

4.5.6.2 Uji Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Putri Malu (*Mimosa pudica*) dan Fraksinya menggunakan Metode Difusi Cakram

Bahan yang digunakan adalah pelarut DMSO 1%, bakteri *ESBL Eschericia coli* yang telah diinokulasi pada media, dan bahan uji berupa cakram berisi ekstrak etanol 96%, serta fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, fraksi n-butanol, dan fraksi air dari ekstrak etanol 96% daun putri malu (*Mimosa pudica*), dan cakram gentamisin (10 µg).

Alat yang digunakan adalah *plate*, penjepit steril, inkubator, dan label.

4.5.7 Uji Antibakteri menggunakan Metode KLT-Bioautografi

Bahan yang digunakan adalah aquadest steril, metanol, suspensi bakteri *ESBL Eschericia coli* 1×10^6 CFU/ml, dan bahan uji berupa ekstrak etanol 96%, serta fraksi etil asetat, fraksi n-butanol, fraksi n-heksan, fraksi air dari ekstrak etanol 96% daun putri malu (*Mimosa pudica*), pelarut metanol (pa), pelarut n-heksan (pa), aquades, pelarut kloroform (pa), asam formiat, pelarut etil asetat (pa), dan MTT 0,05% b/v.

Alat yang digunakan adalah timbangan analitik METTLER TOLEDO™, *hair dryer*, mikrotube, spatel, plat KLT fase diam silika GF₂₅₄ nm, pipa kapiler, *chamber* CAMAG™, cawan petri, *reagent spray*, pipet ukur 10 ml PYREX®, mikropipet SOCOREX™, tip, pipet tetes, inkubator, mistar berskala, dan beaker glass SCHOTT DURAN™.

4.6 Definisi Operasional

- 1) Serbuk kering daun putri malu (*Mimosa pudica*) yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari UPT Materia Medika Batu yang terletak pada

ketinggian 875 mdpl dengan curah hujan 256 mm/bulan dan suhu rata-rata 23°C serta kelembaban sekitar 96%.

- 2) Ekstrak etanol 96% daun putri malu (*Mimosa pudica*) adalah hasil ekstraksi metode maserasi daun putri malu sebanyak 300 gram dengan pelarut etanol 96% dengan perbandingan serbuk daun:pelarut 1:10 kemudian dievaporasi dengan *vaccum rotary evaporator*. Remaserasi dilakukan dua kali untuk mendapatkan konsentrasi ekstrak 100%.
- 3) Fraksi dari ekstrak etanol 96% daun putri malu (*Mimosa pudica*) adalah hasil fraksinasi cair-cair dari ekstrak etanol 96% daun putri malu (*Mimosa pudica*) menggunakan pelarut n-heksan, dilanjutkan pelarut etil asetat, kemudian pelarut n-butanol, dan air.
- 4) Dosis yang digunakan dalam kelompok perlakuan ekstrak dan fraksi dari ekstrak etanol 96% daun putri malu (*Mimosa pudica*) masing-masing adalah 3 mg, 6 mg, 9 mg, 12 mg, dan 15 mg.
- 5) Kultur bakteri yang digunakan pada pengulangan uji aktivitas antibakteri adalah berasal dari tiga pasien infeksi saluran kemih (ISK) akibat *Eschericia coli* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi RSSA Malang yang dinyatakan positif bakteri yang memproduksi *Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL)*.
- 6) Hasil uji sensitivitas terhadap antibiotik diketahui *ESBL Eschericia coli* sebanyak satu kode bakteri sensitif terhadap gentamisin dan dua kode bakteri lainnya resisten terhadap gentamisin.
- 7) Rf merupakan nilai yang menyatakan derajat retensi suatu komponen fase diam, digunakan sebagai acuan dalam mengidentifikasi sampel dengan cara membandingkan nilai Rf yang tidak diketahui dengan nilai Rf

senyawa marker. R_f = jarak yang ditempuh oleh komponen : jarak yang ditempuh oleh permukaan larutan.

- 8) Warna spot yang tampak melalui visual maupun sinar UV λ 254 nm dan UV λ 366 nm menyatakan jenis golongan senyawa metabolit yang terkandung dalam suatu sampel ekstrak etanol 96% daun putri malu (*Mimosa pudica*) serta fraksinya.
- 9) Zona hambat merupakan zona bening yang terbentuk disekitar sampel uji pada bakteri. Diameter zona hambatan pertumbuhan bakteri menunjukkan sensitifitas bakteri terhadap zat antibakteri, semakin lebar diameter zona hambatan yang terbentuk maka antibakteri tersebut semakin sensitif.
- 10) KLT pembanding merupakan KLT yang ditotol dengan sampel ekstrak etanol 96% daun putri malu (*Mimosa pudica*) dan fraksinya yang dieluasi dengan fase gerak yang sesuai, digunakan untuk membandingkan R_f dan warna spot dengan zona hambat yang terbentuk disekitar spot pada uji aktivitas antibakteri menggunakan metode KLT-bioautografi.

4.7 Prosedur Penelitian/Pengumpulan Data

4.7.1 Prosedur Ekstraksi Daun Putri Malu (*Mimosa pudica*)

- a. Sebanyak 300 g serbuk daun putri malu ditimbang menggunakan timbangan analitik METTLER TOLEDO™.
- b. Serbuk daun putri malu dimasukkan ke dalam toples kaca dan dicampurkan dengan etanol 96% sebanyak 1 liter, lalu diaduk menggunakan stirer IKA® selama 30 menit pada kecepatan 400 rpm, kemudian toples diberi aluminium foil dan ditutup rapat.

- c. Campuran maserasi awal didiamkan dalam suhu ruang dan disimpan selama 1x24 jam. Disaring menggunakan corong buchner yang dihubungkan dengan *vaccum* untuk mendapatkan maserat. Hasil maserat ditampung dalam toples kaca lain. Ampas maserasi awal dimasukkan kembali ke toples awal.
- d. Remaserasi dilakukan sebanyak dua kali.
- e. Proses remaserasi pertama yakni mencampurkan ampas maserasi awal dengan etanol 96% sebanyak 1 liter dan disimpan selama 1x24 jam. Hasil maserat disaring kembali menggunakan corong buchner yang dihubungkan dengan *vaccum* dan ditampung kedalam toples kaca hasil maserat. Diulangi prosedur yang sama untuk proses remaserasi kedua.
- f. Hasil maserat ditampung dalam toples kaca dan dipekatkan dengan vakum rotavapor IKA® pada suhu 40°C dengan kecepatan 30-35 rpm selama 1 jam untuk setiap 250 mL maserat, sehingga diperoleh ekstrak kental, ekstrak kental dikeringkan dalam oven MEMMERT™ pada suhu 40°C.

4.7.2 Prosedur Fraksinasi dari Ekstrak Etanol Daun Putri Malu (*Mimosa pudica*)

Ekstrak etanol 96% daun putri malu (*Mimosa pudica*) difraksinasi dengan metode cair-cair. Pelarut yang digunakan adalah n-heksan, etil asetat, dan n-butanol dengan prosedur kerja sebagai berikut:

- a. Sebanyak 20 g ekstrak etanol 96% daun putri malu (*Mimosa pudica*) kering ditimbang menggunakan METTLER TOLEDO™, kemudian

disuspensikan dalam aquadest 100 ml dengan menggunakan mortir dan stamper.

- b. Pelarut n-heksan sebanyak 100 ml ditambahkan ke dalam suspensi air-ekstrak hingga terpisah sempurna. Pemisahan antara dua fase air dan pelarut didasarkan pada perbedaan berat jenis.
- c. Campuran larutan yang telah terbentuk dipindah ke dalam corong pisah dan dikocok selama 5 menit sambil sesekali dikeluarkan gas dalam corong pisah dengan membuka krannya, kemudian diambil lapisan pelarut n-heksan. Ke dalam residu ditambahkan n-heksan sebanyak 100 ml, lalu dikocok 5 menit, dan ditampung fase n-heksan.
- d. Prosedur tersebut diulangi hingga fase n-heksan jernih. Fase n-heksan dari ekstrak etanol daun putri malu (*Mimosa pudica*) ditampung dalam satu wadah.
- e. Residu fase air ditambahkan 100 mL etil asetat, kemudian dilakukan sesuai prosedur di atas. Etil asetat ditambahkan hingga fase etil asetat berwarna bening jernih (warna mulai konstan). Fase etil asetat dari ekstrak etanol daun putri malu (*Mimosa pudica*) ditampung dalam satu wadah.
- f. Lalu fase air ditambahkan larutan n-butanol sebanyak 100 ml, dikocok selama 5 menit sambil sesekali dikeluarkan gas dalam corong pisah dengan membuka krannya dan ditampung fase n-butanol. Prosedur tersebut diulangi sampai warna lapisan fase n-butanol konstan. Fase n-butanol dari ekstrak etanol daun putri malu (*Mimosa pudica*) ditampung dalam satu wadah.

- g. Masing masing fraksi n-heksan, etil asetat, n-butanol, air dari ekstrak etanol daun putri malu (*Mimosa pudica*) dipekatkan dengan vakum rotavapor IKA® pada suhu yang sesuai dan dikeringkan dalam oven MEMMERT™ pada suhu 40°C.
- h. Setelah kering ditimbang berat masing-masing fraksi dari ekstrak etanol daun putri malu (*Mimosa pudica*).
- i. Ekstrak dan fraksinya yang didapat disimpan pada lemari pendingin suhu 2-8°C.

4.7.3 Prosedur Optimasi Fase Gerak KLT

- a. Masing-masing sebanyak 10 mg dari ekstrak etanol 96% daun putri malu (*Mimosa pudica*) dan fraksinya dilarutkan dalam pelarut metanol 0,5 mL, kemudian ditotolkan 4 µl pada lempeng KLT fase diam silika GF₂₅₄ nm (ukuran 20 cm x 20 cm x1 mm) secara memanjang (digariskan), dan dikeringkan.
- b. Selanjutnya dibuat beberapa fase gerak dengan perbandingan yang sesuai untuk mengeluasi sampel.
- c. Dimasukkan kertas saring ke dalam *chamber* CAMAG™ berisi fase gerak untuk menjenuhkan fase gerak.
- d. Dimasukkan plat KLT yang telah ditotol dengan sampel ke dalam *chamber* berisi fase gerak yang sesuai.
- e. Setelah eluasi selesai, lempeng KLT dikeringkan dan hasil eluasi ditandai, dan dilihat dengan bantuan lampu UV CAMAG™ λ 254 dan λ 366 nm. Digunakan penampak noda asam sulfat 10% dan pemanasan pada suhu 120°C, kemudian dilihat pada UV CAMAG™ λ 366 nm.

- f. Dilakukan analisa terhadap masing-masing hasil plat KLT yang telah dievaluasi dengan masing-masing fase gerak yang digunakan untuk optimasi sehingga dapat digunakan untuk identifikasi golongan senyawa metabolit dan metode bioautografi.

4.7.4 Identifikasi Bakteri

4.7.4.1 Metode VITEK (Biomerieux, 2013; Pincus, 2014)

- a. Isolat yang diinokulasikan dipilih dari koloni tunggal yang serupa. Tes biokimia sederhana dan pengecatan Gram terhadap isolat bakteri dilakukan untuk menentukan jenis kartu yang akan digunakan. Bakteri kokus Gram positif menggunakan kartu VITEK 2 GP, sedangkan bakteri batang Gram negatif menggunakan kartu VITEK GN.
- b. Dimasukkan 3 ml larutan salin 0,45%-0,5% steril ke dalam tabung plastik bersih secara aseptis. Isolat bakteri yang tampak sama di swab dan dimasukkan ke dalam larutan salin untuk membuat suspensi bakteri. Suspensi bakteri dihomogenkan dan dibuat kekeruhan bakteri 0,05-0,063 Mc Farland dengan menggunakan VITEK 2 DensiCHEK. Suspensi tidak boleh lebih dari 30 menit diinokulasikan ke kartu VITEK 2.
- c. Tabung suspensi bakteri dan kartu VITEK 2 (GP, GN, AST) dimasukkan ke rak khusus. Kemudian dimasukkan ke *vaccum chamber station* baik secara manual (VITEK 2 Compact) atau dipindahkan secara otomatis (VITEK 2 dan VITEK 2 XL). Suspensi bakteri dipindahkan ke sumuran oleh alat. Tabung transfer dipotong secara otomatis.

- d. Kartu dipindahkan ke ruang inkubator setelah 15 menit, setelah itu akan dianalisis secara otomatis oleh sistem dan diinterpretasikan sebagai sensitif, *intermediate*, dan resisten.

