

**EFEK EKSTRAK ETANOL DAUN BELUNTAS (*Pluchea indica* L.)
SEBAGAI ANTIMIKROBA TERHADAP *Proteus mirabilis* SECARA IN
VITRO**

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran**



Oleh:

Stephanus Kukuh Aryo Pambudi

NIM. 155070100111034

**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN**

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

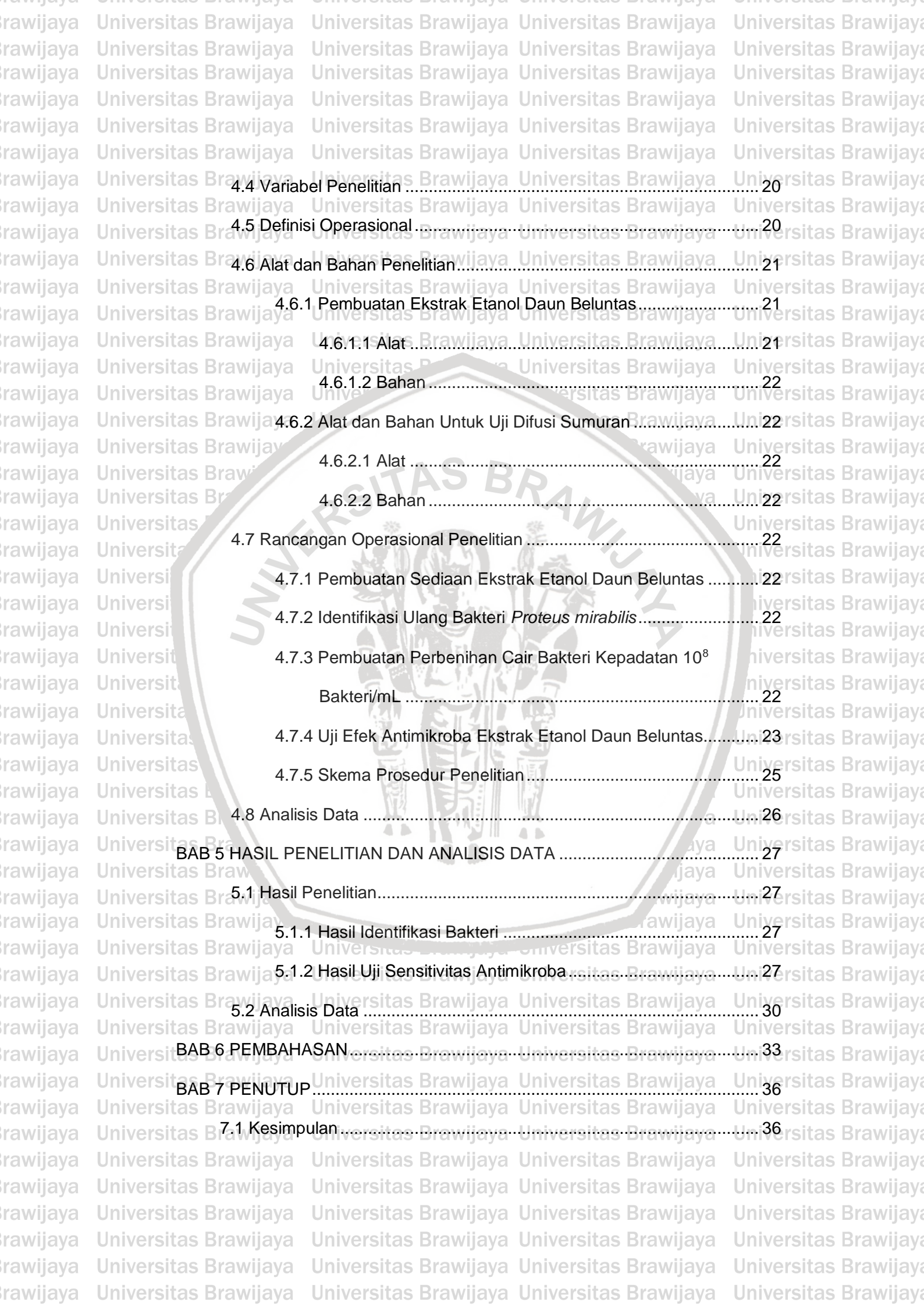
MALANG

2018

DAFTAR ISI

JUDUL.....	i
HALAMAN PERSETUJUAN.....	ii
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN.....	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
ABSTRAK.....	vi
ABSTRACT.....	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
DAFTAR SINGKATAN.....	xv
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.3.1 Tujuan Umum.....	3
1.3.2 Tujuan Khusus.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
1.4.1 Manfaat Akademis.....	4
1.4.2 Manfaat Praktis.....	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Tanaman Beluntas.....	5
2.1.1 Taksonomi Tanaman Beluntas.....	6

2.1.2	Morfologi Tanaman Beluntas	7
2.1.3	Habitat dan Penyebaran Tanaman Beluntas	7
2.1.4	Kandungan Kimia Daun Beluntas	7
2.1.4.1	Alkaloid	7
2.1.4.2	Flavonoid	8
2.1.4.3	Tanin	8
2.2	<i>Proteus mirabilis</i>	9
2.2.1	Taksonomi <i>Proteus mirabilis</i>	10
2.2.2	Struktur Antigen	11
2.2.3	Ciri-Ciri pada Media Perkembangbiakan	12
2.2.4	Kepentingan Klinis <i>Proteus mirabilis</i>	13
2.3	Mekanisme Antimikroba	13
2.3.1	Merubah Permeabilitas Membran Sel	13
2.3.2	Merusak Protein dan Asam Nukleat	13
2.3.3	Menghambat Metabolisme Bakteri	14
2.4	Uji Kepekaan Terhadap Antimikroba Secara <i>In Vitro</i>	14
2.4.1	Metode Difusi	15
2.4.2	Metode Dilusi	15
