dicampur bakteri *Escherichia coli* yang digunakan untuk mengetahui apakah bahan yang digunakan steril di mana nilai kontrol positif adalah 0 (tidak terdapat pertumbuhan koloni bakteri jenis apapun).

4.6.5 Kontrol negatif adalah biakan bakteri *Escherichia coli* murni yang tidak dicampur dengan ekstrak daun beluntas dengan tujuan digunakan untuk mengetahui apakah bakteri yang digunakan terkontaminasi dengan bakteri lain.

4.6.6 Kadar konsentrasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah 0%, 10%, 12.5%, 15%, 17.5%, 20%, 22.5% dan 25%.

4.6.7 Tingkat kekeruhan pada masing-masing tabung dievaluasi menggunakan kertas putih bergaris-garis hitam yang diposisikan tepat dibelakang tabung.

4.7 Bahan dan Alat Penelitian

4.7.1 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Daun Beluntas

4.7.1.1 Alat

- Evaporator
- Labu Evaporator
- Timbangan
- Gelas Erlenmeyer
- Waterbath
- Blender

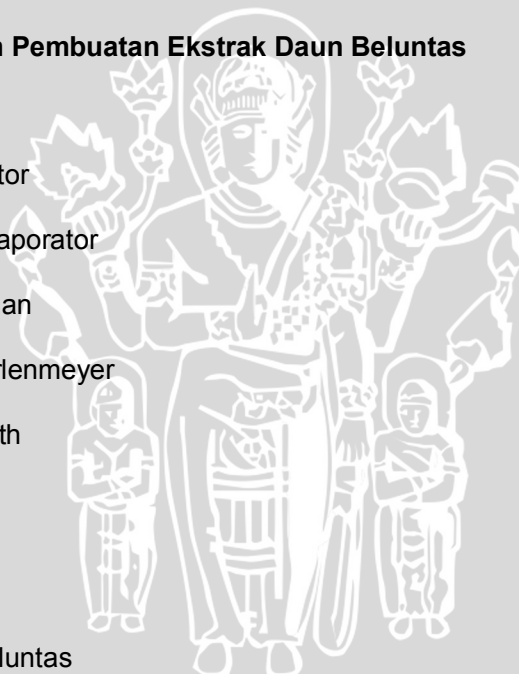
4.7.1.2 Bahan

- Daun beluntas
- Etanol 96%
- Aquades

4.7.2 Alat dan Bahan untuk Kultur Bakteri

1. Alat

- Tabung reaksi
- Ose



- Spektrofotometer
- Incubator
- Lampu spiritus atau Bunsen
- Korek api
- Label

2. Bahan

- *Escherichia coli*
- Medium EMB (*Eosin Methylene Blue*)

4.7.3 Alat dan Bahan untuk Pewarnaan Gram

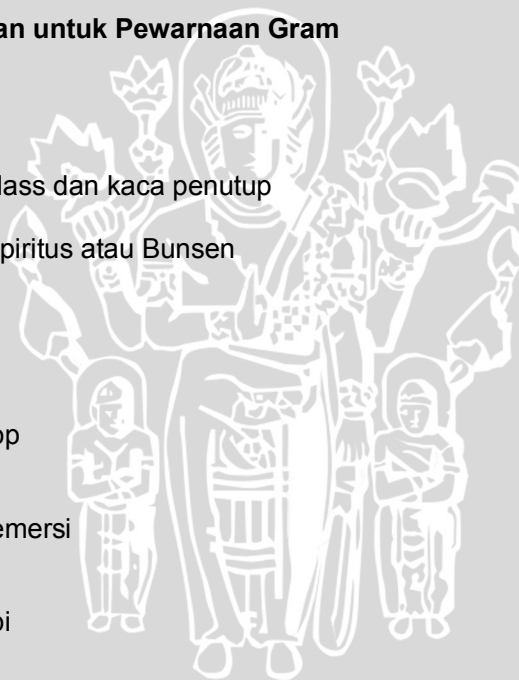
1. Alat

- a. Obyek glass dan kaca penutup
- b. Lampu spiritus atau Bunsen
- c. Ose
- d. Mikroskop
- e. Minyak emersi
- f. Korek api

2. Bahan

- a. Suspensi bakteri dari *Muller Hinton Broth*
- b. Bahan pewarnaan Gram : Kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin
- c. Aquades steril

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



4.7.4 Alat dan Bahan untuk Dilusi Tabung

1. Alat
 - a. Tabung reaksi
 - b. Pipet steril ukuran 1 mL dan 10 mL
 - c. Karet penghisap
 - d. Inkubator
 - e. Vortex
 - f. Bunsen
 - g. Korek api
 - h. Objek glass
 - i. Plate kosong dan steril
 - j. Alat penjepit (skalpel) steril
 - k. *Colony counter*
 - l. Kapas
2. Bahan
 - a. Ekstrak Daun beluntas
 - b. Suspensi bakteri dari *MH Broth*

4.8 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian meliputi pembuatan ekstrak daun beluntas, identifikasi bakteri uji (*Escherichia coli*), persiapan suspensi uji *Escherichia coli* dan uji sensitivitas antimikroba.

4.8.1 Pembuatan Ekstrak Daun beluntas

4.8.1.1 Proses Pengeringan

1. Daun beluntas dibersihkan dengan cara dibasuh dengan air mengalir.

2. Proses selanjutnya adalah memotong atau mengiris kecil-kecil daun beluntas, untuk mempercepat proses pengeringan.
3. Daun beluntas di keringkan dengan cara diangin-anginkan selama lebih kurang 2 hari hingga benar-benar kering.

4.8.1.2 Proses Ekstraksi

1. Setelah melalui proses pengeringan, daun beluntas tadi kemudian dihaluskan dengan menggunakan blender bumbu hingga berbentuk bubuk.
2. Timbang sebanyak 100 gr (sampel kering).
3. Masukkan 100 gr sampel kering ke dalam gelas erlenmeyer ukuran 1 liter.
4. Kemudian rendam dengan etanol 96% hingga volume 900 ml.
5. Kocok sampai benar-benar tercampur (\pm 30 menit).
6. Didiamkan satu malam sampai mengendap.
7. Daun beluntas yang telah hancur tadi kemudian dicampur dengan etanol 96% sebanyak 3 kali.
8. Setelah dilakukan proses pelarutan ulang oleh etanol 96% tadi maka daun beluntas kemudian diuapkan secara bertahap di dalam evaporator; hasil akhir dari proses evaporasi ini adalah terbentuknya daun beluntas yang siap dipergunakan dalam penelitian ini.

4.8.1.3 Proses Evaporasi

1. Ambil lapisan atas campuran etanol 96% dengan zat aktif daun beluntas yang sudah terambil.
2. Masukkan dalam labu evaporasi 1 liter.
3. Pasang labu evaporasi pada evaporator.

4. Isi water bath dengan air sampai penuh.
5. Pasang semua rangkaian alat, termasuk rotary evaporator, pemanas water bath, (atur sampai (90°C), sambungkan dengan aliran listrik.
6. Biarkan larutan etanol 96% memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu.
7. Tunggu sampai aliran etanol 96% berhenti menetes pada labu penampung (\pm 1,5 sampai 2 jam untuk 1 labu).
8. Hasil yang diperoleh kira-kira $\frac{1}{3}$ dari daun beluntas kering.
9. Apabila tidak sedang digunakan dalam jangka waktu yang cukup lama maka ekstrak daun beluntas tadi dapat disimpan di dalam suatu botol plastik tertutup dan kemudian didiamkan atau disimpan dalam freezer.

4.8.2 Identifikasi *Escherichia coli*

4.8.2.1 Pewarnaan Gram

Prosedur pengecatan gram :

- Dibuat sediaan, dikeringkan di udara kemudian dilakukan fiksasi.
- Sediaan dituangi kristal violet dan dibiarkan selama 1 menit.
- Sisa bahan pewarna dibuang dan dibilas dengan air.
- Sediaan dituangi larutan lugol sebagai *mordant*, dibiarkan selama 1 menit.
- Sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air.
- Sediaan dituangi alkohol 96 % sebagai peluntur selama 5-10 detik.
- Sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air.
- Sediaan dituangi safranin sebagai warna pembanding selama 30 detik.
- Sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air.

- Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap, ditetesi minyak imersi dan dilihat di bawah mikroskop dengan lensa objektif pembesaran 100x.

4.8.2.2 Microbact 12A/E-24E

- Sebelum ditentukan menggunakan 12A/12E atau 24E, koloni bakteri dilakukan uji oksidase, jika hasil oksidase negative menggunakan
- *Micorbact system* 12A/12E saja, sedangkan jika hasil oksidasenya positif maka menggunakan 24E.
- Satu koloni bakteri yang telah diinkubasi selama 18-24 jam diambil dengan menggunakan ose kemudian dilarutkan kedalam 5 mL NaCl 0,9% pada tabung reaksi steril dan divortex hingga homogen.
- Larutan bakteri yang telah homogen ditetaskan ke dalam sumur *Microbact* sebanyak 100 UI (4 tetes), untuk sumur Lysin, Omitin, dan H₂S ditambah dengan tetesan *mineral oil* sebanyak 1-2 tetes. Setelah itu *Microbact* diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
- *Microbact* yang telah diinkubasi diambil kemudian ditetaskan 2 tetes reagen Nitrat A dan B pada sumur 7, pada sumur nomor 8 dengan *Indol Kovact* sebanyak 2 tetes, sumur nomor 10 dengan VP I dan VP II masing-masing satu tetes, dan sumur 12 dengan TDA sebanyak satu tetes.
- Untuk Uji fermentasi karbohidrat pada *microbact* 12B, tanpa ada penambahan reagen yaitu hasil dari sumuran langsung bisa dibaca hasilnya, yaitu jika fermentasi positif menunjukkan warna kuning, sedangkan hasil negatif tidak ada perubahan warna tetap biru.
- Evaluasi hasil dilihat melalui sumur-sumur *microbact* apakah positif atau negatif dengan cara membandingkan dengan table warna dan hasilnya ditulis pada formulir *Patient Record*.

