

UJI EFEKTIVITAS EKSTRAK ETANOL KACANG MERAH (*Phaseolus vulgaris* L.) TEHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI *Escherichia coli* SECARA IN VITRO

TUGAS AKHIR

Untuk Memenuhi Persyaratan

Memperoleh Gelar Sarjana Kebidanan



Oleh :

Agusta Afrilia Alvin

NIM 145070600111015

PROGRAM STUDI S1 KEBIDANAN

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2018

DAFTAR ISI

Halaman Sampul	i
Halaman Lembar Persetujuan	ii
Pernyataan Keaslian Tulisan	iii
Kata Pengantar	iv
Abstrak	vii
Abstract	viii
Daftar Isi	xi
Daftar Gambar	xiv
Daftar Tabel	xv
Daftar Lampiran	xvi
Daftar Singkatan	xvii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.3.1 Tujuan Umum	5
1.3.2 Tujuan Khusus.....	5
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
1.4.1 Manfaat Akademik	5
1.4.2 Manfaat Praktis.....	5



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 <i>Eschericia coli</i>	6
2.1.1 Taksonomi	6
2.1.2 Morfologi dan Sifat Umum.....	7
2.1.3 Medium Selektif Pertumbuhan	8
2.1.4 Struktur Antigen.....	10
2.1.5 Patologi dan Patogenesis.....	11
2.1.6 Manifestasi Klinik	12
2.1.7 Diagnosa Laboratorium.....	19
2.1.8 Pengobatan.....	19
2.1.9 Mekanisme Kerja Antibakteri.....	20
2.1.10 Resistensi Antibiotik.....	21
2.1.11 Uji Aktivitas Antimikroba.....	23
2.2 Kacang Merah (<i>Phaseolus vulgaris L.</i>).....	26
2.2.1 Taksonomi	26
2.2.2 Varietas Kacang Merah (<i>Phaseolus vulgaris L.</i>).....	27
2.2.3 Habitat Kacang Merah (<i>Phaseolus vulgaris L.</i>).....	28
2.2.4 Manfaat Kacang Merah (<i>Phaseolus vulgaris L.</i>).....	29
2.2.5 Kandungan Gizi Kacang Merah (<i>Phaseolus vulgaris L.</i>).....	31
2.2.6 Definisi dan Macam-macam Ekstraksi.....	38
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS	41
3.1 Kerangka Konsep	41

3.2	Deskripsi Kerangka Konsep.....	42
3.3	Hipotesis.....	43
BAB 4 METODE PENELITIAN.....		44
4.1	Rancangan Penelitian.....	44
4.2	Sampel Penelitian.....	44
4.3	Variabel Penelitian.....	45
4.3.1	Variabel Bebas (Variabel Independen)	45
4.3.2	Variabel Tergantung (Variabel Dependen).....	45
4.4	Tempat dan Waktu Penelitian.....	46
4.5	Alat dan Bahan Penelitian.....	46
4.5.1	Pembuatan Ekstrak Kacang Merah (<i>Phaseolus vulgaris L.</i>)..	46
4.5.2	Identifikasi Bakteri <i>E. coli</i>	47
4.5.3	Uji Kepekaan Ekstrak Kacang Merah (<i>Phaseolus vulgaris L.</i>)	48
4.6	Definisi Operasional.....	48
4.7	Prosedur Penelitian.....	51
4.7.1	Pembuatan Ekstrak Kacang Merah (<i>Phaseolus vulgaris L.</i>)..	51
4.7.1.1	Proses Pengeringan.....	51
4.7.1.2	Proses Ekstraksi	51
4.7.1.3	Proses Evaporasi.....	52
4.7.2	Identifikasi Bakteri	52
4.7.2.1	Pewarnaan Gram.....	52
4.7.2.2	Penanaman Kultur Bakteri <i>E. coli</i>	53
4.7.3	Pembuatan Suspensi Bakteri Uji.....	54
4.7.4	Uji Kepekaan Antibakteri Ekstrak Kacang Merah.....	54
4.8	Kerangka Alur Kerja Penelitian	56

4.9	Analisis Data.....	57
BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA		59
5.1	Hasil Penelitian.....	59
5.1.1	Hasil Identifikasi Bakteri.....	59
5.1.2	Hasil Ekstrak Etanol Kacang Merah.....	61
5.1.3	Hasil Uji	61
5.2	Analisis Data.....	64
5.2.1	Uji <i>One Way ANOVA</i>	65
5.2.2	Uji <i>Post Hoc Turkey</i>	65
5.2.3	Uji Korelasi dan Regresi	66
BAB 6 PEMBAHASAN		67
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN		73
7.1	Kesimpulan.....	73
7.2	Saran.....	73
DAFTAR PUSTAKA.....		74

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

**UJI EFEKTIVITAS EKSTRAK ETANOL KACANG MERAH (*Phaseolus vulgaris* L.)
TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI *Escherichia coli* SECARA *IN VITRO***

Oleh:

Agusta Afrilia Alvin

NIM 145070600111015

Telah diuji pada

Hari : Kamis

Tanggal : 5 April 2018

Dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji I,



Prof. Dr. dr. Teguh Wahyu Sardjono, DTM&H, M.Sc, Sp. Par.K
NIP. 195204101980021001

Penguji II,



Dr. dr. Dwi Yuni Nur Hidayati, M.Kes
NIP. 196603231997032001

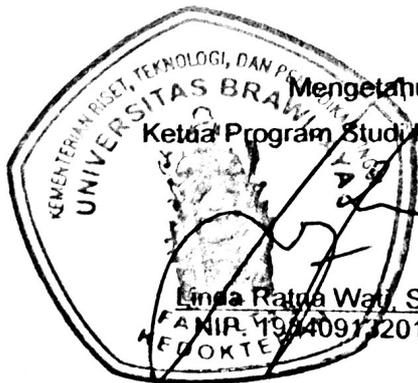
Penguji III,



Ningrum Paramita Sari, S. Keb, Bd, M.Biomed
NIK. 2012038707032001

Mengetahui,

Ketua Program Studi Kebidanan S1



Linda Ratna Wati, SST, M.Kes
NIP. 198409132014042001

ABSTRAK

Infeksi Saluran Kemih (ISK) merupakan penyakit yang bisa menyerang siapa saja. Wanita berpeluang lebih besar untuk mengalami ISK dibanding laki-laki, karena wanita memiliki uretra yang relatif lebih pendek. *Escherichia coli*, bakteri yang pada umumnya hidup di saluran cerna, merupakan penyebab ISK yang paling sering terutama pada wanita. Infeksi saluran kemih pada wanita hamil dapat menyebabkan infeksi intrauterin hingga gangguan kehamilan berupa abortus dan kelahiran prematur. Penggunaan antibiotika untuk ISK pada wanita hamil memiliki keterbatasan, karena tidak semua antibiotika aman untuk bayi dalam kandungan. Kacang merah (*Phaseolus vulgaris L.*) merupakan salah satu bahan makanan yang dipercaya memiliki komponen bioaktif yang berkhasiat sebagai bahan antibakteri. Penelitian ini dilakukan dengan rancangan *post test only with control group design* dengan tujuan untuk membuktikan bahwa ekstrak kacang merah (*Phaseolus vulgaris L.*) mempunyai efek antimikroba terhadap pertumbuhan *Escherichia coli* secara *In vitro*. Penelitian dilakukan pada media kultur bakteri *E.coli* yang dipapar dengan ekstrak etanol kacang merah dengan konsentrasi masing-masing 0%, 20%, 40%, 60%, 80% dan 100% menggunakan metode difusi lubang/sumuran, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Prosedur tersebut diulang sebanyak empat kali. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa ekstrak kacang merah dengan konsentrasi 80% memiliki zona hambat dengan diameter rata-rata paling besar (19,125 mm ± 0,3 mm), dan berbeda bermakna dibanding konsentrasi yang lain ($p < 0,05$, One way ANOVA). Hasil uji korelasi menunjukkan nilai regresi (*Ajusted R Square*) sebesar 0,747 ($p < 0.05$). Kesimpulan dari penelitian ini adalah ekstrak etanol kacang merah memiliki daya yang cukup kuat untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* secara *in vitro*.

Kata kunci: Infeksi bakteri, *Escherichia coli*, ISK, kacang merah, diameter zona hambat.

ABSTRACT

Urinary Tract Infection (UTI) is a disease that can affect anyone. Women are more likely to suffer UTI than men, because women have a relatively shorter urethra. Escherichia coli, a bacterium that generally lives in the gastrointestinal tract, is the most common cause of UTI especially in women. Urinary tract infections in pregnant women can lead to intrauterine infection and pregnancy disorders such as abortion and premature birth. Use of antibiotics for UTI in pregnant women has limitations, as not all antibiotics are safe for babies. Red beans (Phaseolus vulgaris L.) is one of the herbals that believed to have bioactive components with antibacterial effects. This study was conducted using post test only with control group design, to demonstrate that red bean extract (Phaseolus vulgaris L.) has an antimicrobial effect on Escherichia coli growth in vitro. The study was conducted on Escherichia coli culture media which exposed with red beans ethanol extract at concentrations of 0%, 20%, 40%, 60%, 80% and 100%, using hole diffusion method then incubated at 37 ° C for 18-24 hours.

The procedure were repeated for four times. The results showed that extract of red beans with 80% concentration had the inhibition zone with the largest mean diameter ($19.125 \text{ mm} \pm 0,3 \text{ mm}$), and was significantly different than the other concentration ($p < 0.05$, One way ANOVA). Result of correlation test showed regression value (Adjusted R Square) of 0.747 ($p < 0.05$). It can be concluded that red bean ethanol extract has potency to inhibit the growth of *Escherichia coli* bacteria *in vitro*.

Keywords: Bacterial infection, *Escherichia coli*, UTI, red bean, drag zone diameter.



ABSTRAK

Infeksi Saluran Kemih (ISK) merupakan penyakit yang bisa menyerang siapa saja. Wanita berpeluang lebih besar untuk mengalami ISK dibanding laki-laki, karena wanita memiliki uretra yang relatif lebih pendek. *Escherichia coli*, bakteri yang pada umumnya hidup di saluran cerna, merupakan penyebab ISK yang paling sering terutama pada wanita. Infeksi saluran kemih pada wanita hamil dapat menyebabkan infeksi intrauterin hingga gangguan kehamilan berupa abortus dan kelahiran prematur. Penggunaan antibiotika untuk ISK pada wanita hamil memiliki keterbatasan, karena tidak semua antibiotika aman untuk bayi dalam kandungan. Kacang merah (*Phaseolus vulgaris L.*) merupakan salah satu bahan makanan yang dipercaya memiliki komponen bioaktif yang berkhasiat sebagai bahan antibakteri. Penelitian ini dilakukan dengan rancangan *post test only with control group design* dengan tujuan untuk membuktikan bahwa ekstrak kacang merah (*Phaseolus vulgaris L.*) mempunyai efek antimikroba terhadap pertumbuhan *Escherichia coli* secara *In vitro*. Penelitian dilakukan pada media kultur bakteri *E.coli* yang dipapar dengan ekstrak etanol kacang merah dengan konsentrasi masing-masing 0%, 20%, 40%, 60%, 80% dan 100% menggunakan metode difusi lubang/sumuran, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Prosedur tersebut diulang sebanyak empat kali. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa ekstrak kacang merah dengan konsentrasi 80% memiliki zona hambat dengan diameter rata-rata paling besar (19,125 mm ± 0,3 mm), dan berbeda bermakna dibanding konsentrasi yang lain ($p < 0,05$, One way ANOVA). Hasil uji korelasi menunjukkan nilai regresi (*Ajusted R Square*) sebesar 0,747 ($p < 0.05$). Kesimpulan dari penelitian ini adalah ekstrak etanol kacang merah memiliki daya yang cukup kuat untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* secara *in vitro*.

Kata kunci: Infeksi bakteri, *Escherichia coli*, ISK, kacang merah, diameter zona hambat.

ABSTRACT

Urinary Tract Infection (UTI) is a disease that can affect anyone. Women are more likely to suffer UTI than men, because women have a relatively shorter urethra. Escherichia coli, a bacterium that generally lives in the gastrointestinal tract, is the most common cause of UTI especially in women. Urinary tract infections in pregnant women can lead to intrauterine infection and pregnancy disorders such as abortion and premature birth. Use of antibiotics for UTI in pregnant women has limitations, as not all antibiotics are safe for babies. Red beans (Phaseolus vulgaris L.) is one of the herbals that believed to have bioactive components with antibacterial effects. This study was conducted using post test only with control group design, to demonstrate that red bean extract (Phaseolus vulgaris L.) has an antimicrobial effect on Escherichia coli growth in vitro. The study was conducted on Escherichia coli culture media which exposed with red beans ethanol extract at concentrations of 0%, 20%, 40%, 60%, 80% and 100%, using hole diffusion method then incubated at 37 ° C for 18-24 hours.

The procedure were repeated for four times. The results showed that extract of red beans with 80% concentration had the inhibition zone with the largest mean diameter ($19.125 \text{ mm} \pm 0,3 \text{ mm}$), and was significantly different than the other concentration ($p < 0.05$, One way ANOVA). Result of correlation test showed regression value (Adjusted R Square) of 0.747 ($p < 0.05$). It can be concluded that red bean ethanol extract has potency to inhibit the growth of *Escherichia coli* bacteria *in vitro*.

Keywords: Bacterial infection, *Escherichia coli*, UTI, red bean, drag zone diameter.



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Infeksi adalah proses invasi dan multiplikasi berbagai mikroorganisme ke dalam tubuh (seperti bakteri, virus, jamur dan parasit), yang dalam keadaan normal mikroorganisme tersebut tidak terdapat di dalam tubuh (Potter *et al.*, 2005). Infeksi dapat menular dari satu orang ke orang yang lain bahkan dapat terjadi antara manusia dengan hewan. Penyakit infeksi merupakan penyebab utama kematian dan kecacatan di dunia. Kejadian penyakit infeksi masih menjadi masalah kesehatan yang tinggi baik di negara maju maupun berkembang seperti Indonesia. Profil Kesehatan Indonesia pada tahun 2009 mencatat bahwa infeksi menjadi nomor 2 dari 10 penyakit yang menyebabkan kematian di rumah sakit (Depkes RI, 2010).

Selama bertahun-tahun lamanya, jutaan manusia di dunia telah dilaporkan meninggal akibat infeksi bakteri (Jawetz, *et al.*, 2001). Infeksi bakteri merupakan satu dari tiga penyebab tersering kematian ibu dan anak, yakni sebanyak 11% kasus (Depkes RI, 2008). *Escherichia coli* adalah salah satu bakteri yang menyebabkan kasus infeksi (Madappa, 2010).

Escherichia coli merupakan bakteri yang dalam keadaan normal hidup pada usus manusia. Keberadaan *Escherichia coli* pada usus manusia membantu dalam mencegah masuknya mikroorganisme patogen. *Escherichia coli* dikatakan non patogen dalam jumlah yang normal, namun apabila jumlahnya berlebih akan menjadi agen penyebab berbagai penyakit (Venugopal *et al.*, 2009). *Escherichia coli*

merupakan penyebab dari banyak kasus infeksi terutama Infeksi Saluran Kemih (ISK). ISK lebih banyak terjadi pada wanita dibandingkan dengan laki-laki karena wanita memiliki struktur anatomi uretra yang relatif lebih pendek sehingga memungkinkan bakteri untuk naik ke dalam kandung kemih atau dikenal dengan *ascending infection* (Russo TA. *et al*, 2003).

Infeksi Saluran Kemih (ISK) yang terjadi pada ibu hamil terutama *ascending infection* pada saluran kemih dapat menyebabkan infeksi intrauterin dan Ketuban Pecah Dini (KPD) yang keduanya dapat menyebabkan abortus dan kelahiran prematur (Sherrard J. *et al*, 2011). Meningitis pada neonatus karena infeksi *E. coli* sebanyak 28.5%. Wanita hamil memiliki risiko kolonisasi yang lebih tinggi dengan strain kapsul K1 dari *E. coli*. Strain ini juga sering ditemukan pada sepsis neonatal dengan tingkat kematian 8%. Sebagian besar korban selamat mengalami kelainan neurologis atau gangguan perkembangan. Salah satu penyebab penyakit lain dari *E. coli* adalah *Enteropatogenic E. coli (EPEC)* (Madappa, 2010).

Pengobatan infeksi *E. coli* dewasa ini menjadi fokus di berbagai pelayanan kesehatan. Perkiraan biaya yang dibutuhkan dari mulai penentuan diagnosis hingga perawatan di lebih dari 20 tahun terakhir adalah 25\$ milyar dolar atau rata-rata 2,47\$ milyar dolar pada tahun 2000 (Russo TA. *et al*, 2003).

Penggunaan antibiotika untuk ISK pada wanita hamil memiliki keterbatasan, karena tidak semua antibiotika aman untuk bayi dalam kandungan. Selain itu, dewasa ini semakin banyak penggunaan antibiotik yang irasional menjadi salah satu faktor utama terjadinya resistensi antibiotik. Resistensi antibiotik adalah perubahan kemampuan bakteri hingga menjadi kebal terhadap antibiotik misalnya dengan

merubah ekspresi gen pengkode betalaktamase (CDC, 2013). Prevalensi resistensi antibiotik pun meningkat setiap tahun. Berdasarkan survei yang dilakukan oleh CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) pada tahun 2013 di Amerika Serikat, setiap tahun setidaknya dua juta manusia terkena infeksi bakteri yang resisten terhadap satu atau beberapa jenis antibiotik. Di Indonesia sendiri, data menunjukkan bahwa sekitar 23.000 orang meninggal setiap tahunnya karena mendapat infeksi bakteri yang telah resisten terhadap antibiotik (Departemen Kesehatan RI, 2005).

Indonesia adalah negara yang sangat kaya akan keragaman hayati. Dari empat puluh ribu jenis flora yang tumbuh di dunia, tiga puluh ribu diantaranya tumbuh di Indonesia dan 25% sudah dibudidayakan sedangkan sisanya masih tumbuh liar. Dari banyak tanaman herbal yang dibudidayakan (kurang lebih tujuh ribu jenis), lebih dari 940 jenis digunakan sebagai obat tradisional (Warsito H, 2011). Saat ini, 88% populasi di dunia mulai menggunakan tanaman herbal sebagai alternatif lini pertama, baik untuk mempertahankan kesehatan, pencegahan maupun pengobatan (Srinivasan *et al.*, 2001). Alasan dari penggunaan tanaman sebagai obat adalah dikarenakan dirasa cukup aman, efektif, dan murah (Warsito H, 2011).