4.7.5 Pembuatan Suspensi Bakteri *ESBL Eschericia coli*

Berikut ini merupakan prosedur untuk memperoleh inkulum *ESBL Eschericia coli* dengan konsentrasi 10^6 CFU/mL:

- Sampel bakteri *ESBL Eschericia coli* yang telah diidentifikasi, diinkolusikan kedalam *Nutrient Broth* dengan cara mengambil koloni *ESBL Eschericia coli* dari media NAP dengan menggunakan ose steril dengan api bunsen kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi steril yang berisi *Nutrient Broth*. Kemudian divortex ad homogen, setelah itu diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
- Biakan bakteri *ESBL Eschericia coli* diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 625 nm untuk mengetahui kepadatan bakteri atau *Optical Density* (OD). Nilai OD yang diperoleh dicatat sebagai N_1 untuk rumus perhitungan yang akan dilakukan pada poin (c).
- Volume *ESBL Eschericia coli* yang akan diambil dari tabung reaksi yang telah diperoleh nilai ODnya diperoleh dengan perhitungan sebagai berikut:

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

$$\text{Nilai OD} \times V_1 = 0,1 \times V_2$$

$$V_1 = 0,1 \times V_2 / \text{nilai OD}$$

Keterangan :

V_1 = Volume bakteri yang akan ditambah dengan pengenceran (volume ESBL *Eschericia coli* yang akan diambil dari tabung reaksi)

N_1 = Nilai OD hasil spektrofotometri (nilai absorbansi suspensi)

N_2 = Konsentrasi bakteri awal 0,1 yang setara dengan 10^8 CFU/mL (standar 0,5McFarland)

V_2 = Volume suspensi bakteri uji yang diharapkan (10 mL)

- d. Diambil volume bakteri sesuai hasil perhitungan, kemudian dimasukkan ke tabung reaksi steril kosong, ditambahkan larutan NaCl 0,9% steril *ad* 10 mL. Tutup dengan kapas steril lalu divortex *ad* homogen. Diperoleh biakan cair dengan konsentrasi 1×10^8 CFU/mL.
- e. Selanjutnya, diencerkan sampai konsentrasi 10^6 CFU/mL dengan cara menyiapkan tabung reaksi sebanyak 2 buah lalu pada tabung reaksi pertama dan kedua masing-masing diisi dengan larutan *Nutrient Broth* dengan volume 9 mL.
- f. Suspensi ESBL *Eschericia coli* konsentrasi 1×10^8 CFU/mL diambil sebanyak 1 mL dengan mikropipet dari tabung reaksi kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi pertama yang telah diisi 9 mL *Nutrient Broth*. Divortex *ad* homogen. Konsentrasi sekarang menjadi 1×10^7 CFU/mL.
- g. Suspensi ESBL *Eschericia coli* dengan konsentrasi bakteri 1×10^7 CFU/mL tersebut diambil sebanyak 1 mL larutan dari tabung reaksi pertama dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi kedua yang telah diisi 9 mL *Nutrient Broth*. Divortex *ad* homogen. Konsentrasi bakteri sekarang menjadi 1×10^6 CFU/mL dan siap digunakan.

4.7.6 Metode Difusi Cakram

4.7.6.1 Pembuatan Cakram Uji Ekstrak Etanol Daun Putri Malu (*Mimosa pudica*) dan Fraksinya

- a. Sebanyak 500 mg ekstrak etanol 96% daun putri malu (*Mimosa pudica*) ditimbang menggunakan METTLER TOLEDO™, kemudian dilarutkan dalam 1 mL DMSO 1%. Jika perlu divortex. Sehingga konsentrasi menjadi 500 mg/ml. Kemudian diisikan ke cakram kosong dengan diameter berukuran 6 mililiter berkapasitas 30 μ l sehingga dosis sampel menjadi 15 mg.
- b. Sebanyak 800 μ L larutan (a) diambil menggunakan mikropipet dan diencerkan menggunakan 200 μ L DMSO 1%, sehingga konsentrasi menjadi 400 mg/ml. Kemudian diisikan ke cakram kosong dengan diameter berukuran 6 mililiter berkapasitas 30 μ l sehingga dosis sampel menjadi 12 mg.
- c. Sebanyak 750 μ L larutan (b) diambil menggunakan mikropipet dan diencerkan menggunakan 250 μ L DMSO 1%, sehingga konsentrasi menjadi 300 mg/ml. Kemudian diisikan ke cakram kosong dengan diameter berukuran 6 mililiter berkapasitas 30 μ l sehingga dosis sampel menjadi 9 mg.
- d. Sebanyak 666 μ L larutan (c) diambil menggunakan mikropipet dan diencerkan menggunakan 334 μ L DMSO 1%, sehingga konsentrasi menjadi 200 mg/ml. Kemudian diisikan ke cakram kosong dengan diameter berukuran 6 mililiter berkapasitas 30 μ l sehingga dosis sampel menjadi 6 mg.

- e. Sebanyak 500 μ L larutan (d) diambil menggunakan mikropipet dan diencerkan menggunakan 500 μ L DMSO 1%, sehingga konsentrasi menjadi 100 mg/ml. Kemudian diisi ke cakram kosong dengan diameter berukuran 6 mililiter berkapasitas 30 μ l sehingga dosis sampel menjadi 3 mg. Perhitungan dosis sampel ekstrak dan fraksinya dapat dilihat pada **Lampiran 6**.
- f. Dilakukan prosedur tersebut untuk setiap sampel fraksi dari ekstrak etanol 96% daun putri malu (*Mimosa pudica*).

4.7.6.2 Uji Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Putri Malu (*Mimosa pudica*) dan Fraksinya menggunakan Metode Difusi Cakram

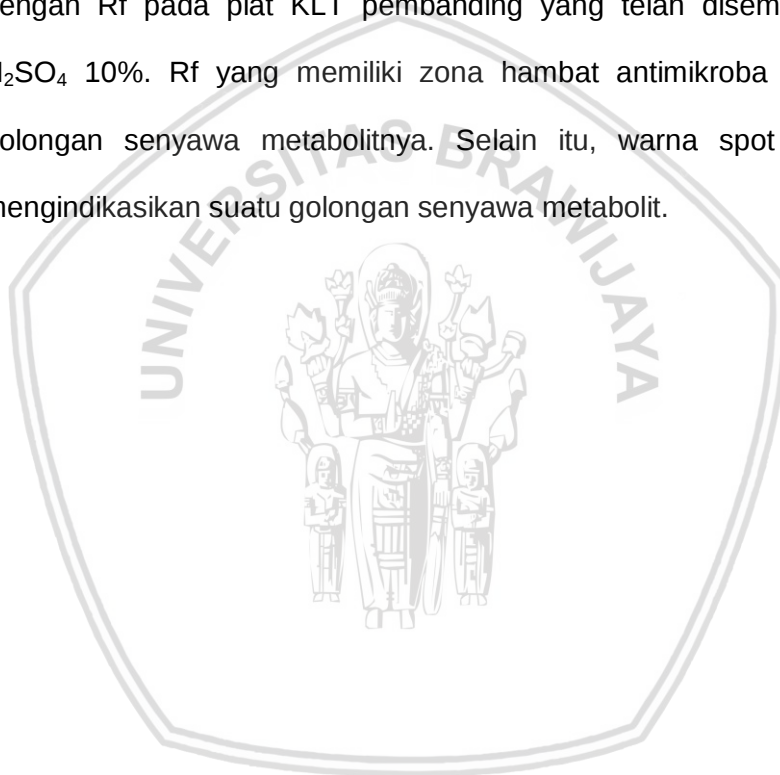
- a. *Muller Hinton Agar* digunakan dalam teknik difusi cakram dimana *ESBL Eschericia coli* disebarkan menggunakan sapu kapas steril dan kemudian Cakram berisi sampel ekstrak dan fraksinya pada berbagai dosis yaitu 3 mg, 6 mg, 9 mg, 12 mg, dan 15 mg ditempatkan dengan jarak yang sama di antara keduanya di dalam *plate* agar yang telah diinokulasi dengan *ESBL Eschericia coli* menggunakan metode *Kirby Bauer*. Cakram kontrol pembanding mengandung gentamisin (10 μ g) sedangkan cakram kontrol negatif DMSO1%.
- b. Cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Diameter zona hambat yang terbentuk diukur dalam milimeter dan rata-rata ditentukan.
- c. Dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali dengan kode bakteri berbeda. Dan dihitung rata-rata diameter zona hambat yang terbentuk.

4.7.7 Uji Antibakteri menggunakan Metode KLT-Bioautografi

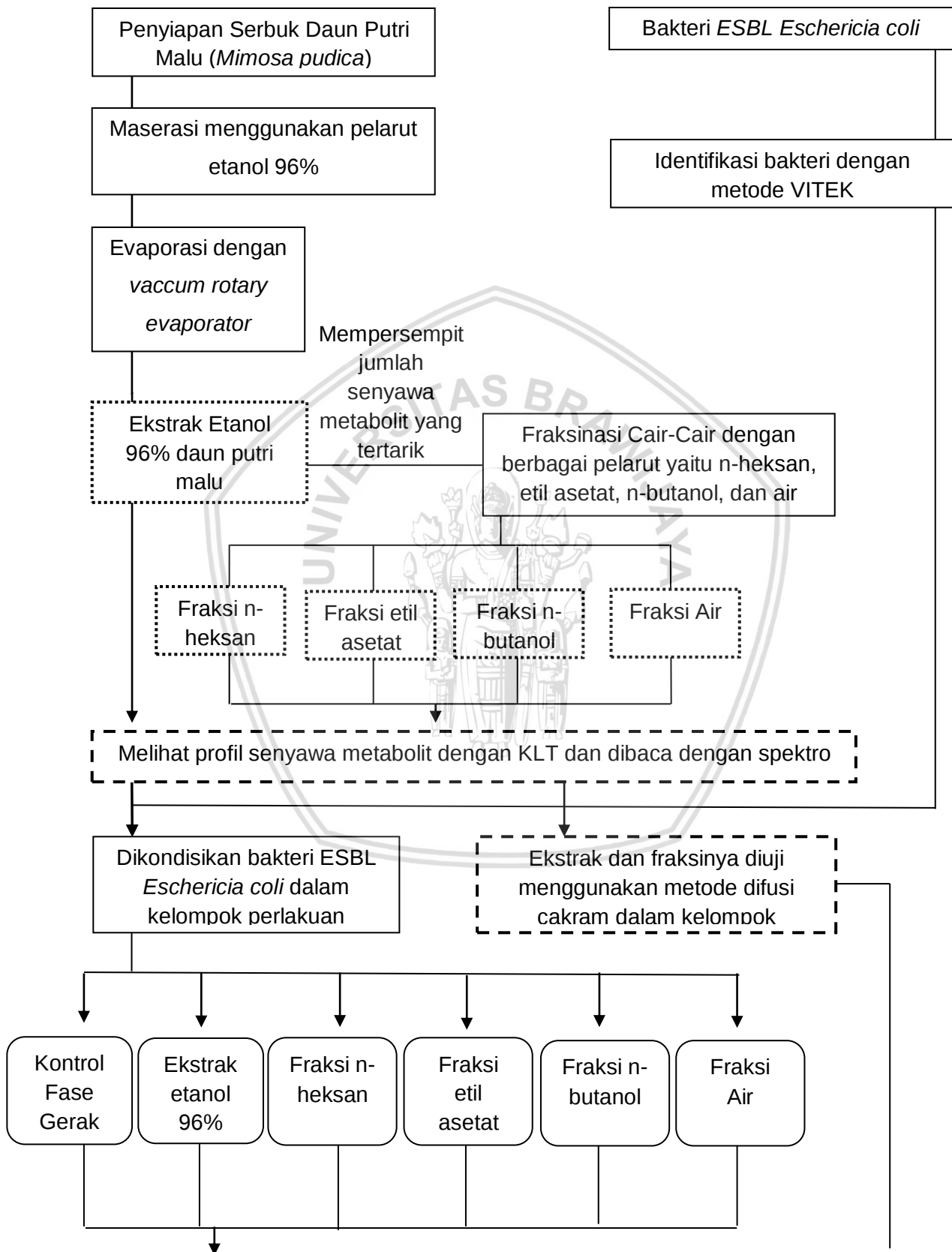
- a. Untuk mendeteksi senyawa metabolit aktif yang mempunyai aktivitas sebagai antibakteri digunakan metode bioautografi. Sebanyak 10 mg untuk masing-masing sampel ditimbang dan dilarutkan dalam 0,5 mL metanol. Sebanyak 5 μ l larutan sampel ditotolkan pada plat KLT berukuran 2 cm x 8,7 cm sehingga dosis yang ditotolkan sebesar 100 μ g tiap sampelnya, (perhitungan dosis sampel ekstrak dan fraksinya dapat dilihat pada **Lampiran 6**) dielusi dalam *chamber* dengan fase gerak yang sesuai (hasil optimasi) yaitu:
 - Kloroform: aseton: asam formiat (2:7,5:0,5) untuk ekstrak etanol dan fraksi n-butanol dari ekstrak etanol 96% daun putri malu (*Mimosa pudica*).
 - Kloroform: metanol (8:2) untuk fraksi n-heksan dari ekstrak etanol 96% daun putri malu (*Mimosa pudica*).
 - Etil asetat: n-heksan (4:6) untuk fraksi etil asetat dari ekstrak etanol 96% daun putri malu (*Mimosa pudica*).
 - Kloroform: aseton: asam formiat (2:7:1) untuk fraksi air fraksi etil asetat dari ekstrak etanol 96% daun putri malu (*Mimosa pudica*).
- b. Plat KLT diangin-anginkan pada lemari asam atau di keringkan menggunakan *hairdryer*, hingga fase gerak menguap atau plat KLT kering
- c. Plat KLT disemprot atau decelupkan ke dalam suspensi bakteri *ESBL Eschericia coli* yang mengandung sekitar 1×10^6 per ml.
- d. Bioautogram kemudian diinkubasi pada suhu 25°C selama 48 jam dalam kondisi lembab. Untuk visualisasi pertumbuhan mikroba, garam tetrazolium digunakan. Garam-garam ini diubah oleh dehidrogenase