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN		17
3.1	Kerangka Konsep Penelitian	17
3.2	Hipotesis Penelitian	18
BAB 4 METODE PENELITIAN		19
4.1	Rancangan Penelitian	19
4.2	Tempat dan Waktu Penelitian	19
4.3	Sampel Penelitian	19



4.4 Variabel Penelitian	20
4.5 Definisi Operasional	20
4.6 Alat dan Bahan Penelitian.....	21
4.6.1 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Beluntas.....	21
4.6.1.1 Alat.....	21
4.6.1.2 Bahan.....	22
4.6.2 Alat dan Bahan Untuk Uji Difusi Sumuran.....	22
4.6.2.1 Alat	22
4.6.2.2 Bahan	22
4.7 Rancangan Operasional Penelitian	22
4.7.1 Pembuatan Sediaan Ekstrak Etanol Daun Beluntas	22
4.7.2 Identifikasi Ulang Bakteri <i>Proteus mirabilis</i>	22
4.7.3 Pembuatan Perbenihan Cair Bakteri Kepadatan 10 ⁸ Bakteri/mL.....	22
4.7.4 Uji Efek Antimikroba Ekstrak Etanol Daun Beluntas.....	23
4.7.5 Skema Prosedur Penelitian.....	25
4.8 Analisis Data	26
BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA	27
5.1 Hasil Penelitian.....	27
5.1.1 Hasil Identifikasi Bakteri	27
5.1.2 Hasil Uji Sensitivitas Antimikroba.....	27
5.2 Analisis Data	30
BAB 6 PEMBAHASAN.....	33
BAB 7 PENUTUP.....	36
7.1 Kesimpulan.....	36

7.2 Saran

36

DAFTAR PUSTAKA

37

LAMPIRAN

40



HALAMAN PENGESAHAN
TUGAS AKHIR

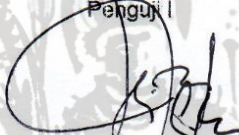
EFEK EKSTRAK ETANOL DAUN BELUNTAS (*Pluchea indica* L.) SEBAGAI
ANTIMIKROBA TERHADAP *Proteus mirabilis* SECARA *IN VITRO*

Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran

Oleh :
Stephanus Kukuh Aryo Pambudi
155070100111034

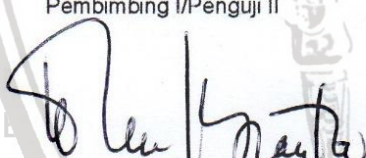
Telah diuji pada
Hari : Jumat
Tanggal : 30 November 2018
Dan dinyatakan lulus oleh :