Kacang merah atau dalam istilah asing disebut *kidney beans* yang mempunyai nama latin *Phaseolus vulgaris L.* yang termasuk dalam jenis polong-polongan (*legume*). Kacang merah memiliki warna merah pada kulitnya dan memiliki bentuk yang bervariasi sesuai dengan jenisnya. Kacang merah (*Phaseolus vulgaris L.*) merupakan salah satu bahan makanan yang dipercaya memiliki komponen bioaktif yang berkhasiat sebagai bahan antibakteri. Selain itu, kacang merah juga memiliki komponen bioaktif yang berhubungan dengan kesehatan seperti, alkaloid,

karbohidrat, katechin, serat, flavonoids, phasine, asam fitat, quercetin, saponin, steroid, tanin, terpenoid, dan inhibitor tripsin (Ocho A *et al.*, 2010). Sebagai tumbuhan yang banyak mengandung flavonoid, kacang merah dipercaya dapat digunakan sebagai antibakteri. Mereka juga terbukti melindungi tubuh dari tekanan lingkungan seperti merokok dan polusi (Cos P. *et al*, 2004). Jurnal berjudul "*Cranberries and Lower Urinary Tract Infection Prevention*" menyebutkan bahwa sumber makanan yang mengandung proantosianidin seperti buah cranberi dikaitkan dengan sejumlah manfaat kesehatan salah satunya infeksi saluran kemih (Cos *et al*, 2004). Proantosianidin ini merupakan kelas flavonoid yang banyak juga ditemukan pada kacang merah. Selain itu, proantosianidin juga banyak dijumpai pula terkandung dalam buah-buahan, kacang-kacangan, sereal, bir dan cokelat (Ou Keqin. *et al*. 2012). Karena tingginya insiden infeksi bakteri serta adanya ancaman resistensi bakteri setelah diberikannya terapi antibiotik profilaksis, dengan melihat potensi tanaman di Indonesia, penulis tertarik untuk mengangkat judul "*Uji Efektivitas Ekstrak Etanol Kacang Merah (Phaseolus vulgaris L) terhadap Pertumbuhan Bakteri Escherichia coli secara In Vitro*".

1.2 Rumusan Masalah

Bedasarkan latar belakang yang telah diuraikan di atas, maka rumusan masalah untuk penelitian ini adalah:

Apakah ekstrak kacang merah (*Phaseolus vulgaris L.*) mempunyai efek antimikroba terhadap pertumbuhan *Escherichia coli* secara *In vitro*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan bahwa ekstrak kacang merah (*Phaseolus vulgaris L.*) mempunyai efek antimikroba terhadap pertumbuhan *Escherichia coli* secara *In vitro*.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengukur diameter zona hambat ekstrak etanol kacang merah (*Phaseolus vulgaris L.*) sebagai antibakteri terhadap bakteri *E. coli*
2. Menganalisis hubungan antara konsentrasi ekstrak etanol kacang merah (*Phaseolus vulgaris L.*) dengan diameter zona hambat.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademis

1. Mengembangkan ilmu pengetahuan di bidang mikrobiologi berbasis bahan alam di bidang kesehatan pada umumnya dan bidang kebidanan pada khususnya.
2. Menambah khasanah ilmu pengetahuan mengenai manfaat kacang merah di bidang kesehatan khususnya di bidang kebidanan.

1.4.2 Manfaat Praktis

Memberikan informasi dan terapi Infeksi Saluran Kemih (ISK) oleh *Escherichia coli* dengan memanfaatkan kacang merah (*Phaseolus vulgaris L.*)

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli pertama kali diidentifikasi oleh dokter hewan Jerman, Theodor Escherich dalam studinya mengenai sistem pencernaan pada bayi hewan. Pada 1885, beliau menggambarkan organisme ini sebagai komunitas bakteri *coli*. Nama "*Bacterium Coli*" sering digunakan sampai pada tahun 1991. Ketika Castellani dan Chalames menemukan genus *Escherichia* dan menyusun tipe spesies *E. coli* (Jawetz *et al.*, 2008).

2.1.1 Taksonomi

Klasifikasi

Kingdom	: <i>Bacteria</i>
Filum	: <i>Proterobacteria</i>
Kelas	: <i>Gamma Proteobacteria</i>
Ordo	: <i>Enterobacteriales</i>
Family	: <i>Enterobacteriaceae</i>
Genus	: <i>Escherichia</i>
Species	: <i>Escherichia coli</i>

(Jawetz *et al.*, 2008)



Gambar 2.1. *E. Coli* dengan perbesaran 500x menggunakan mikroskop elektron (Prescott, 2002).

2.1.2 Morfologi dan Sifat Umum

E.coli merupakan bakteri Gram negatif bersifat anaerob fakultatif dan tidak dapat membentuk spora. Bakteri ini dapat hidup pada berbagai substrat dengan melakukan fermentasi anaerobik menghasilkan asam laktat, suksinat, asetat, etanol dan karbondioksida. *E. coli* termasuk family *Enterobacteriaceae*, bentuknya batang atau koma, terdapat tunggal atau berpasangan dalam rantai pendek (tebal batang 0,5-1,5 μm dan panjang 24 μm). Pertumbuhan paling baik pada suhu 37°C. Bakteri ini dapat membentuk kapsula atau mikrokapsula yang terbuat dari asam-asam polisakarida. *E. coli* dapat hidup soliter maupun berkelompok, umumnya motil (bergerak menggunakan flagel atau fimbriae), dapat berkembang cepat di air (Whittam *et al.*, 2011).

Escherichia coli yang diisolasi dari spesimen feses, urin, sputum, cairan serebrospinal, maupun darah dapat dikultur dengan menggunakan media agar *Mac Conkey* maupun agar EMB (*Eosin Methylene Blue*). Agar EMB yang mengandung satu jenis gula dalam konsentrasi tinggi akan menyebabkan organisme memfermentasi gula sehingga membentuk koloni berwarna kemerahan (Brooks *et al.*, 2005).

Escherichia coli atau sering disebut *E. coli* merupakan flora normal yang berada di dalam usus manusia dan mamalia lainnya. *E. coli* juga belakangan digunakan dalam kloning teknologi DNA rekombinan. Namun sayangnya, keberadaan *E. coli* di luar usus menjadi hal yang perlu diwaspadai karena bersifat patogen yang mematikan. Beberapa strain *E.coli* yang berbeda menyebabkan beberapa insidensi penyakit usus dan ekstraintestinal dengan faktor virulensi yang

memengaruhi berbagai proses seluler (James *et al.*, 2004). *E. coli* biasanya berkolonisasi di dalam saluran gastrointestinal bayi dalam beberapa jam setelah dilahirkan. Biasanya, *E. coli* hidup dan manusia hidup berdampingan dan saling menguntungkan. *E. coli* jarang menyebabkan penyakit kecuali pada insidensi *host immunocompromised* atau seperti dalam kasus peritonitis. Tempat hidup bakteri ini tepatnya adalah di lendir usus mamalia (James *et al.*, 2004).

Salah satu hipotesis yang menarik menunjukkan bahwa *E. coli* mungkin mengeksploitasi kemampuannya untuk memanfaatkan glukonat di usus besar lebih efisien daripada spesies bakteri lainnya, sehingga memungkinkan untuk menempati tempat metabolisme yang sangat spesifik (James *et al.*, 2004).

2.1.3 Medium Selektif Pertumbuhan

Bakteri *E. coli* adalah bakteri anaerob fakultatif, kemoorganotropik yang mempunyai tipe metabolisme fermentasi dan respirasi, tetapi pertumbuhan paling banyaknya justru pada keadaan anaerob. Pertumbuhan yang baik pada suhu 37°C dengan media yang mengandung 1% pepton sebagai sumber karbon dan nitrogen.

2.1.3.1 Media MacConkey Agar

Media ini mempunyai keistimewaan dengan memilih bakteri enterik Gram negatif yang dapat memfermentasikan laktosa, karena media ini mengandung laktosa, *crystal violet* dan *neutral red bile salt*. Kemampuan *E. coli* dalam memfermentasikan laktosa dapat menurunkan pH, sehingga mempermudah dalam absorpsi *neutral red* untuk mengubah koloni lain (*S. aureus*, *P. Aeruginosa* dan

Salmonella). Bila tumbuh tidak akan berwarna dikarenakan tidak mampu untuk memfermentasikan laktosa. Bakteri lain yang dapat tumbuh pada media ini adalah *Enterobacter*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Aerobacter* dan *Enterococcus* (Brooks *et al.*, 2004).

2.1.3.2 Media MacConkey Broth

Dalam media ini terdapat *Oxagall* yang berfungsi sebagai penghambat bakteri gram positif seperti *S. aureus*. Kandungan laktosa sangat penting untuk memilih *E. coli* dari bakteri lain yang tidak memfermentasikan laktosa, terutama *P. aeruginosa* dan *Salmonella*. Fermentasi laktosa oleh *E. coli* menyebabkan turunnya pH. Kondisi ini membuat lingkungan menjadi asam yang menyebabkan *bromo cresol purple* (media berwarna ungu) berubah menjadi kuning (media berwarna kuning) dan adanya pembentukan gas yang dapat diamati dalam tabung Durham. Sedangkan bakteri lain seperti *Salmonella* dan *P. aeruginosa* tidak dapat merubah warna media (Suwandi, 1999).

2.1.3.3 Media Eosin Methylene Blue

Media ini mengandung laktosa dan berfungsi untuk memilah bakteri yang memfermentasikan laktosa seperti *E. coli*, dengan bakteri yang tidak dapat memfermentasikan laktosa seperti *S. aureus*, *P. aeruginosa*, dan *Salmonella*. Bakteri yang dapat memfermentasikan laktosa dapat menghasilkan koloni berwarna gelap dengan kilap logam (*metallic sheen*). Sedangkan bakteri lain yang dapat tumbuh koloninya tidak berwarna. Adanya *methylene blue* dan *eosin* membantu

mempertajam adanya perbedaan tersebut. Namun, jika media ini digunakan pada tahap awal dapat menimbulkan keraguan dikarenakan pada saat yang sama juga tumbuh *P. aeruginosa* dan *Salmonella sp.* Media ini baik untuk mengkonfirmasi kontaminan tersebut adalah *E. coli* (Dzen *et al.*, 2003).

2.1.4 Struktur Antigen

Struktur antigen pada *E. coli* terdiri dari:

1. Antigen K

Polisakarida pada kapsul yang dapat melindungi bakteri terhadap lisis oleh komplemen dan fagosis. Juga lebih banyak ditemukan pada kasus pielonefritis daripada sistitis.

2. Antigen O

Bersifat toksik dan menyebabkan terjadinya inflamasi.

3. Hemolisin

Protein sitotoksik yang pada percobaan *In vitro* dapat merusak sel epitel (tubulus).

4. Colisin (colisin-V)

Jenis protein yang dapat membunuh bakteri lain.

5. Aerobaktin

Protein yang dapat mengikat dan menumpuk zat besi yang berguna untuk pertumbuhan bakteri.

(Brooks *et al.*, 2004).

2.1.5 Patologi dan Patogenesis

E. coli terdiri dari beberapa kelompok organisme yang dapat menginfeksi berbagai sistem hospes dan memproduksi berbagai faktor virulensi sebagai berikut:

2.1.5.1 Faktor Permukaan

E. coli merupakan penyebab utama meningitis, dimana 75% *E. coli* yang diambil dari isolasi penderita meningitis mampu memproduksi kapsul (antigen tipe K1). *E. coli* dengan antigen tipe K1 memiliki kekhususan yaitu kapsul yang dapat bertahan terhadap proses pembunuhan oleh neutrofil maupun serum normal manusia. Tipe antigen O penting sebagai predileksi ikatan pada reseptor yang terdapat dalam endotelium vaskular dan lapisan sel epitel pada plexus choroidalis dan otak pada anak kecil. Fimbria dan mannose sensitif fimbria (Dzen *et al.*, 2003). Fimbria digunakan sebagai faktor kolonisasi (*colonization factor*), perlekatan sel bakteri pada inangnya (Brooks, 2007).

1.1.5.2 Enterotoksin

E. coli mampu memproduksi beberapa enterotoksik yang dapat menimbulkan diare karena infeksi. Produksi ini sangat tergantung dari keberadaan plasmid yang mengkode produksi toksin. *E. coli* memiliki plasmid tertentu yang akan memproduksi *heat-labile enterotoksin* (LT) yang mirip dengan enterotoksin pada *vibrio cholera*. LT akan merangsang aktivitas adenisiklase dalam sel epitel mukosa usus halus, yang kemudian meningkatkan permeabilitas permukaan intestinal, yang menyebabkan

pengeluaran cairan dan elektolit (diare). Selain LT, *E. coli* juga dapat memproduksi dua enterotoksin yang tahan terhadap panas, *heat-stabel enterotoksin* (ST) yaitu STa (ST-I) dan STb (ST-II) (Mitterhuemer *et al.*, 2010).

1.1.5.3 Verotoksin

Verotoksin (VTEC) adalah bakteri *E. coli* yang diinfeksi bakteriofage dan dapat memproduksi sitotoksin. Karena kemiripannya dengan *shigatoxin*, verotoksin juga disebut *shigalike toxin* (SLT). Ada dua jenis verotoksin yakni VT-1 dan VT-2 yang keduanya menghambat sintesa protein pada sel eukariotik. Perbedaan VT-1 dan VT-2 terletak pada proses reaktivitas imunologis dan aktivitas biologis kultur jaringan (Jawetz *et al.*, 2008). Toksin inilah yang berhubungan dengan tiga sindrom pada manusia yaitu diare, *colitis hemoragik*, dan *hemolytic uremic syndrome* (HUS) (Dzen *et al.*, 2003).

2.1.6 Manifestasi Klinik

Manifestasi klinik infeksi oleh *E. coli* bergantung pada tempat infeksi dan tidak dapat dibedakan dengan gejala infeksi yang disebabkan oleh bakteri lain (Jawetz *et al.*, 2008). Penyakit yang disebabkan oleh *E. coli* yaitu:

2.1.6.1 Infeksi Saluran Kemih (ISK)

Infeksi Saluran Kemih (ISK) adalah invasi mikroba pada beberapa jaringan saluran kemih, kelanjutan dari meatus uretra ke korteks ginjal. Kriteria ISK

disederhanakan apabila didapatkan pada kultur urin positif lebih dari sama dengan 10^5 colony forming unit (cfu)/ml urin dan ditemukan 1 atau 2 spesies mikroorganisme dengan atau tanpa disertai gejala klinis lainnya. Infeksi ini membutuhkan pengobatan utama jangka panjang berupa pemberian profilaksis antibiotik sehingga memiliki risiko besar terhadap timbulnya resistensi bakteri (Hisano M *et al.*, 2012). Selain itu, meskipun pengobatan menggunakan antibiotik dirasa lebih efektif, perawatan ini memiliki efek samping, seperti jamur super-infeksi (oral thrush atau vagina) dan infeksi gastrointestinal terutama *Clostridium difficile* (Albert X *et al.*, 2004). Seiring dengan kemajuan di bidang ilmu dan teknologi, berbagai ilmu dikembangkan untuk memunculkan penemuan baru berupa pengobatan alternatif tanpa menggunakan antibiotik (Russo T.A *et al.*, 2003).

Infeksi saluran kemih sendiri diperkirakan terjadi pada setidaknya 60% wanita di beberapa negara selama hidup mereka (Russo T.A *et al.*, 2003). ISK 50 kali lipat lebih banyak terjadi pada perempuan dibandingkan dengan laki-laki karena wanita memiliki uretra yang relatif lebih pendek yang memungkinkan bakteri untuk naik ke dalam kandung kemih. Langkah pertama dalam infeksi adalah kolonisasi jaringan periuretra, diikuti oleh bagian dari bakteri melalui uretra. Langkah kedua adalah bakteri menuju ke uretra dan dinding kandung kemih serta mengalami proliferasi (Sobel JD., 1997). Karena prevalensinya yang tinggi, ISK merupakan masalah penting dalam masyarakat. Mahalnya biaya pengobatan menjadi tantangan tersendiri bagi para peneliti untuk menemukan alternatif lain dalam pengobatan ISK ini.

E. coli merupakan penyebab infeksi saluran kemih pada kira-kira 90 % wanita muda. Gejala dan tanda-tandanya antara lain sering kencing, disuria, hematuria, dan piuria. Nyeri pinggang berhubungan dengan infeksi saluran kemih bagian atas. UTI (*Urine Tract Infection*) atau lebih dikenal dengan ISK adalah infeksi *E. coli* ekstraintestinal yang paling umum dan disebabkan oleh uropathogenic *E. coli* (UPEC) (James B *et al.*, 2004).

Uropathogenic E. coli (UPEC) adalah infeksi dari bakteri yang paling umum. *E. coli* menyebabkan gangguan pada kandung kemih penderitanya yang dikenal dengan istilah sistitis dan apabila bakteri ini menuju ke ginjal maka akan mengakibatkan pielonefritis (James B *et al.*, 2004). *E. coli* dari sejumlah kecil serogrup O (Enam O kelompok menyebabkan 75% dari UTI) memiliki fenotipe yang secara epidemiologis terkait dengan sistitis dan pielonefritis akut pada saluran kemih normal, yang meliputi ekspresi p-fimbria, hemolisin, aerobaktin, resistensi serum dan enkapsulasi. Kelompok dan strain epidemi yang berkaitan dengan ISK telah teridentifikasi (Manges, A. R. *et al.* 2011).

Patogenesis ISK yang disebabkan oleh *E.coli* adalah pertama terjadi kontaminasi daerah periuretra bakteri *E. coli* yang sebelumnya berada di usus. Setelah itu terjadi perlekatan terhadap uroepitelial sel dengan fimbria tipe 1 (*hence mannose-sensible fimbriae* atau fimbria selektif) dan p-fimbria (*hence mannose-resistant fimbriae*). Fimbria tipe 1 ini dapat dihambat dengan fruktosa, namun p-fimbria tidak dapat dihambat oleh fruktosa atau molekul rendah karbohidrat lainnya melainkan dengan PACs atau proantosianidin. Setelah itu, terjadi proses invasi intraseluler. Karena invasi ini terjadilah apoptosis dan pengelupasan sel epitel

kandung kemih dan masuklah PMN (*polymorphonuclear*). Tipe 1 fimbria *E. coli* dipilih pada CFU (*colony forming units*) atau unit pembentukan koloni yang tinggi dan rendah O₂. *E. coli* naik ke ginjal dan p-fimbria mengikat sel epitel tubular ginjal. Proses berikutnya diinduksi sitokin dan terjadi hemolisin ganti rugi epitel. Sel epitel vacuolates dan glomeruli mengalami kerusakan. Selanjutnya *E. coli* melintasi tubular epitel penghalang sel untuk memulai bakteremia (James B *et al.*, 2004).