- Angka-angka *oktal* didapat dari penjumlahan reaksi positif saja, dari tiap-tiap kelompok (3 sumur didapatkan 1 angka *oktal*).
- Nama spesies bakteri dilihat dengan *software microbact system* di komputer berdasarkan angka *oktal* yang didapat.

4.8.2.3 Perbenihan

Pada hari kedua, koloni bakteri *Escherichia coli* ditanam pada *MH Broth* dan diinkubasikan pada suhu 37°–37,5° C selama 18-24 jam.

4.8.3 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

4.8.3.1 Koloni dengan karakteristik sama diambil dari lempeng medium EMB, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril yang berisi *Nutrient Broth*.

4.8.3.2 Tabung reaksi lalu diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

4.8.3.3 Dilakukan spektrofotometri pada tabung reaksi di atas dengan panjang gelombang 625 nm untuk mengetahui OD (Optical Density) dari suspensi.

4.8.3.4 Untuk mendapatkan konsentrasi bakteri sebesar 10⁸ CFU/ml (sesuai standar McFarland 0,5) yang setara dengan OD=0,1 maka dilakukan perhitungan sebagai berikut :

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

Keterangan :

N₁ = Nilai absorbansi suspensi (Hasil spektrofotometri)

V₁ = Volume bakteri yang akan ditambah pengencer

N₂ = OD (0,1 setara dengan 10⁸ CFU/ml)

V₂ = Volume suspense bakteri uji (10 ml)

Dari hasil perhitungan tersebut diperoleh volume bakteri (ml) yang akan ditambah pengencer untuk mendapatkan konsentrasi 10^8 CFU/ml sebanyak 10 ml.

4.8.3.5 Dilakukan pengenceran suspensi bakteri dengan konsentrasi sebanyak

100 kali untuk mendapatkan konsentrasi bakteri 10^6 CFU/ml, caranya:

Dari 10 ml bakteri dengan konsentrasi 10^8 CFU/ml diambil 1 ml larutan kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang telah diisi 9 ml NaCl sehingga konsentrasi bakteri menjadi 10^7 CFU/ml. Lalu dari larutan dengan konsentrasi bakteri 10^7 CFU/ml tersebut diambil 1 ml larutan kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang telah diisi 9 ml *Nutrient broth* sehingga konsentrasi bakteri menjadi 10^6 CFU/ml (Dzen *dkk.*, 2003).

4.8.4 Uji Sensitivitas Antimikroba

4.8.4.1 Ekstrak daun beluntas disentrifugasi dengan kecepatan 3500 rpm selama 15 menit agar larutan ekstrak menjadi homogen dan tidak mengendap. Untuk perlakuan yang diambil adalah larutannya.

4.8.4.2 Siapkan 7 tabung steril, beri tanda 10%, 12.5%, 15%, 17.5%, 20%, 22.5%, 25% sebagai uji antibakteri, 1 tabung sebagai kontrol positif (KP), dan 1 tabung sebagai kontrol negatif (KN).

4.8.4.3 Masukkan 0,9 ml aquades steril ke dalam tabung bertanda 10%, lalu tambahkan 0,1 ml ekstrak daun beluntas.

4.8.4.4 Masukkan 0,87.5 ml aquades steril ke dalam tabung bertanda 12.5%, lalu tambahkan 0,125 ml ekstrak daun beluntas.

4.8.4.5 Masukkan 0,85 ml aquades steril ke dalam tabung bertanda 15%, lalu ditambahkan 0,15 ml ekstrak daun beluntas.

4.8.4.6 Masukkan 0,825 ml aquades steril ke dalam tabung bertanda 17.5% lalu ditambahkan 0,175 ml ekstrak daun beluntas

4.8.4.7 Masukkan 0,8 ml aquades steril ke dalam tabung bertanda 20%, lalu ditambahkan 0,2 ml ekstrak daun beluntas.

4.8.4.8 Masukkan 0,775 ml aquades steril ke dalam tabung bertanda 22,5% lalu ditambahkan 0,225 ml ekstrak daun beluntas.

4.8.4.9 Masukkan 0,75 ml aquades steril ke dalam tabung bertanda 25%, lalu ditambahkan 0,25 ml ekstrak daun beluntas.

4.8.4.10 Masukkan 1 mL ekstrak daun beluntas ke dalam tabung KP dan masukkan 1 mL suspensi bakteri saja ke dalam tabung KN.

4.8.4.11 Tambahkan 1 ml suspensi bakteri *Escherichia coli* dengan konsentrasi bakteri 10^6 CFU/mL ke dalam tabung 1-6.

4.8.4.12 Ambil bakteri dari tabung bertanda KN sebanyak 1 ose kemudian digoreskan pada NAP sebagai *original inoculum* kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C .

4.8.4.13 Setelah 18-24 jam, diperhatikan dan dicatat derajat kekeruhan pada semua tabung. Cara membaca derajat kekeruhan adalah dengan meletakkan sebuah kertas putih dibelakang tabung, dimana sebelumnya pada kertas tersebut digambar sebuah garis hitam, kemudian garis hitam tersebut diperhatikan dari depan tabung. Konsentrasi paling rendah yang tidak menunjukkan kekeruhan adalah KHM.

4.8.4.14 Jumlah koloni pada *original inoculum* dihitung dengan menggunakan *colony counter*.

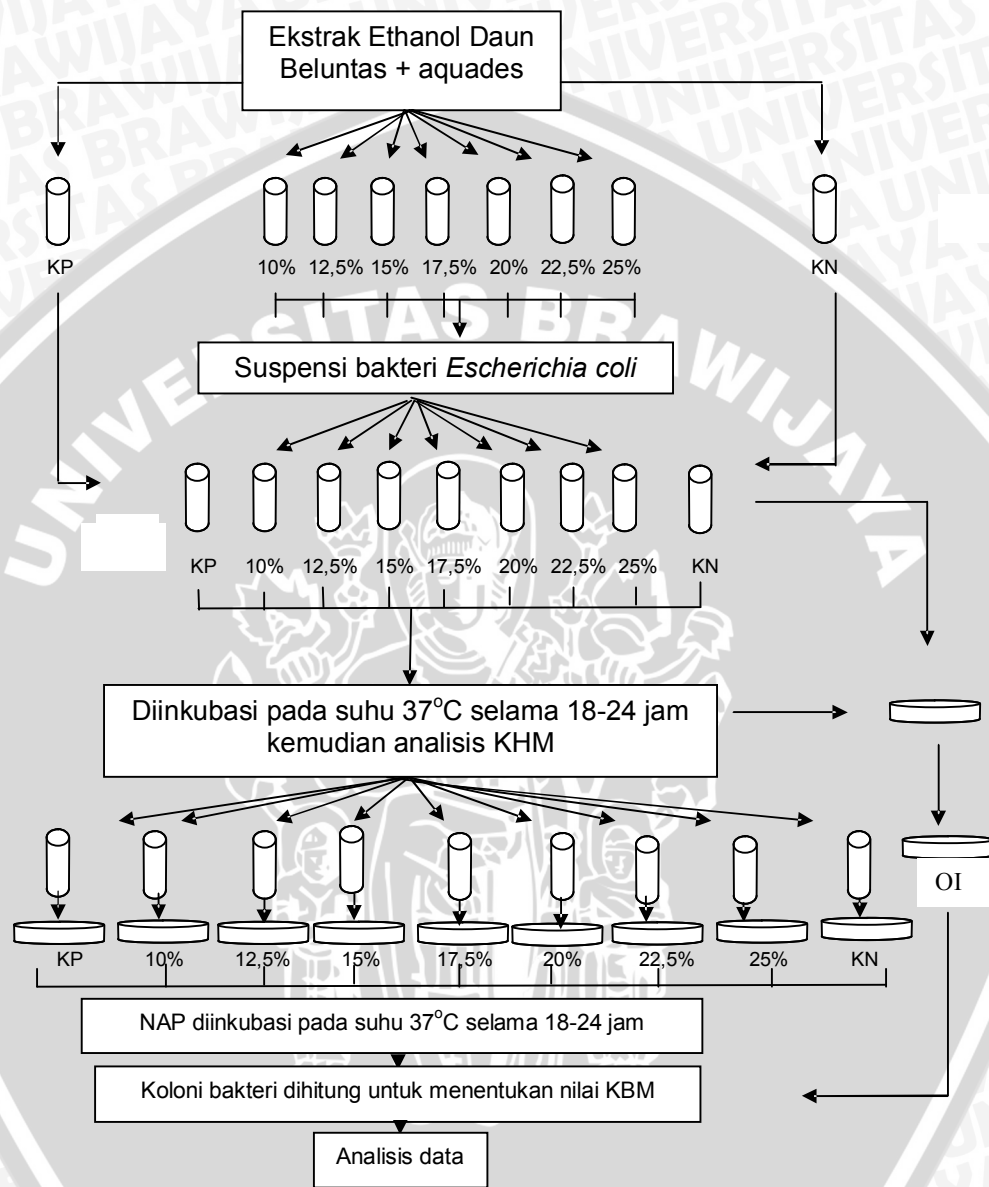
4.8.4.15 Untuk mengetahui KBM, lakukan penggoresan dari seluruh tabung kemudian diinokulasikan pada media NAP yang berbeda, kemudian diinkubasikan pada suhu 37°-37,5° C selama 18-24 jam.