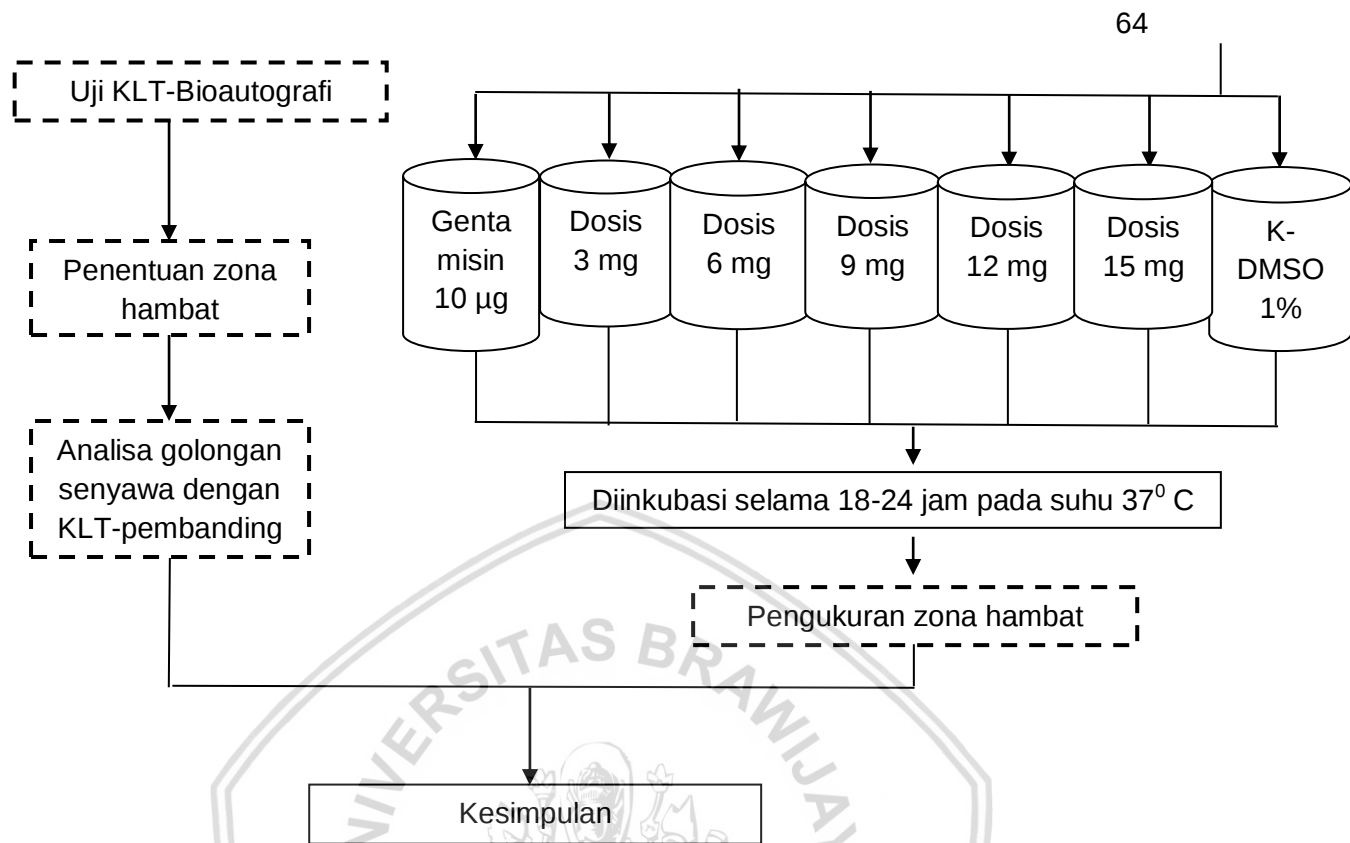
mikroorganisme hidup menjadi formazan yang sangat berwarna. Garam ini (MTT 0,05%) disemprotkan ke bioautogram dan diinkubasi kembali pada 25°C selama 24 jam atau pada suhu 37°C selama 3-4 jam.

- e. Zona putih yang jernih dengan latar belakang keruh atau keunguan pada pelat KLT menunjukkan aktivitas antimikroba sampel.
- f. Dihitung nilai Rf dari masing-masing zona hambat dan dibandingkan dengan Rf pada plat KLT pembanding yang telah disemprot dengan H₂SO₄ 10%. Rf yang memiliki zona hambat antimikroba diidentifikasi golongan senyawa metabolitnya. Selain itu, warna spot juga dapat mengindikasikan suatu golongan senyawa metabolit.



4.7.8 Skema Prosedur Penelitian





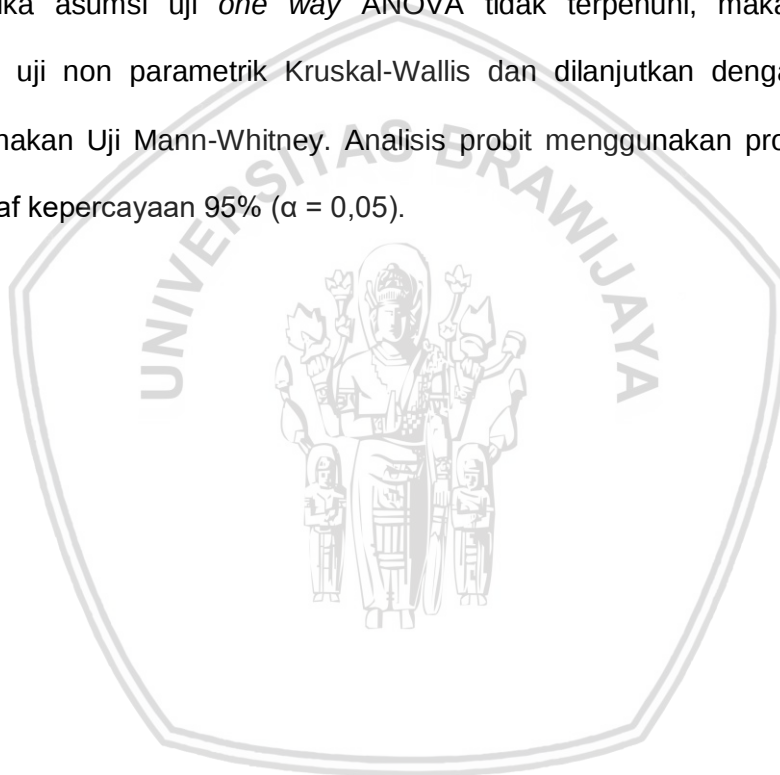
Gambar 4.1 Alur Penelitian

4.8 Analisis Data

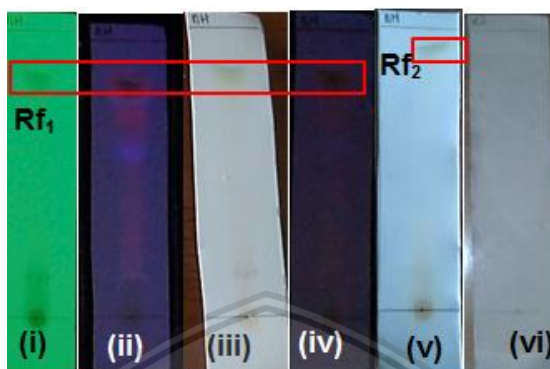
Uji statistik yang digunakan adalah one way ANOVA dilanjutkan dengan *Post Hoc* jika asumsi uji parametrik terpenuhi. Uji statistik *one way* ANOVA dilanjutkan dengan *Post Hoc* digunakan untuk melihat adanya perbedaan bermakna atau tidak antara masing-masing sampel ekstrak etanol daun putri malu (*Mimosa pudica*) dan fraksinya dalam berbagai dosis yang digunakan dalam menghambat pertumbuhan *ESBL Eschericia coli* dan kontrol pembanding gentamisin (10 µg) yang dinyatakan dalam satuan zona hambat milimeter (mm). Untuk mengetahui data yang diperoleh berdistribusi normal atau tidak, digunakan

uji Kolmogorov Smirnov dan homogenitas varian percobaan diuji menggunakan uji Levene. Analisis probit menggunakan program SPSS pada taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Aktivitas antibakteri secara *in vitro* dari sampel uji ditentukan dari zona hambat (mm) terhadap *ESBL Eschericia coli* menggunakan metode difusi cakram. Semakin besar zona hambat (mm), maka aktivitas antibakteri semakin tinggi.

Jika asumsi uji *one way* ANOVA tidak terpenuhi, maka digunakan alternatif uji non parametrik Kruskal-Wallis dan dilanjutkan dengan *post hoc* menggunakan Uji Mann-Whitney. Analisis probit menggunakan program SPSS pada taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$).



2. Hasil Uji KLT-Bioautografi Fraksi N-Heksan Ekstrak Etanol Daun Putri Malu (*M. pudica*)

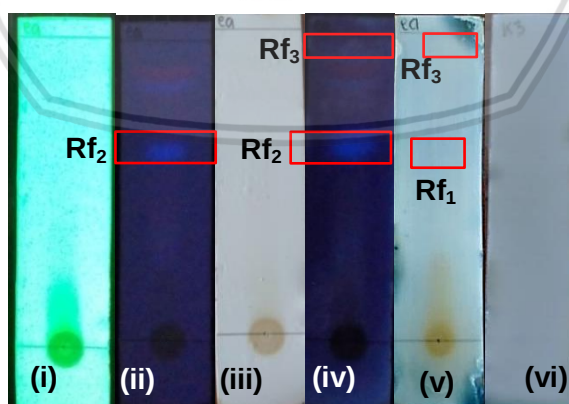


Gambar 5.3 Hasil Uji KLT-Bioautografi Fraksi N-Heksan Ekstrak Etanol Daun Putri Malu (*Mimosa pudica*)

Keterangan: (i) KLT pembanding pada UV λ 254 nm; (ii) KLT pembanding pada UV λ 366 nm sebelum disemprot H_2SO_4 ; (iii) KLT pembanding pada cahaya tampak setelah disemprot H_2SO_4 ; (iv) KLT pembanding pada UV λ 366 nm setelah disemprot H_2SO_4 ; (v) KLT-bioautografi sampel fraksi n-heksan; (vi) KLT-bioautografi kontrol negatif fase gerak (kloroform: metanol= 8: 2).

Bedasarkan hasil KLT-bioautografi fraksi n-heksan, pada $Rf_2 = 0,971$ terdapat zona hambat terhadap *ESBL Escherichia coli* yang diduga sama dengan spot pada KLT pembanding pada $Rf_1 = 0,843$.

3. Hasil Uji KLT-Bioautografi Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Daun Putri Malu (*M. pudica*)



Gambar 5.4 Hasil Uji KLT-Bioautografi Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanol Daun Putri Malu (*Mimosa pudica*)

Keterangan: (i) KLT pembanding pada UV λ 254 nm; (ii) KLT pembanding pada UV λ 366 nm sebelum disemprot H_2SO_4 ; (iii) KLT pembanding pada cahaya tampak setelah disemprot H_2SO_4 ; (iv) KLT pembanding pada UV λ 366 nm setelah disemprot H_2SO_4 ; (v) KLT-bioautografi sampel fraksi etil asetat; (vi) KLT-bioautografi kontrol negatif fase gerak (etil asetat: n-heksan= 4: 6).

Bedasarkan data hasil uji KLT-bioautografi sampel fraksi etil asetat ekstrak etanol daun putri malu (*Mimosa pudica*), pada $Rf_1 = 0,614$ terdapat zona hambat terhadap pertumbuhan *ESBL Escherichia coli* yang diduga sama dengan spot pada KLT pembanding pada $Rf_2 = 0,643$. Sedangkan pada $Rf_3 = 0,886-0,971$ juga terdapat zona hambat yang diduga sama dengan spot pada KLT pembanding pada Rf yang sama.