2.1.6.2 Vaginitis

Gejala vaginitis karena bakteri *E.coli* berhubungan erat dengan penipisan mukosa vagina dan menyebabkan adanya reaksi inflamasi. Umumnya banyak wanita tidak menyadari mengalami vaginitis dikarenakan tidak merasakan adanya gejala. Beberapa gejala yang dapat muncul diantaranya seperti dispareuni, peningkatan *vaginal discharge* (berwarna kuning, tidak berbau amis, terkadang menimbulkan rasa terbakar), warna kemerahan pada permukaan vagina dengan ulserasi kecil dan meluas pada pemeriksaan spekulum (predisposisi ISK atau HIV). Gejala dapat berlagsung dalam jangka waktu yang lama tergantung tingkat keparahan. Pengobatan dengan antibiotik tidak memberikan hasil yang jelas (Sherrard J. *et al*, 2011).

2.1.6.3 Infeksi Aerobik Intraamniotik dan Korioamnionitis

Bakteri Gram negatif menyebabkan infeksi intrauterin dan korioamnionitis serta abortus pada trimester dua (Rezeberga, 2008). Vaginitis terdeteksi secara klinis pada kultur sat ANC (*Antenatal Care*) pertama sebelum usia kehamilan dua

belas minggu, dimana dapat meningkatkan risiko korioamnionitis dan inflamasi pada tali pusat (Sherrard J. *et al*, 2011).

2.1.6.4 Abortus (keguguran)

Derivat lipopolisakarida yang terdapat pada bakteri *E. coli* menyebabkan gagalnya implantasi, diduga akibat peningkatan sitokin antiinflamatori. Pada kasus serotip *E. coli* menunjukkan adanya kasus aborsi berulang (*abortus iminens*) (Sherrard J. *et al*, 2011).

2.1.6.5 Prematuritas

Enteropatogen pada swab vagina mengindikasikan kelahiran prematur sebelum usia kehamilan 34 minggu atau 37 minggu karena keberadaan bakteri *E. coli* (Sherrard J. *et al*, 2011).

2.1.6.6 Diare

E. coli yang menyebabkan diare banyak ditemukan di seluruh dunia. *E. coli* diklasifikasikan oleh ciri khas sifat-sifat virulensinya, dan setiap kelompok menimbulkan penyakit melalui mekanisme yang berbeda. Ada lima kelompok galur *E. coli* yang patogen, yaitu:

a. ***E. coli* Enteropatogenik (EPEC)**

EPEC penyebab penting diare pada bayi, khususnya di negara berkembang. EPEC sebelumnya dikaitkan dengan wabah diare pada anak-anak di negara maju. EPEC melekat pada sel mukosa usus kecil.

b. ***E. coli* Enterotoksigenik (ETEC)**

ETEC penyebab yang sering dari “diare wisatawan” dan penyebab diare pada bayi di negara berkembang. Faktor kolonisasi ETEC yang spesifik untuk manusia menimbulkan pelekatan ETEC pada sel epitel usus kecil.

c. ***E. coli* Enteroinvasif (EIEC)**

EIEC menimbulkan penyakit yang sangat mirip dengan shigelosis. Penyakit yang paling sering pada anak-anak di negara berkembang dan para wisatawan yang menuju negara tersebut. Galur EIEC bersifat non-laktosa atau melakukan fermentasi laktosa dengan lambat serta bersifat tidak dapat bergerak. EIEC menimbulkan penyakit melalui invasinya ke sel epitel mukosa usus.

d. ***E. coli* Enterohemoragik (EHEK)**

EHEK menghasilkan verotoksin, dinamai sesuai efek sitotoksiknya pada sel Vero, suatu ginjal dari monyet hijau Afrika.

e. *E. coli* Enteroagregatif (EAEC)

EAEC menyebabkan diare akut dan kronik pada masyarakat di negara berkembang (James B *et al.*, 2004).

2.1.6.7 Sepsis

Bila pertahanan inang normal tidak mencukupi, *E. coli* dapat memasuki aliran darah dan menyebabkan sepsis. Bayi baru lahir dapat menjadi sangat rentan terhadap sepsis akibat bakteri ini, dikarenakan tidak adanya antibodi IgM. Sepsis dapat juga terjadi sebagai akibat sekunder infeksi saluran kemih (Jawetz *et al.*, 2008).

2.1.6.8 Meningitis

E. coli dan *Streptokokus* adalah penyebab utama meningitis pada bayi. *E. coli* merupakan penyebab pada sekitar 40% kasus meningitis neonatal (Jawetz *et al.*, 2008). 75% dari kasus meningitis karena *E. coli* ini mempunyai antigen K1 yang dapat bereaksi silang dengan polisakarida kapsular grup B dari *Neisseria meningitidis* (Dzen *et al.*, 2003). Mekanisme virulensi yang berhubungan dengan antigen K1 masih belum diketahui dengan jelas (Brooks, 2007).

Strain *E. coli* yang menginvasi pembuluh darah bayi dari nasofaring atau saluran gastrointestinal (Todar, 2008). Strain ini juga dapat menyebabkan sepsis neonatorum dengan tingkat kematian mencapai 8% dari semua kasus. Bayi-bayi yang sembuh dari sepsis ini kemungkinan mengalami gangguan neurologis atau pertumbuhan. Bayi dengan berat lahir rendah dengan hasil kultur pada

serebrospinal positif dapat memberikan gambaran prognosis yang buruk (Madappa, 2010).

2.1.7 Diagnosis Laboratorium

Diagnosis infeksi akibat bakteri *E. coli* dapat ditegakan dengan kultur spesimen pada medium yang umum digunakan untuk *Enterobacteriaceae*. Dengan pewarnaan gram, bakteri *E. coli* bersifat Gram negatif (Dzen *et al.*, 2003). Beberapa galur dapat menunjukkan hemolisis tipe beta pada medium agar darah (Jawetz *et al.*, 2008).

2.1.8 Pengobatan

Infeksi oleh *E. coli* dapat diobati menggunakan sulfonamida, ampisilin, sefalosporin, kloramfenikol, tetrasiklin dan aminoglikosida. Aminoglikosida kurang baik diserap oleh gastrointestinal, dan mempunyai efek beracun pada ginjal. Jenis antibiotik yang paling sering digunakan adalah ampisilin. Ampisilin adalah asam organik yang terdiri dari satu inti siklik dengan satu rantai samping. Inti siklik terdiri dari cincin tiazolidin dan cincin betalaktam, sedangkan rantai sampingnya merupakan gugus amino bebas yang mengikat satu atom H (Ganiswarna S.G., 1995).

Ampisilin memiliki spektrum kerja yang luas terhadap bakteri Gram negatif, misalnya *E. coli*, *H. Influenzae*, *Salmonella*, dan beberapa genus *Proteus*. Namun ampisilin tidak aktif terhadap *Pseudomonas*, *Klebsiella*, dan *Enterococci*

(Ganiswarna S. G., 1995). Ampisilin banyak digunakan untuk mengatasi berbagai infeksi saluran pernafasan, saluran cerna dan saluran kemih (Tjay T. H *et al.*, 2002).

2.1.9 Mekanisme Kerja Antibakteri

Menurut (Kee dan Hayes, 1996), mekanisme kerja antibakteri yang dapat menghambat atau menghancurkan mikroorganisme adalah sebagai berikut:

2.1.9.1 Menghambat Sintesis Dinding Bakteri

Mekanisme ini berlangsung saat bakteri sedang aktif membelah. Antibakteri menyerang dinding sel bekerja dengan cara memecah enzim pada dinding sel dan menghambat enzim dalam sintesis dinding sel.

2.1.9.2 Mengubah Permeabilitas Membrane Sel Bakteri

Mekanisme ini menyerang membran sel menjadi lisis. Rusaknya membrane sel bakteri dapat menyebabkan metabolit penting dalam sel keluar dari dalam sel.

2.1.9.3 Menghambat sintesis protein

Efek bakteriostatik dan bakterisidal dalam mekanisme ini adalah dengan cara memengaruhi tahap-tahap proses sintesis protein.

2.1.9.4 Mengganggu metabolisme dalam sel

Umumnya proses ini bersifat bakteriostatik dengan cara menghambat tahap-tahap metabolisme bakteri di dalam sel.

2.1.10 Resistensi Antibiotik

Salah satu obat pilihan yang digunakan untuk mengobati infeksi *E. coli* yang disebabkan oleh *E. coli* adalah ampisilin. Namun *E. coli* dilaporkan telah resisten terhadap ampisilin sehingga tidak digunakan lagi. Untuk menanggulangi terjadinya resistensi pada ampisilin maka diperlukan pengobatan antimikroba yang lain seperti trimethoprim-sulfamethoxazol (TMP-SMZ), siprofloksacin, norfloksacin, nitrofurantoin, dan fluoroquinolon. Dilaporkan pada tahun 1995 sampai 2001 terjadi kecenderungan resistensi antimikroba terhadap isolat *E. coli* dalam infeksi saluran urin pada pasien wanita di Amerika Serikat, 14,8-17% pertahun resisten terhadap trimethoprim-sulfametoxazol, 0,7-2,5% pertahun resisten terhadap siprofloksacin, 0,4-0,8% pertahun resisten terhadap nitrofurantoin, dan 36–37,4% per tahun resisten terhadap ampisilin, nilai presentase tersebut bervariasi dalam setiap tahunnya (Karlowsky J. A *et al.*, 2002). Resistensi intrinsik pada ampisilin disebabkan oleh ekspresi gen, yaitu gen pengkode betalaktamase yang berlokasi pada kromosom bakteri gram negatif. Gen ini mengkode enzim betalaktamase yang menginaktivasi cincin betalaktam ampisilin dengan cara menghidrolisis cincin betalaktam tersebut, sehingga menjadi resisten terhadap ampisilin (Russel A. D *et al.*, 1990).

Resistensi ampisilin dapat juga disebabkan oleh ekspresi gen pengkode betalaktamase yang terdapat pada plasmid. Plasmid adalah elemen genetik

ekstrakromosom yang bereplikasi secara otonom. Plasmid membawa gen pengkode resisten antibiotik, salah satunya adalah ampisilin. Resistensi yang diperantai oleh plasmid adalah resistensi yang umum ditemukan pada isolate klinik. Gen yang berlokasi pada plasmid lebih mudah pindah jika dibandingkan dengan gen yang berlokasi pada kromosom, sehingga gen resistensi yang berlokasi pada plasmid dapat ditransfer dari satu bakteri ke bakteri yang lain (Tjay T. H *et al.*, 2002). Resistensi menghasilkan perubahan bentuk pada gen bakteri yang disebabkan oleh dua proses genetik dalam bakteri:

a. Mutasi dan Seleksi (Evolusi Vertikal)

Evolusi vertikal didorong oleh prinsip seleksi alam. Mutasi spontan pada kromosom bakteri memberikan resistensi terhadap suatu populasi bakteri. Pada lingkungan tertentu bakteri yang tidak termutasi (nonmutan) mati, sedangkan bakteri yang termutasi (mutan) menjadi resisten, kemudian tumbuh dan berkembang biak.

b. Perubahan Gen Antar Galur dan Spesies (Evolusi Horizontal)

Evolusi horizontal yaitu pengambilalihan gen resistensi dari organisme lain. Contohnya, *streptomices* mempunyai gen resistensi terhadap streptomisin. Tetapi kemudian gen ini lepas dan masuk ke dalam *E. coli* atau *Shighella sp.* Beberapa bakteri mengembangkan resistensi genetik melalui proses mutasi dan seleksi, kemudian memberikan gen ini kepada beberapa bakteri lain melalui salah satu proses perubahan genetik pada bakteri.

Penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri patogen merupakan permasalahan kesehatan yang pernah dihadapi oleh hampir setiap orang. Hingga saat ini, cara yang dilakukan untuk pengobatan berbagai jenis penyakit infeksi adalah dengan pemberian antibiotik. Jenis antibiotik yang paling banyak digunakan adalah betalaktam. Antibiotik ini dipilih karena tingkat selektivitasnya tinggi, mudah diperoleh, dan analog sintetikanya tersedia dalam jumlah banyak (Jawetz *et al.*, 2008).

Meningkatnya penggunaan antibiotik betalaktam, memacu meningkatnya resistensi bakteri terhadap antibiotik tersebut. Mekanisme utama resistensi bakteri Gram-positif dan Gram-negatif terhadap antibiotik betalaktam yakni dengan menghasilkan enzim betalaktamase, yang berperan memotong cincin betalaktam, sehingga aktivitas antibakterinya hilang. Enzim betalaktamase merupakan enzim perusak penisilin yang dihasilkan oleh sejumlah bakteri gram negatif. Enzim ini membuka cincin betalaktam dari penisilin dan sefalosporin serta menghilangkan daya antimikrobanya. Klasifikasi betalaktamase sangat kompleks, didasarkan atas sifat genetik, sifat-sifat biokimia, dan substrat yang berafinitas terhadap inhibitor betalaktamase (Jawetz *et al.*, 2008).

2.1.11 Uji Aktivitas Antimikroba

Tujuan pengukuran aktivitas antibakteri adalah untuk menentukan potensi suatu zat yang diduga atau telah memiliki aktivitas sebagai antibakteri dalam larutan

terhadap suatu bakteri (Jawetz et al., 2001). Macam-macam metode uji aktivitas antimikroba antara lain:

2.1.11.1 Metode Pengenceran Agar

Metode pengenceran agar sangat cocok untuk pemeriksaan sekelompok besar isolat versus rentang konsentrasi antimikroba yang sama (Sacher & McPherson, 2004). Kelemahan metode ini yaitu hanya dapat digunakan untuk isolasi tipe organisme yang dominan dalam populasi campuran (Jawetz et al., 2005).

2.1.11.2 Difusi Agar

Metode difusi digunakan untuk menentukan aktivitas agen antimikroba. Piringan yang berisi agen antimikroba diletakkan pada media agar yang telah ditanami mikroorganisme yang akan berdifusi pada media agar tersebut. Area jernih pada permukaan media agar mengindikasikan adanya hambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh agen antimikroba (Pratiwi, 2008). Metode difusi agar dibedakan menjadi dua yaitu cara Kirby Bauer dan cara sumuran.

1. Cara Kirby Bauer

Metode difusi disk (tes Kirby Bauer) dilakukan untuk menentukan aktivitas agen antimikroba. Piringan yang berisi agen antimikroba diletakkan pada media agar yang telah ditanami mikroorganisme yang akan berdifusi pada media agar tersebut. Area jernih mengindikasikan adanya hambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh agen antimikroba pada permukaan media agar (Pratiwi,

2008). Keunggulan uji difusi cakram agar mencakup fleksibilitas yang lebih besar dalam memilih obat yang akan diperiksa (Sacher dan McPherson, 2004).

2. Cara Sumuran

Metode ini serupa dengan metode difusi disk, di mana dibuat sumur pada media agar yang telah ditanami dengan mikroorganisme dan pada sumur tersebut diberi agen antimikroba yang akan diuji (Pratiwi, 2008). Pengukuran zona bening dilakukan dengan pengukuran tiga garis yang dibuat saling tegak lurus dimana garis ketiga membentuk sudut 45° . Hasil pengukuran dijumlahkan dan dibuat rata-rata dengan membagi hasil penjumlahan menggunakan angka tiga (Pratiwi, 2008)..

2.1.11.3 Metode Dilusi

Metode dilusi dibedakan menjadi dua yaitu dilusi cair dan dilusi padat.

1. Metode Dilusi Cair

Metode ini mengukur KHM (Kadar Hambat Minimum) dan KBM (Kadar Bakterisidal Minimum). Cara yang dilakukan adalah dengan membuat seri pengenceran agen antimikroba pada medium cair yang ditambahkan dengan mikroba uji (Pratiwi, 2008).

2. Metode Dilusi Padat

Metode ini serupa dengan metode dilusi cair namun menggunakan media padat (solid). Keuntungan metode ini adalah satu konsentrasi agen antimikroba yang diuji dapat digunakan untuk menguji beberapa mikroba uji (Pratiwi, 2008).

2.2 Kacang Merah (*Phaseolus vulgaris* L.)

Kacang merah merupakan salah satu varietas dari kacang buncis (*Phaseolus vulgaris* L.) yang termasuk dalam jenis polong-polongan (*legume*). Kacang merah memiliki warna merah pada kulitnya dan memiliki bentuk yang bervariasi sesuai dengan jenisnya. Pada negara di Asia, kacang dengan genus *Phaseolus* lebih dikenal dengan *Vigna*. Oleh karena itu, di daerah Asia nama lain dari kacang merah adalah *Vigna angularis* meskipun termasuk dalam kelompok *Phaseolus* (Gepts P et al., 2006). Menurut Gepts, genus *Phaseolus* memiliki lebih dari 50 spesies yang tumbuh liar dan tersebar hanya di Amerika. Terdapat perbedaan warna dan ukuran dari berbagai spesies tersebut (Gepts P et al., 2006).

2.2.1 Taksonomi

Klasifikasi botani kacang merah adalah sebagai berikut:

1. Kingdom : *Plant Kingdom*
2. Divisi : *Spermatophyta*
3. Subdivisi : *Angiospermae*
4. Kelas : *Dicotyledonae*
5. Subkelas : *Calyciflorae*
6. Ordo : *Rosales (Leguminales)*
7. Famil : *Leguminosae (Papilionaceae)*
8. Subfamili : *Papilionoideae*
9. Genus : *Phaseolus*
10. Spesies : *Phaseolus vulgaris* L. (Rukmana, R., 2009).



Gambar 2.2 : Kacang Merah (*Phaseolus vulgaris* L.) (Rukmana, R., 2009).

2.2.2 Varietas Kacang Merah (*Phaseolus vulgaris* L.)

Varietas kacang merah yang beredar di pasaran jumlahnya sangat banyak dan beraneka ragam (Rukmana, R., 2009). Kacang merah memiliki beberapa jenis varietas, diantaranya ialah kacang *adzuki* (kacang merah kecil), *red bean*, dan jenis *kidney bean* (kacang merah ukuran besar). Berbagai varietas kacang merah memiliki kandungan gizi yang hampir sama. Berikut beberapa varietas kacang merah:

2.2.2.1 Kacang Adzuki (*Vigna Angularis*)

Kacang ini berukuran kecil, dengan warna merah tua. Kacang ini berasal dari Asia, terutama di Jepang dan China. Polong tumbuh 4 sampai 5 inci (10-12,5 cm) dan masa panennya pada bulan November sampai Desember. Kacang ini memiliki rasa manis sehingga sering dibuat menjadi pasta kacang merah untuk bahan isian roti atau kue, sebagai makanan penutup, maupun difermentasikan (Rukmana, R., 2009).



Gambar 2.3 Kacang Adzuki (*Vigna angularis* L.) (Rukmana, R., 2009).

2.2.2.2 Red Bean

Memiliki ukuran sedang dengan bentuk seperti ginjal dan warna merah gelap. *Red bean* memiliki tekstur yang lebih halus dibandingkan *kidney bean* dan berasal dari Amerika Tengah dan Selatan. Olahan yang disukai di Amerika Selatan yaitu hidangan kacang merah yang dikombinasikan dengan nasi. Sejumlah kultivar dikembangkan di berbagai daerah (Rukmana, R., 2009).