4.8.4.16 Setelah 18-24 jam hitung jumlah koloni *Escherichia coli* yang tumbuh dengan *colony counter*. KBM ditentukan dari tidak adanya jumlah koloni yang tumbuh pada NAP atau jumlah koloninya kurang dari 0,1% inokulum OI.

Tabel 4.1 Persiapan Ekstrak Daun beluntas

Tabung	konsentrasi (%)	ekstrak (ml)	aquades (ml)	total (ml)
1	10	0,10	0,90	1
2	12,5	0,125	0,875	1
3	15	0,15	0,85	1
4	17,5	0,175	0,825	1
5	20	0,20	0,80	1
6	22,5	0,225	0,775	1
7	25	0,25	0,75	1
KP	100	1	0	1
KN	0	0	0	1

4.8.5 Alur Kerja Penelitian



Gambar 4.1 Skema Alur Uji Antimikroba Ekstrak Ethanol Daun Beluntas Terhadap *Escherichia coli*

Keterangan : KP : Kontrol Positif (ekstrak)

KHM : Kadar Hambat Minimum

KN : Kontrol Negatif (bakteri)

KBM : Kadar Bunuh Minimal

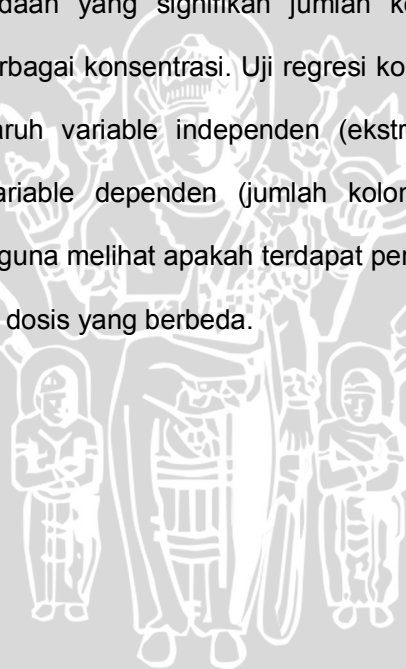
NAP : Nutrient Agar Plate

OI : Original Inoculum

4.9 Analisis Data

Data yang diperoleh merupakan data kuantitatif dari hasil penghitungan jumlah koloni *Escherichia coli* pada NAP yang telah diinkubasikan selama 18-24 jam pada suhu 37°C.

Dalam perhitungan hasil penelitian ini digunakan batas kepercayaan 95%. Data yang diperoleh yaitu data konsentrasi ekstrak etanol daun beluntas dan jumlah koloni bakteri. Analisis yang digunakan adalah uji regresi korelasi, Man - Whitney dan uji beda non parametrik Kruskal Wallis. Uji Kruskal Wallis digunakan untuk mengetahui perbedaan yang signifikan jumlah koloni bakteri setelah diberikan ekstrak pada berbagai konsentrasi. Uji regresi korelasi bertujuan untuk mengetahui besar pengaruh variable independen (ekstrak dengan berbagai konsentrasi) terhadap variable dependen (jumlah koloni bakteri). Uji multi komparasi Mann Whitney guna melihat apakah terdapat perbedaan jumlah koloni bakteri antara dua macam dosis yang berbeda.



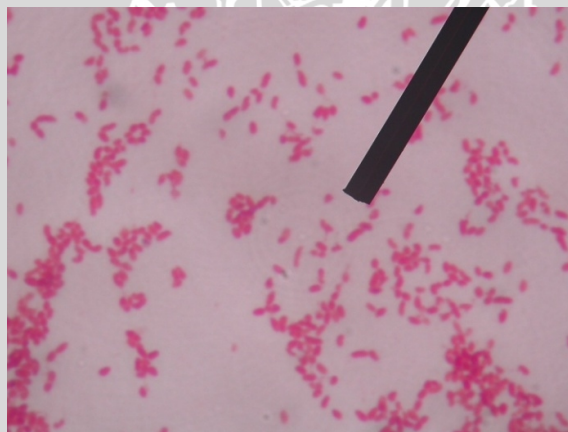
BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Data Hasil Penelitian

5.1.1 Identifikasi *Escherichia coli*

Dalam penelitian ini sampel yang digunakan adalah bakteri *E.coli* milik Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Sebelum melakukan penelitian, dilakukan identifikasi ulang yang meliputi pewarnaan Gram dan *microbact test*. Dari pewarnaan Gram didapatkan sel bakteri berbentuk batang, gram negatif berwarna merah.



Gambar 5.1 *E. coli* dengan pengecatan Gram. Tampak pada ujung petunjuk bakteri gram negatif berbentuk batang berwarna merah yang menandakan bahwa bakteri tersebut adalah bakteri *Escherichia coli*.

Identifikasi dilanjutkan dengan uji biokimia, dalam penelitian ini digunakan *Microbact System test*. Sebelum dilakukan uji *microbact* ini, bakteri diuji oksidase dengan menggoreskan koloni bakteri pada *stick* oksidase dan dibiarkan 5 menit. Hasilnya menunjukkan oksidase negatif, yaitu dengan tidak adanya perubahan warna *stick* menjadi biru tua. Setelah itu dilanjutkan uji *microbact* dengan



Gambar 5.3 Dilusi tabung dengan beberapa konsentrasi ekstrak daun beluntas terhadap pertumbuhan bakteri *E.coli* untuk uji KHM. Dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak, pertumbuhan bakteri semakin berkurang. Hal ini tampak dari tabung yang semakin jernih, diperoleh KHM 17,5%.

Gambar 5.3 menunjukkan percobaan untuk mengetahui KHM dengan metode dilusi tabung yang berisi campuran ekstrak daun beluntas dan bakteri dengan konsentrasi 0% (Kontrol Kuman / KK), 10%, 12,5%, 15%, 17,5%, 20%, 22,5% dan 25%. Tabung akan diinkubasikan selama 24 jam kemudian dilihat tingkat kekeruhannya menggunakan kertas bergaris-garis hitam yang diposisikan tepat di belakang tabung.

Hasil pengamatan pada tabung (Gambar 5.3) setelah diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam tampak bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun beluntas yang diberikan, semakin sedikit bakteri yang tumbuh (bandingkan dengan tabung KK atau konsentrasi 0% dan garis-garis hitam semakin jelas).

Konsentrasi terendah yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri disebut sebagai kadar hambat minimal (KHM) ekstrak daun beluntas sebagai antimikroba. Berdasarkan Gambar 5.3, penulis menetapkan konsentrasi 17,5% sebagai kadar hambat minimal (KHM) karena konsentrasi ini merupakan

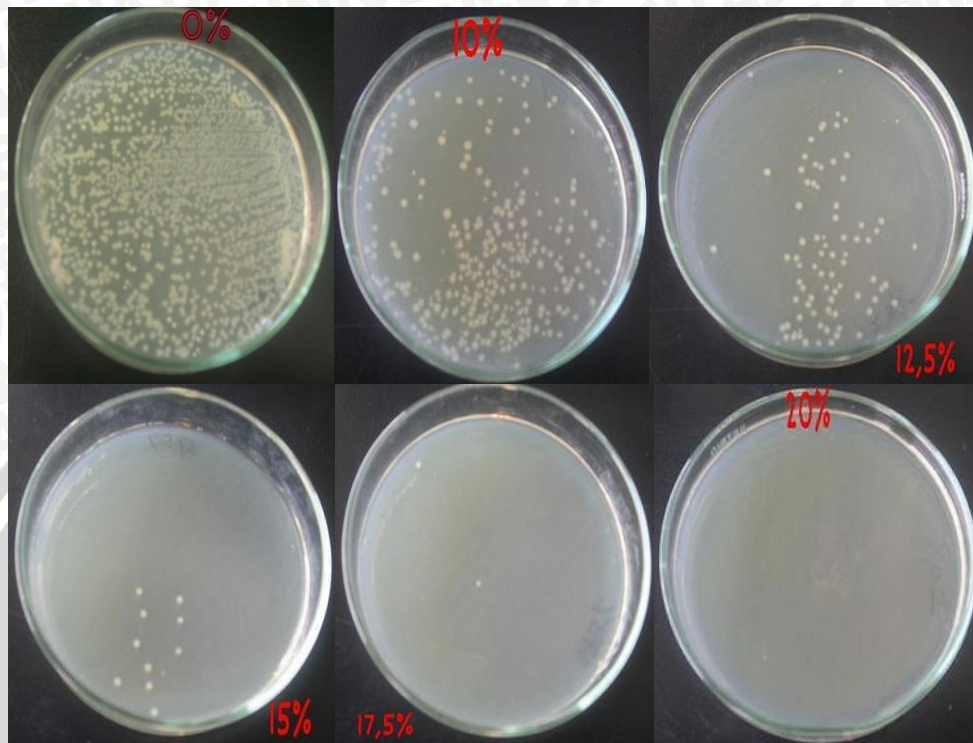
konsentrasi minimal yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri, dapat dilihat dari mulai berkurangnya kekeruhan tabung dan garis-garis hitam mulai tampak.