Penguji I


dr. Nurul Hidayati, M.Sc.
NIP. 197707062005012001

Pembimbing I/Penguji II

Pembimbing III/Penguji III


Dr. Dra. Sri Winarsih, M.Si., Apt.
NIP. 196312171989112001


dr. Desy Wulandari, Sp.A., M.Biomed.
NIP/NIK. 2016078410212001

Mengetahui,
Ketua Program Studi Sarjana Kedokteran


dr. Triwahju Astuti, M.Kes., Sp.P(K)
NIP. 196310221996012001



ABSTRAK

Pambudi, Stephanus Kukuh Aryo. 2018. *Efek Ekstrak Etanol Daun Beluntas (Pluchea indica L.) Sebagai Antimikroba Terhadap Proteus mirabilis Secara In Vitro*. Tugas Akhir, Program Studi Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Dr. Dra. Sri Winarsih, M.Si, Apt. (2) dr. Desy Wulandari, Sp.A, M.Biomed.

Infeksi nosokomial merupakan salah satu penyebab meningkatnya angka kematian dan morbiditas pada pasien yang dirawat di rumah sakit. Infeksi nosokomial dapat berupa *central-line associated blood stream infection* (CABS), *ventilator-associated pneumonia* (VAP), dan *catheter-associated urinary tract infection* (CAUTI). Salah satu bakteri yang sering menyebabkan CAUTI adalah *Proteus mirabilis*. Terapi pada kasus infeksi *Proteus mirabilis* menjadi semakin sulit karena *Proteus mirabilis* memiliki kemampuan untuk menghindari respon imun tubuh dan membentuk resistensi terhadap antimikroba. Penggunaan bahan herbal sebagai antimikroba dapat menjadi alternatif dalam mengatasi permasalahan resistensi antimikroba tersebut. Salah satu bahan herbal yang mudah didapat dan memiliki potensi antimikroba adalah daun beluntas (*Pluchea indica* L.). Bahan aktif dalam daun beluntas yang memiliki efek antimikroba adalah alkaloid, flavonoid, dan tannin. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk membuktikan efek antimikroba ekstrak etanol daun beluntas (*Pluchea indica* L.) terhadap *Proteus mirabilis* secara *in vitro*. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah difusi sumuran dengan konsentrasi ekstrak etanol daun beluntas sebesar 10%, 20%, 30%, 40%, dan 50% dengan pengulangan sebanyak empat kali untuk tiap konsentrasi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa zona inhibisi terbentuk pada semua konsentrasi tersebut. Analisis data menggunakan *One-way ANOVA Test* menunjukkan nilai $p < 0,05$ sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh signifikan antara perubahan konsentrasi ekstrak etanol daun terhadap pertumbuhan *Proteus mirabilis*. Uji korelasi *Spearman* menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi ekstrak etanol daun beluntas maka semakin besar zona inhibisi yang terbentuk. Jadi dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun beluntas memiliki efek antimikroba terhadap *Proteus mirabilis* secara *in vitro*.

Kata Kunci : *Proteus mirabilis*, antimikroba, *Pluchea indica* L.

ABSTRACT

Pambudi, Stephanus Kukuh Aryo. 2018. *Effect of Ethanolic Extract of Beluntas Leaf (*Pluchea indica* L.) as Antimicrobial on *Proteus mirabilis* In Vitro*. Final Assignment, Medical Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: (1) Dr. Dra. Sri Winarsih, M.Si, Apt. (2) dr. Desy Wulandari, Sp.A, M.Biomed.