2.2.2.3 Kidney Bean / Kacang Merah Ukuran Besar (*Phaseolus vulgaris* L.)

Kacang berbentuk ginjal, memiliki ukuran yang lebih besar dan tekstur yang lembut. Kacang ini berwarna merah daging dan memiliki rasa yang hambar. *Cannellini bean* merupakan kacang merah putih. *Kidney bean* diolah sebagai salad ataupun sup, direbus, bahan tambahan dalam membuat cabai, rendang. Ketika dimasak, *kidney bean* akan mempertahankan bentuk semulanya kecuali jika dihancurkan (Rukmana, R., 2009).

2.2.3 Habitat Kacang Merah/ *Kidney Bean* (*Phaseolus vulgaris* L.)

Kacang jogo (*Phaseolus vulgaris* L.) bukan merupakan tanaman asli Indonesia. Tanaman ini berasal dari Meksiko Selatan, Amerika Selatan dan dataran Cina. Selanjutnya tanaman tersebut menyebar ke daerah lain seperti Indonesia, Malaysia, Karibia, Afrika Timur, dan Afrika Barat. Di Indonesia, daerah yang banyak

ditanami kacang jogo adalah Lembang (Bandung), Pacet (Cipanas), Kota Batu (Bogor), dan Pulau Lombok (Astawan, M., 2009).

Kacang merah merupakan makanan nabati kelompok kacang polong (*legume*). Kacang merah (*Phaseolus vulgaris L.*) mempunyai nama ilmiah yang sama dengan kacang buncis yaitu *Phaseolus vulgaris L.*, hanya tipe pertumbuhan dan kebiasaan panennya yang berbeda. Kacang merah (kacang jogo) sebenarnya merupakan kacang buncis tipe tegak (tidak merambat) dan umumnya dipanen polong tua, sehingga disebut juga *Bush beans*. Sedangkan kacang buncis umumnya tumbuh merambat (*pole beans*) dan dipanen polong-polongan mudanya saja. Nama umum di pasaran internasional untuk kacang merah adalah *Kidney beans*, sementara kacang buncis dinamakan *Snap beans* atau *French beans*. Biji kacang merah berbentuk bulat agak panjang, berwarna merah atau merah berbintik-bintik putih. Kacang merah banyak ditanam di Indonesia (Rukmana, R., 2009).

Kacang merah tumbuh dengan tinggi sekitar 3,5 m hingga 4,5 m. Sedangkan buahnya berbentuk polong serta memanjang. Dalam satu polong umumnya terdapat 2 hingga 3 biji kacang merah. Bentuk biji kacang merah memiliki ukuran lebih besar dibandingkan biji kacang hijau maupun kacang panjang. Kulit biji kacang merah berwarna merah tua atau merah bata. Jika kulit biji dikupas, maka akan terlihat biji kacang yang berwarna putih (Rukmana, R., 2009).

2.2.4 Manfaat Tanaman Kacang Merah

Kacang merah dimanfaatkan sebagai kacang-kacangan dan sebagai sayuran hijau. Polong muda dan biji tua dimakan dan pada keadaan tertentu juga biji

mudanya. Di beberapa bagian daerah tropik, daun mudanya dimanfaatkan sebagai lalap. Di wilayah beriklim sedang kacang merah dibudidayakan terutama polong mudanya yang masih hijau, yang dikonsumsi sebagai sayur-mayur, juga dikalengkan dan dibekukan. Biji keringnya juga dimasak dengan saus tomat dan dikalengkan. Serasahnya digunakan sebagai pakan ternak. Cara memasaknya dengan direbus; bijinya sangat cocok untuk berbagai saus daging dan sayuran hijaunya dapat dimanfaatkan sebagai pakan ternak. Pemanfaatan kacang merah biasanya digunakan sebagai pelengkap dalam pembuatan bubur, sup, es kolak, sayur dan lain-lain (Ningrum, HC., 2012). Hal ini sesuai menurut Astawan, yang menyatakan bahwa kacang merah dapat digunakan sebagai sayuran (sayur asam, sup), campuran salad, sambal goreng, kacang goreng, bahan dodol, wajik, dan aneka kue lainnya (Astawan, M., 2009).

Tanaman buncis dapat menyuburkan tanah, karena akar-akarnya dapat bersimbiosis dengan bakteri *Rhizobium* sp. Akar-akar tersebut berfungsi mengikat nitrogen bebas dari udara yang berperan untuk menyediakan unsur nitrogen dalam tanah, sehingga berguna bagi usaha mempertahankan kesuburan dan produktivitas tanah (Rukmana, R., 2009).

Selain dikonsumsi, menurut hasil penelitian terhadap kacang merah dalam jurnal berjudul "Evaluation of Bioactive Components in *Phaseolus vulgaris* L. Seeds" disebutkan bahwa kacang merah juga dapat digunakan untuk mengurangi berat badan obesitas, dan diabetes mellitus. Bahan bioaktif pada kacang merah juga berhubungan dengan penurunan penyakit kronik degeneratif (Ocho A *et al.*, 2010).

2.2.5 Kandungan Gizi Kacang Merah

Menurut penelitian, pemberian pakan berupa kacang merah pada tikus wistar dengan diabetes mellitus selama 4 minggu menunjukkan terjadinya penurunan kadar glukosa darah tikus sebesar 69%. Hasil ini didapatkan karena kacang merah memiliki indeks glikemik (IG) yang rendah yaitu 26 sehingga dapat membantu mengendalikan kadar gula darah. Sedangkan IG pada nasi putih yaitu 80, singkong 78, sukun 90, kacang kedelai 31, dan kacang kapri IG-nya 30 (Marsono, Y., 2002).

Biji *Phaseolus vulgaris* L. juga memiliki komponen bioaktif yang berhubungan dengan kesehatan seperti, alkaloid, antosianidin, karbohidrat, katechin, serat, flavonoids, phasine, asam fitat, quercetin, saponin, steroid, tanin, terpenoid, dan inhibitor tripsin (Ocho A *et al.*, 2010). Dengan ini, kacang merah memiliki kemampuan untuk mengatasi berbagai macam penyakit, diantaranya mampu mengurangi kerusakan pembuluh darah, menurunkan resiko kanker usus besar dan kanker payudara serta merupakan senyawa antibakteri (Afriansyah, N., 2010).

Kacang merah kaya akan asam folat (180 µg/100 gram), natrium (19 mg/100 gram), kalium (1151 mg/100 gram), mangan (194 mg/100 gram), tembaga (0.95 mg/100 gram), serat dan yodium yang sangat tinggi. Kandungan protein dalam kacang merah hampir sama banyaknya dengan daging. Kacang merah mengandung lemak dan natrium yang rendah, bebas lemak jenuh dan kolesterol, serta berfungsi sebagai sumber serat yang baik. Seratus gram kacang merah kering dapat menghasilkan 4 gram serat yang larut air dan serat yang tidak larut air. Serat larut air mampu menurunkan kadar kolesterol dan kadar gula darah (Afriansyah N., 2010). Di

antara jenis biji-bijian, kacang merah memiliki kandungan serat paling tinggi dengan kadar 26,3 gram per 100 gram bahan (Rusilanti *et al.*, 2007).

Selain mengandung vitamin, kacang merah juga mempunyai susunan asam amino esensial yang lengkap. Kandungan protein dari kacang merah (23,1) lebih tinggi dibandingkan dengan daging sapi (18,8) dan ayam (18,2), udang segar (21,0) per 100 gram bahan makanan. Sedangkan yang memegang peranan tinggi yaitu kacang kedelai (34,9). Asam amino pembatas pada protein kacang merah adalah metionin dan sistein dengan kandungan relatif rendah yaitu 10,56 dan 8,46 mg/100 g. Namun protein kacang biasanya mengandung lisin yang banyak, sedangkan sereal dan tanaman lainnya yang dapat dikonsumsi umumnya defisit akan lisin. Kacang-kacangan selain sebagai sumber protein juga sebagai sumber mineral (Afriansyah, N., 2010).

Kandungan antosianidin/proantosianidin pada kacang merah ini banyak dijumpai pula pada buah-buahan, kacang-kacangan lain, sereal, bir dan coklat. Mereka memberikan efek berupa peningkatan nilai nutrisi, penampilan, rasa dan tekstur dari makanan dan dapat digunakan sebagai pencegahan berbagai penyakit diantaranya jantung, kanker, infeksi saluran kemih, dan penuaan yang berhubungan dengan komplikasi metabolik (Ou Keqin *et al.* 2012).

Menurut data USDA 2004, kacang merah atau dikenal dengan istilah asing *kidney beans* termasuk spesies kacang yang mengandung kadar tinggi proantosianidin. Dalam jurnal nutrisi disebutkan bahwa kandungan proantosianidin total dalam 100 gram kacang merah ini berkisar antara 563.8 dan termasuk ke

dalam kelas kacang-kacangan dengan kadar tinggi proantosianidin (Gu L, *et al.*, 2004).

Tabel 2.1 Hasil Deteksi Kandungan Fitokimia Ekstrak Kacang Merah (*Phaseolus vulgaris L.*) (Ocho A *et al.*, 2010)

Senyawa Fitokimia	Ada/ Tidak Ada
Saponin	+
Tanin	+
Alkaloid	+
Flavonoid	+
Terpenoid	+

Hasil penelitian pada jurnal yang berjudul “*Evaluation of Bioactive Components in Phaseolus vulgaris L. seeds*” menerangkan beberapa kandungan bahan aktif sebagai antibiotik pada kacang merah yaitu saponin, tanin, alkaloid, flavonoid, proantosianidin dan terpenoid. yang masing-masingnya mempunyai fungsi antibiotik sebagai berikut (Ocho A *et al.*, 2010):

2.2.5.1 Saponin

Saponin merupakan senyawa glikosida kompleks dengan berat molekul tinggi yang banyak dihasilkan oleh tanaman. Berdasarkan struktur kimianya, saponin dikelompokkan menjadi tiga kelas utama yaitu kelas steroid, kelas steroid alkaloid, dan triterpenoid. Sifat yang khas dari saponin adalah berasa pahit, berbusa dalam air. Mekanisme triterpenoid sebagai

antibakteri adalah bereaksi dengan porin (protein transmembran) pada membran luar dinding sel bakteri, membentuk ikatan polimer yang kuat sehingga mengakibatkan rusaknya porin. Rusaknya porin yang merupakan pintu keluar masuknya senyawa akan mengurangi permeabilitas membran sel bakteri yang akan mengakibatkan sel bakteri akan kekurangan nutrisi, sehingga pertumbuhan bakteri terhambat atau mati (Cushine, T *et al.*, 2005).

Mekanisme kerja saponin termasuk dalam kelompok antibakteri yang mengganggu permeabilitas membran sel bakteri, yang mengakibatkan kerusakan membran sel dan menyebabkan keluarnya berbagai komponen penting dari dalam sel bakteri yaitu protein, asam nukleat dan nukleotida. Hal ini akhirnya mengakibatkan sel bakteri mengalami lisis (Cushine, T *et al.*, 2005).

2.2.5.2 Tanin

Tanin merupakan salah satu jenis senyawa yang termasuk ke dalam golongan polifenol. Senyawa tanin ini banyak dijumpai pada tumbuhan. Tanin memiliki aktivitas antibakteri, secara garis besar mekanisme yang diperkirakan adalah toksisitas tanin dapat merusak membran sel bakteri, senyawa astringent tanin dapat menginduksi pembentukan kompleks ikatan tanin terhadap ion logam yang dapat menambah daya toksisitas tanin itu sendiri. Mekanisme kerja 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 dan mati (Ajizah, 2004). Tanin juga 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 (Masduki, 1996).

2.2.5.3 Flavonoid

Flavonoid adalah senyawa pereduksi yang baik, menghambat reaksi oksidasi, baik secara enzim maupun non enzim. Flavonoid merupakan golongan terbesar senyawa fenol yang mempunyai sifat efektif menghambat pertumbuhan virus, bakteri, dan jamur. (Sjahid, 2008). Aktivitas farmakologi dari flavonoid berperan sebagai anti-inflamasi, antibakteri, analgesik, antioksidan. Flavonoid merupakan senyawa polar yang pada umumnya mudah larut dalam pelarut polar seperti etanol, menthanol, butanol, dan aseton (Thomson RH, 1993). Senyawa-senyawa pada flavonoid umumnya bersifat antioksidan dan banyak yang digunakan sebagai salah satu komponen bahan baku obat-obatan. Senyawa flavonoid dan turunannya memiliki dua fungsi fisiologi tertentu, yaitu sebagai bahan kimia untuk mengatasi serangan penyakit (sebagai antibakteri) dan anti virus pada tanaman. Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri dengan cara membentuk senyawa kompleks terhadap protein ekstraseluler yang mengganggu keutuhan membran sel bakteri. Mekanisme kerjanya dengan cara mendenaturasi protein sel bakteri

dan merusak membran sel tanpa dapat diperbaiki lagi sehingga dapat mengganggu permeabilitas dinding sel bakteri (Juliantina, 2009).

Mekanisme anti-inflamasi terjadi melalui penghambatan pada jalur metabolisme asam arakhidonat, pembentukan prostaglandin, pelepasan histamin pada radang. Manfaat lain flavanoid adalah melindungi struktur sel tubuh. Flavanoid mengandung senyawa fenol. Fenol merupakan sejenis alkohol bersifat asam sehingga disebut juga asam karbolat. Fenol memiliki kemampuan mendenaturasi protein dan merusak dinding sel bakteri (Thomson RH, 1993). Salah satu senyawa polifenol yang sering diabaikan adalah proantosianidin (PACs).

Proantosianidin atau yang lebih dikenal dengan kondensasi dari tanin merupakan kelas flavonoid yang banyak dijumpai pada buah-buahan, bir, sereal dan kacang-kacangan. Proantosianidin dilaporkan memiliki manfaat sebagai antioksidan, antibakteri dan pencegahan dari suatu penyakit.

Mekanisme kerja PACs pada infeksi *E. coli* yang menyebabkan ISK adalah dengan menghambat perlekatan fimbria bakteri *E. coli* pada permukaan mukosa kandung kemih. Tipe 1 fimbria dihambat dengan adanya fruktosa dalam kandungan bahan makanan, sedangkan p-fimbria *E. coli* pada ISK dihambat dengan adanya PACs yang terdapat pada bahan makanan tersebut.

Mekanisme lain aktivitas PACs adalah dengan menurunkan ekspresi p-fimbria pada *E. coli* dengan mengubah konformasi molekul permukaan. Bahwa adanya PACs ini dapat menurunkan virulensi bakteri. Selanjutnya terjadi

penurunan perlekatan bahkan dengan memengaruhi berbagai fimbria bakteri. Pemberian PACs pada bakteri menyebabkan perubahan konformasi di permukaan makromolekul p-fimbria khususnya dengan mengurangi panjang dan kerapatan dari fimbria (Hisano M, *et al.*, 2012).

2.2.5.4 Alkaloid

Alkaloid adalah senyawa organik yang banyak ditemukan di alam. Sifat alkaloid yang terpenting adalah kebasaannya. Semua alkaloid mengandung paling sedikit satu atom nitrogen yang biasanya bersifat basa dan dalam sebagian besar atom nitrogen ini merupakan bagian dari cincin hidrosiklik (Lenny, 2006). Alkaloid biasanya terdapat dalam tumbuhan sebagai garam berbagai senyawa organik. Penggolongan alkaloid dilakukan berdasarkan sistem cincinnya seperti piridina, piperidina, indol, isokuinolina dan tropana (Robinson, 1995). Mekanisme yang diduga adalah dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut (Ajizah A, 2004). Flavon, antosianidin, flavonon, isoflavon dan flavonol adalah kelas dari flavonoid (Shashank K *et al.*, 2013).

2.2.5.5 Terpenoid

Terpenoid tumbuhan mempunyai manfaat sebagai obat tradisional, antibakteri, anti jamur dan gangguan kesehatan (Thomson, 1993). Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa senyawa terpenoid dapat menghambat

pertumbuhan dengan mengganggu proses terbentuknya membran atau dinding sel, sehingga membran atau dinding sel tidak terbentuk sempurna (Markham KR, 2012).

2.2.6 Definisi dan Macam-Macam Ekstraksi

Menurut Departemen Kesehatan RI (2006), ekstraksi adalah proses penarikan kandungan kimia yang dapat larut dari suatu serbuk simplisia, sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut. Beberapa metode yang banyak digunakan untuk ekstraksi bahan alam antara lain:

2.2.6.1 Maserasi

Maserasi adalah proses ekstraksi simplisia menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengadukan pada suhu ruangan. Prosedurnya dilakukan dengan merendam simplisia dalam pelarut yang sesuai dalam wadah tertutup. Pengadukan dilakukan dapat meningkatkan kecepatan ekstraksi. Kelemahan dari maserasi adalah prosesnya membutuhkan waktu yang cukup lama. Ekstraksi secara menyeluruh juga dapat menghabiskan sejumlah besar volume pelarut yang dapat berpotensi hilangnya metabolit. Beberapa senyawa juga tidak terekstraksi secara efisien jika kurang terlarut pada suhu kamar (27°C). Ekstraksi secara maserasi dilakukan pada suhu kamar (27°C), sehingga tidak menyebabkan degradasi metabolit yang tidak tahan panas (Departemen Kesehatan RI, 2006).

2.2.6.2 Perkolasi

Perkolasi merupakan proses mengekstraksi senyawa terlarut dari jaringan selular simplisia dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna yang umumnya dilakukan pada suhu ruangan. Perkolasi cukup 19 sesuai, baik untuk ekstraksi pendahuluan maupun dalam jumlah besar (Departemen Kesehatan RI, 2006).

2.2.6.3 Soxhlet

Metode ekstraksi soxhlet adalah metode ekstraksi dengan prinsip pemanasan dan perendaman sampel. Hal itu menyebabkan terjadinya pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar sel. Dengan demikian, metabolit sekunder yang ada di dalam sitoplasma akan terlarut ke dalam pelarut organik. Larutan itu kemudian menguap ke atas dan melewati pendingin udara yang akan mengembunkan uap tersebut menjadi tetesan yang akan terkumpul kembali. Bila larutan melewati batas lubang pipa samping soxhlet maka akan terjadi sirkulasi. Sirkulasi yang berulang itulah yang menghasilkan ekstrak yang baik (Departemen Kesehatan RI, 2006).

2.2.6.4 Refluks

Ekstraksi dengan cara ini pada dasarnya adalah ekstraksi berkesinambungan. Bahan yang akan diekstraksi direndam dengan cairan penyari dalam labu alas bulat yang dilengkapi dengan alat pendingin tegak, lalu dipanaskan sampai mendidih. Cairan penyari akan menguap, uap tersebut akan diembunkan dengan pendingin tegak dan akan kembali menyari zat aktif dalam simplisia

tersebut. Ekstraksi ini biasanya dilakukan 3 kali dan setiap kali diekstraksi selama 4 jam (Departemen Kesehatan RI, 2006).