5.1.3 Hasil Penentuan KBM

Dari hasil uji dilusi dilakukan penanaman dengan metode *streaking* pada media NAP (*Sodium Agar Plate*) untuk mengetahui Kadar Bunuh Minimal (KBM). Setelah itu dilakukan perhitungan jumlah koloni pada masing-masing konsentrasi dan perulangan dengan alat *colony counter*. Berikut tabel dan gambar hasil penanaman pada masing-masing konsentrasi :

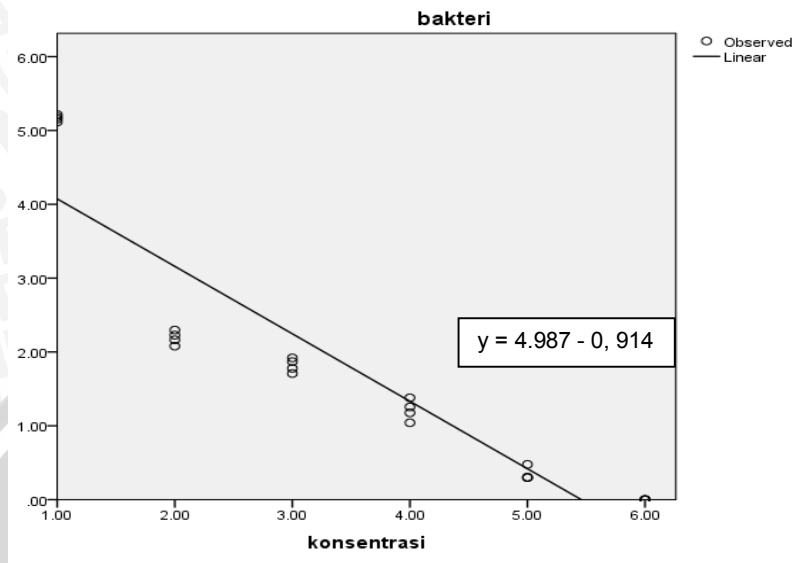
Tabel 5.1 Jumlah Koloni *E.coli* pada Berbagai Konsentrasi Ekstrak Daun Beluntas

Konsentrasi	(Jumlah Koloni CFU/plate)				total	rata-rata
	1	2	3	4		
0% (KN)	1301	1426	1643	1522	5892	1473
10%	119	168	145	197	629	157
12,5%	59	82	73	50	264	66
15%	23	10	14	17	64	16
17,5%	1	1	2	1	5	1
20%	0	0	0	0	0	0
100% (KP)	0	0	0	0	0	0



Gambar 5.4 Hasil *Streaking E.coli* pada Medium NAP untuk uji KBM. *E.coli* digoreskan pada *plate* dengan konsentrasi ekstrak 0%; 10%; 12,5%; 15%; 17,5%; 20%. Tampak koloni yang tumbuh (berupa bintik-bintik putih) pada konsentrasi 0% lebih banyak dibandingkan 10%. Koloni bakteri tumbuh banyak pada konsentrasi 10% namun koloni bakteri tumbuh lebih sedikit pada konsentrasi 15% dibanding 12,5% dan sama sekali tidak tumbuh koloni bakteri pada *plate* 20%. Diperoleh KBM 20%.

Berdasarkan Gambar 5.4 dan Tabel 5.1 diperoleh nilai KBM pada konsentrasi 20% dimana konsentrasi ini memenuhi syarat KBM yaitu $< 0,1\%$ dari OI (*Original Inoculum* : 268×10^4 CFU/mL). Dapat terlihat pola dimana semakin tinggi konsentrasi ekstrak, jumlah koloni bakteri semakin berkurang. Hal ini nampak lebih jelas pada gambar berikut :



Gambar 5.5 Kurva Regresi Linier Jumlah Koloni untuk Masing-masing Konsentrasi Ekstrak Daun Beluntas dimulai dari Konsentrasi Rendah ke Konsentrasi Tinggi; y = jumlah koloni bakteri, x = perlakuan dengan ekstrak daun beluntas.

5.2 Analisis Data

Data jumlah koloni bakteri terlebih dahulu diuji untuk normalitas dan homogenitasnya sebagai uji pra-syarat agar bisa dilakukan uji beda parametrik *One way anova*. Jika dari hasil uji normalitas Kolmogorov-Smirnov menunjukkan distribusi data yang normal ($p > 0,05$) dan uji homogenitas menyatakan bahwa data penelitian homogen ($p > 0,05$), maka dapat dilakukan uji beda parametrik *One way anova*. Berdasarkan hasil uji normalitas Kolmogorov-Smirnov, distribusi data jumlah koloni bakteri tidak normal ($p = 0,000$) dan berdasarkan hasil uji homogenitas, data tidak homogen ($p = 0,000$), sehingga data jumlah koloni bakteri tidak dapat dianalisis dengan uji beda *one way anova*.

Kemudian data jumlah koloni ditransformasi dan dilakukan uji normalitas dan homogenitas kembali. Hasil uji normalitas dan homogenitas data transformasi jumlah koloni bakteri masih menunjukkan tidak homogen ($p = 0,000$), meskipun distribusinya normal (Kolmogorov-Smirnov, $p = 0,207$). Dengan demikian data

tidak bisa diolah dengan menggunakan uji beda parametrik *one way anova*, sehingga dilakukan uji beda non parametrik Kruskal Wallis sebagai pengganti uji *one way anova*.

Sama halnya dengan uji beda parametrik *one way anova*, uji non parametrik Kruskal Wallis dilakukan guna mengetahui apakah terdapat perbedaan jumlah koloni bakteri setelah terpapar oleh ekstrak daun beluntas dengan berbagai konsentrasi. Dikatakan terdapat perbedaan jumlah koloni yang bermakna jika $p < 0,05$. Dari uji beda Kruskal Wallis, terdapat perbedaan yang bermakna atau signifikan jumlah koloni bakteri setelah terpapar oleh ekstrak daun beluntas pada berbagai konsentrasi ($p = 0,000$) atau dengan kata lain perbedaan konsentrasi ekstrak mengakibatkan perbedaan jumlah koloni bakteri.

Selanjutnya dilakukan uji multi komparasi Mann Whitney guna melihat apakah terdapat perbedaan jumlah koloni bakteri antara dua macam dosis yang berbeda. Adapun ringkasan dari uji multi komparasi ini tercantum dalam tabel dibawah ini:

Tabel 5.2 Ringkasan Nilai Signifikansi (p) Uji Mann Whitney

Konsentrasi	0%	10%	12,5%	15%	17,5%	20%
0%		0.021	0.021	0.021	0.018	0.014
10%	0.021		0.021	0.021	0.018	0.014
12,5%	0.021	0.021		0.021	0.018	0.014
15%	0.021	0.021	0.021		0.018	0.014
17,5%	0.018	0.018	0.018	0.018		0.011
20%	0.014	0.014	0.014	0.014	0.011	

Terdapat perbedaan jumlah koloni yang bermakna pada semua kelompok perlakuan jika dibandingkan antar kelompok perlakuan (lihat tabel di atas, $p < 0,05$). Dengan kata lain terdapat penurunan jumlah koloni bakteri yang signifikan seiring dengan peningkatan dosis ekstrak.

Uji korelasi non parametrik Spearman menunjukkan nilai signifikansi (P -value) = 0,000 ($p < 0,05$) dan *correlation coefficient* -0,921 yang berarti terdapat korelasi bermakna antara dua variabel (konsentrasi ekstrak terhadap jumlah koloni bakteri). *Spearman correlation coefficient* (r) bernilai negatif berarti korelasinya berbanding terbalik, yang artinya semakin tinggi dosis/konsentrasi ekstrak, maka semakin rendah jumlah koloni bakteri, serta menunjukkan korelasi yang sangat kuat ($r > 0,799$). Note : r = *correlation coefficient*, shows the strength of correlation. Weak correlation ($r < 0,500$), moderate correlation ($r = 0,500-0,599$), strong correlation ($r = 0,600-0,799$), very strong correlation ($r > 0,799$).

Uji regresi linier merupakan uji statistik yang dilakukan untuk mengetahui besar pengaruh variable independen (ekstrak dengan berbagai konsentrasi) terhadap variable dependen (jumlah koloni bakteri). Nilai R^2 (*R square*) dari tabel *Model summary* menunjukkan bahwa 84,8% ($0,848 \times 100\%$) dari variabel jumlah koloni bakteri dipengaruhi oleh variable independen yakni paparan ekstrak. Atau persamaan garis regresi menggunakan metode kuadrat terkecil (*least square method*) yang di dapat adalah :

$$y = 4.987 - 0,914x$$

Adapun bentuk kurva dari persamaan regresi di atas telah ditampilkan sebelumnya (lihat Gambar 5.5).