Nosocomial infection is one of the causes of the increase in mortality and morbidity in patients who are hospitalized. Nosocomial infection can be in the form of central-line associated blood stream infection (CABS), ventilator-associated pneumonia (VAP), and catheter-associated urinary tract infection (CAUTI). One of the bacteria that often causes CAUTI is *Proteus mirabilis*. Therapy in the case of *Proteus mirabilis* infection becomes increasingly difficult because *Proteus mirabilis* has the ability to avoid the body's immune response and develop resistance to antimicrobials. The use of herbal ingredients as antimicrobials can be an alternative in overcoming the problem of antimicrobial resistance. One of the herbal ingredients that can be found easily and has antimicrobial potential is beluntas leaves (*Pluchea indica* L.). The active ingredients in beluntas leaves that have antimicrobial effects are alkaloids, flavonoids, and tannins. The purpose of this study was to prove the antimicrobial effect of ethanol extract of beluntas (*Pluchea indica* L.) leaves on *Proteus mirabilis* in vitro. The method used in this study was well diffusion method with concentration of ethanol extract of beluntas leaves by 10%, 20%, 30%, 40%, and 50% with repetition four times for each concentration. The results showed that the zone of inhibition was formed at all of these concentrations. Data analysis using One-way ANOVA Test showed $p < 0.05$ so it can be concluded that there was a significant effect between changes in the concentration of ethanol extract of beluntas leaves on the growth of *Proteus mirabilis*. Spearman correlation test showed that the greater the concentration of ethanol extract of beluntas leaves, the greater the zone of inhibition formed. So it can be concluded that the ethanol extract of beluntas leaves has antimicrobial effects on *Proteus mirabilis* in vitro.

Keywords : *Proteus mirabilis*, antimicrobial, *Pluchea indica* L.

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang.

Proteus mirabilis adalah bakteri batang Gram negatif, mampu membentuk biofilm dan bakteri ini dapat menyebabkan *Catheter-Associated Urinary Tract Infection* (CAUTI), cystitis, prostatitis, pyelonephritis akut, dan urolithiasis. *Proteus mirabilis* sering menjadi objek penelitian yang berkaitan dengan infeksi saluran kemih yang disebabkan oleh bakteri non-*E. coli* karena pemahaman tentang patogenesis dari infeksi saluran kemih yang disebabkan oleh bakteri ini lebih lengkap daripada bakteri non-*E. coli* lain yang dapat menyebabkan infeksi saluran kemih (Foxmoon *et al.*, 2015).

Infeksi nosokomial merupakan salah satu penyebab utama meningkatnya angka kematian dan morbiditas pada pasien yang dirawat di rumah sakit (World Health Organization, 2002). Contoh dari penyakit infeksi nosokomial adalah *central-line associated bloodstream infection*, *ventilator-associated pneumonia*, dan *catheter-associated urinary tract infection* (Garcia *et al.*, 2015). Salah satu bakteri yang sering menyebabkan infeksi nosokomial di Rumah Sakit Umum Dr. Saiful Anwar Malang adalah *Proteus mirabilis* (Noorhamdani dkk., 2015)

Proteus mirabilis memiliki beberapa cara untuk menghindari respon imun tubuh dan menimbulkan resistensi terhadap antibiotik yang memungkinkan bakteri ini untuk menginfeksi, beradaptasi, dan bertahan hidup di saluran kemih sehingga akan mempersulit terapi pada kasus infeksi saluran kemih. *Proteus mirabilis* memiliki lipopolisakarida (LPS) yang berfungsi untuk melawan rantai peptida dari antimikroba dan molekul defensin. *Proteus mirabilis* memiliki kemampuan untuk

membentuk biofilm yang berfungsi untuk menyediakan perlindungan alami bagi bakteri dari respon imun tubuh dan antibiotik (Foxmoon *et al.*, 2015). Terapi antibiotik untuk infeksi saluran kemih akibat *Proteus mirabilis* adalah Fluoroquinolone, Cotrimoxazole, atau Cephalosporin generasi tiga. Cephalosporin generasi tiga yaitu Ceftriaxone lebih sering dipilih karena aman diberikan pada anak-anak dan ibu hamil (Foris, 2017).