2.2.6.5 Digesti

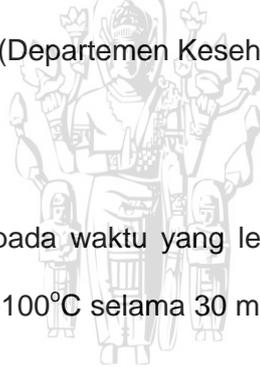
Digesti adalah maserasi kinetik (dengan pengadukan kontinu) pada suhu yang lebih tinggi dari suhu ruangan, yaitu secara umum dilakukan pada suhu 40-50°C (Departemen Kesehatan RI, 2006).

2.2.6.6 Infusa

Infusa adalah ekstraksi dengan pelarut air pada suhu penangas air (bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih), suhu terukur (96- 98oC) selama waktu tertentu (15-20 menit) (Departemen Kesehatan RI, 2006).

2.2.6.7 Dekok

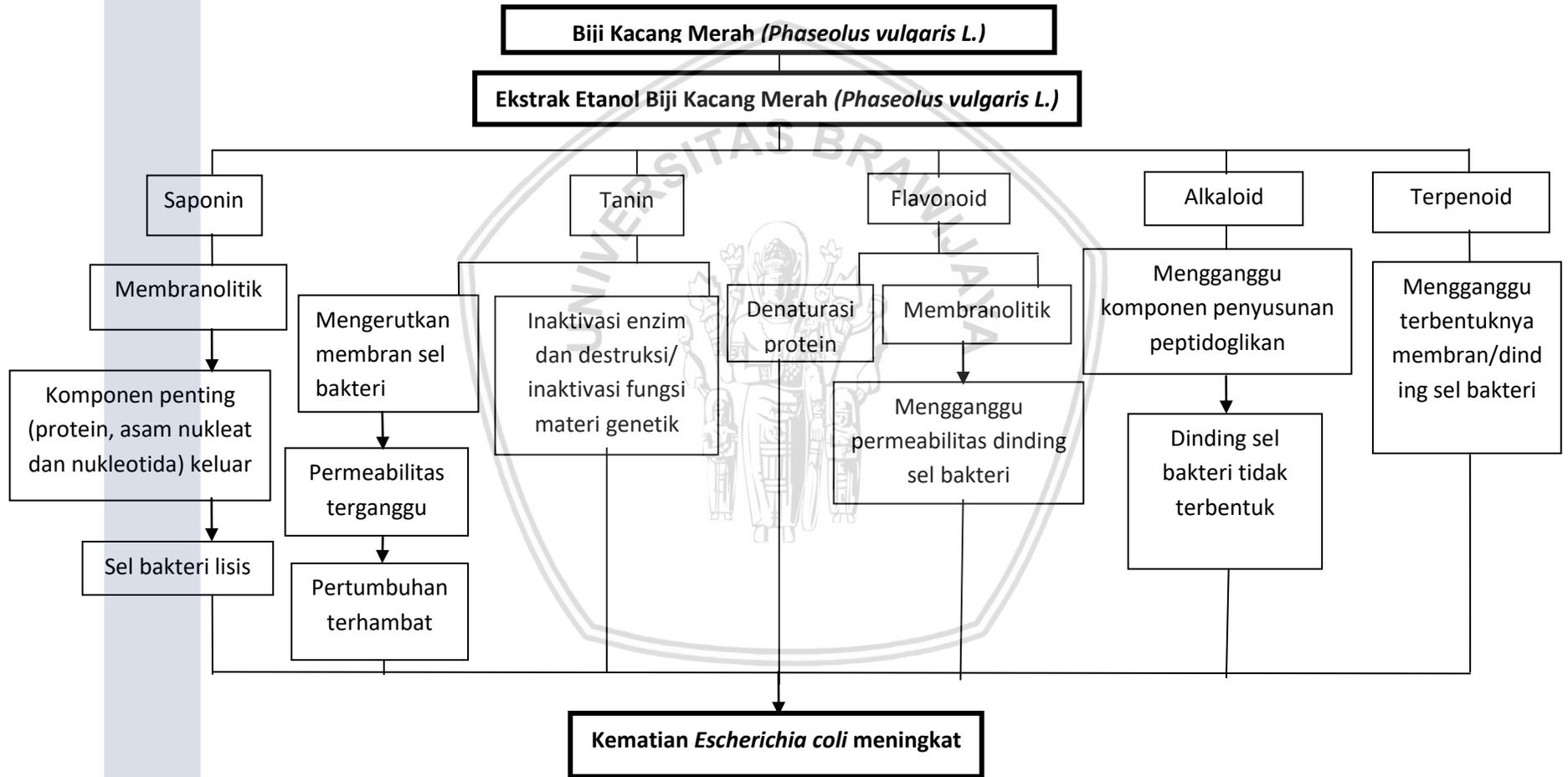
Dekok adalah infus pada waktu yang lebih lama dan suhu sampai titik didih air, yaitu pada suhu 90-100°C selama 30 menit (Departemen Kesehatan RI, 2006).



BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 3.1 : Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan:

— : Menunjukkan bagian atau kandungan yang diteliti

→ : Berpengaruh

□ : Tidak diteliti

□ : Diteliti

3.2 Deskripsi Kerangka Konsep

Kacang merah (*Phaseolus vulgaris* L.) mengandung senyawa bioaktif yang berperan sebagai antimikroba diantaranya saponin, tanin, flavonoid, alkaloid, dan terpenoid. Saponin berperan dengan merusak membran bakteri (membranolitik) sehingga menyebabkan komponen penting dalam bakteri seperti protein, asam nukleat dan nukleotida keluar sehingga sel bakteri menjadi lisis. Tanin berperan dalam mengerutkan membran sel bakteri sehingga permeabilitas sel bakteri terganggu dan pertumbuhan bakteri terhambat. Selain itu, tanin juga berperan dalam menginaktivasi enzim dan destruksi/ inaktivasi fungsi materi genetik. Sedangkan flavonoid memiliki dua peran diantaranya denaturasi protein bakteri dan membranolitik sehingga permeabilitas dinding sel bakteri terganggu. Alkaloid berperan dengan mengganggu komponen penyusun peptidoglikan yang menyebabkan dinding sel bakteri tidak terbentuk. Sedangkan terpenoid berperan dengan mengganggu terbentuknya membran/ dinding sel bakteri. Keseluruhan senyawa bioaktif ini berpengaruh terhadap biosintesis bakteri *E. coli* sehingga diharapkan dengan pemberian ekstrak (*Phaseolus vulgaris* L.) terhadap bakteri *E.coli* maka dapat meningkatkan kematian bakteri *E. coli*.

3.3 Hipotesis

Ada penurunan pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* setelah diberikan ekstrak etanol kacang merah (*Phaseolus vulgaris L.*).



BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah *true experimental laboratory study*, dilakukan dengan rancangan *post test only with control group design*, dengan tujuan untuk menilai efektivitas ekstrak etanol kacang merah (*Phaseolus vulgaris L*) dalam berbagai konsentrasi terhadap hambatan pertumbuhan koloni bakteri *Escherichia coli* secara *in vitro*.

4.2 Sampel Penelitian

Sampel dalam penelitian ini adalah koloni bakteri *Escherichia coli* isolat urin yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Rumah Sakit Syaiful Anwar Malang. Penelitian ini menggunakan perlakuan dengan memberi bakteri uji sebanyak enam konsentrasi ekstrak etanol kacang merah dengan konsentrasi yang berbeda-beda, yaitu masing-masing 0%, 20%, 40%, 60%, 80% dan 100%. Dalam penelitian ini, banyaknya pengulangan ditentukan dengan menggunakan rumus-rumus Loekito (1998) sebagai berikut:

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

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

$$6n-6 \geq 15$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 3,5$$
$$n = 4 \text{ (hasil pembulatan)}$$

Keterangan:

n = Jumlah Pengulangan (dilakukan sebanyak 4 kali pengulangan)

p = Jumlah Perlakuan (6, yaitu 5 konsentrasi dan 1 kontrol bakteri)

Jadi pada penelitian ini, setiap perlakuan dilakukan minimal sebanyak empat kali pengulangan.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas (Variabel Independen)

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol kacang merah (*Phaseolus vulgaris L.*) yang berbeda-beda menggunakan deret hitung, yaitu: 0%, 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100% didasarkan pada hasil penelitian pendahuluan dengan konsentrasi minimal daya hambat pada konsentrasi 25% dan maksimal pada konsentrasi 100%. Sehingga perbedaan kemampuan ekstrak etanol kacang merah dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli* menjadi lebih terlihat jika menggunakan deret hitung.

4.3.2 Variabel Tergantung (Variabel Dependen)

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri *E. coli* dengan mengukur diameter zona bening di sekitar lubang sumuran menggunakan alat ukur penggaris.

4.4 Tempat dan Waktu Penelitian

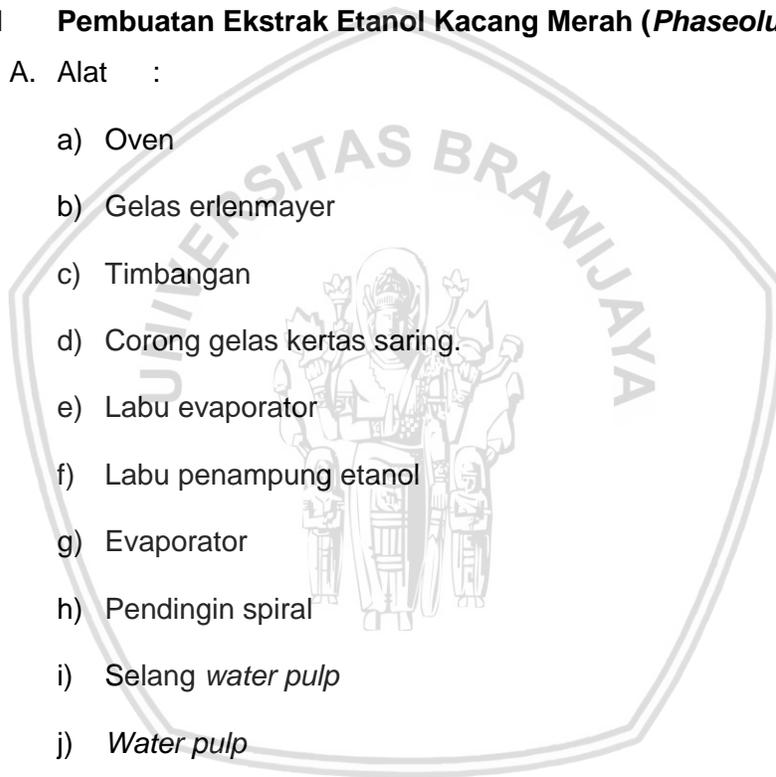
Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada Tahun 2017.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Pembuatan Ekstrak Etanol Kacang Merah (*Phaseolus vulgaris L.*)

A. Alat :

- a) Oven
- b) Gelas erlenmayer
- c) Timbangan
- d) Corong gelas kertas saring.
- e) Labu evaporator
- f) Labu penampung etanol
- g) Evaporator
- h) Pendingin spiral
- i) Selang *water pulp*
- j) *Water pulp*
- k) *Water bath*
- l) *Vacuum pulp*
- m) *Grinder*
- n) *Shaker*
- o) *Alumunium foil*
- p) Kulkas



B. Bahan :

- a) Kacang merah (*Phaseolus vulgaris L.*)
- b) Etanol 95%
- c) Akuades
- d) Botol hasil ekstrak

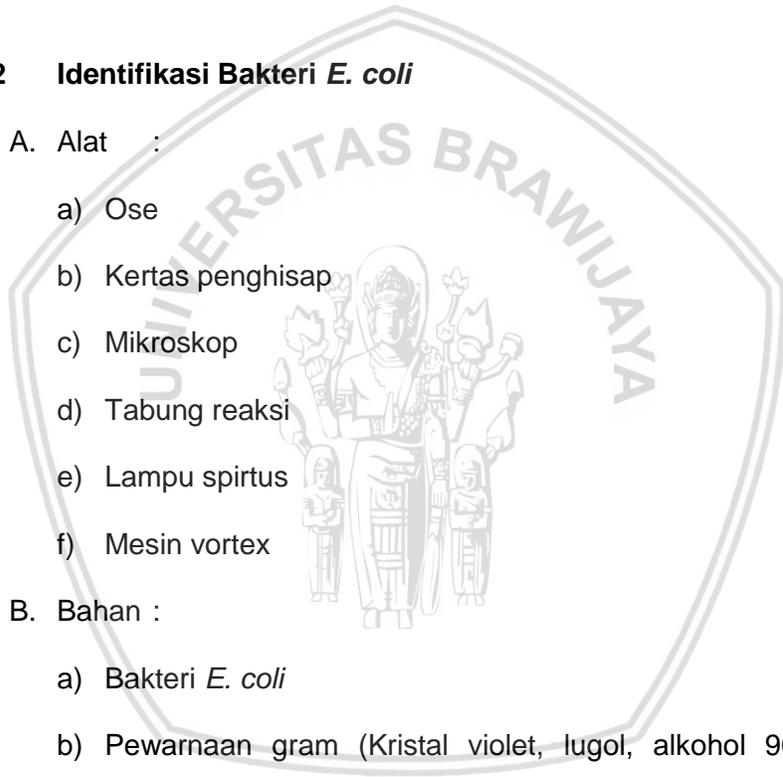
4.5.2 Identifikasi Bakteri *E. coli*

A. Alat :

- a) Ose
- b) Kertas penghisap
- c) Mikroskop
- d) Tabung reaksi
- e) Lampu spiritus
- f) Mesin vortex

B. Bahan :

- a) Bakteri *E. coli*
- b) Pewarnaan gram (Kristal violet, lugol, alkohol 90%, safranin, minyak emersi)
- c) *McConkey* agar
- d) Medium EMB



4.5.3 Uji Kepekaan Ekstrak Etanol Kacang Merah (*Phaseolus vulgaris* L.)

A. Alat :

- a) Cawan petri
- b) Pelubang sumuran
- c) Pipet mikro
- d) Bunsen burner
- e) Inkubator
- f) Korek api
- g) Penggaris

B. Bahan :

- a) Ekstrak etanol kacang merah (*Phaseolus vulgaris* L.)
- b) Suspense bakteri *Escherichia coli* 10^8 CFU/ml (*Colony Forming Unit/ml*)
- c) Aquades
- d) Nutrient Broth dan medium EMB.

4.6. Definisi Operasional

1. Kacang merah yang digunakan dalam penelitian ini adalah kacang merah dalam keadaan baik dengan bentuk dan ukuran normal serta tidak busuk yang didapatkan dari petani Kacang Merah di Kota Batu Jawa Timur. Ditanam pada ketinggian 700-1700 meter di atas permukaan air laut dengan

suhu udara rata-rata mencapai 12-19° C yang sebelumnya telah diidentifikasi oleh peneliti disesuaikan pada kemiripan karakteristik kacang merah (*Phaseolus vulgaris L.*) sesuai literatur yang didapatkan.

2. Kacang merah yang digunakan dalam penelitian ini adalah yang telah dikeringkan menggunakan sinar matahari secara langsung hingga bebas kandungan air kemudian dihaluskan oleh peneliti hingga berbentuk serbuk.
3. Ekstrak etanol kacang merah yang digunakan dalam penelitian ini didapat melalui proses ekstraksi metode maserasi dengan pelarut etanol 95% di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya (Pratiwi, 2008).
4. Bakteri *E. coli* isolat Infeksi Saluran Kemih (ISK) didapat dari Laboratorium Mikrobiologi Rumah Sakit Syaiful Anwar Malang yang sebelumnya telah dilakukan identifikasi oleh petugas laboratorium dan dilakukan penanaman pada medium MaConkey Agar (MAC).
5. Kelompok perlakuan merupakan hasil biakan bakteri *E. coli* yang dicampurkan pada medium pertumbuhan *Mueller Hinton* dan diberi perlakuan dengan pemberian ekstrak etanol kacang merah serta dibiakan pada inkubator dengan suhu 37° C selama 18-24 jam.
6. Kontrol bakteri merupakan hasil biakan bakteri *E. coli* yang dicampurkan pada medium pertumbuhan tanpa diberi perlakuan dengan pemberian ekstrak etanol kacang merah dan berfungsi untuk membedakan pertumbuhan bakteri antara yang diberikan perlakuan dengan yang tidak diberi perlakuan.

7. Zona hambat merupakan zona bening yang ada di sekeliling lubang sumuran dan menunjukkan kemampuan ekstrak dalam menghambat pertumbuhan bakteri (Pratiwi, 2008).
8. Pengukuran diameter zona hambat dilakukan dengan membagi diameter zona hambat yang terbentuk menggunakan tiga garis. Garis pertama dan kedua dibuat tegak lurus membentuk sudut 90° sedangkan garis ketiga dibuat membentuk sudut 45° memotong sudut 90° menjadi dua bagian. Hasil pengukuran diameter yang didapat kemudian dijumlahkan dan dibagi tiga untuk mendapatkan diameter zona bening rata-rata (Pratiwi, 2008). Pengukuran zona bening dilakukan oleh peneliti pada selang waktu 18-24 jam setelah biakan bakteri uji ditetesi ekstrak etanol kacang merah pada masing-masing lubang sumuran setelah sebelumnya diinkubasi di dalam inkubator.
9. Diameter zona bening dihitung menggunakan penggaris termasuk diameter lubang sebesar 6 mm yang sebelumnya telah dibuat menggunakan alat pelubang sumuran (Pratiwi, 2008). Pengukuran zona bening dilakukan oleh peneliti pada selang waktu 18-24 jam setelah biakan bakteri uji ditetesi ekstrak etanol kacang merah pada masing-masing lubang sumuran setelah sebelumnya diinkubasi di dalam inkubator menggunakan alat ukur penggaris.

4.7. Prosedur Penelitian

4.7.1. Pembuatan Ekstrak Etanol Kacang Merah (*Phaseolus vulgaris L.*)

(Pratiwi, 2008).

4.7.1.1 Proses Pengeringan

1. Kacang merah (*Phaseolus vulgaris L.*) dicuci hingga bersih.
2. Kacang merah (*Phaseolus vulgaris L.*) yang telah dicuci bersih lalu dipotong kecil-kecil lalu dikeringkan dengan oven atau dengan panas matahari sampai kering/ bebas kandungan air.
3. Kacang merah (*Phaseolus vulgaris L.*) yang telah dikeringkan kemudian digrinder sampai bentuk serbuk.

4.7.1.2 Proses Ekstraksi

1. Serbuk kacang merah (*Phaseolus vulgaris L.*) ditimbang sebanyak 200 gram kemudian dimasukkan ke dalam gelas Erlenmayer berukuran 1 liter.
2. Kemudian rendam serbuk kacang merah (*Phaseolus vulgaris L.*) dalam larutan etanol 96% dengan volume 2000ml.
3. *Shaker* dan tutup toples selama 24 jam.
4. Saring ekstrak dan lakukan remaserasi pada ampas ekstraksi.