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian eksperimental ini bertujuan untuk mengetahui efektivitas ekstrak daun beluntas (*Pluchea Indica*) sebagai antimikroba terhadap bakteri *Escherichia coli* secara *in vitro*. Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode dilusi tabung (tube dilution test). Dengan metode ini dapat ditentukan Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM). Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun beluntas yang dipetik bagian yang masih muda, segar dan berwarna hijau. Pemilihan daun beluntas ini didasarkan karena banyaknya tanaman beluntas yang tersedia di Indonesia namun banyak orang yang masih belum bisa memanfaatkan tanaman ini sebagai obat.

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari *stock culture* yang disimpan di laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Sebelum digunakan dalam penelitian, bakteri *E. coli* dilakukan identifikasi menggunakan pewarnaan gram. Dengan pewarnaan Gram serta pengamatan di bawah mikroskop menggunakan pembesaran 1000x, didapatkan gambaran sel bakteri yang berbentuk batang dan berwarna merah (Gram negatif) dan perbenihan pada agar EMB (*Eosin Methylene Blue*) didapatkan gambaran khas koloni bakteri mengkilat seperti logam (*Metalic Sheen*) yang menunjukkan bahwa *E. coli* memfermentasikan laktosa. Pada identifikasi menggunakan tes *Microbat* 12A/E didapatkan hasil atau ketepatan akurasi bakteri *Escherichia coli* sebesar 96,39%.

Agar dapat memperoleh zat aktif yang terkandung dalam daun beluntas dengan maksimal, maka proses ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Metode ini cocok untuk senyawa yang tidak tahan

pemanasan dengan suhu tinggi. Metode maserasi merupakan proses ekstraksi atau penyarian yang paling sederhana dan sering dipakai untuk mengekstraksi bahan obat yang berupa serbuk simplisia yang halus (Bashori, 2008). Ethanol dipilih sebab bahan aktif yang diduga terdapat pada daun beluntas yaitu senyawa flavonoid, saponin dan tanin cenderung larut terhadap etanol dan sifatnya yang mampu melarutkan hampir semua zat, baik yang bersifat polar, semi polar dan non polar serta kemampuannya untuk mengendapkan protein dan menghambat kerja enzim sehingga dapat terhindar proses hidrolisis dan oksidasi (Harborne, 2005).

Pada penelitian ini digunakan kontrol bahan yaitu ekstrak daun beluntas dengan konsentrasi 96% dan kontrol bakteri yaitu *E. coli*. Tujuan penggunaan kontrol bahan dan kontrol bakteri adalah sebagai pembanding dengan bakteri yang diberi perlakuan. Pada dilusi tabung, kontrol media (bahan) digunakan untuk menentukan tingkat kejernihan. Tabung reaksi yang medianya dapat menghambat pertumbuhan bakteri akan menampilkan kejernihan yang sama dengan kontrol bahan. Sebelum mendapatkan konsentrasi perlakuan, penulis terlebih dahulu melakukan penelitian eksplorasi. Kemudian didapatkan konsentrasi 10%, 12.5%, 15%, 17.5%, 20% sebagai konsentrasi perlakuan. Kadar Hambat Minimal (KHM) pada penelitian ekstrak daun beluntas terhadap *E. Coli* ini ditentukan dengan melihat tingkat kekeruhan pada tabung dari masing-masing konsentrasi perlakuan. Dari kelima konsentrasi tersebut Kadar Hambat Minimal (KHM) berada pada konsentrasi 17.5%. Hal ini ditunjukkan dengan terlihat jernih pertama kali perbandingan tabung perlakuan dengan tabung kontrol bahan. Kemudian masing-masing tabung perlakuan ditanam pada medium NAP dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Setelah itu

dilakukan penghitungan menggunakan *colony counter* terhadap bakteri yang tumbuh dari masing-masing konsentrasi perlakuan. Kadar Bunuh Minimal (KBM) ditandai dengan pertumbuhan koloni bakteri pada NAP < 0.1% dari Original Inoculum pada rata-rata jumlah koloni dari pengulangan. Sedangkan Original Inoculum bakteri *Escherichia coli* adalah 26800 CFU/plate. Maka dapat ditentukan besar KBM adalah pada konsentrasi 20% (0,1% dari 26800 adalah 26.8; konsentrasi ekstrak yang memenuhi adalah 20%).

Dari kelima konsentrasi yang di dapat, dilakukan pengulangan sebanyak 4 kali dan data jumlah koloni yang diperoleh dianalisis dengan uji statistik menggunakan software *SPSS 16 for Windows*[®] dengan batas kepercayaan 95%. Artinya, kemungkinan kesalahan hasil penelitian berkisar 5%. Uji statistik yang dipakai yaitu Kruskal Wallis, Man Whitney, serta *regresi linier*. Berdasarkan Kruskal Wallis, didapatkan nilai signifikansi ($p = 0.000$) yaitu nilai $p < 0.05$. Hal ini menunjukkan bahwa perbedaan konsentrasi ekstrak mengakibatkan perbedaan jumlah koloni bakteri setelah diberikan ekstrak pada berbagai konsentrasi. Untuk mengetahui kelompok perlakuan mana yang memiliki perbedaan, maka dilakukan analisis *post hoc*. Analisis *post hoc* untuk uji Kruskal Wallis adalah dengan uji Mann Whitney antara konsentrasi 0%, 10%, 12.5%, 15%, 17.5% dan 20%. Dikatakan terdapat perbedaan signifikan antar dua dosis jika nilai $P < 0.05$. Dari uji multi komparasi ini didapatkan pada setiap perbandingan dosis ($p < 0.05$) maka terdapat perbedaan jumlah koloni yang bermakna antar semua dosis yang dibandingkan, hal ini menandakan bahwa setiap dosis ekstrak daun beluntas menghasilkan jumlah koloni bakteri yang berbeda.

Uji korelasi non parametric Spearman menunjukkan nilai signifikansi (P -value) = 0.000 ($p < 0.05$) dan *correlation coefficient* -0.921 yang berarti terdapat

korelasi bermakna antara dua variable (konsentrasi ekstrak terhadap jumlah koloni bakteri). *Spearman correlation coefficient* (r) bernilai negatif berarti korelasinya berbanding terbalik, yang artinya semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun beluntas, maka semakin rendah jumlah koloni bakteri *Escherichia coli*, serta menunjukkan korelasi yang sangat kuat ($r > 0.799$).

Uji regresi linier merupakan uji statistik yang dilakukan untuk mengetahui besar pengaruh variable independen (ekstrak dengan berbagai konsentrasi) terhadap variable dependen (jumlah koloni bakteri). Hasil persamaan regresi liniernya adalah $y = 4.987 - 0,914x$ di mana Y adalah jumlah koloni bakteri *E. coli* yang dihasilkan pada pada medium NAP, sedangkan X adalah perlakuan pemberian ekstrak daun beluntas. Berdasarkan nilai koefisien determinasi (R^2) didapatkan bahwa 84,8% variasi jumlah koloni *E. coli* dipengaruhi oleh dosis ekstrak daun beluntas. Sedangkan 15,2% lainnya dipengaruhi faktor lain yang tidak dapat dikontrol oleh peneliti, seperti waktu penyimpanan ekstrak yang lama sehingga menurunkan daya kerjanya, terjadi resistensi oleh *E. coli* itu sendiri, atau adanya *human error* saat dilakukan penelitian tersebut. Berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun beluntas dengan kandungan flavonoid, saponin, tannin mempunyai efek anitimikroba terhadap bakteri, khususnya *E.coli*.

Penelitian mengenai tanaman beluntas khususnya daun beluntas (*Pluchea Indica*) yang dilakukan oleh Sulistyaningsih (2009) menyebutkan bahwa ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica*) memiliki aktivitas antibakteri terbesar terhadap *Methicillin Resistant Stapylococcus aureus*. Konsentrasi hambat minimum ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica*) terhadap *Pseudomonas aeruginosa Multi Resistant* terletak pada konsentrasi 52% sedangkan pada bakteri *Methicillin*

Resistant Staphylococcus aureus terletak pada konsentrasi 20%. Hasil uji banding 1 bagian ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica*) dengan siprofloksasin terhadap *Pseudomonas aeruginosa Multi Resistant* dan *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* berturut-turut sebesar 1 : 1,77 x 10⁻⁵ dan 1 : 5,49 x 10⁻⁵. Skringing fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica*) mengandung alkaloid, flavonoid, polifenol, tanin, monoterpen atau sesquiterpen, dan kuinon.

Penelitian lain mengenai ekstraksi daun beluntas (*Pluchea Indica*) dilakukan dengan pelarut alcohol 90%. Bakteri *E. coli* diinokulasikan pada medium NA yang telah diberi lubang sumuran dan diisi dengan ekstrak daun beluntas pada konsentrasi 0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, dan 100%; selanjutnya biakan diinkubasi selama 1x 24 jam pada suhu 37°C. Perlakuan ini diulang sebanyak 4 kali, kemudian dilakukan pengukuran diameter zona hambat pertumbuhan *E. coli* yang terbentuk disekeliling lubang sumuran pada medium NA yang telah diinokulasikan dengan bakteri *E. coli*. Daya antibakteri ekstrak daun beluntas ditentukan berdasarkan hasil pengukuran zona hambat pertumbuhan *E. coli* pada medium NA Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa: (1) ada pengaruh perbedaan konsentrasi ekstrak daun beluntas terhadap pertumbuhan bakteri *E. coli*; (2) konsentrasi ekstrak daun beluntas yang memiliki daya hambat tertinggi dalam menghambat pertumbuhan *E. coli* adalah 100% tetapi tidak berbeda nyata dengan konsentrasi 90% (Ulfa, 2009).