4. Hasil Uji KLT-Bioautografi Fraksi N-Butanol Ekstrak Etanol Daun Putri Malu (*Mimosa pudica*)

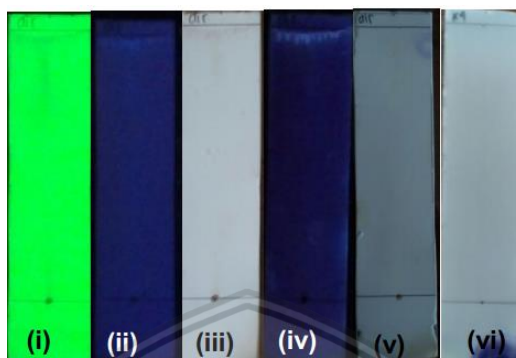


Gambar 5.5 Hasil Uji KLT-Bioautografi Fraksi N-Butanol Ekstrak Etanol Daun Putri Malu (*Mimosa pudica*)

Keterangan: (i) KLT pembanding pada UV λ 254 nm; (ii) KLT pembanding pada UV λ 366 nm sebelum disemprot H_2SO_4 ; (iii) KLT pembanding pada cahaya tampak setelah disemprot H_2SO_4 ; (iv) KLT pembanding pada UV λ 366 nm setelah disemprot H_2SO_4 ; (v) KLT-bioautografi fraksi n-butanol; (vi) KLT-bioautografi kontrol negatif fase gerak (kloroform: aseton: asam formiat= 2,5: 7,5: 0,5).

Bedasarkan data hasil uji KLT-bioautografi sampel fraksi n-butanol ekstrak etanol daun putri malu (*Mimosa pudica*), tidak terdapat zona hambat terhadap pertumbuhan terhadap *ESBL Escherichia coli*.

5. Hasil Uji KLT-Bioautografi Fraksi Air Ekstrak Etanol Daun Putri Malu (*Mimosa pudica*)



Gambar 5.6 Hasil Uji KLT-Bioautografi Fraksi Air Ekstrak Etanol Daun Putri Malu (*Mimosa pudica*)

Keterangan: (i) KLT pembanding pada UV λ 254 nm; (ii) KLT pembanding pada UV λ 366 nm sebelum disemprot H_2SO_4 ; (iii) KLT pembanding pada cahaya tampak setelah disemprot H_2SO_4 ; (iv) KLT pembanding pada UV λ 366 nm setelah disemprot H_2SO_4 ; (v) KLT-bioautografi fraksi air; (vi) KLT-bioautografi kontrol negatif fase gerak (kloroform: aseton: asam formiat= 2: 7: 1).

Bedasarkan data hasil uji KLT-bioautografi sampel fraksi air ekstrak etanol daun putri malu (*Mimosa pudica*), tidak terdapat zona hambat terhadap pertumbuhan terhadap *ESBL Escherichia coli*.

Hasil KLT-bioautografi terhadap kontrol negatif masing-masing fase gerak yang tidak menunjukkan zona hambat. Sehingga berdasarkan hasil uji antibakteri menggunakan metode KLT-bioautografi, dapat diketahui pada R_f dan warna spot tertentu pada setiap sampel ekstrak dan fraksinya yang membentuk zona hambat menunjukkan aktivitas antibakteri dari kandungan senyawa yang dapat dilihat pada **Tabel 5.4**.

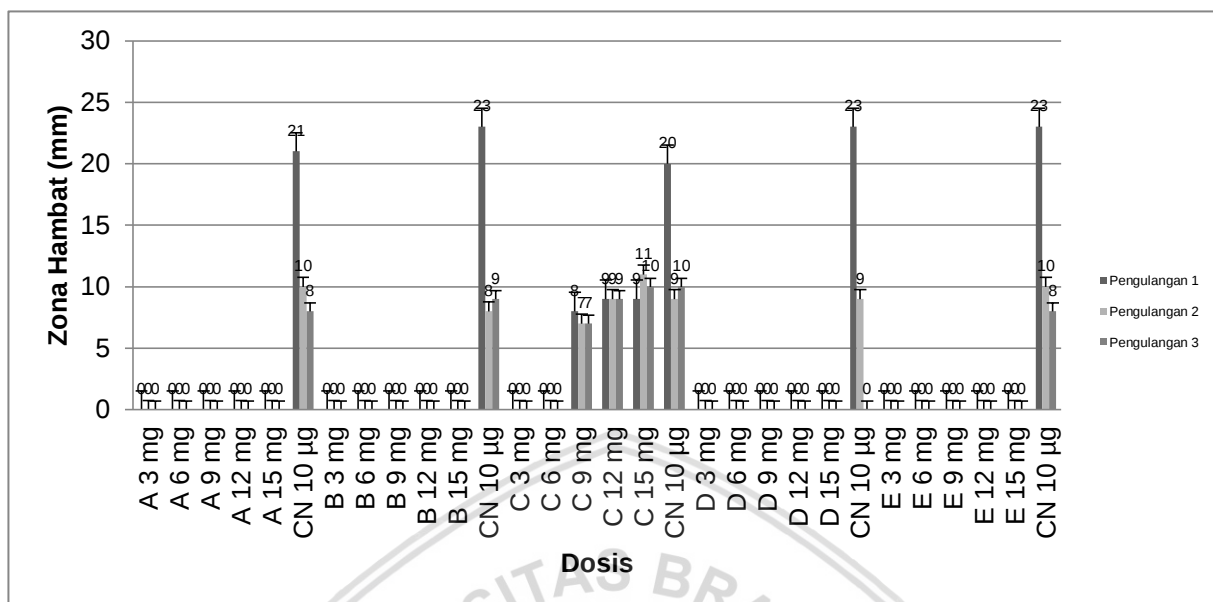
Tabel 5.4 Hasil Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Putri Malu (*Mimosa Pudica*) dan Fraksinya terhadap *ESBL Escherichia coli* dengan Metode KLT-Bioautografi

Hasil KLT-Bioautografi			KLT Pembanding				Interpretasi
Sampel	Rf	Rf	Warna Spot Sebelum Disemprot H ₂ SO ₄ 10%		Warna Spot Setelah Disemprot H ₂ SO ₄ 10%		
			UV λ 254 nm	UV λ 366 nm	Vis	UV λ 366 nm	
Ekstrak Etanol 96%	0,857	0,857	Kehitam an	Kehijauan	Kecoke latan	Kehijau an	Flavonoid
Fraksi N-Heksan	0,971	0,843	hijau tua	merah	hijau tua	merah	Pigmen Klorofil
Fraksi Etil Asetat	0,614	0,643	-	kebiruan	-	kebiruan	Flavonoid
	0,886-0,971	0,886-0,971	-	-	-	keunguan	Alkaloid/ Saponin
Fraksi N-Butanol	-	-	-	-	-	-	-
Fraksi Air	-	-	-	-	-	-	-

5.5 Analisis Data

Pada penelitian ini, analisa data dilakukan dengan menggunakan grafik pengaruh pemberian serial konsentrasi pada masing-masing sampel ekstrak etanol 96% daun putri malu (*Mimosa pudica*) dan fraksinya dibandingkan dengan antibiotik gentamisin (CN 10 μ g) sebagai kontrol pembanding.

Serial dosis 3 mg, 6 mg, 9 mg, 12 mg, dan 15 mg pada ekstrak etanol daun putri malu (*Mimosa pudica*), fraksi n-heksan, fraksi n-butanol, dan fraksi air tidak menunjukkan terbentuknya zona hambat. Sedangkan fraksi etil asetat menunjukkan zona hambat yang semakin besar seiring meningkatnya dosis dimulai dari konsentrasi 9 mg, 12 mg, dan 15 mg.



Gambar 5.7 Pengaruh Dosis Ekstrak Etanol Daun Putri Malu (*Mimosa pudica*) dan Fraksinya serta Gentamisin terhadap Diameter Zona Hambat menggunakan Metode Difusi Cakram

Keterangan: A= Ekstrak Etanol 96%, B= Fraksi N-Heksan, C= Fraksi Etil Asetat, D= Fraksi N-Butanol, E= Fraksi Air, CN= Gentamisin

Dari kelima sampel ekstrak etanol dan fraksinya, fraksi etil asetat adalah yang menunjukkan zona hambat sehingga dilanjutkan untuk diuji statistik. Dilakukan analisa non parametrik Kruskal-Wallis menggunakan SPSS karena asumsi uji parametrik *One Way ANOVA* untuk mengetahui signifikansi zona hambat yang dihasilkan fraksi etil asetat pada berbagai dosis dengan zona hambat antibiotik gentamisin tidak terpenuhi.

Bedasarkan hasil uji Kruskal-Wallis terhadap zona hambat yang terbentuk dari fraksi etil asetat pada lima konsentrasi dan antibiotik gentamisin (10 µg), terdapat perbedaan zona hambat yang signifikan secara statistik antara kelompok fraksi etil asetat 3 mg, fraksi etil asetat 6 mg, fraksi etil asetat 9 mg, fraksi etil asetat 12 mg, fraksi etil asetat 15 mg, dan kontrol pembanding antibiotik gentamisin (10 µg) ($p=0,008$). Jika nilai $p<0,05$ maka berarti ada pengaruh

variabel bebas (sampel fraksi etil asetat dan kontrol pembanding antibiotik gentamisin) terhadap variabel terikat (zona hambat).

Bedasarkan uji *post hoc* dengan Mann-Whitney, dapat diketahui bahwa tidak terdapat perbedaan zona hambat yang signifikan antara sampel fraksi etil asetat 3 mg dengan fraksi etil asetat 6 mg; fraksi etil asetat 12 mg dengan fraksi etil asetat 15 mg dan gentamisin; dan fraksi etil asetat 15 mg dengan gentamisin (10 µg) ($p > 0,05$). Terdapat perbedaan zona hambat yang signifikan antara sampel fraksi etil asetat 3 mg dengan fraksi etil asetat 9 mg, fraksi etil asetat 12 mg, fraksi etil asetat 15 mg, dan gentamisin (10 µg); fraksi etil asetat 6 mg dengan fraksi etil asetat 9 mg, fraksi etil asetat 12 mg, fraksi etil asetat 15 mg, dan gentamisin (10 µg); serta fraksi etil asetat 9 mg dengan fraksi etil asetat 12 mg, fraksi etil asetat 15 mg, dan gentamisin (10 µg) ($p < 0,05$). Signifikansi hasil uji *Post Hoc* dengan Mann-Whitney antar dua sampel dapat dilihat pada **Tabel 5.5**.

Tabel 5.5 Signifikansi Hasil Uji *Post Hoc* dengan Mann-Whitney

	Fraksi Etil Asetat 3 mg	Fraksi Etil Asetat 6 mg	Fraksi Etil Asetat 9 mg	Fraksi Etil Asetat 12 mg	Fraksi Etil Asetat 15 mg	Gentamisin (10 µg)
Fraksi Etil Asetat 3 mg		p= 1,000	p= 0,034*	p= 0,025*	p= 0,037*	p= 0,037*
Fraksi Etil Asetat 6 mg	p= 1,000		p= 0,034*	p= 0,025*	p= 0,037*	p= 0,037*
Fraksi Etil Asetat 9 mg	p= 0,034*	p= 0,034*		p= 0,034*	p= 0,046*	p= 0,046*
Fraksi Etil Asetat 12 mg	p= 0,025*	p= 0,025*	p= 0,034*		p= 0,121	p= 0,121
Fraksi Etil Asetat 15 mg	p= 0,037*	p= 0,037*	p= 0,046*	p= 0,121		p= 0,822
Gentamisin (10 µg)	p= 0,037*	p= 0,037*	p= 0,046*	p= 0,121	p= 0,822	

Keterangan: * = Berbeda Signifikan

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Uji Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Putri Malu (*Mimosa pudica*) dan Fraksinya menggunakan Metode Difusi Cakram

Pada penelitian ini, digunakan daun putri malu (*Mimosa pudica*) yang bertindak sebagai agen antibakteri dalam melawan pertumbuhan *ESBL Escherichia coli* yang diuji secara *in vitro* menggunakan metode difusi cakram dengan parameter yang didapatkan adalah diameter zona hambat (mm). Bakteri uji berasal dari isolat klinis pasien ISK (Infeksi Saluran Kemih) yang sebelumnya telah diidentifikasi dan menunjukkan *Escherichia coli* yang memproduksi *ESBL*. Berdasarkan hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun putri malu (*Mimosa pudica*) dan fraksinya pada berbagai dosis yaitu 3 mg, 6 mg, 9 mg, 12 mg, dan 15 mg, didapatkan zona hambat yang terbentuk adalah hanya dari sampel fraksi etil asetat pada dosis 9 mg, 12 mg, dan 15 mg. Sedangkan ekstrak etanol 96%, fraksi n-heksan, fraksi n-butanol, dan fraksi air tidak menunjukkan terbentuknya zona hambat dalam melawan pertumbuhan *ESBL Escherichia coli* pada semua dosis.