4.7.1.3 Proses Evaporasi

1. Hasil ekstraksi dimasukkan kedalam labu evaporasi.
2. Pasang labu evaporasi pada evaporator. Isi *water bath* dengan air bersih sampai penuh, persiapkan semua alat evaporator.
3. Tunggu hingga aliran etanol berhenti menetes pada labu penampung.
4. Hasil yang didapat dimasukkan ke dalam botol dan disimpan dalam lemari pendingin.

4.7.2 Identifikasi Bakteri

4.7.2.1 Pewarnaan Gram

1. Bersihkan gelas obyek dengan kapas dan lewatkan di atas api untuk menghilangkan lemak, kemudian biarkan hingga dingin.
2. Buat sediaan bakteri di atas gelas objek dengan ketebalan cukup dan biarkan kering di udara. Kemudian difiksasi di atas lampu Bunsen.
3. Sediaan dituangi dengan Kristal Violet. Setelah 1 menit, sediaan dibilas dengan menggunakan air.
4. Kemudian sediaan dituangi dengan alkohol 90%. Setelah 5-10 detik, sediaan dibilas dengan air.
5. Kemudian sediaan dituangi dengan safranin. Setelah 30 detik, sediaan dibilas dengan air.

6. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap, ditetesi minyak emersi selanjutnya dilihat di bawah mikroskop dengan pembesaran lensa objektif 100x (Dzen *et al.*, 2013).

4.7.2.2 Penanaman Kultur Bakteri *E. coli*

a) Penanaman pada Medium EMB (Eosin Methylen Blue)

1. Disiapkan satu buah cawan petri berisi medium EMB yang sebelumnya telah didinginkan.
2. Diambil biakan bakteri dengan ose kemudian dilakukan *streaking* pada permukaan media EMB secara merata.
3. Cawan petri ditutup, kemudian diletakkan dalam incubator dengan suhu 37°C untuk diinkubasi selama 18-24 jam.
4. Setelah 24 jam, dilakuka pengamatan terhadap warna pada koloni bakteri yang tumbuh (Dzen *et al.*, 2013).

b) Penanaman pada Medium MAC (MacConkey Agar)

1. Disiapkan satu buah cawan petri yang berisi medium MAC yang sebelumnya telah didinginkan.
2. Diambil biakan bakteri dengan ose kemudian lakukan *streaking* pada permukaan media MAC secara merata.
3. Cawan petri ditutup, kemudian diletakkan dalam inkubator dengan suhu 37°C untuk diinkubasi selama 18-24 jam.
4. Setelah 24 jam, dilakuka pengamatan terhadap warna pada koloni bakteri yang tumbuh (Dzen *et al.*, 2013).

4.7.3 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

1. Beberapa koloni *E. coli* dipindahkan ke tabung reaksi steril yang berisi nutrient broth dengan menggunakan ose.
2. Tabung reaksi lalu diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
3. Untuk mendapatkan konsentrasi bakteri 10⁸CFU/ ml dilakukan penghitungan sebagai berikut:

$$N1 \times V1 = N2 \times V2$$

Keterangan:

V1 : Volume bakteri yang akan ditambah pengencer

N1 : Nilai absorbansi suspensi (hasil spektrofotometri)

V2 : Volume suspensi bakteri uji (10 ml)

N2 : Optical Density (0,1 = setara dengan 10⁸CFU/ ml)

Dari hasil perhitungan di atas diperoleh volume (ml) bakteri yang akan ditambah pengencer untuk mendapatkan bakteri dengan konsentrasi 10⁸/ml sebanyak 10 ml.

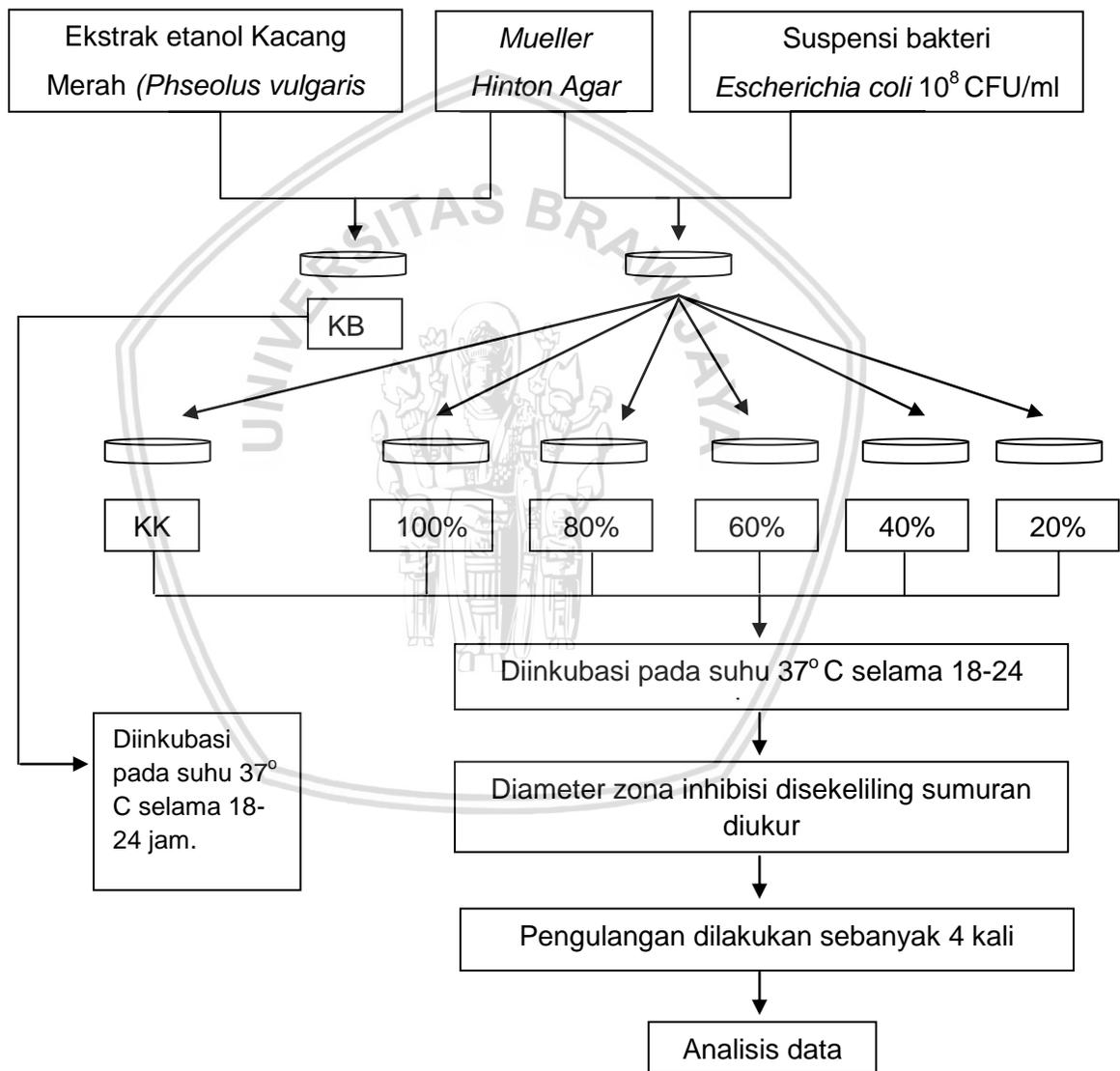
4.7.4 Uji Kepekaan Antibakteri Ekstrak Etanol Kacang Merah (*Phaseolus vulgaris L.*)

1. Menyiapkan medium agar Mueller Hinton (MH).

2. Menambahkan suspensi bakteri *Escherichia coli* sebanyak 0,1 ml bakteri 10^8 CFU/ml ditetaskan pada medium MH Agar dalam cawan petri.
3. Cawan petri digoyang-goyangkan sehingga campuran tercampur dengan baik, lalu didiamkan beberapa saat hingga mengeras.
4. Campuran medium MH dan suspense bakteri *Escherichia coli* 10^8 CFU/ml yang telah mengeras tadi, dibuat lubang sumuran sebanyak 6 lubang menggunakan pelubang sumuran dengan cara menancapkan alat pelubang sumuran.
5. Ekstrak etanol kacang merah tidak diberikan pada sumur Kontrol Kuman (KK).
6. Konsentrasi ekstrak etanol kacang merah dengan konsentrasi masing-masing 100%, 80%, 60%, 40%, dan 20% sebanyak 40 mikroliter ditetaskan ke dalam masing-masing lubang sumuran dengan menggunakan pipet.
7. Memasukan cawan petri ke dalam inkubator selama 18-24 jam pada suhu 37°C .
8. Daya antimikroba yang terbentuk ditentukan dengan mengukur diameter zona hambatan pertumbuhan menggunakan penggaris dalam satuan millimeter (mm).
9. Pengulangan perlakuan dilakukan sebanyak 4 kali.

4.8 Kerangka Alur Kerja Penelitian

Skema alur penelitian uji efektivitas ekstrak etanol kacang merah (*Phaseolus vulgaris* L.) terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* secara *in vitro*.



Gambar 4.1 Bagan Alur Uji Antibakteri Ekstrak Etanol Kacang Merah (*Phaseolus vulgaris* L.) terhadap *E. coli*

4.9 Analisis Data

Analisis statistik dibuat dari data yang diperoleh. Diperlukan beberapa uji statistik diantaranya uji normalitas data. Jika data parametric, maka yang digunakan adalah uji *One Way ANOVA*.

4.9.1 Uji Normalitas Data

Uji normalitas data menggunakan *Kolmogorov Smirnov test* untuk menguji apakah data tersebar normal dan homogen (parametrik) atau tidak tersebar normal dan tidak homogen (non parametrik).

4.9.2 Uji Homogenitas

Pengujian homogenitas adalah pengujian tentang sama atau tidaknya variasi-variasi dua buah distribusi atau lebih. Uji homogenitas dilakukan untuk melihat apakah data hasil penelitian uji efektivitas ekstrak etanol kacang merah (*Phaseolus vulgaris L*) terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* bersifat homogen.

4.9.3 Uji Komparasi dengan Menggunakan Cara *One Way ANOVA*

Komparasi dengan menggunakan cara *One Way ANOVA* untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian ekstrak etanol daun ketapang terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* secara *In vitro*, dengan syarat sebagai berikut:

- a. Sebaran data harus normal
- b. Varian data harus sama (homogen)

Apabila data tidak homogen atau tidak tersebar normal, maka digunakan metode *Kruskal Wallis* untuk mengetahui perbedaan ukuran zona inhibisi yang terbentuk di sekitar lubang sumuran pada setiap perlakuan yang disebabkan oleh pemberian ekstrak etanol kacang merah.

4.9.4 Uji Post Hoc

Analisis setelah *One Way ANOVA* atau pasca *ANOVA (post hoc)* dilakukan apabila hipotesis nol (H_0) ditolak. Fungsi uji ini adalah untuk mencari kelompok mana yang berbeda. Contoh uji ini adalah Mann-Whitney atau Turkey. Uji Turkey digunakan apabila data parametric, sedangkan uji Mann-Whitney digunakan apabila datanya non parametrik. Uji Mann-Whitney digunakan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan respon dari dua populasi data yang saling independen. Uji ini merupakan uji yang paling kuat diantara uji non parametrik yang lain.

4.9.5 Uji Korelasi dan Regresi

Uji korelasi regresi digunakan untuk mengetahui kekuatan dan bentuk hubungan antara ekstrak etanol kacang merah terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* (variabel dependen dan variabel independen). Uji korelasi *Pearson* digunakan apabila datanya parametrik, sedangkan uji korelasi *Spearman* digunakan jika datanya non parametrik. Uji regresi dilakukan untuk mengetahui besarnya pengaruh pengaruh satu variabel bebas (variabel independen) atau lebih terhadap satu variabel tidak bebas (variabel dependen).

BAB 5

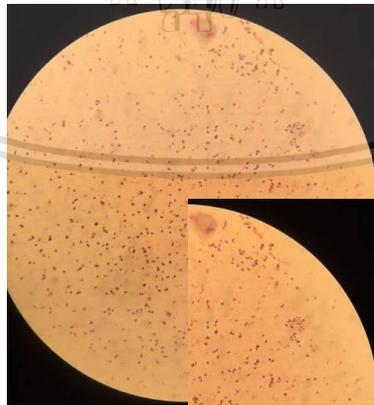
HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil penelitian

5.1.1 Hasil Identifikasi Bakteri

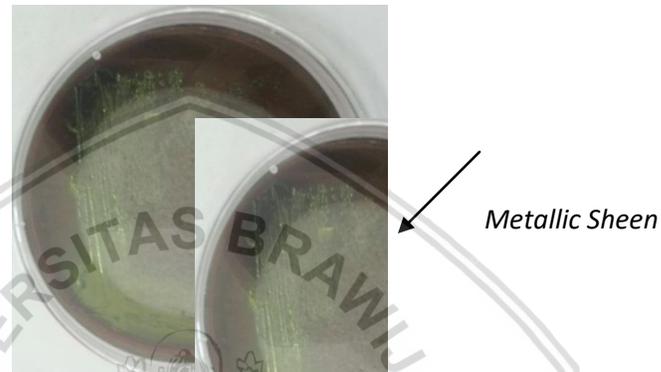
Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Escherichia coli* dari isolat urine yang didapat dari Lab Mikrobiologi Rumah Sakit Syaiful Anwar Malang. Identifikasi ulang bakteri dilakukan sebelum isolate tersebut dipakai sebagai sampel penelitian. Proses identifikasi dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dengan cara pewarnaan Gram, penanaman pada media EMB, dan penanaman pada media MacConkey Agar.

Hasil pewarnaan gram dan pengamatan di bawah mikroskop dengan pembesaran lensa obyektif 100x didapatkan bakteri berbentuk batang (basil) dan bewarna merah, hal ini menunjukkan bahwa bakteri tersebut merupakan bakteri gram negatif. Hasil pewarnaan gram dapat dilihat pada gambar 5.1



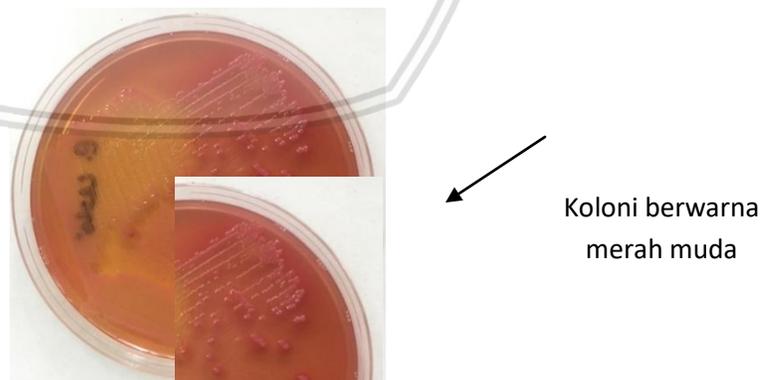
Gambar 5.1 Hasil Identifikasi *Escherichia coli* perbesaran 1000x dengan pewarnaan Gram (gram negatif berbentuk basil)

Penanaman pada media EMB (*Eosin Methylen Blue*) didapatkan hasil yang merupakan ciri khas dari *Escherichia coli*, yaitu hasil koloni yang mempunyai warna khas mengkilat seperti logam (*metallic sheen*). Hasil penanaman pada media EMB (*Eosin Methylen Blue*) bisa dilihat pada gambar 5.2



Gambar 5.2 Hasil Identifikasi *Escherichia coli* dengan Penanaman pada Media EMB (*Eosin Methylen Blue*) didapatkan Gambaran *Metallic Sheen*.

Penanaman pada media MacConkey Agar didapatkan hasil warna pink (merah muda). Hasil penanaman pada media MacConkey Agar bisa dilihat pada gambar 5.3 di bawah ini.



Gambar 5.3 Hasil Identifikasi *Escherichia Coli* dengan Penanaman pada Media *Macconkey Agar*

5.1.2 Hasil Ekstrak Etanol Kacang Merah

Kacang merah diekstrak dengan etanol menggunakan metode maserasi. Hasil akhir dari ekstraksi tersebut adalah solusio berwarna cokelat tua kehitaman kental sebanyak 9 gram.



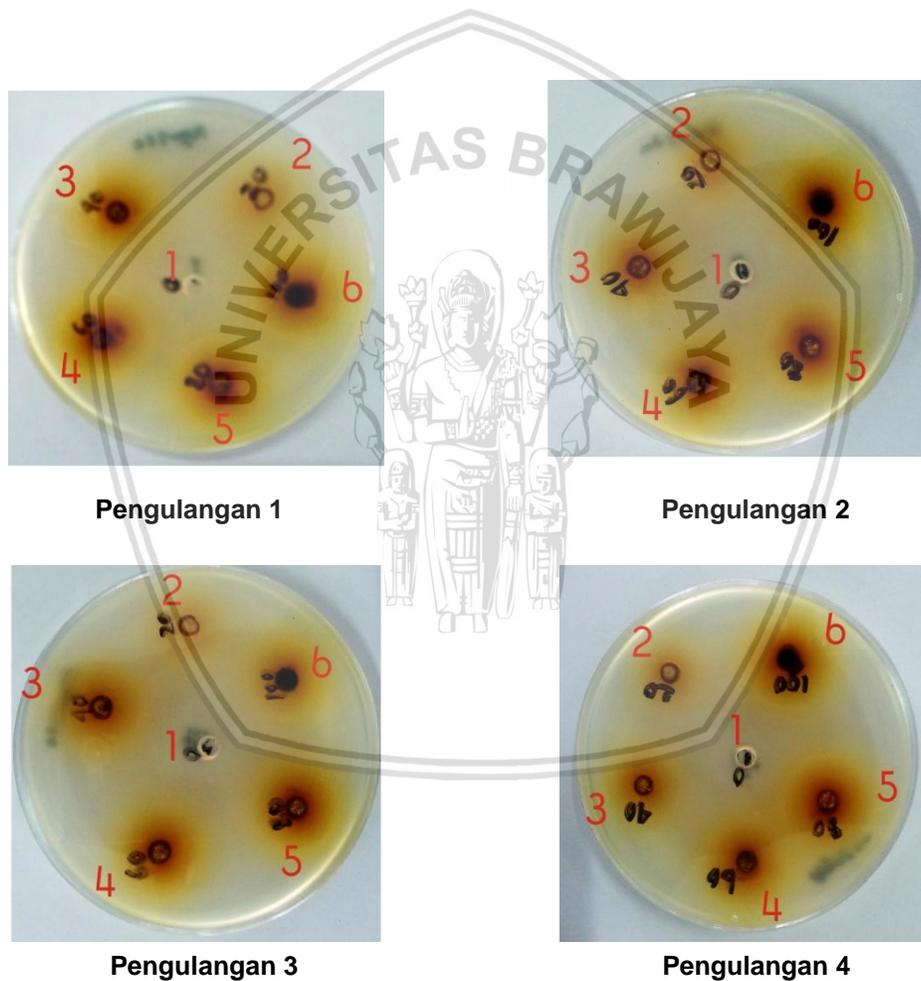
Gambar 5.4 Hasil Ekstrak Etanol Kacang Merah

5.1.3 Hasil Uji

Penelitian pendahuluan menggunakan konsentrasi ekstrak etanol kacang merah sebesar 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%. Hasil penelitian pendahuluan tersebut digunakan sebagai penentu konsentrasi yang digunakan pada penelitian ini. Konsentrasi ekstrak etanol kacang merah 0%, 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100% adalah konsentrasi yang digunakan pada uji efektivitas antimikroba ekstrak etanol kacang merah terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.