Dengan melihat fakta hasil penelitian yakni adanya penurunan jumlah koloni bakteri *E. coli* seiring dengan peningkatan konsentrasi perlakuan yang diperkuat dengan data kandungan bahan aktif ekstrak daun beluntas yang mampu

menghambat pertumbuhan *E. coli*, maka dapat dikatakan bahwa ekstrak daun beluntas terbukti sensitif sebagai antibakteri terhadap *E. coli*.

Keterbatasan penelitian ini antara lain tidak dapat mengetahui jumlah pasti masing-masing bahan aktif yang dihasilkan dari proses ekstraksi. Bahan aktif tersebut dapat bekerja sendiri-sendiri ataupun bersama-sama untuk menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli*. Selain itu adanya variasi biologis dari masing-masing spesies beluntas juga dapat mempengaruhi jumlah bahan aktif antimikroba. Sebagai misal, beluntas yang tumbuh di daerah X dapat memiliki kandungan yang berbeda dengan beluntas yang tumbuh di daerah Y. Faktor lain yang dapat mempengaruhi adalah lamanya masa penyimpanan ekstrak. Oleh karena itu, untuk penelitian-penelitian selanjutnya perlu adanya standarisasi, baik dari pemilihan bahan yang digunakan (beluntas), dan lamanya masa simpan (jangka waktu ekstrak masih dapat digunakan sebagai antibakteri) sehingga diharapkan apabila dilakukan penelitian yang sama di tempat yang berbeda akan didapatkan hasil yang sama. Oleh sebab itu, untuk penerapan langsung di masyarakat, penelitian ini dapat dikatakan masih terlalu dini dan masih membutuhkan banyak penelitian-penelitian lanjutan agar nantinya kandungan antibakteri yang didapatkan pada ekstrak daun beluntas ini dapat diaplikasikan secara klinis.

Aplikasi klinis yang memungkinkan dari penelitian ini adalah penggunaan ekstrak daun beluntas secara oral untuk pengobatan diare akibat infeksi *Escherichia coli*. Sedangkan penggunaan secara sistemik, masih memerlukan penelitian lebih lanjut yaitu melalui pengujian pada hewan coba maupun pengujian pada manusia (uji klinik). Sebelum calon obat baru dicobakan pada manusia, dibutuhkan waktu untuk meneliti sifat farmakodinamik, farmakokinetik

dan efek toksiknya pada hewan coba. Dalam studi farmakodinamik ini tercakup pengembangan teknik analisis untuk mengukur kadar senyawa tersebut dan metabolitnya dalam cairan biologis. Semuanya diperlukan untuk memperkirakan dosis efektif dan memperkecil resiko penelitian pada manusia. Studi toksikologi pada hewan umumnya dilakukan 3 tahap yaitu penelitian toksisitas akut bertujuan mencari besarnya dosis tunggal yang membunuh 50% sekelompok hewan coba (LD50), penelitian toksisitas jangka panjang bertujuan meneliti efek toksik pada hewan coba setelah pemberian obat dalam jangka panjang, penelitian toksisitas khusus meliputi penelitian terhadap sistem reproduksi termasuk teratogenitas, uji karsinogenitas, dan mutagenisitas, serta uji ketergantungan. Sedangkan pengujian pada manusia (uji klinik) terdiri dari uji fase I sampai IV (Setiawati, 2007). Pada dasarnya uji klinik tersebut bertujuan untuk memastikan efikasi, keamanan, dan gambaran efek samping yang sering timbul pada manusia akibat pemberian suatu obat (Setiawati, 2007), dalam hal ini adalah obat yang berasal dari daun beluntas.

BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian disimpulkan bahwa:

1. Ekstrak ethanol daun beluntas (*Pluchea Indica*) memiliki efek sebagai antimikroba terhadap *Escherichia coli* secara *in vitro*.
2. Kadar Hambat Minimal (KHM) ekstrak ethanol daun beluntas terhadap *Escherichia coli* pada konsentrasi 17,5%
3. Kadar Bunuh Minimal (KBM) ekstrak ethanol daun beluntas terhadap *Escherichia coli* pada konsentrasi 20%
4. Semakin besar konsentrasi larutan ekstrak ethanol daun beluntas maka semakin sedikit jumlah koloni *Escherichia coli* yang tumbuh pada media NAP.

7.2 Saran

Perencanaan, proses, dan hasil penelitian ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu dibutuhkan banyak perbaikan. Perbaikan yang mungkin dapat dilakukan antara lain:

- Perlu dilakukan pengujian untuk mengetahui kadar masing-masing zat aktif yang terkandung dalam ekstrak daun beluntas sehingga dapat diketahui zat aktif utama yang memiliki aktifitas antimikroba terbesar terhadap bakteri yang diuji.
- Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dengan metode lain, misalnya dengan dilusi cakram untuk mengetahui kemampuan ekstrak daun beluntas sebagai antimikroba terhadap bakteri *Escherichia coli*.
- Perlu dilakukan pengujian lebih lanjut secara *in vivo* untuk mengetahui dosis efektif, dosis lethal, dosis toksik.

DAFTAR PUSTAKA

- Agnol, R. Dall.; Ferraz, A.; Bernardi, A.P.; Albring, D.; Nor, C.; Sarmiento, L.; Lamb, L. 2003. *Antimicrobial Activity of Some Hypericum species*. TANAC S. A. Brazil, p. 511-516.
- Ajizah, A. 2004. *Sensitivitas Salmonella typhimurium Terhadap Ekstrak Daun Psidium Guajava L. Bioscientiae*.
- Akiyama, H.; Fujii, K.; Yamasaki, O.; Oono, T.; Iwatsuki, T. 2001. *Antibacterial Action of Several Tanins Against Staphylococcus aureus*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, p. 487-91.
- Alnicolsa, S.A.C. 2003. Direct Analysis of Complex Tannin Mixtures. *Tannin*, (Online), (<http://taninos.tripod.com/hidrolisables.htm>), accessed 10 November 2011).
- Anonymous. 2011. Beluntas (*Pluchea indica*), (online), (http://www.scribd.com/doc/4907979/beluntas?secret_password=&autodown=pdf), diakses 18 Desember 2011).
- Anonymous. 2007. *Tanaman Obat Indonesia*, (online), (http://www.iptek.net.id/ind/pd_tanobat/view.php?id=26), diakses 22 Desember 2011).
- Anonymous, 1989. *Cermin Dunia Kedokteran*. (online), (www.kalbe.co.id), diakses 22 Desember 2011).
- Ardiansyah. Nuraida, L. Andarwulan, N. 2003., Aktivitas antimikroba daun beluntas (*Pluchea indica Less*) dan stabilitas aktivitasnya pada berbagai konsentrasi garam dan tingkat pH. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan* 14(2) : 90-97.
- Arsyi, I. A. 2008. *Uji aktivitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Dan Arbenan (Duchesnea Indica Andr.Focke) terhadap Staphylococcus aureus dan Pseudomonas Aeroginosa Multiresisten Antibiotik beserta Profil Kromatografi Lapisan Tipisnya*. (online), (<http://etd.eprints.ums.ac.id>), diakses tanggal 20 Oktober 2009).
- Asti, RH. 2009. *Ekstrak Daun Salam (Syzgium polyanthum) sebagai Pegobatan Demam Tifoid*. (online), (<http://www.beswandjarum.com/article>), diakses 23 Desember 2011).
- Bashori, M. 2008. *Efek Antiinflamasi Ekstrak Etanol Daun Belimbing Wuluh (Averrhoa bilimbi Linn.) Pada Tikus Putih Jantan Galur Wistar*. Tugas Akhir. Tidak diterbitkan, Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta.

Brooks, G.F., Butel, J.S, Morse, S.A. 2004. *Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology*. 23rd Ed. San Francisco: McGrawHill, p: 248-254.

Carlos C.C and Saniel M.C. 2006. Etiology and Epidemiology of Diarrhea. Research Institute for Tropical Medicine, Metro Manila. (online), (<http://www.nhlbi.nih.gov/health/prof/other/etio.pdf>, accessed 29 November 2011).

Chandronita,C., Ananthi, S., Ramakrishnan, G., Lakshmisundaram, R., Gayathri, V., Vasanthi, H.R. Protective Role of Tannin-Rich Fraction of *Camellia sinensis* in Tissue Arsenic Burden in Sprague Dawley Rats. *Original Papers*, 2010; 29(9): 705-719.

Dalimartha, S. 2003. Atlas Tumbuhan Obat. Puspa Swara Jilid 1-3, Jakarta.

Dalimartha, S. 2005. Tanaman Obat di Lingkungan Sekitar, Puspa Swara, Jakarta, hal 5.