Aktivitas antimikroba daun putri malu (*Mimosa pudica*) dihubungkan dengan adanya senyawa bioaktif seperti terpenoid, flavonoid, glikosida, alkaloid, kina, fenol, tanin, saponin dan kumarin (Gandhiraja *et al.*, 2009). Pada penelitian ini, ekstraksi awal dilakukan dengan etanol 96% diikuti dengan fraksinasi bertingkat dengan rutan pelarut n-heksan, kemudian etil asetat, n-butanol dan akhirnya dengan air. Kelarutan senyawa metabolit juga mengikuti prinsip *like dissolve like*. Berbagai pelarut mengekstraksi kelas senyawa metabolit yang

berbeda berdasarkan indeks polaritasnya yang berbeda. Berdasarkan penelitian yang dilakukan Amengialue *et al.* (2016), ekstrak etanol daun putri malu (*Mimosa pudica*) menunjukkan diameter zona hambat secara berurutan dari konsentrasi 25 mg/ml, 50 mg/ml, dan 100 mg/ml terhadap isolat klinis *Escherichia coli* menggunakan metode sumuran adalah 5,3 mm; 10,7 mm; dan 14 mm. Sedangkan berdasarkan hasil penelitian, ekstrak etanol 96% daun putri malu (*Mimosa pudica*) terhadap isolat klinis *ESBL Escherichia coli* yang dilakukan menggunakan metode difusi cakram ini tidak menunjukkan terbentuknya zona hambat pada semua dosis yaitu 3 mg, 6 mg, 9 mg, 12 mg, dan 15 mg. Perbedaan hasil dari penelitiann sebelumnya dan hasil penelitian ini dimungkinkan karena perbedaan lingkungan tempat tumbuh putri malu (*Mimosa pudica*) dan bakteri yang digunakan dalam peneltian ini adalah MDR sehingga terdapat berbagai macam mekanisme resistensinya terhadap agen antibakteri. Adanya golongan senyawa antagonis terhadap sifat antibakteri terhadap *ESBL Escherichia coli* juga menjadi salah satu faktor yang menyebabkan tidak terbentuknya zona hambat pada sampel, terutama pada ekstrak etanol 96%. Menurut Archana *et al.* (2011), aktivitas antibakteri tumbuhan selain bergantung pada senyawa metabolit yang terkandung, juga memungkinkan dipengaruhi oleh konsentrasi senyawa metabolit dan adanya mekanisme sinergisme serta antagonisnya. Hal ini senada dengan hasil uji KLT-bioautografi pada ekstrak etanol 96% yang menunjukkan adanya aktivitas antibakteri terhadap *ESBL Escherichia coli* pada satu spot tertentu.

Hasil penelitian aktivitas antibakteri dari ekstrak n-heksan daun putri malu (*Mimosa pudica*) terhadap bakteri standar *Escherichia coli* dengan konsentrasi yang digunakan 33,3 µg/ml; 66,6 µg/ml; 133,3 µg/ml; dan 200 µg/ml

menggunakan metode difusi cakram menunjukkan zona hambat hanya pada konsentrasi 133,3 dan 200 µg/ml (Rajendran and Sundararajan, 2010). Sedangkan berdasarkan hasil penelitian, fraksi n-heksan, dari ekstrak etanol daun putri malu (*Mimosa pudica*) terhadap isolat klinis *ESBL Escherichia coli* yang dilakukan menggunakan metode difusi cakram ini tidak menunjukkan adanya zona hambat pada semua dosis yaitu 3 mg, 6 mg, 9 mg, 12 mg, dan 15 mg. Perbedaan hasil dari penelitiann sebelumnya dan hasil penelitian ini dimungkinkan karena perbedaan strain bakteri yang digunakan sehingga pada penelitian Rajendran tersebut dengan konsentrasi µg/ml sudah menunjukkan zona hambat dan juga perbedaan sampel yang digunakan dimana pada penelitian ini digunakan fraksi sehingga senyawa metabolitnya sudah terpisah berdasarkan polaritasnya. Selain itu, fraksi n-heksan yang bersifat non polar memungkinkan untuk tidak dapat berdifusi pada media yang bersifat polar sehingga tidak menunjukkan aktivitas antibakterinya terhadap *ESBL Escherichia coli*. Kemudian dimungkinkan juga berhubungan dengan kandungan senyawa metabolit di dalamnya yang memiliki aktivitas antibakteri dan kuantitas dari senyawa tersebut yang terlalu sedikit. Karena hasil uji KLT-bioautografi pada fraksi n-heksan menunjukkan adanya aktivitas antibakteri terhadap *ESBL Escherichia coli* pada satu spot tertentu.

Ekstrak etil asetat daun putri malu (*Mimosa pudica*) dari penelitian sebelumnya yang dilakukan Rajendran and Sundararajan (2010), hanya menunjukkan zona hambat pada konsentrasi 133,3 dan 200 µg/ml. Fraksi metanolik (metanol:etil asetat 50:50 dan 75:25) efektif pada konsentrasi 33,33 µg/ml. Zona hambatan yang dihasilkan dari fraksi metanolik (metanol:etil asetat 75:25) sebanding dengan antibiotik standar siprofloksasin dalam melawan

bakteri standar *Escherichia coli* yaitu dengan diameter zona hambat 29 mm. Hasil penelitian ini menunjukkan rata-rata diameter zona hambat yang dihasilkan fraksi etil asetat pada dosis yaitu 9 mg, 12 mg, dan 15 mg secara berurutan adalah 7,33 mm; 9 mm; dan 10 mm. Hal ini menunjukkan dengan meningkatnya konsentrasi maka zona hambat yang terbentuk juga semakin besar. Senyawa-senyawa semi polar atau polar yang memiliki aktivitas antibakteri memungkinkan jika akan lebih tertarik pada pelarut etil asetat karena sifatnya yang semi polar dengan indeks polaritas 4,4. Sebuah penelitian yang dilakukan oleh Tunna *et al.* (2015) menunjukkan fraksi etil asetat (EtOAc) ekstrak *Mimosa pudica* diketahui memiliki nilai TFC (*Total Flavonoid Content*) yang tinggi setara dengan standar kuersetin, dibandingkan fraksi n-heksan yang memiliki TFC (*Total Flavonoid Content*) sangat rendah. Menurut Tsuchiya *et al.* (1996), aktivitas antibakteri flavonoid mungkin karena kemampuannya untuk membentuk kompleks dengan protein ekstraselular dan terlarut dan kompleks dengan dinding sel bakteri.

Aktivitas antibakteri dari ekstrak n-butanol *Medicago falcata* L. (Javid *et al.*, 2015) yang merupakan tanaman satu famili dengan *Mimosa pudica* diuji menggunakan metode sumuran menunjukkan diameter zona hambat pada bakteri *Escherichia coli* sebesar 17,33 mm pada konsentrasi 20 mg/ml. Sedangkan berdasarkan hasil penelitian, fraksi n-butanol dari ekstrak etanol daun putri malu (*Mimosa pudica*) terhadap isolat klinis *ESBL Escherichia coli* yang dilakukan menggunakan metode difusi cakram ini tidak menunjukkan adanya zona hambat pada semua dosis yaitu 3 mg, 6 mg, 9 mg, 12 mg, dan 15 mg. Perbedaan hasil dari penelitiannya sebelumnya dan hasil penelitian ini dimungkinkan karena perbedaan strain bakteri yang digunakan dan juga perbedaan sampel yang digunakan walaupun satu famili, dan jenis sampel pada

penelitian ini adalah fraksi sehingga senyawa metabolitnya sudah terpisah berdasarkan polaritasnya. Selain itu, karena sifat pelarut n-butanol yang semi polar dengan indeks polaritas sedikit dibawah etil asetat, memungkinkan jika senyawa bioaktif yang memiliki aktivitas antibakteri akan terakumulasi dalam pelarut etil asetat pada saat fraksinasi yang dibuktikan dengan terbentuknya zona hambat pada tiga konsentrasi fraksi etil asetat yang digunakan.

Bedasarkan penelitian yang dilakukan Amengialue *et al.* (2016), ekstrak air daun putri malu (*Mimosa pudica*) menunjukkan diameter zona hambat secara berurutan dari konsentrasi 25 mg/ml, 50 mg/ml, dan 100 mg/ml terhadap isolat klinis *Escherichia coli* menggunakan metode sumuran adalah 0 mm; 3 mm; dan 6,3 mm. Sedangkan berdasarkan hasil penelitian, fraksi air dari ekstrak etanol daun putri malu (*Mimosa pudica*) terhadap isolat klinis *ESBL Escherichia coli* yang dilakukan menggunakan metode difusi cakram ini tidak menunjukkan adanya zona hambat pada semua dosis yaitu 3 mg, 6 mg, 9 mg, 12 mg, dan 15 mg. Pada penelitian sebelumnya menunjukkan terdapat zona hambat yang kecil dengan sampel ekstrak, dan pada penelitian ini digunakan fraksi sehingga senyawa metabolitnya sudah terpisah berdasarkan polaritasnya. Pada penelitian ini, etil asetat yang indeks polaritasnya sedikit lebih tinggi dibandingkan n-butanol digunakan terlebih dahulu sebelum n-butanol kemudian air, sehingga terdapat kemungkinan jika komponen yang seharusnya tertarik di pelarut polar akan rusak. Seperti diketahui bahwa fraksi air tidak menunjukkan zona hambat pada semua konsentrasinya.

Menurut Davise *et al.* (1994), faktor lingkungan seperti suhu, presipitasi, intensitas cahaya, dan ketinggian, yang menentukan iklim suatu wilayah, mempengaruhi akumulasi senyawa metabolit. Pernyataan tersebut mungkin

dapat menjelaskan mengapa penelitian aktivitas antibakteri daun putri malu (*Mimosa pudica*) di daerah/negara lain dapat menunjukkan zona hambat tertentu.

DMSO merupakan pelarut yang dapat melarutkan hampir seluruh senyawa baik polar dan nonpolar. Hasil uji menggunakan difusi cakram untuk kontrol negatif (DMSO 1% yang digunakan sebagai pelarut sampel) tidak menunjukkan adanya zona hambat, sehingga dapat dikatakan DMSO tidak memiliki efek antibakteri terhadap *ESBL Escherichia coli* pada konsentrasi 1%. Dan efek antibakteri dari sampel fraksi etil asetat adalah karena aktivitas dari senyawa metabolit yang terdapat di dalamnya.

Studi lain tentang antimikroba ekstrak tumbuhan menunjukkan bahwa mikroorganisme Gram positif biasanya lebih rentan terhadap agen antimikroba daripada bakteri Gram negatif (Othman, 2003), dimana pada penelitian ini digunakan *ESBL Escherichia coli* yang termasuk bakteri Gram negatif. Selain terkait dengan kandungan senyawa metabolit, hal yang mungkin menjelaskan bagaimana ekstrak etanol daun putri malu (*Mimosa pudica*) dan beberapa fraksinya tidak menunjukkan terbentuknya zona hambat adalah karena faktor resistensi dari *ESBL Escherichia coli*. Bakteri dapat mengalami mutasi atau konjugasi dan transformasi dengan adanya antibiotik yang dianggap sebagai faktor stresnya (Groisman dan Ochman, 1996). Beberapa mikroorganisme patogen menjadi resisten terhadap antibiotik β -laktam dengan memodifikasi antibiotik atau melepaskan beberapa enzim seperti transferase yang menghambat atau menghancurkan struktur kimia antibiotik (Wright, 2005). Plasmid dapat membawa gen resisten dan menularkannya ke bakteri lain (terutama bakteri Gram-negatif) melalui konjugasi (Wardal et al., 2010). Selain

itu, patogenitas resistensi juga dipengaruhi faktor individu. Dilihat dari metode yang digunakan yaitu difusi cakram, diketahui bahwa pada banyak penelitian menyatakan bahwa sampel yang diduga memiliki aktifitas antimikroba (ekstrak/fraksi) pada cakram disk kurang sehingga memungkinkan kurangnya pelepasan agen antimikroba ke permukaan kultur bakteri. Selain itu, hasil dari metode difusi cakram terbatas pada diameter zona hambat yang terbentuk yang menunjukkan aktivitas antibakterinya, tidak bisa ditentukan Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM).

Didapatkan bakteri *ESBL Escherichia coli* sensitif terhadap gentamisin pada pengulangan pertama dan resisten terhadap gentamisin pada pengulangan kedua dan ketiga yang didukung dengan hasil identifikasi bakteri menggunakan metode VITEK. Dikatakan bakteri tersebut sensitif terhadap gentamisin adalah jika diameter zona hambat yang terbentuk ≥ 15 mm. Dinding sel bakteri berfungsi sebagai penghalang alami untuk molekul kecil seperti aminoglikosida/AG (contoh: gentamisin) dan lebih lanjut dapat terjadi mutasi. Pompa eflux bekerja dengan mengeluarkan AG dari sel bakteri dan modifikasi yang menyebabkan resistensi terhadap AG. Mutasi pada target ribosom AG, juga berkontribusi terhadap resistensi. Masalah klinis yang berkembang adalah resistensi yang disebabkan oleh metiltransferase ribosom. Sejauh ini mekanisme penolakan AG yang paling umum adalah inaktivasi antibiotik dengan enzim pengubah AG (Tsodikovaa dan Kristin, 2016). Penelitian aktivitas antibakteri dari ekstrak polong dan biji *Crotalaria incana* (Alemu *et al.*, 2015) yang merupakan tanaman satu famili dengan *Mimosa pudica* menggunakan metode difusi cakram pada konsentrasi 25 mg/ml, 50 mg/ml, 75 mg/ml, dan 100 mg/ml terhadap *Escherichia coli* dengan kontrol pembanding antibiotik

gentamisin, didapatkan diameter zona hambat pada konsentrasi 100 mg/ml dari biji dan polong secara berurutan adalah 11,4 mm dan 12 mm, sedangkan gentamisin (50 mg/ml) menunjukkan diameter zona hambat 18 mm.