Cara untuk mengatasi permasalahan resistensi *Proteus mirabilis* adalah dengan menggunakan bahan alternatif antimikroba. Bahan alternatif antimikroba dapat diperoleh dari ekstrak tanaman yang didapat dari alam. Salah satu tanaman yang dapat digunakan sebagai alternatif antimikroba adalah Beluntas (*Pluchea indica*). Beluntas merupakan tanaman yang mudah tumbuh secara liar walaupun tidak dibudidayakan sehingga daun beluntas mudah didapat, terutama di daerah pedesaan (Dalimartha, 2009). Ekstrak etanol daun Beluntas (*Pluchea indica*) memiliki kandungan bahan aktif berupa alkaloid, flavonoid, dan tanin. Etanol dipilih sebagai pelarut karena sebagian besar bahan aktif di daun beluntas (*Pluchea indica*) bersifat polar, sama seperti etanol (Widyawati *et al.*, 2010). Ekstrak etanol daun Beluntas (*Pluchea indica*) memiliki kandungan fenol yang lebih tinggi daripada beberapa ekstrak etanol tanaman lain seperti Pegagan (*Centella asiatica*), Selasih (*Ocimum americanum*), dan Krokot (*Portulaca oleracea*). Ekstrak etanol daun Beluntas (*Pluchea indica*) juga memiliki kandungan flavonoid yang lebih tinggi daripada ekstrak etanol tanaman lain seperti Mangkokan (*Nothopanax scutellarius*), Poslen (*Talinum triangulare*), dan Kecombrang (*Etilingera elatior*). Flavonoid yang terdapat pada ekstrak etanol daun Beluntas (*Pluchea indica*) yaitu quercetin, myricetin, dan kaempferol. Di antara ketiga jenis flavonoid tersebut kandungan yang terbanyak adalah quercetin yaitu sebanyak 81% (Andarwulan *et*

al., 2010). Quercetin memiliki efek antibakteri dengan cara berikatan dengan fragmen DNA gyrase B pada bakteri dan menghambat aktivitas DNA gyrase B dengan berikatan pada ATP *binding site* dari enzim gyrase B (Plaper *et al.*, 2003).

Ekstrak etanol daun Beluntas (*Pluchea indica*) memiliki efek antimikroba terhadap beberapa jenis bakteri Gram positif yaitu *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, dan *Staphylococcus aureus* dan bakteri Gram negatif yaitu *E. coli* dan *Pseudomonas aeruginosa* (Vu *et al.*, 2016). Penelitian yang dilakukan di Indonesia

juga membuktikan bahwa daun beluntas memiliki efek antimikroba terhadap *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *S.aureus*, *E. coli*, dan *Pseudomonas fluorescens* (Ardiansyah, 2002). Salah satu metode yang sering digunakan untuk skrining efek

antimikroba suatu ekstrak adalah metode difusi sumuran (Valgas *et al.*, 2007).

Mengingat *Proteus mirabilis* termasuk dalam bakteri Gram negatif dan mempertimbangkan sulitnya terapi karena munculnya resistensi antibiotik pada bakteri *Proteus mirabilis*, maka perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui

efektivitas ekstrak etanol daun Beluntas (*Pluchea indica*) sebagai alternatif antimikroba terhadap bakteri *Proteus mirabilis*.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang diangkat berdasarkan uraian di atas adalah :

Apakah ekstrak etanol daun Beluntas (*Pluchea indica*) memiliki efek antimikroba terhadap *Proteus mirabilis* secara *in vitro* yang ditunjukkan dengan makin tinggi dosis yang diberikan maka makin besar diameter zona inhibisi yang terbentuk?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan bahwa ekstrak etanol daun Beluntas (*Pluchea indica*) memiliki efek antimikroba terhadap *Proteus mirabilis* secara *in vitro*.

1.3.2 Tujuan Khusus

Menganalisis hubungan dari perbedaan konsentrasi ekstrak etanol daun

Beluntas (*Pluchea indica*) terhadap diameter zona hambat yang terbentuk pada pertumbuhan koloni *Proteus mirabilis* secara *in vitro*.

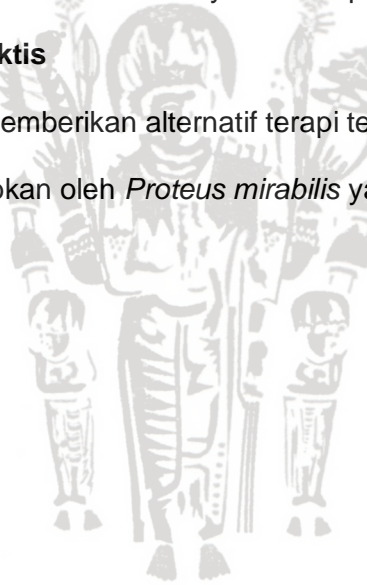
1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademis

Dapat digunakan sebagai dasar teori untuk pengembangan ilmu dalam bidang kesehatan yang berkaitan dengan penggunaan herbal sebagai antimikroba khususnya terhadap *Proteus mirabilis*.