De Padua, L. S.; Bunyaprahastra.; Lemmens, J. R. 1999. *Medicinal and Poisonous Plants*, Prosea, Bogor, p. 286-7.

Dorland, W.A.N. 2002. Kamus Kedokteran Dorland. 29th Ed. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC, p: 607

Dzen, SM, Roekistiningsih, Santoso S, Winarsih S. 2003. *Bakteriologi Medik*, Bayumedia Publishing, Jilid 1, Malang, hal. 50

Elbing, K and Brent, R. 2002. *Current Protocols in Molecular Biology*. Massachusetts: John Wiley & Sons, Inc. p: 58-63.

Elena, S.F., Whittam, T.S., Winkworth, C.L., Riley, M.A., Lensky, R.E. Genomic Divergence of *Escherichia coli* strains: Evidence for Horizontal Transfer and Variation in Mutation Rates. *Internal Microbiology*, 2005; 8: 271-278.

Fairus, A. 2010 Uji Aktivitas Antibakteri, (online), (<http://fairuzzabadi57.blogspot.com/2010/03/uji-aktivitas-antibakteri.html>, diakses 25 Desember 2011).

Greenwood, D., Slack, R.C.B., Peutherer, J.F. 1992. 14th Ed. *Medical Microbiology*. UK: Longman Group (FE) Ltd, p: 326-333.

Gunasekera, T.S., Paliy, O. Growth of *E.coli* BL21 in Minimal Media with Different Gluconeogenic Carbon Source and Salt Contents. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2007; 73(5): 1169-1172.

Harborne IB, 2005. *Metode Fitokimia*. ITB, Bandung.

Harbone, J.B. 1996., *Metode Fitokimia*. Padmawinata K, Soediro I, penerjemah, Bandung : Institut Teknologi Bandung.

Hariani, A. 2006. Tumbuhan Obat dan Khasiatnya. Seri 1. Penebar Swadaya. Jakarta.

IPB fakultas Pertanian 2006. Ragam Tanaman. (online), (www.beluntasplantamor.com). http://www.freewebs.com/ar1_ipb_2006/deskripsi/asteraceae.pdf, diakses 18 Desember 2011).

Jawetz, E., Melnick, J. L., Adelberg, E. A., 2007, *Mikrobiologi Kedokteran*, diterjemahkan oleh Mudihardi, E., Kuntaman, Wasito, E. B., Mertaniasih. p. 255-256

Kappeli, U., Hachler, H., Giezendanner, N., Cheasty, T. Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157 Associated with Human Infecitous in Switzerland, 2000-2009. *Epidemiology Infection*, 2011; 139: 1097-1104.

Kuntaman, K., Lestari, E.S., Johnson, J.R., Belkum, A.V., Verbrugh, H.A., Purwanta, M. 2005. Fluoroquinolone-Resistant *Escherichia coli*, Indonesia. *Emerging Infectious Disease*. 11(9): 1363-1369.

Lanova, Hersipa. 2008 Alkaloid (online), (<http://hersipa.wordpress.com/alkaloid/>, diakses 20 Desember 2011).

Lee, H., Han, O., Prak, J., Suwandono, J., Sjarurachman, A., Campbell, J.R. The Burden of Diarrhoea, Shigellosis, and Cholera in North Jakarta. *Infectious Disease*, 2005; 94: 542-549.

Leny, S. 2006. *Senyawa Flavonoida, Fenilpropanoida, dan Alkaloida*. Tugas Akhir. Tidak diterbitkan, Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Sumatra Utara, Medan.

Lewis, D.A., Fields, W.N., Shaw, G.P. A Natural Flavonoid Present in Unripe Plantain Banana Pulp (*Musa sapientum* L. var. *paradisiaca*) Protects the Gastric Mucosa from Aspirin-Induced Erosions. *Journal of Ethnopharmacology*, 1999; 65: 283-288.

Lukito, H. 1998. *Rancangan Percobaan, Suatu Pengantar*. Malang, IKIP. Hal: 25-75.

Michalak, A. *Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing under Heavy Metal Stress*. *Polish J. of Environ. Stud*, 2006; 15(4): 523-530.

Min, B.R., Pinchak, W.E., Merkel, R., Walker, S., Tomita, G., Anderson, R.C. Comparative Antimicrobial Activity of Tannin Extracts from Perennial Plants on Mastitis Pathogens. *Scientific Research and Essay*, 2008; 3(2): 066-073.

Mitterhuemer, S., Krebs, S., Klanner, A., Wolf, E., Blum, H *et al*. *Escherichia coli* Infection Induces Distinct Local and Systemic Transcriptome Response in the Mammary Gland. *Bioinformatics*, 2010; 17(2): 126-136.

Nelson, T. 2008. *E.coli (Escherichia coli)*, (Online), (<http://www.bettyjung.net/pch202fs.htm>, accessed 18 November 2011).

Nenden S.; Anny N. T.; Astuti, S.; Pujiastuti, F.; Nila. 2007. *Penentuan Indeks Kepedasan, Indeks Pengembangan, dan Kadar Tanin dalam Simplisia*. (online), (<http://hub.indonesiadl.net/download.php?id=167>, diakses 23 Desember 2011).

Oyoyo, B.A., Subekti, D.S., Campbell, J.R., Corwin, A.L., Lesmana, M *et al.* Toxins and Colonization Antigens of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Among Residents of Jakarta Indonesia. *Tropical Medicine*, 2001; 65(2): 120-124.

Philpot, D., Ebel, F. eds. 2009. *E.coli: Shiga Toxin Methods and Protocols*. New Jersey: Humana Press, Inc. p: 1-5.

Power, M.L., Wyer, J.L., Gordon, D.M., Veal, D.A., Slade, M.B. Phenotypic and Genotypic Characterization of Encapsulated *Escherichia coli* Isolated from Blooms in Two Australian Lakes. *Environmental Microbiology*, 2005; 7(5): 631-640.

Purnomo, M. 2001. *Isolasi Flavonoid dari Daun Beluntas (Pluchea indica Less) yang mempunyai Aktivitas Antimikroba Terhadap Penyebab Bau Keringat Secara biotografi*. Universitas Airlangga, Surabaya.

Pujowati, P. 2006. *Pengenalan Ragam Tanaman Lanskap*. Tesis. Tidak diterbitkan, Fakultas Pertanian Institut Pertanian Bogor, Bogor.

Rahayu, P. Winiati. 2000. *Aktivitas Antimikroba Bumbu Masakan Tradisional Hasil Olahan Industri Terhadap Bakteri Patogen dan Perusak*. Vol 11(2). Buletin Teknologi dan Industri Pangan.

Setiawan, 1999. Atlas Tumbuhan Obat Indonesia. Trubus Agriwidya. Bogor.

Suwandi, U 1999. *Peran media untuk identifikasi mikroba pathogen*. Jakarta: Kalbe Farma, (online), (<http://www.kalbe.co.id/files/cdk/files/10peranmediauntukidentifikasimikroba124.pdf/10peranmediauntukidentifikasimikroba124.html>, diakses 15 Desember 2011).

Sulistyaningsih, 2008. *Potensi Daun Beluntas (Pluchea indica Less.) Sebagai Inhibitor Terhadap Pseudomonas aeruginosa Multi Resistant dan Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*. Tesis. Tidak diterbitkan, Fakultas Ilmu Farmasi Universitas Padjajaran, Bandung.

Tim, C and Andrew J.L. Antimicrobial Activity of Flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2005: 343-356.

Triatmodjo, P. 1992. *Pola Kuman Penyebab Diare Akut pada Neonatus dan Anak*. Jakarta., (online),

(<http://www.kalbe.co.id/files/cdk/files/08PolaKuman086.pdf/08PolaKuman086.html>, diakses 10 Desember 2011).

Traithip, A. 2005., *Phytochemistry and antioxidant activity of Pluchea indica*. Tesis. Tidak diterbitkan, Mahidol University Thailand. Thailand.

Ulfa, 2009. *Daya antibakteri ekstrak Alkohol daun beluntas (Pluchea indica L.) dalam berbagai konsentrasi terhadap bakteri E. coli secara in vitro*. Tesis. Tidak diterbitkan, Fakultas Kimia Universitas Negeri Malang, Malang.

Universitas Indonesia. 2007. Jurnal Makara Kesehatan, Jakarta. hal. 1-10, (online), (<http://journal.ui.ac.id/?hal=artikel&q=5>, diakses 20 Desember 2011).

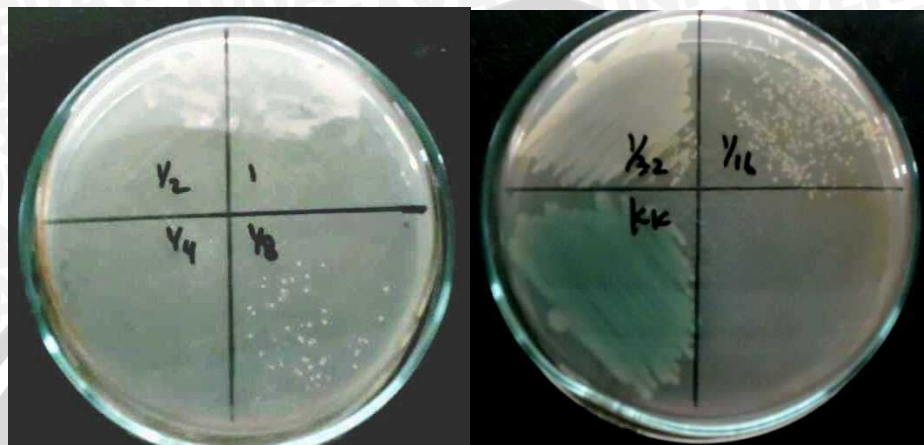
Verma, S and Singh, S.P. Current and Future Status of Herbal Medicines. *Veterinary World*, 2008; 1(11): 347-350

Yalun. 2008. *Mengenal Bakteri E. coli*. (online), (<http://yalun.wordpress.com/2008/10/07/mengenal-bakteri-escherichia-coli/>, diakses 15 Desember 2011).