Bedasarkan hasil uji Kruskal-Wallis terhadap zona hambat yang terbentuk dari fraksi etil asetat pada lima konsentrasi dan antibiotik gentamisin (10 μ g), terdapat perbedaan zona hambat yang signifikan secara statistik antara kelompok fraksi etil asetat 3 mg, fraksi etil asetat 6 mg, fraksi etil asetat 9 mg, fraksi etil asetat 12 mg, fraksi etil asetat 15 mg, dan kontrol pembanding antibiotik gentamisin (10 μ g) ($p=0,008$) dengan rerata diameter zona hambat yang terbesar adalah pada antibiotik gentamisin (10 μ g). Berdasarkan uji *post hoc* dengan Mann-Whitney, dapat diketahui bahwa diameter zona hambat fraksi etil asetat dosis 3 mg, 6 mg, dan 9 mg berbeda signifikan dengan antibiotik gentamisin (10 μ g) ($p= 0,037$; $p= 0,037$; $p= 0,046$), dengan rerata diameter zona hambat gentamisin (10 μ g) yang lebih besar. Sedangkan diameter zona hambat fraksi etil asetat dosis 12 mg dan 15 mg tidak berbeda signifikan dengan antibiotik gentamisin (10 μ g) ($p= 0,121$; $p= 0,822$), dengan rerata diameter zona hambat gentamisin (10 μ g) yang sedikit lebih besar. Dapat dikatakan bahwa untuk membentuk diameter zona hambat yang hampir sama terhadap *ESBL Escherichia coli*, dibutuhkan dosis fraksi etil asetat yang lebih besar daripada gentamisin. Atau, aktivitas antibakteri gentamisin (10 μ g) terhadap *ESBL Escherichia coli* sebanding dengan fraksi etil asetat pada dosis 12 mg dan 15 mg dilihat dari diameter zona hambat yang terbentuk. Penelitian aktivitas antibakteri dari ekstrak polong dan biji *Crotalaria incana* (Alemu et al., 2015) yang merupakan tanaman satu famili dengan *Mimosa pudica* menggunakan metode difusi cakram pada konsentrasi 25 mg/ml, 50 mg/ml, 75 mg/ml, dan 100 mg/ml

terhadap bakteri *Escherichia coli* dengan kontrol pembanding antibiotik gentamisin (10 µg) tidak menunjukkan perbedaan zona hambat yang signifikan setelah di uji statistik ($p>0,05$).

6.2 Uji Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Putri Malu (*Mimosa pudica*) dan Fraksinya menggunakan Metode KLT-Bioautografi

Uji KLT-bioautografi dilakukan untuk menganalisa golongan senyawa metabolit yang terkandung dalam ekstrak etanol daun putri malu (*Mimosa pudica*) dan fraksinya yang menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *ESBL Escherichia coli*. Dengan dosis 100 µg masing-masing ekstrak etanol dan fraksinya, terdapat beberapa spot dari ekstrak etanol 96%, fraksi n-heksan, dan fraksi etil asetat menunjukkan zona hambat terhadap pertumbuhan *ESBL Escherichia coli* menggunakan metode KLT-bioautografi ini. Menurut Archana *et al.* (2011), aktivitas antibakteri tumbuhan selain bergantung pada senyawa metabolit yang terkandung, juga memungkinkan dipengaruhi adanya mekanisme antagonisnya. Hal ini senada dengan hasil difusi cakram pada sampel ekstrak yang tidak menunjukkan zona hambat sedangkan pada metode KLT-bioautografi menunjukkan hambatan pada suatu spot. Selain itu, pada sampel n-heksan yang bersifat non polar mungkin menyebabkan tidak terbentuknya zona hambat pada metode difusi cakram, sedangkan pada metode KLT-bioautografi menunjukkan hambatan pada suatu spot. Selain itu, terpisahnya golongan senyawa pada plat KLT pada metode KLT-bioautografi sehingga memungkinkan menunjukkan hambatan pada suatu spot.

Spot pada ekstrak etanol yang menunjukkan zona hambat diduga adalah senyawa metabolit golongan flavonoid yang pada Rf 0,857 spotnya berwarna

kehijauan pada sinar UV 366 nm. Menurut Cushnie (2005), aktivitas antimikroba senyawa flavonoid terhadap mikroorganisme patogen manusia dapat dikelompokkan menjadi tiga mekanisme. Pertama adalah flavonoid dapat menghambat sintesis asam nukleat karena cincin B flavonoid berhubungan dengan interkalasi atau ikatan hidrogen dengan penumpukan basa asam nukleat. Flavonoid juga mempengaruhi sintesis protein dan lipid namun pada tingkat yang lebih rendah. Mekanisme antimikroba lain dari flavonoid adalah penghambatan fungsi membran sitoplasma dengan mengurangi fluiditas membran sel bakteri, mengubah permeabilitas membran seluler dan merusak fungsi membran. Selain itu, flavonoid menunjukkan efek penghambatan pada bakteri dengan menghambat metabolisme energi yang diperlukan untuk serapan aktif berbagai metabolit dan biosintesis.

Kemudian zona hambat yang terbentuk pada sampel fraksi n-heksan diduga merupakan klorofil yang pada Rf 0,971 spotnya berwarna kemerahan pada sinar UV 366 nm. Zona hambat yang dimaksud menunjukkan aktivitas antibakteri senyawa metabolit terhadap *ESBL Escherichia coli*. Penelitian yang dilakukan Rajalakshmi dan Banu (2016) adalah untuk mengetahui aktivitas antimikroba klorofilin dari *Mimosa pudica*. Klorofilin adalah *water soluble sodium copper salt of chlorophyll* semi sintesis. Hasil yang diperoleh pada penelitian tersebut menunjukkan bahwa klorofilin dari *Mimosa pudica* memiliki aktivitas antimikroba potensial terhadap *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, dan *Candida albicans*. Klorofil bekerja dengan mengganggu permeabilitas dan toleransi sel.

Selanjutnya, zona hambat yang terbentuk pada sampel etil asetat diduga termasuk senyawa metabolit golongan favonoid yang pada Rf 0,614 spotnya

menunjukkan warna biru pada sinar UV 366 nm, serta pada Rf 0,886-Rf 0,971 spotnya berwarna keunguan pada sinar UV 366 nm yang diduga senyawa metabolit golongan alkaloid atau saponin. Saponin bersifat seperti deterjen dan dengan sifat aktif permukaan dapat mengganggu sel bakteri bakteri bakteri. Aktivitas biologis saponin bergantung pada sifat struktur aglikon dan jumlah gula mereka. Selain itu Gunawan (2009) menyatakan bahwa senyawa alkaloid memiliki gugus basa yang mengandung nitrogen yang akan bereaksi dengan senyawa asam amino penyusun dinding sel bakteri dan DNA bakteri, sehingga terjadi perubahan struktur dan susunan asam amino yang mengakibatkan perubahan keseimbangan genetik pada rantai DNA bakteri akan mengalami kerusakan kemudian mendorong terjadinya lisis sel bakteri yang akan menyebabkan kematian sel pada bakteri.

Sedangkan senyawa yang diduga furanokoumarin yang tereluasi pada fraksi n-heksan dan fraksi etil asetat didapatkan tidak menunjukkan zona hambat berdasarkan uji antibakteri menggunakan KLT-bioautografi. Hal ini bukan berarti furanokoumarin tidak memiliki aktivitas antibakteri, tetapi dimungkinkan kuantitas furanokoumarin yang terlalu sedikit dengan dosis penotolan sebesar 100 µg sehingga tidak cukup potensial untuk menghambat pertumbuhan *ESBL Escherichia coli* menggunakan KLT-bioautografi. Hal ini mungkin juga dapat menjelaskan bagaimana senyawa yang sama pada sampel berbeda ada yang menunjukkan aktivitasnya terhadap pertumbuhan *ESBL Escherichia coli* dan ada yang tidak. Sedangkan pada fraksi air tidak menunjukkan terdapat senyawa yang tereluasi dan tidak menunjukkan aktivitas antibakteri menggunakan metode KLT-Bioautografi.

Beberapa peneliti telah menyatakan bahwa komponen antimikroba dari ekstrak tumbuhan (senyawa terpenoid, alkaloid dan fenolik) berinteraksi dengan enzim dan protein membran sel mikroba yang menyebabkan terganggunya penyebaran fluks proton ke eksterior sel yang menyebabkan kematian sel atau dapat menghambat enzim yang diperlukan untuk biosintesis asam amino (Burt, 2004). Plat KLT kosong masing-masing diekspose dengan fase gerak tiap sampel kemudian dicelupkan pada bakteri dan disemprot MTT 0,05% digunakan sebagai kontrol negatifnya untuk menjelaskan efek antibakteri berasal dari senyawa metabolitnya. Hasil menunjukkan bioautogram kontrol negatif tidak menunjukkan adanya zona hambat, sehingga dapat dikatakan fase gerak dan MTT 0,05% tidak menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan *ESBL Escherichia coli*.

6.3 Implikasi terhadap Bidang Kefarmasian/Kedokteran

Implikasi dari penelitian ini terhadap bidang kefarmasian adalah didapatkannya pelarut yang efektif untuk mengekstrak daun putri malu yang berpotensi sebagai agen antimikroba baru yang dapat dikembangkan dalam berbagai formulasi dan sistem penghantaran obat sehingga memudahkan senyawa bioaktif dalam menjangkau target didalam sel bakteri. Selain itu, dengan diketahuinya fraksi etil asetat memiliki aktivitas terhadap *ESBL Escherichia coli* sebagai antibakteri, maka dapat dilakukan pemurnian lanjutan untuk didapatkan senyawa bioaktifnya. Dalam bidang kedokteran, fraksi etil asetat ekstrak etanol daun putri malu (*Mimosa pudica*) menjadi agen antimikroba terhadap infeksi yang disebabkan oleh *ESBL Escherichia coli* yang dapat dikembangkan pada penelitian selanjutnya.

BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan, dapat disimpulkan bahwa:

1. Ekstrak etanol daun putri malu (*Mimosa pudica*) dan beberapa fraksinya (fraksi n-heksan, fraksi n-butanol, dan fraksi air) tidak menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *ESBL Escherichia coli*, sedangkan fraksi etil asetat ekstrak etanol daun putri malu (*Mimosa pudica*) menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *ESBL Escherichia coli* yang diketahui berdasarkan terbentuknya diameter zona hambat. Didapatkan aktivitas antibakteri fraksi etil asetat ekstrak etanol daun putri malu (*Mimosa pudica*) pada dosis 12 mg dan 15 mg sebanding dengan antibiotik gentamisin (10 µg).
2. Didapatkan ekstrak etanol daun putri malu (*Mimosa pudica*) mengandung senyawa metabolit golongan flavonoid dan pigmen klorofil. Fraksi n-heksan ekstrak etanol daun putri malu (*Mimosa pudica*) mengandung senyawa metabolit golongan alkaloid, saponin, furanokoumarin, dan klorofil. Fraksi etil asetat ekstrak etanol daun putri malu (*Mimosa pudica*) mengandung senyawa metabolit golongan flavonoid, alkaloid, saponin, dan furanokoumarin. Fraksi n-butanol ekstrak etanol daun putri malu (*Mimosa pudica*) mengandung senyawa metabolit golongan flavonoid, alkaloid, dan saponin. Fraksi air ekstrak etanol daun putri malu (*Mimosa pudica*) mengandung senyawa metabolit golongan flavonoid, alkaloid, dan saponin.

3. Senyawa golongan flavonoid dari ekstrak etanol daun putri malu (*Mimosa pudica*) dan fraksi etil asetat ekstrak etanol daun putri malu (*Mimosa pudica*), pigmen klorofil dari fraksi n-heksan ekstrak etanol daun putri malu (*Mimosa pudica*), serta alkaloid dan saponin dari fraksi etil asetat ekstrak etanol daun putri malu (*Mimosa pudica*) menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *ESBL Escherichia coli* berdasarkan metode KLT-bioautografi.