Penentuan daya antimikroba ekstrak etanol kacang merah dilakukan dengan metode difusi sumuran. Penentuan daya antimikroba ditentukan dengan besar diameter zona hambat pada medium Muller Hinton yang telah dicampurkan dengan bakteri *Escherichia coli* dan yang sudah dibuat lubang sumurannya. Ekstrak etanol kacang merah sebanyak 40 μ L kemudian diteteskan pada lubang sumuran tersebut dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37 $^{\circ}$ C.

Perubahan yang diamati pada penelitian ini yakni terbentuknya diameter zona hambat bakteri yang ada disekeliling sumuran. Pengukuran dilakukan dengan menggunakan penggaris dan pengukuran ini sudah termasuk lubang sumuran (sebesar 6mm). Hasil uji daya antimikroba ekstrak etanol kacang merah menggunakan deret hitung pada masing-masing konsentrasi 0%, 20%, 40%, 60%, 80%, dan 100% dengan menggunakan metode difusi sumuran disajikan pada gambar 5.6



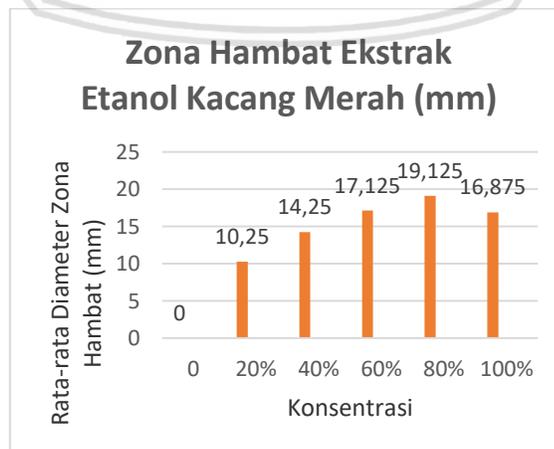
Gambar 5.5 Hasil Diameter Zona Bening Ekstrak Etanol Kacang Merah pada Masing-masing Konsentrasi

Keterangan gambar

1. Lubang sumuran nomor 1 merupakan kontrol kuman (KK)
2. Lubang sumuran nomor 2 menggunakan ekstrak etanol kacang merah 20%
3. Lubang sumuran nomor 3 menggunakan ekstrak etanol kacang merah 40%
4. Lubang sumuran nomor 4 menggunakan ekstrak etanol kacang merah 60%
5. Lubang sumuran nomor 5 menggunakan ekstrak etanol kacang merah 80%
6. Lubang sumuran nomor 6 menggunakan ekstrak etanol kacang merah 100%

Tabel 5.1 Hasil Perhitungan Zona Hambat Ekstrak Etanol Kacang Merah (*Phaseolus vulgaris* L.) sebagai Antibakteri terhadap *Escherichia coli* 10⁸ CFU/ml pada Berbagai Konsentrasi Perlakuan

Konsentrasi	Zona Hambat Ekstrak Etanol Kacang Merah (mm) Pengulangan				Rata-rata (mm)	Standar Deviasi/ (± mm)
	1	2	3	4		
0	0	0	0	0	0	0
20 %	10,0	10,0	10,5	10,5	10,25	0,3
40%	14,5	14,0	14,5	14,0	14,25	0,3
60%	17,0	17,0	17,5	17,0	17,125	0,3
80%	19,0	19,0	19,0	19,5	19,125	0,3
100%	16,5	17,0	17,0	17,0	16,875	0,3



Gambar 5.6 Rata-rata Konsentrasi Daya Hambat Ekstrak Etanol Kacang Merah (*Phaseolus vulgaris* L.) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli*

Berdasarkan tabel di atas dapat dilihat perbedaan zona hambat pada setiap perlakuan Ekstrak Etanol Kacang Merah (*Phaseolus vulgaris L.*) dengan konsentrasi 0, 20%, 40%, 60%, 80% dan 100% menghasilkan rata-rata zona hambat sebesar 0; 10,25 mm; 14,25 mm; 17,125 mm; 19,125 mm; 16,875 mm. Hasil tersebut menunjukkan bahwa ekstrak etanol kacang merah mempunyai efek antimikroba terhadap *Escherichia coli*. Zona hambat sudah terbentuk pada konsentrasi 20% ekstra etanol kacang merah dan konsentrasi 80% menunjukkan zona hambat terbesar.

5.2 Analisis Data

Hasil penelitian ini menggunakan analisis statistika SPSS. Analisis data hasil zona hambat dilakukan menggunakan uji statistik parametrik mengingat data pada penelitian merupakan data jenis rasio yang memiliki satu variabel bebas dan satu variabel tergantung. Perhitungan hasil penelitian menggunakan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) dengan hasil perhitungan dinyatakan bermakna apabila $p < 0,05$.

Sebelum dilakukan analisis, diperlukan beberapa pengujian pendahuluan untuk membuktikan bahwa data tersebut telah memenuhi syarat uji parametrik. Data sampel diuji dengan uji normalitas *Kolmogorov-Smirnov* untuk mengetahui apakah data terdistribusi normal atau tidak. Hasil uji tersebut menunjukkan nilai signifikansi X ($p > 0,05$) yang menunjukkan bahwa data pada variabel zona hambat terdistribusi normal.

Syarat berikutnya untuk uji parametrik adalah varian data harus sama atau data tersebar homogen, yaitu apabila nilai signifikansinya lebih dari 0,05 ($p > 0,05$). Uji homogenitas ragam data dilakukan untuk mendeteksi ada atau tidaknya heterogenitas pada data penelitian. Hasil uji homogenitas data sampel dengan metode uji *Levene (Levene Test Homogeneity of Variance)* menunjukkan nilai signifikansi X ($p > 0,05$) yang artinya bahwa varian data adalah homogen. Setelah

diketahui bahwa data terdistribusi normal dan varian data homogen maka selanjutnya data dianalisis menggunakan uji statistik *One Way ANOVA*, korelasi linier *Pearson* dan regresi.

5.2.1 Uji *One Way ANOVA*

One Way ANOVA merupakan pengujian untuk mengetahui perbedaan nyata antar konsentrasi ekstrak etanol kacang merah terhadap perumbuhan bakteri *Escherichia coli* pada masing-masing konsentrasi dengan taraf kepercayaan yang digunakan adalah 95%. Hasil uji tersebut menunjukkan adanya pengaruh konsentrasi ekstrak etanol kacang merah terhadap zona hambat dengan nilai 0,000 ($p < 0,05$). Hipotesis dalam *One Way ANOVA* ditentukan melalui pengujian H_0 dan H_1 . H_0 dari penelitian ini adalah tidak ada pengaruh antimikroba antar setiap konsentrasi ekstrak etanol kacang merah terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* yang tumbuh pada media *Mueller Hinton*. H_1 adalah terdapat pengaruh antimikroba setiap konsentrasi ekstrak etanol kacang merah terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* yang tumbuh pada media *Mueller Hinton* (Kebalikan H_0). H_1 ditolak apabila $p > 0,05$ sedangkan H_1 diterima apabila nilai $p < 0,05$. Berdasarkan nilai analisis *One way ANOVA*, diperoleh nilai signifikansi sebesar 0,000 ($p < 0,005$) dengan konsentrasi optimum 80% memiliki diameter zona hambat rata-rata 19, 125 mm \pm 0,3 mm sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol kacang merah memiliki pengaruh terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* pada media *Mueller Hinton* secara *In vitro*. Hasilnya dapat dilihat pada tabel 5.4 di bagian lampiran.

5.2.2 Uji Post Hoc Turkey

Uji Post Hoc Turkey merupakan uji perbandingan berganda (*multiple comparisons*). Uji ini menunjukkan pasangan kelompok sampel yang memberikan perbedaan yang signifikan dan yang tidak memberikan perbedaan secara

signifikan. Hasil analisis data menggunakan uji ini hampir semuanya menunjukkan signifikansi dengan p value $< 0,05$. Yang artinya masing-masing konsentrasi yang dibandingkan menunjukkan perbedaan yang signifikan, kecuali pada konsentrasi 60% dan 100%. Pada kedua konsentrasi ini menunjukkan data yang kurang signifikan yakni p value sebesar 0,695 pada konsentrasi 60% yang dibandingkan dengan konsentrasi 100%. Perbedaan yang tidak signifikan juga terjadi yakni dengan p value sebesar 0,695 pada konsentrasi 100% dibandingkan dengan konsentrasi 60%. Dari dua konsentrasi ini, dapat kita tarik kesimpulan bahwa konsentrasi 60% dan 100% tidak memberikan perbedaan yang bermakna dalam penghambatan pertumbuhan bakteri. Hasil analisis data dapat dilihat pada tabel 5.5 lampiran.

5.2.3 Uji Korelasi dan Regresi

Uji korelasi digunakan untuk mengetahui arah hubungan antara pemberian ekstrak etanol kacang merah terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* pada media *Mueller Hinton*. Hasil uji korelasi diperoleh angka signifikan 0,000 ($p < 0,05$). Hal ini diperjelas dengan koefisien korelasi (R) sebesar 0,861 (korelasi positif), yang berarti bahwa terdapat hubungan yang kuat antara konsentrasi ekstrak etanol kacang merah dan zona hambat yang terbentuk. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada tabel 5.7 pada bagian lampiran.

Uji regresi bertujuan untuk menentukan model yang paling sesuai untuk pasangan data serta dapat digunakan untuk membuat model dan menyelidiki hubungan antara dua variabel atau lebih. Uji regresi yang ditunjukkan dari nilai *Ajusted R Square* bernilai 0,747 atau 74,7%, artinya kemungkinan terjadinya zona hambat bakteri *Escherichia coli* karena pemberian ekstrak etanol kacang merah adalah sebesar 74,7%, sedangkan 25,3% dipengaruhi oleh variabel zat lain yang tidak dapat dikontrol oleh peneliti. Hasil regresi disajikan pada tabel 5.8 pada bagian lampiran.

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui efek ekstrak etanol kacang merah (*Phaseolus vulgaris L*) sebagai antibakteri terhadap pertumbuhan *Escherichia coli* secara *In vitro*. Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode difusi lubang/sumuran. Metode ini digunakan untuk mengetahui konsentrasi ekstrak etanol kacang merah yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dengan cara mengukur zona hambat yang terbentuk setelah pemberian ekstrak kacang merah (*Phaseolus vulgaris L*).

Metode difusi sumuran ini adalah salah satu metode uji bakteri yang praktis, cepat dalam pembacaan hasilnya, murah dan mudah (Arundhina, 2014). Metode dilusi tabung tidak dapat digunakan oleh peneliti pada penelitian ini dikarenakan setelah ekstrak dicampur dengan aquades didapatkan endapan keruh sehingga dikhawatirkan bakteri ikut mengendap dan tidak dapat diamati kekeruhan di masing-masing tabung uji.

Bakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah bakteri *Escherichia coli* yang didapat dari isolate urin milik Laboratorium Mikrobiologi Rumah Sakit Syaiful Anwar Malang. Sedangkan bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah kacang merah (*Phaseolus vulgaris L*) yang didapat melalui proses ekstraksi maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 95%. Pemilihan jenis pelarut harus mempertimbangkan beberapa faktor seperti toksisitas, kemampuan untuk mengekstrak, selektivitas dan kemudahan untuk diuapkan (Depkes RI, 2000). Larutan pengestraksi harus disesuaikan dengan kepolaran senyawa yang diinginkan. Pelarut cenderung melarutkan senyawa yang memiliki tingkat kepolaran yang sama (Depkes RI, 2000). Flavonoid merupakan senyawa yang bersifat polar sehingga pemilihan pelarut etanol yang merupakan pelarut polar dalam proses pengestrakan dirasa sudah tepat. Nantinya, pelarut ini akan menguap bersamaan

proses evaporasi sehingga yang didapatkan pada ekstrak merupakan murni senyawa aktif tanpa campuran etanol.

Zona hambat adalah zona bening disekitar lubang sumuran yang menunjukkan adanya penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri uji. Dari hasil pengujian tersebut dapat diketahui bahwa zona hambat terbentuk di sekitar lubang sumuran pada konsentrasi 20%, 40%, 60%, 80% dan 100% dengan diameter terkecil terbentuk pada konsentrasi 20% dengan rata-rata sebesar 10,25 mm dan diameter terbesar pada konsentrasi 80% dengan rata-rata sebesar 19,125 mm. Dengan demikian, konsentrasi 80% merupakan konsentrasi optimal pada penelitian ini, dimana 80% menjadi konsentrasi terendah yang mempunyai efek antimikroba yang paling tinggi. Diameter zona bening 10-20 mm memiliki zona hambat kuat, diameter zona bening 5-10 mm mempunyai daya hambat sedang dan diameter zona bening <5 mm memiliki daya hambat lemah (Davis and Stout, 1971).

Setelah hasil penelitian dianalisis, didapatkan hasil adanya perbedaan efek pada pemberian tiap konsentrasi ekstrak etanol kacang merah terhadap diameter zona hambat bakteri. Selain itu, didapatkan pula bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol kacang merah yang digunakan, maka semakin besar pula zona hambat yang terbentuk di sekitar lubang sumuran. Hasilnya menunjukkan peningkatan diameter zona bening dari konsentarsi 0%, 20%, 40%, 60%, dan tertinggi 80%, kecuali pada konsentrasi 100% dimana diameter zona bening justru menunjukkan penurunan.

Penurunan diameter zona bening pada konsentrasi yang lebih tinggi mungkin saja terjadi. Laju difusi antimikroba melalui agar-agar antara lain dipengaruhi oleh konsentrasi antibiotik, berat molekul antibiotik, sifat kelarutan antibiotik, pH dan ionisasi. Molekul yang lebih besar akan berdifusi lebih lambat dari pada senyawa dengan berat molekul lebih rendah. Pada konsentrasi 100% berat molekul yang lebih tinggi menyebabkan bahan antibiotik berdifusi lebih lambat sehingga diameter

zona bening yang ditimbulkan akan lebih kecil. Selain konsentrasi antibiotik, faktor kedalaman agar juga menjadi salah satu faktor penentu diameter zona hambat antibiotik. Jika *plate nutrient* agar terlalu dangkal (<4mm), maka akan menghasilkan hasil yang salah karena senyawa antimikroba akan berdifusi lebih jauh dari seharusnya, menciptakan zona inhibisi yang lebih besar. Sebaliknya, jika *plate nutrient* agar terlalu dalam (>4mm) maka akan menciptakan zona inhibisi yang lebih kecil (Brady MS *et al*, 1990). Hal ini yang mungkin menyebabkan pada konsentrasi 100%, zona inhibisi antibiotik justru lebih kecil dibandingkan dengan konsentrasi 80%. Meskipun demikian, berdasarkan uji statistik hasil ini tetap menunjukkan adanya hubungan positif antara konsentrasi ekstrak etanol kacang merah dengan diameter zona hambat.

Efek antibakteri ekstrak etanol kacang merah terhadap *Escherichia coli* disebabkan adanya kandungan zat aktif di dalam kacang merah yang larut dalam etanol 96%. Kandungan kimia suatu tumbuhan dipengaruhi oleh faktor internal dan faktor eksternal. Faktor internal meliputi genetik, morfologi, mutasi, polipoidi, pengaruh hibridisasi, dan pengaruh mikrobial. Sedangkan faktor eksternal meliputi iklim dan cahaya matahari, pengaruh ketinggian, nutrisi, umur tumbuhan, dan parasit. Jumlah kandungan kimia tumbuhan ditentukan oleh banyak faktor misalnya juga tanah, iklim dan pengolahan paska panen (Spillane, 2010). Faktor ini yang menyebabkan kemampuan antibakteri kacang merah akan berbeda jika kacang merah yang ditanam berasal dari daerah yang berbeda pula. Kacang merah memiliki komponen bioaktif yang berhubungan dengan kesehatan seperti, alkaloid, karbohidrat, katechin, serat, flavonoids, phasine, asam fitat, quercetin, saponin, steroid, tanin, terpenoid, dan inhibitor tripsin (Ocho A *et al.*, 2010).

Kacang merah (*Phaseolus vulgaris L.*) mengandung senyawa bioaktif yang dipercaya berperan sebagai antimikroba diantaranya seperti saponin, tanin, flavonoid, alkaloid, dan terpenoid. Meskipun dalam penelitian ini tidak menguji kandungan bahan aktif tersebut, namun beberapa hipotesis menduga bahwa kerja saponin sebagai antibakteri adalah dengan merusak membran bakteri (membranolitik) sehingga menyebabkan komponen penting dalam bakteri seperti

protein, asam nukleat dan nukleotida keluar sehingga sel bakteri menjadi lisis. Tanin berperan dalam mengerutkan membran sel bakteri sehingga permeabilitas sel bakteri terganggu dan pertumbuhan bakteri terhambat. Selain itu, tanin juga berperan dalam menginaktivasi enzim dan destruksi/inaktivasi fungsi materi genetik. Sedangkan flavonoid memiliki dua peran diantaranya denaturasi protein bakteri dan membranolitik sehingga permeabilitas dinding sel bakteri terganggu. PACs yang merupakan bagian dari flavonoid pada kacang merah memiliki mekanisme kerja dengan menghambat p-fimbria dan tipe 1 fimbria pada bakteri *E. coli* dengan mengurangi jumlah dan kerapatan fimbria sehingga bakteri tidak dapat menginvasi mukosa kandung kemih pada studi secara *In vivo* (Cos P. *et al*, 2004). Alkaloid berperan dengan mengganggu komponen penyusun peptidoglikan yang menyebabkan dinding sel bakteri tidak terbentuk. Sedangkan terpenoid berperan dengan mengganggu terbentuknya membran/dinding sel bakteri. Keseluruhan senyawa bioaktif ini diperkirakan mempengaruhi biosintesis bakteri *E. coli* sehingga kematian bakteri *E. coli* dapat meningkat.