LAMPIRAN

Lampiran 1. Penelitian Pendahuluan



Lampiran 2. Uji Normalitas dan Homogenitas Uji Normalitas Jumlah Bakteri

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		konsentrasi	jumlahbakteri
N		24	24
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	3.5000	24590.0833
	Std. Deviation	1.74456	56302.01503
Most Extreme Differences	Absolute	.138	.501
	Positive	.138	.501
	Negative	-.138	-.331
Kolmogorov-Smirnov Z		.678	2.454
Asymp. Sig. (2-tailed)		.748	.000

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Uji Homogenitas Jumlah Koloni

Test of Homogeneity of Variances

Jumlahbakteri

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
7.628	5	18	.001

Lampiran 3. Uji Beda Non Parametrik Kruskal Wallis

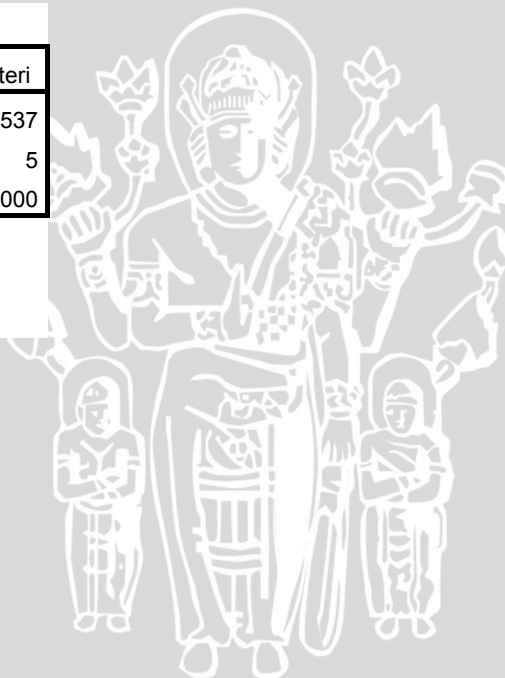
Ranks			
	konsentrasi	N	Mean Rank
	0%	4	22.50
	5%	4	18.50
	7,5%	4	14.50
Jumlahbakteri	10%	4	10.50
	12,5%	4	6.50
	15%	4	2.50
	Total	24	

Test Statistics ^{a,b}	
	jumlahbakteri
Chi-Square	22.537
Df	5
Asymp. Sig.	.000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:

konsentrasi



Lampiran 4. Uji Multi Komparasi Non Parametrik Mann Whitney

Ranks

konsentrasi		N	Mean Rank	Sum of Ranks
	0%	4	6.50	26.00
bakteri	10%	4	2.50	10.00
Total		8		

Test Statistics^a

	bakteri
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^b

- a. Grouping Variable: konsentrasi
- b. Not corrected for ties.

Ranks

konsentrasi		N	Mean Rank	Sum of Ranks
	0%	4	6.50	26.00
bakteri	12,5%	4	2.50	10.00
Total		8		

Test Statistics^a

	bakteri
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^b

- a. Grouping Variable: konsentrasi
- b. Not corrected for ties.

Ranks

konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
-------------	---	-----------	--------------

	0%	4	6.50	26.00
bakteri	15%	4	2.50	10.00
	Total	8		

Test Statistics^a

	bakteri
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^b

a. Grouping Variable: konsentrasi

b. Not corrected for ties.

Ranks

	konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	0%	4	6.50	26.00
bakteri	17,5%	4	2.50	10.00
	Total	8		

Test Statistics^a

	bakteri
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.366
Asymp. Sig. (2-tailed)	.018
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^b

a. Grouping Variable: konsentrasi

b. Not corrected for ties.

Ranks

	konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	0%	4	6.50	26.00
bakteri	20%	4	2.50	10.00
	Total	8		

Test Statistics^a

	bakteri
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.460
Asymp. Sig. (2-tailed)	.014
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^b

a. Grouping Variable: konsentrasi

b. Not corrected for ties.

Ranks

konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
10%	4	6.50	26.00
bakteri 12,5%	4	2.50	10.00
Total	8		

Test Statistics^a

	bakteri
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^b

a. Grouping Variable: konsentrasi

b. Not corrected for ties.

Ranks

konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
10%	4	6.50	26.00
bakteri 15%	4	2.50	10.00
Total	8		

Test Statistics^a

	bakteri
Mann-Whitney U	.000



Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^b

- a. Grouping Variable: konsentrasi
 b. Not corrected for ties.

Ranks			
konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
10%	4	6.50	26.00
bakteri 17,5%	4	2.50	10.00
Total	8		

Test Statistics ^a	
	bakteri
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.366
Asymp. Sig. (2-tailed)	.018
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^b

- a. Grouping Variable: konsentrasi
 b. Not corrected for ties.

Ranks			
konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
10%	4	6.50	26.00
bakteri 20%	4	2.50	10.00
Total	8		

Test Statistics ^a	
	bakteri
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.460
Asymp. Sig. (2-tailed)	.014
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^b



- a. Grouping Variable: konsentrasi
- b. Not corrected for ties.

Ranks			
konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
12,5%	4	6.50	26.00
bakteri 15%	4	2.50	10.00
Total	8		

Test Statistics ^a	
	bakteri
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^b

- a. Grouping Variable: konsentrasi
- b. Not corrected for ties.

Ranks			
konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
12,5%	4	6.50	26.00
bakteri 17,5%	4	2.50	10.00
Total	8		

Test Statistics ^a	
	bakteri
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.366
Asymp. Sig. (2-tailed)	.018
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^b

- a. Grouping Variable: konsentrasi
- b. Not corrected for ties.

Ranks			
konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks

	12,5%	4	6.50	26.00
bakteri	20%	4	2.50	10.00
Total		8		

Test Statistics^a

	bakteri
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.460
Asymp. Sig. (2-tailed)	.014
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^b

a. Grouping Variable: konsentrasi

b. Not corrected for ties.

Ranks

	konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	15%	4	6.50	26.00
bakteri	17,5%	4	2.50	10.00
Total		8		

Test Statistics^a

	bakteri
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.366
Asymp. Sig. (2-tailed)	.018
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^b

a. Grouping Variable: konsentrasi

b. Not corrected for ties.

Ranks

	konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
	15%	4	6.50	26.00
bakteri	20%	4	2.50	10.00
Total		8		

Test Statistics^a

	bakteri
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.460
Asymp. Sig. (2-tailed)	.014
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^b

a. Grouping Variable: konsentrasi

b. Not corrected for ties.

Ranks

konsentrasi	N	Mean Rank	Sum of Ranks
17,5%	4	6.50	26.00
bakteri 20%	4	2.50	10.00
Total	8		

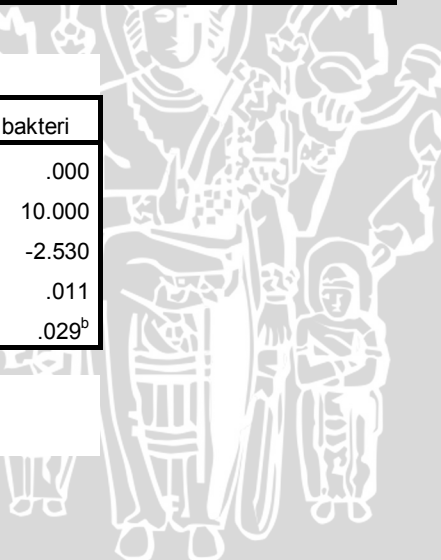
Test Statistics^a

	bakteri
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.530
Asymp. Sig. (2-tailed)	.011
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^b

a. Grouping Variable: konsentrasi

b. Not corrected for ties.

AS BRAWIJAYA



Lampiran 5. Uji Korelasi Non Parametrik Spearman

Correlations			
		konsentrasi	bakteri
konsentrasi	Pearson Correlation	1	-.921**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	24	24
bakteri	Pearson Correlation	-.921**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	24	24

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).



Lampiran 6. Uji Regresi Linier

Variables Entered/Removed^a

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	konstrasi ^b		Enter

a. Dependent Variable: bakteri

b. All requested variables entered.

Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.921 ^a	.848	.841	.68945

a. Predictors: (Constant), konstrasi

ANOVA^a

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	58.438	1	58.438	122.938	.000 ^b
	Residual	10.458	22	.475		
	Total	68.896	23			

a. Dependent Variable: bakteri

b. Predictors: (Constant), konstrasi

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	4.987	.321		15.540	.000
	konstrasi	-.914	.082	-.921	-11.088	.000

a. Dependent Variable: bakteri