7.2 Saran

Bedasarkan hasil penelitian, studi tambahan yang diperlukan mungkin adalah mengenai pemurnian dan kuantifikasi komponen bioaktif dari fraksi etil asetat ekstrak etanol daun putri malu (*Mimosa pudica*) sehingga mempermudah proses standarisasi dan penentuan dosis. Selain itu, untuk mengetahui dosis yang aman dan tepat dari fraksi etil asetat ekstrak etanol daun putri malu (*Mimosa pudica*) sebagai antibakteri terhadap *ESBL Escherichia coli* diperlukan uji lanjutan pada hewan coba untuk mengetahui efek farmakokinetik, farmakodinamik, dan toksisitasnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Aarthi N., Murugan K.. Antimalarial Activity And Phytochemical Screening Of Ethanolic Leaf Extract Of *Phyllanthus niruri* And *Mimosa pudica*. *IJPRD*. 2011; 3(3): 198 – 205.
- Abirami SKG., Sudha MK., Devi MN., & Devi PN.. The Antimicrobial Activity Of *Mimosa pudica* L. *International Journal Of Ayurveda And Pharma Research*. 2014; 2(1):105-108.
- Alemu MA., Mekonnen HG., Annisa ME.. Phytochemical analysis and antibacterial activity on seed and pod extracts of *Crotalaria incana*. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research*. 2015; 3(4): 100-108.
- Amengialue OO., Oviasogie EF., Omoigberale MNO., Omoregie BO., Bodunrinde RE.. Phytochemical Screening And Assessment Of Antimicrobial Activity Of *Mimosa pudica*. *European Virtual Conference on Natural and Applied Sciences*. 2016; 1: 1-10.
- Aminzadeh Z., Sadat KM., Shabani M.. Bacteriuria By Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* And *Klebsiella pneumoniae*: Isolates In A Governmental Hospital In South Of Tehran, Iran. *Iran J Kidney Dis*. 2008; 2(4): 197-200.
- Andersen OM., and Markham KR.. *Flavonoid: Chemistry, Biochemistry, and Applications*. USA: Taylor and Francis Group. 2006.
- Anonymous, *Mimosa pudica* Plant. Online [WWW]. aci.gov.au [Diakses 28 Mei 2017].
- Anonymous, *Mimosa pudica*. Online [WWW]. <https://lkcnm.nus.edu.sg/dna/organisms/details/486> [Diakses 28 Mei 2017].
- Anonymous, *Metode Corong Pisah*. Online [WWW]. www.gcsescience.com [Diakses 28 Mei 2017].
- Archana SJ., Paul R., And Tiwari A.. Indian Medicinal Plants: A Rich Source Of Natural Immuno-Modulator. *Int. J. Pharmacol*. 2011; 7: 198-205.
- Azmi L., et al. Pharmacological And Biological Overview On *Mimosa pudica* Linn. *International Journal Of Pharmacy & Life Science*. 2011; 2 (11).
- Banwart GJ. *Basic Food Microbiology*. Connecticut: Avi Publishing Company Inc. 1983.

- Bauer AW., Kirby WM., Sherris JC., Tenckhoff M.. Antibiotic Susceptibility Testing By A Standard Single Disc Method. *Am J Clin Path.* 1966; 45: 493.
- Ben-Ami R., Schwaber MJ., Navon-Venezia S., Schwartz D., Giladi M., Chmelnitsky I., Leavitt A., Carmeli Y.. Influx Of Extended-Spectrum Betalactamase-Producing Enterobacteriaceae Into The Hospital. *Clin Infect Dis.* 2006; 42(7):925–934.
- Bendgude RD., Maniyar MG., Kondawar MS., Patil SB., Hirave RV.. Anthelmintic Activity Of Leaves Of *Mimosa Pudica*. *International Journal Of Institutional Pharmacy And Life Sciences.* 2012; 2(1).
- BioMérieux. *Vitek 2™ Technology Product Information*. France: Lyon. 2013.
- Bonang, G. *Mikrobiologi Untuk Profesi Kesehatan*. Edisi 16. Jakarta: Buku Kedokteran EGC. 1992.
- Bonnet R. Growing Group Of Extendedspectrum B-Lactamases: The CTX-M Enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48: 1–14.
- Bradford PA. Extended-Spectrum B-Lactamases In The 21st Century: Characterization, Epidemiology, And Detection Of This Important Resistance Threat. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14: 933-951.
- Burt S. Essential Oils: Their Antibacterial Properties And Potential Applications In Foods—A Review. *Int J Food Microbiol.* 2004; 94: 223–253.
- Bush K., Fisher JF.. Epidemiological Expansion, Structural Studies, And Clinical Challenges Of New β -Lactamase From Gram-Negative Bacteria. *Ann Rev Microbiol.* 2011. 65: 455–478.
- Carter G.R. *Essentials Of Veterinary Bacteriology And Mycology*. 3rd Ed. USA: Iowa State Press. 1986.
- Chandra H., Parul B., Archana Y., Babita P., Abhay PM., Anant RM.. Antimicrobial Resistance And The Alternative Resources With Special Emphasis On Plant-Based Antimicrobials—A Review. *Plants.* 2017; 6: 16.
- Cheeke PR. *Saponins: Suprising Benefits Of Desert Plants*. Online [WWW]. 2003. <http://ipi.eregonstate.edu/spsu98/sponins.html> [Diakses 2 Februari 2018]
- Cheesbrough M. *Medical Laboratory Manual For Tropical Countries*. Vol. II. England: The Thetford Press. 1985.
- Choma I. *The Use Of Thin-Layer-Chromatography With Direct Bioautography For Antimicrobial Analysis*. Europe: LCGC Europe. 2005.

- Chowdhury SA. Cytotoxicity, Antimicrobial And Antioxidant Studies Of The Different Plant Parts Of *Mimosa pudica*. *Stamford Journal Of Pharmaceutical Sciences*. 2008; 1(1, 2): 80-84.
- Colorado RJ., Galeano JE., Martinez MA. Development Of Direct Bioautography As Reference Method For Testing Antimicrobial Activity Of Gentamicin Againsts *Escherichia Coli*. *Vitae*. 2007; 14(1): 67-71.
- Cushnie TPT., Lamb AJ.. Antimicrobial Activity Of Flavonoids. *International Journal Of Antimicrobial Agents*. 2005; 26(5), 343–356.
- Dalimartha S. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia*. Jilid 2. Jakarta: PT. Niaga Swadaya. 2008.
- Davise FS., Albrigo LG., Citrus AB.. *Citrus*. CAB. Wallington: International Press. 1994.
- Debenedetti S. *Isolation, Identification and Characterization of Allelochemicals*. Buenos Aires: Penerbit TLC dan PC Publisher. 2009; p. 30-66.
- DepKes RI. *Acuan Sediaan Herbal*. Jakarta: Direktorat Jendral POM-DepKes RI. 2000.
- Dewanjee S., Moumita G., Niloy B., Ritu K., Tarun KD.. Bioautography And Its Scope In The Field Of Natural Product Chemistry. *Journal Of Pharmaceutical Analysis*. 2014; 5(2): 75-84.
- Dhillon RHP., Clark J.. *ESBLs: A Clear And Present Danger?*. Online [WWW]. 2012. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/625170> [Diakses 25 Februari 2018]
- Dinan L. *Dereplication and Partial Identification of Compound*, in Sarker S.D., Latif Z., and Gray A.I., *Natural Products Isolations*. 2nd edition. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc. 2005; p. 30-58.
- Doyle MP., and Schoeni JL.. Survival And Growth Characteristics Of *Escherichia Coli* Associated With Hemorrhagic Colitis. *Appl Environ Microbiol*. 1984; 48(4): 855-856.
- Drugbank. *Gentamycin*. Online [WWW]. 2005. <https://www.drugbank.ca/drugs/db00798> [Diakses 2 Februari 2018]
- Elango V., Carolin ORPS.. Antiulcer Activity Of The Leaf Ethanolic Extract Of *Mimosa pudica* In Rats. *Hygeia. J. D. Med*. 2012; 4(1): 34-40.
- Escherich T. Die Darmbakterien Desneugeboren Und Sauglings. *Fortschr Med*. 1885; 3: 515–522 and 547–554.

- Fajriaty I., Hariyanto IH., Saputra IR., Silitonga M.. Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Dari Ekstrak Etanol Buah Lerak (*Sapindus rarak*). *Jurnal Pendidikan Informatika dan Sains*. 2017; 6(2): 243.
- Falagas ME., Karageorgopoulos DE.. Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Organisms. *J Hosp Infect*. 2009; 73(4): 345-54.
- Gandhiraja N., Sriram S., Meena V., Srilakshmi K., Sasikumar C, Rajeshwari R.. Phytochemical Screening And Antimicrobial Activity Of The Plant Extracts Of *Mimosa pudica* L. Against Selected Microbes. *Ethnobotanical Leaflets*. 2009; 13: 618-24.
- Ganguly M., Devi N., Mahanta R., Borthakur MK.. Effect Of *Mimosa pudica* Root Extract On Vaginal Estrous And Serum Hormones For Screening Of Antifertility Activity In Albino Mice. *EPUB*. 2007; 76(6): 482-5.
- Glenks SM., Wlodarczyk M., Radom M., and Cisowski W.. TLC as a Rapid and Convient Method for Saponin Investigation. *Journal of Planar Chromatography*. 2005; 18(2): 167-170.
- Greenwood. *Antibiotics Susceptibility (Sensitivity) Test, Antimicrobial Ant Chemoterapy*. San Fransisco, USA: Addison Westley Longman Inc. 1995.
- Groisman EA., and Ochman H.. Pathogenicity Islands: Bacterial Evolution in Quantum Leaps. *Cell*, 1996, 87: 791–794.
- Gunawan D., dan Mulyani S.. *Ilmu Obat Alam*. Jakarta: Penebar Swadaya. 2004.
- Guzmán DJ. *Especies Utiles De La Flora Salvadoreña*. San Salvador, El Salvador: Ministerio De Educación, Dirección De Publicaciones. 1975.
- Hagerman AE. *Tannin Chemistry*. USA: Departmen of Chemistry and Biochemistry, Miami University. 1998.
- Harborne JB. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan* (Terjemahan Kosaasih P Dan Iwang S). Ed 2. Bandung: Institut Teknologi Bandung. 1987; p. 234-259.
- Harris PN., and Ferguson JK.. Antibiotic Therapy For Inducible Ampc Beta-Lactamase-Producing Gram-Negative Bacilli: What Are The Alternatives To Carbapenems, Quinolones And Aminoglycosides. *Int J Antimicrob Agents*. 2012; 40: 297-305.
- Hayouni EA., Abedrabba M., Bouix M., Hamdi M.. The Effects Of Solvents and Extraction Method On The Phenolic Content and Biological Activities In Vitro of Tunisian *Quercus coccifera* L. and *Juniperus phoenica* L. Fruit Extracts. *Food chemistry*. 2007; 105: 1126-1134.

- Howard RA. *Flora Of The Lesser Antilles, Leeward And Windward Islands. Dicotyledoneae*, 1(4). Jamaica Plain, MA: Arnold Arboretum, Harvard University. 1988.
- Iro. *Prevalensi Infeksi Saluran Kemih Cukup Tinggi*. Online [WWW]. 2017. <http://fk.ugm.ac.id/2017/02/prevalensi-infeksi-saluran-kemih-cukup-tinggi/> [Diakses 19 Desember 2017].
- Jacoby GA. Ampc Beta-Lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2009; 22: 161-82.
- Jacoby GA., and Munoz-Price LS.. The New B-Lactamases. *N Engl J Med*. 2005; 352(4): 380-91.
- Javid T., et al. Antimicrobial Activity Of Three Medicinal Plants (*Artemisia indica*, *Medicago falcata* And *Tecoma stans*). *J Tradit Complement Altern Med*. 2015; 12(3): 91-96.
- Jawetz E., Melnick JL., dan Adelberg EA.. *Mikrobiologi Kedokteran*, Diterjemahkan Oleh Maulany RF., dan Edinugroho. Jakarta: Salemba Madika. 2005.
- Johnson JR. Virulence Factors In *Escherichia coli* Urinary Tract Infection. *Clinical Microbiology Reviews*. 1991; 4(1): 80-128.
- Joseph B., et al. Pharmacology And Traditional Uses Of *Mimosa Pudica*. *International Journal Of Pharmaceutical Sciences And Drug Research*. 2013; 5(2): 41-44.
- Juliantina F., Dewa AC., Nirwani B., Nurmasitoh T., and Bowo ET.. Manfaat Sirih Merah Sebagai Agen Anti Bakterial terhadap Bakteri Gram positif dan Gram negatif. *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia*. 2009.
- Kaper JB., Nataro JP., and Mobley HL.. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2004; 2: 123–140.
- Kataja J., Seppala H., Skurnik M., Sarkkinen H., Huovinen P.. Different Erythromycin Resistance Mechanisms In Group C And Group G Streptococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998; 42: 1493–1494.
- Kavanagh F. *Analytical Microbiology*. Vol II. New York And London: Academic Press. 1972.
- Khanfar HS., Bindayna KM., Senok AC., Botta GA.. Extended Spectrum Beta-Lactamases (ESBL) In *Escherichia coli* And *Klebsiella pneumoniae*: Trends In The Hospital And Community Settings. *J Infect Dev Ctries*. 2009; 3(4): 295-9.