Uji aktivitas antibakteri menggunakan ekstrak terhadap bakteri *E. coli* pernah dilakukan menggunakan tanaman herbal diantaranya kunyit, kayu putih, temulawak dan temuireng. Hasil dari jurnal menunjukkan aktivitas antibakteri terbaik mengacu pada diameter zona bening terbesar adalah kunyit sebesar $\pm 5,8$ mm sedangkan diameter zona hambat terkecil adalah kunyit putih sebesar ± 2 mm. Uji diameter zona hambat dilakukan menggunakan metode difusi sumuran (Rahmawati N. *et al.*, 2014). Dari hasil yang didapatkan jika dibandingkan dengan hasil pada penelitian ini, menunjukkan bahwa kemampuan ekstrak kacang merah pada konsentrasi 80% dalam menghambat pertumbuhan bakteri lebih besar yakni rata-rata $\pm 19,125$ mm dibandingkan dengan kunyit ditunjukkan dengan hasil diameter zona bening yang lebih besar. Uji bakteri menggunakan metode difusi lubang/sumuran tersebut kemudian dilanjutkan dengan menentukan KHM menggunakan metode dilusi tabung. Hasilnya menunjukkan bahwa kunyit mempunyai aktivitas antibakteri yang lebih tinggi dibandingkan dengan bahan lain dengan konsentrasi hambat minimum sebesar 50% dan maksimum 100%. Pada konsentrasi 50%, jumlah *E. coli* mengalami penurunan sebesar $0,4 \times 10^7$ sedangkan pada konsentrasi 100% jumlah bakteri *E. coli* menurun

sebanyak $1,5 \times 10^4$ (Rahmawati N. *et al.*, 2014). Jika ditinjau dari metode uji kemampuan ekstrak kacang merah sebagai antibakteri menggunakan dilusi tabung tidak mungkin dilakukan oleh peneliti dikarenakan kekeruhan yang ditimbulkan saat ekstrak dicampur dengan aquades justru akan menimbulkan kesulitan interpretasi data.

Penelitian untuk menguji aktivitas antibakteri kacang merah dengan menggunakan bakteri uji *Escherichia coli* sebelumnya pernah dilakukan oleh Savita Chaurasia dan Rimsi Saxena pada tahun 2012. Penelitian ini menggunakan metode difusi cakram dan menggunakan streptomisin sebagai kontrol. Ekstrak kacang merah yang digunakan adalah 10^6 CFU/ml sebanyak 100 μ L dan streptomisin sebanyak 30 μ L digunakan sebagai kontrol. Hasilnya, kacang merah memiliki zona hambat sebesar ± 15 -16 mm pada *Escherichia coli* sedangkan streptomisin sebesar ± 23 mm. Dari penelitian ini dapat ditarik kesimpulan bahwa kacang merah telah terbukti memiliki kemampuan antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* meskipun dengan hasil yang lebih kecil jika dibandingkan dengan streptomisin. Meski demikian kemampuan bahan alam terkait perannya sebagai antibakteri tidak dapat dikesampingkan mengingat angka kejadian resistensi antibiotik yang semakin tinggi setiap tahunnya.

Bagian kesimpulan pada jurnal yang ditulis oleh Víctor Javier *et. al* tahun 2008 juga menyebutkan bahwa ekstrak kacang merah menggunakan pelarut metanol yang diberikan pada bakteri uji menggunakan metode difusi cakram dengan konsentrasi 10 μ l/mg menunjukkan efek penghambat bakteri. Bakteri-bakteri tersebut diantaranya *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* dan *Listeria monocytogenes*. Dari banyak bakteri yang digunakan pada penelitian tersebut menunjukkan bahwa kemampuan kacang merah dalam menghambat pertumbuhan bakteri dapat digunakan pada bakteri baik Gram positif maupun Gram negatif. Itu artinya, kacang merah memiliki kemampuan antibiotik *broad spectrum* (spektrum luas). Sehingga potensi kacang merah sebagai alternatif pilihan sebelum diberikannya antibiotik produksi pabrik perlu untuk diperhitungkan.

Kelemahan dari penelitian ini antara lain adalah kemungkinan terdapatnya kesalahan prosedur dikarenakan belum terdapat prosedur tetap pembuatan ekstrak bahan alam. Akibatnya, kemungkinan efek antibakteri akan berbeda jika dilakukan pada proses ekstraksi yang berbeda pula. Keterbatasan selanjutnya, pembuatan ekstrak etanol kacang merah ini dilakukan tanpa pemisahan bahan-bahan aktif sehingga tidak diketahui secara pasti jenis bahan aktif dan proporsi jumlah bahan aktif yang berperan besar dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Dari segi prosedur penelitian, kelemahan selanjutnya adalah ketersediaan alat penelitian yang masih kurang misalnya alat pelubang sumuran yang masih dibuat manual serta alat hitung diameter zona bening yang masih menggunakan penggaris. Hasil pengukuran menggunakan penggaris dikatakan kurang kuantitatif dikarenakan kemampuan penggaris dalam mengukur zona bening memiliki ketelitian yang lebih rendah jika dibandingkan dengan alat ukur lain seperti misalnya menggunakan jangka sorong.

Meskipun hipotesis dalam penelitian ini terbukti, penelitian ini masih memiliki beberapa kelemahan, seperti kacang merah yang dikeringkan dengan cara dijemur langsung di bawah sinar matahari serta filtratnya diuapkan pada suhu 70°C sehingga kemungkinan suhu yang tinggi tersebut dapat membuat jumlah bahan aktif misalnya flavonoid yang terkandung dalam kacang merah tersebut jumlahnya menjadi turun. Penelitian efek ekstrak kacang merah sebagai antibakteri terhadap *Escherichia coli* secara *In vivo* pada hewan dan uji klinik pada manusia untuk mengetahui dosis toksik, dosis efektif, dosis letal, serta efek samping masih belum diesplorasi secara luas sehingga diperlukan studi lebih lanjut.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

1. Ekstrak etanol kacang merah (*Phaseolus vulgaris L.*) memiliki efek antimikroba terhadap pertumbuhan bakteri *E. coli* secara *In vitro*.
2. Hasil uji antimikroba menggunakan metode difusi sumuran terbentuk rata-rata diameter zona hambat ekstrak etanol kacang merah (*Phaseolus vulgaris L.*) terhadap bakteri *E. coli* pada konsentrasi 100%, 80%, 60%, 40% dan 20% masing-masing sebesar 16, 875 mm, 19,125 mm, 17,125 mm, 14, 25 mm dan 10,25 mm. Dengan diameter zona hambat terbesar pada konsentrasi 80% yakni sebesar 19,125 mm \pm 0,3 mm menunjukkan konsentrasi optimum yang merupakan konsentarsi terendah dengan kemampuan penghambatan pertumbuhan bakteri yang paling tinggi dan rendah toksisitas.

7.2 Saran

1. Perlunya penelitian lain yang membandingkan hasil ekstrak bahan alam dengan antibiotik produksi pabrik yang umum digunakan pada kasus infeksi oleh *E. coli*.
2. Perlunya penelitian lebih lanjut untuk menguji aktivitas antimikroba ekstrak etanol kacang merah terhadap bakteri lain.
3. Perlunya penelitian lebih lanjut untuk menguji daya antimikroba ekstrak etanol kacang merah terhadap pertumbuhan bakteri *E.coli* dengan menggunakan metode lainnya.
4. Perlunya penelitian menggunakan hewan coba.

DAFTAR PUSTAKA

- Afriansyah, N. 2010. *Kacang merah Turunkan Kolesterol dan Gula Darah*. Jakarta: Depkes RI.
- Ajizah A., Sensitivitas Salmonella Typhimurium terhadap Ekstrak Daun Psidium Guajava L. *Bioscientie*. 2004, p. 1(1): 31-8.
- Alatas, H. 2002. *Diagnosa dan Tatalaksana Infeksi Saluran Kemih pada Anak dalam Hot Topics in Pediatrics II*. Balai Penerbit FKUI, Jakarta, p. 162-179
- Albert X, Huertas I, Pereiro I, Sanfelix J, Gosalbes V, Perrota C. 2004. *Antibiotics for Preventing Recurrent Urinary Tract Infection in Nonpregnant Women*. USA, Cochrane Database Syst.
- Arundhina, E. *Aktivitas Ekstrak Etanol Daun Alamanda (Allamanda cathatica) sebagai Antijamur terhadap Candida albicans dan Pityosporum ovale secara In vitro*. *Journal Teknobiologi*. 2014. p. 15-18
- Astawan, M. 2009. *Sehat dengan Hidangan Kacang dan Biji-bijian*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- Brady M& Katz S.E. 1990. *Factors Influencing optimization of diffusion Assays for Antibiotics*. New Brunswick, Rutgers State University of New Jersey, Cook College, Department of Biochemistry and Microbiology.
- Brooks, G. F., Butel J.S & Morse S.A. 2004. *Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology*. Ed.22 Lange Medical Brooks/McGraw-hill. Medical Publishing Division
- Brooks. G, Butel. J, dan Morse. S. 2005. *Mikrobiologi Kedokteran*. Salemba Medika. Jakarta.
- Brooks, G.F., Caroll, K.C., Butel, J.S., dan Morse, S.A., 2007. *Struktur Sel*. In: *Mikrobiologi Kedokteran Jawetz, Melnick and Adelberg*. Jakarta: EGC

- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2013. *Antibiotic Resistance Threats in the United States*, U.S Department of Health and Human Services, USA.
- Cos P, De Bruyne T, Hermans N, Apers S, Berghe D, Vietinck A. 2004. *Proanthocyanidins in Health Care: Current and New Trends*. *Curr Med Chem*; 11(10): 1345-259.
- Cushine, T.P.T., dan A.J. Lamb. 2005. Antimicrobial Activity of Flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 26:343-356.
- Davis, W.W dan T.R Stout. 1971. *Disc Plate Methods of Microbiological Antibiotic Assay*. *Microbiology* 22: 659-665.
- Departemen Kesehatan RI. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Depkes RI
- Departemen Kesehatan RI. 2005. *Antimicrobial Resistance, Antibiotic Usage and Infection Control*. Jakarta: Depkes RI
- Departemen Kesehatan RI. 2006. *Monografi Ekstrak Tumbuhan Obat Indonesia*. Jakarta: Depkes RI
- Departemen Kesehatan RI. 2008. *Profil Kesehatan Indonesia 2007*. Jakarta: Kemenkes RI
- Departemen Kesehatan RI. 2010. *Profil Kesehatan Indonesia 2009*. Jakarta: Kemenkes RI
- Djamil, R& Tria, A. 2009. *Penapisan Fitokimia, Uji BLST dan Uji Antioksidan Ekstrak Metanol beberapa Spesies Pabilonaccae*. Fakultas Farmasi Universitas Pancasila. Jakarta
- Dzen, J.M. 2003. *Bakteriologi Medik*. Malang: Banyumedia

- Frenzen PD *et al.* 2005. *Economic Cost of Illness due to Escherichia coli Infection*. USA, Emerging Infection Program FoodNet Working Group.
- Ganiswarna S. G. 1995. *Farmakologi dan Terapi, ed. 4*. UI-Fakultas Kedokteran: Jakarta.
- Gepts, P and Hancock, J. 2006. *The Future of Plant Breeding*. Crop Sci. 46: 1630-1634.
- Gu L, Mark A, John F, Gary B, Joane H, David H, Susan G, Ronald L. 2004. *Concentrations of Proanthocyanidins in Common Foods and Estimations of Normal Consumption*. USA: Department of Agriculture
- Hisano M, Bruschini H, Nicodemo AC, Srougi M. 2012. *Cranberries and Lower Urinary Tract Infection Prevention*. Clinics ;67(6):661-667.
- James B. Kaper, James P. Nataro, Harry L. T. Mobley. 2004. *Pathogenic Escherichia Coli*. Center for Vaccine Development, Department of Microbiology and Immunology, and the Department of Pediatrics, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, Maryland 21201, USA. 132-133.
- Jawetz; Melnick dan Adelber's. 2001. *Mikrobiologi Kedokteran*. Salemba Medika. Jakarta.
- Jawetz, Melnick dan Adelber's. 2007. *Mikrobiologi Kedokteran, Ed.23*. Jakarta: EGC
- Jawetz; Melnick dan Adelber's. 2008. *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta, Salemba Medika.
- Juliantina., Farida R. 2009. *Manfaat Sirih (Piper crocatum) sebagai Agen Anti Bakteri terhadap Gram Positif dan Gram Negatif*. Jakarta, Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia.
- Karlowsky J. A., L. J. Kelly, C. Thornsberry, M. E. Jones, and D. F. Sahn, 2002, *Trends in Antimicrobial Resistance among Urinary Tract Infection Isolates of*

Escherichia coli from Female Outpatient in the United States, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 46(8), 2540-2545.

Kee, Joyce L., Hayes, Evelyn R., 1996. *Farmakologi Pendekatan Proses Keperawatan*. Jakarta: EGC

Lenette, T. H & Albert B. 1991. *Manual Clinical Microbiology (5th ed)*. Washington, DC: American Society for Microbiology.

Lenny, S., 2006. *Senyawa Flavonoida, Fenilpropanida dan Alkaloida*. Karya Ilmiah Departemen Kimia Fakultas MIPA Universitas Sumatera Utara.

Maddapa, Tarun 2010, *Escherichia coli Infection*. Emedicine. Medscape-Article Overview d

Manges, A. R, James R.H., Besty F., Timothy T, O'Bryan. 2001. *Widespread Distribution of Urinary Tract Infections Caused by A Multidrug-Resistant Escherichia coli Clonal Group*. N. Engl. J. Med. 345, 1007–1013. This work identified specific clonal groups of *E. coli* that cause widespread antibiotic resistant bacteria.

Markham KR. *Cara Mengidentifikasi Flavanoid*. Indonesia MedicusVeterinus.2012; 1(3) : 337-51.

Marsono, Y., 2002. Indeks *Glikemik Kacang-kacangan*. J. Teknol. Industri Pangan. 13 (3): 211-216.

Masduki. 1996. *Efek Antibakteri Ekstrak Biji Pinang (Areca catechu) terhadap S. aureus dan E. coli*. Jakarta: Penerbit Cermin Dunia Kedokteran.

Mitterhuemer S., Petzl W., Krebs S., Mehne D., Klanner A. 2010. *Escherichia coli Infection Induces Distinct Local and Systematic transcriptome Response in The Mammary Gland*. BMC Genomics 11:138.

Ningrum, HC. 2012. *Pengembangan Produk Cake dengan Substitusi Tepung Kacang Merah*. Yogyakarta: UNY

- Ocho-Anini et al. J. Appl. Biosci. 2010. *Evaluation of Bioactive Components in Phaseolus vulgaris L Seeds*. Université d'Abobo-Adjamé, UFR Sciences et Technologie des Aliments, Laboratoire de Nutrition et de Sécurité Alimentaire, 02 BP 801 Abidjan 02, Côte d'Ivoire.
- Ou K& Gu L. 2012. *Jurnal Adsorb and Metabolism of Proanthocyanidins*. Food Science and Human Nutrition Department, USA., Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Gainesville, FL 32611.
- Potter P.A. 2005. *Buku Ajar Fundamental Keperawatan : Konsep, Proses, dan Praktik. Edisi 4. Vol 1*. Alih Bahasa: Yasmin Asih, dkk. Jakarta: EGC
- Pratiwi, S.T., 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Erlangga. Jakarta: 150-171
- Prescott, L.M. 2002. *Prescott-Harley-Klein: Microbiology 5th Edition*. USA: The McGraw-Hill Companies.
- Robinson T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi. Edisi Keenam*. Terjemahan Padmawinata K. Bandung: Penerbit ITB.
- Rahmawati N., Sudjarwo E., Widodo E., 2014. *Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Herbal terhadap Bakteri Escherichia coli*. Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan 24 (3): 24-31
- Rukmana, R. 2009. *Budidaya Buncis*. Penerbit Kanisius. Jakarta.
- Rusilanti dan Clara M. Kusharto. 2007. *Sehat dengan Makanan Berserat*. Jakarta: Agromedia Pustaka.
- Russel A. D. and Chopra I. 1990. *Understanding Antibacterial Action and Resistance*. New York: Ellis Hooword. p 68-72.
- Russo TA, Johnson JR. 2003. *Medical and Economic Impact of Extraintestinal Infections Due to Escherichia Coli: Focus on An Increasingly Important Endemic Problem*. Microbes Infect;5(5):449-56.

- Sacher, Ronald A & Richard A McPherson. 2004. Tinjauan Klinis Hasil Pemeriksaan Laboratorium Edisi 11. Alih Bahasa: Brahm U. Pendit dan Dewi Wulandari. EGC: Jakarta.
- Savita C and Rimsi S. 2012. *Antibacterial Activity of Phaseolus vulgaris L.* India, Department of Biotechnology, IMS Engineering College., p. 70-74.
- Shasank Kumar and Abhay K. Pandey. 2013. *Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview.* India, Department of Biochemistry, University of Allahabad.
- Sherrard J, Donders G, White D, Jensen JS. 2011. *European (IUSTI/WHO) Guideline on The Management of Vaginal Discharge.* Int J STD AIDS, 22:421-9.
- Sobel JD. 1997. *Pathogenesis of Urinary Tract Infection. Role of Host Defenses.* Infect Dis Clin North America;11(3):531-49.
- Spillane, J. 2010. *Ekonomi Farmasi*, Grasindo, Jakarta, p. 52.
- Srinivasan D, Sangeetha N, Suresh T, Perumalsamy PL. *Antimicrobial Activity of Certain Indian Medical Plants used in Folkloric Medicine. Journal of Ethnopharmacol.* 2001; 74; 217-220.
- Suwandi, U., 1999. *Peran Media untuk Identifikasi Mikroba Patogen.* Cermin Dunia Kedokteran: Jakarta.
- Thomson RH. 1993. *The Chemistry Of Natural Productst. 2nd Ed.* Glasgow: Chapman andhalltd.
- Tjay T. H. dan R. Kirana. 2002. *Obat-Obat Penting, ed. 5.* Jakarta, PT. Elex Media Komputindo.
- Venugopal A., Dasani S., Rai S. 2009. *Antibacterial Effect of Herbs and Spices Extract on Escherischie coli.* Mumbai-India, Department of Life Sciences, Kishinchand Chellaram College, D. W. Road, Churchgate.

Víctor J., Angel A., Alfredo J., Jesus S., Benito D., Javier V., Misu., S., Alberto G., Jorge E., 2008. Microbiological and Toxicological Effects of Perla Black Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Extracts: *In Vitro* and *In Vivo* Studies. Nordic Pharmacological Society Mexico. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 104 , 81–86.

Warsito H. 2011. *Obat Tradisional Kekayaan Indonesia*. Yogyakarta: Graha Ilmu.

Whittam, T.S & Michael S. 2011. *Phatogenesis and Evaluation of Virulence in Enteropathogenic and Enterohemorrhagic Escherichia coli*. *J. Clin Invest.* 107; 539-548.