- Koohsari H., Ghaemi E., Sadegh SM., Jahedi M., & Zahiri M.. The Investigation Of Antibacterial Activity Of Selected Native Plants From North Of Iran. *Journal Of Medicine And Life*. 2015; 8(2): 38–42.
- Kumala S., Raisa N., Rahayu L. & Kiranasasi A.. Uji Kepakaan Bakeri Yang Diisolasi Dari Urin Penderita Infeksi Saluran Kemih (ISK) Terhadap Beberapa Antibiotik Pada Periode Maret- Juni 2008. *Majalah Ilmu Kefarmasian*. 2009; 6 (2): 1693-9883.
- Kumar A., Schweizer HP.. Bacterial Resistance To Antibiotics: Active Efflux And Reduced Uptake. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005; 57: 1486–1513.
- Kuntaman, Sanarto S., Hendro W., Ni Made M.. The Sensitivity Pattern of Extended Spectrum Beta Lactmase- Producing Bacteria Against Six Antibiotics that Routinely Used in Clinical Setting. *Journal of the Indonesian Medical Association (Majalah Kedokteran Indonesia)*. 2011; 61(12): 482-486.
- Kusumaningtyas E., Estie A., Darmono. Sensitivitas Metode Bioautografi Kontak Dan Agar Overlay Dalam Pembuatan Senyawa Antikapang. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 2008; 6(2): 75.
- Lahey Clinic. *β -Lactamase Classification And Amino Acid Sequences For TEM, SHV And OXA Extended-Spectrum And Inhibitor Resistant Enzymes*. Online [WWW]. www.lahey.org/studies [Diakses 25 Februari 2018].
- Lalitha MK. *Manual on Antimicrobial Susceptibility Testing*, Vellore, Tamil Nadu: Department of Microbiolgy Christian Medical College. 2004.
- Lay BW. *Mikrobiologi*. Jakarta: Rajawali Press. 1994.
- Livermore DM., Hawkey PM.. CTX - M: Changing The Face Of Esbls In The UK. *J Antimicrob Chemother*. 2005; 56: 451-454.
- Livermore DM., Canton R., Gniadkowski M., et al. CTX-M: Changing The Face Of ESBLs In Europe. *J Antimicrob Chemother*. 2007; 59(2): 165-74.
- Lousiana Department Of Health. *Escherichia coli (E. coli) Infections*. Online [WWW]. 2016. www.infectiousdisease.dhh.louisiana.gov [Diakses 13 Desember 2017].
- Macek K. *Pharmaceutical Aplication Of Thin Layer And Paper Chromatograp*. 3rd Ed. New York: Elsevier Publishing Company. 2005.
- Madappa T. *Escherichia coli (E coli) Infections*. Online [WWW]. 2017. <https://emedicine.medscape.com/article/217485-overview#a6> [Diakses 13 Desember 2017].

- Mabry TJ., Markham KR., and Thomas MBS.. *The Systematic Identification of Flavonoids*. New York: Springer Verlag. 1970; p. 2204.
- Martinez-Martinez L., Pascual A., Jacoby GA.. Quinolone Resistance From A Transferable Plasmid. *Lancet*. 1998; 351: 797–799.
- Matsuura HN., Fett-Neto AG.. Plant Alkaloids: Main Features, Toxicity, and Mechanisms of Action. In: Gopalakrishnakone P., Carlini C., Ligabue-Braun R. (eds). *Plant Toxins. Toxinology*. Dordrecht: Springer. 2015; p. 200.
- Meenatchisundaram S., Priyagrace S., Vijayaraghavan R., Velmurugan A., Parameswari G., Michael A.. Antitoxin Activity Of *Mimosa pudica* Root Extracts Against Naja Naja And Bangarus Caerulus Venoms. *Bangladesh J Pharmacol*. 2009; 4: 105-109.
- Mehingko L., Awaloei H., Wowor MP.. Uji Efek Antimikroba Ekstrak Daun Putri Malu (*Mimosa pudica* Duchas & Walp) secara In Vitro. *Jurnal Biomedik*. 2010; 2(1): 44-49.
- Mehrgan H., Rahbar M.. Prevalence Of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* In A Tertiary Care Hospital In Tehran, Iran. *Int J Antimicrob Agents*. 2008; 31(2): 147-51.
- Melzer M., Petersen I.. Mortality following bacteraemic infection caused by extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *E. coli* compared to non-ESBL producing *E. coli*. *J Infect*, 2007. 2007; 55(3): 254-259.
- Merchant IA., Packer RA.. *Veterinary Bacteriology And Virology*. 7th Ed. USA: The Iowa State University Press. 1969.
- Migula. *Escherichia coli*. Online [WWW]. 1895. https://www.itis.gov/servlet/singlerpt/refrpt?search_type=author&search_id=author_id&search_id_value=180249 [Diakses 8 November 2017]
- Muthukumaran P., Pattabiraman K., Kalaiyaran P.. Hepatoprotective And Antioxidant Activity Of *Mimosa pudica* On Carbon Tetra Chloride-Induced Hepatic Damage In Rats. *International Journal Of Current Research*. 2010; 10: 46-53.
- Mitscherlich E., Marth EH.. *Microbial Survival In The Environment: Bacteria And Rickettsiae Important In Human And Animal Health*. New York: Springer-Verlag. 1984.
- Nachimuthu R., Chettipalayam S., Velramar B., Kurumandur R., Velu R.. Urinary Tract Infection And Antimicrobial Susceptibility Pattern Of Extended Spectrum Beta Lactamase Producing Clinical Isolates. *Adv Biol Res (Faisalabad)*. 2008; 2(5-6): 78-82.

- National Committee For Clinical Laboratory Standards. *Performance Standards For Antimicrobial Susceptibility Testing*. 15th Informational Supplement (M100-S15). Wayne, Pa: National Committee For Clinical Laboratory Standards,. 2005.
- Ngo Bum E. Anticonvulsant Activity Of *Mimosa pudica* Decoction. *Fitoterapia*. 2004; 75(3-4): 309-314.
- Nikaido H. Molecular Basis Of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003; 67: 593–656.
- Othman F. Chemical Constituents and Biological Activities of Flavonoids From Hydroponically Grown Pegaga (*Centella asiatica*, Linn., Urban) Extracts. *Universiti Putra Malaysia*. 2003.
- Panche AN., Diwan AD., Chandra SR.. Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*. 2016; 5(47) : 1-10.
- Paterson DL. B-Lactamase Inhibitors And New B-Lactamases. *Curr Treat Options Infect Dis*. 1999; 1: 85-7.
- Paterson DL., Bonomo RA.. Extended-Spectrum Beta-Lactamases: A Clinical Update. *Clin Microbiol Rev*. 2005; 18: 657-86.
- Pelczar MJ., Chan ECS.. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jakarta: Universitas Indonesia Press. 1988.
- Pelczar MJ., Chan ECS.. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jilid 2. Jakarta: Universitas Indonesia Press. 1998.
- Pincus DH. *Microbial Identification Using the Biomerieux VITEK 2 System*. Haselwood USA: Biomerieux. 2009.
- Pitout JD. Multiresistant Enterobacteriaceae: New Threat Of An Old Problem. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2008; 6: 657-69.
- Pitout JD., Nordmann P., Laupland KB., Poirel L.. Emergence Of Enterobacteriaceae Producing Extended-Spectrum Beta-Lactamases (Esbls) In The Community. *J Antimicrob Chemother*. 2005; 56: 52-9.
- Pitout JD. Extraintestinal Pathogenic Escherichia Coli: A Combination Of Virulence With Antibiotic Resistance. *Frontiers In Microbiology*. 2012; 3: 9.
- Pratiwi S. *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta: Erlangga. 2008.
- Rajalakshmi K., and Banu N.. Antimicrobial Activity Of Natural Chlorophyllin From Endangered Medicinal Plant *Mimosa pudica* L. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2016; 8(4): 387-389.

- Rajendran R., Krishnakumar E.. Hypolipidemic Activity Of Chloroform Extract Of *Mimosa Pudica* Leaves. *Avicenna J Med Biotech*. 2010; 2(4): 215-221.
- Rajendran R., Sundararajan R.. Preliminary Phytochemical Analysis & Anti-Bacterial Activity Of *Mimosa Pudica* Leaves. *International Journal Of Pharma and Bio Sciences*. 2010; 1(2): 1-8.
- Robinson T. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi*. Edisi Ke-6. Bandung: Penerbit ITB. 1995.
- Rodriguez-Bano J., Navarro MD., Romero L., Muniain MA., Decueto M., Rios MJ., Hernandez JR.. Pascual A Bacteremia Due To Extended-Spectrum Beta -Lactamase-Producing *Escherichia Coli* In The CTX-M Era: A New Clinical Challenge. *Clin Infect Dis*. 2006; 43(11): 1407–1414.
- Rodriguez-Bano J., Pascual A.. Clinical Significance Of Extended-Spectrum Beta-Lactamases. *Exp Rev Anti Infect Ther*. 2008; 6: 671-83.
- Rosa D., Jose G., Gonzalo P.. Antibiotic Susceptibility Of Bacterial Strains Isolated From Patients With Community- Acquired Urinary Tract Infections. *International J. Antimicrobial Agents*. 2001; 18: 211-215.
- Saifudin A., Rahayu V., Teruna HY.. *Standarisasi Bahan Obat Alam*. Ed 1. Yogyakarta. 2011.
- Savage GP. Saponins. In: Benjamin Caballero (ed). *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. 2nd Edition. Oxford: Academic Press. 2003; p. 5095-5098.
- Schwaber MJ., Carmeli Y.. Mortality And Delay In Effective Therapy Associated With Extended-Spectrum Beta-Lactamase Production In Enterobacteriaceae Bacteraemia: A Systematic Review And Meta-Analysis. *J Antimicrob Chemother*. 2007; 60: 913-20.
- Shakya P., Dhiraj S., Elina M., Vijay K.S., Rabin P.. ESBL Production Among *E. Coli* And *Klebsiella* Spp. Causing Urinary Tract Infection: A Hospital Based Study. *The Open Microbiology Journal*. 2017; 11: 23-30.
- Sherma J. Basic TLC Techniques, Materials, and Apparatus, dalam Sherma, J., Fried, B., (Eds.). *Handbook of Thin-Layer Chromatography*. New York: Marcel Dekker Inc. 2003; p. 68-90.
- Skoog A. *Priciple Of Instrumental Analysis*. Japan: Holt Sounder. 1981.
- Stamm WE., Norrby SR.. Urinary Tract Infections: Disease Panorama And Challenges. *J. Infect. Dis*. 2001; 183: SI-S4.
- Sudjadi. *Metode Pemisahan*. Yogyakarta: UGM Press. 1986.

- Tamilrasi T., Ananthi T.. Phytochemical Analysis And Anti Microbial Activity Of *Mimosa pudica* Linn. *Research Journal Of Chemical Sciences*. 2012; 2(2): 72-74.
- The Editor Of Ensiclopaedia Britannica. *Sensitive Plant*. Online [WWW]. 2017. <https://www.britannica.com/plant/sensitive-plant> [Diakses Pada 29 Mei 2017].
- Thirapanmethee K. Extended Spectrum B-Lactamases: Critical Tools Of Bacterial Resistance. *Mahidol University Journal Of Pharmaceutical Science*. 2012; 39(1): 1-8.
- Thoa NTL., et al. Antibacterial Activities Of The Extracts Of *Mimosa pudica* L. An In-Vitro Study. *International Journal On Advance Science Engineering Information Technology*. 2015; 5(5): 358-361.
- Tunna TS., Zaidul ISM., Ahmed QU., Ghafoor K., Al-Juhaimi FY., Uddin MS., et al.. Analyses And Profiling Of Extract And Fractions Of Neglected Weed *Mimosa pudica* Linn. Traditionally Used In Southeast Asia To Treat Diabetes. *South African Journal Of Botany*. 2015; 99: 144-152.
- Tsodikovaa SG., Kristin JL.. Mechanisms of Resistance to Aminoglycoside Antibiotics: Overview and Perspectives. *Medchemcomm*. 2016; 7(1): 11–27.
- Tsuchiya H., Sato M., Miyazaki T., Fujiwara S., Tanigaki S., et al.. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Ethnopharmacol*. 1996; 50: 27-34.
- Turbet CR., Thuraisingham K.. Feeding Trials With The Sensitive Plant *Mimosa pudica*. *Tropical Agriculturist, Ceylon*. 1948; 104(2): 81-86.
- Vandana KE., Honnavar P.. Amp C. Beta Lactamases Among ESBL Producing *Escherichia Coli* And *Klebsiella*. *J Clin Diagn Res*. 2009; 3: 1653-6.
- Venturella VS. Natural Product. In: Gardnerh, (Ed). Remington. *The Science And Practice Of Pharmacy*. 20th Edition. Philadelphia: Lippincott Williams And Wilkins. 2000.
- Volkov AG., Adesina T., Markin VS., Jovanov E.. Kinetics And Mechanism Of *Dionaea Muscipula* Ellis Trap Closing. *Plant Physiology*. 2008; 146: 694-702.
- Volkov AG. *Electrochemistry Of Photosynthesis* In: Bard AJ, Inzelt G, Scholz F. *Electrochemical Dictionary*, Eds. Berlin: Springer. 2008.
- Wardal E., Sadowy E., Hryniewicz W.. Complex Nature Of Enterococcal Pheromone-Responsive Plasmids. *Pol J Microbiol*. 2010; 59: 79–87.

Wijesekera. *The Medicinal Plant Industry*. Washington DC: CRC Press. 1991.

Wilke MS., Lovering AL., Strynadka NCJ.. B-Lactam Antibiotic Resistance: A Current Structural Perspective. *Curr Opin Microbiol*. 2005; 8: 525–533.

Wright GD. Bacterial Resistance To Antibiotics: Enzymatic Degradation And Modification. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005; 57: 1451–1470.

Yenny , Herwana E.. *Resistensi dari Bakteri Enterik: Aspek Global terhadap Antimikroba*. Jakarta: Universa Medicina. 2007.