1.4.2 Manfaat Praktis

Dapat memberikan alternatif terapi terhadap infeksi saluran kemih yang disebabkan oleh *Proteus mirabilis* yang resisten terhadap antibiotik.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Beluntas (*Pluchea indica*)

Di India, *Pluchea indica* dikenal memiliki efek anti-inflamasi, anti-ulcer, anti-piretik, diuretik, dan antimikroba. Kandungan dalam ekstrak Beluntas (*Pluchea indica*) diketahui memiliki efek anti-amoeba terhadap *Entamoeba histolytica* (Biswas *et al.*, 2007). Selain itu, penelitian lain di India membuktikan bahwa ekstrak dari akar *Pluchea indica* memiliki efek hepatoprotektif yang signifikan pada eksperimen yang dilakukan pada tikus yang mengalami kerusakan liver yang diinduksi oleh karbon tetraklorida (Sen *et al.*, 2002). Kandungan β -sitosterol dan stigmasterol pada ekstrak Beluntas (*Pluchea indica*) memiliki peran yang penting dalam menetralkan bisa ular (Gomes *et al.*, 2007).

Sebuah penelitian di Malaysia membuktikan bahwa penggunaan ekstrak Beluntas (*Pluchea indica*) dapat meringankan gejala Tuberculosis (Mohamad *et al.*, 2011). Selain itu, penelitian lain di Malaysia menyimpulkan bahwa ekstrak Beluntas (*Pluchea indica*) memiliki potensi untuk dikembangkan menjadi bahan untuk suplemen diet dan produk kosmetik (Normala *et al.*, 2011). Penelitian lain yang dilakukan di Thailand membuktikan bahwa ekstrak air panas daun Beluntas (*Pluchea indica*) mengandung senyawa antioksidan, inhibitor Nitric Oxide (NO), dan inhibitor produksi prostaglandin E2 sehingga ekstrak tersebut dapat digunakan sebagai suplemen (Srisook *et al.*, 2012). Penelitian lain di Thailand membuktikan bahwa ekstrak daun Beluntas (*Pluchea indica*) memiliki potensi antimikroba terhadap beberapa jenis bakteri yang sering menyebabkan infeksi saluran kemih (Sittiwet, 2009).

Di Indonesia, *Pluchea indica* dikenal dengan nama beluntas (Melayu), baluntas (Sunda, Madura), luntas (Jawa), dan lamutasa (Makassar) (Dalimartha, 2009). Di Indonesia, tanaman beluntas sering dimanfaatkan sebagai bahan makanan dan obat-obatan (Andarwulan *et al.*, 2010). Sebuah penelitian di Indonesia membuktikan bahwa penambahan daun Beluntas dengan konsentrasi 2% ke dalam bahan makanan untuk ayam potong secara signifikan meningkatkan berat badan ayam, meningkatkan *intake* makanan dan air, dan dapat menurunkan kadar kolesterol ayam potong hingga 8% (Sudarman *et al.*, 2011).

2.1.1 Taksonomi Tanaman Beluntas (*Pluchea indica*)

Taksonomi tanaman beluntas menurut *Integrated Taxonomic Information*

System :

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Viridiplantae
Infra kingdom	: Streptophyta
Superdivision	: Embryophyta
Division	: Tracheophyta
Subdivision	: Spermatophytina
Class	: Magnoliopsida
Superorder	: Asteranae
Order	: Asterales
Family	: Asteraceae
Genus	: <i>Pluchea</i> Cass.
Species	: <i>Pluchea indica</i> (L.) Less.

2.1.2 Morfologi Tanaman Beluntas (*Pluchea indica*)

Tanaman beluntas (*Pluchea indica*) termasuk dalam tanaman perdu yang berukuran kecil, tumbuh tegak, dan kadang tingginya bisa mencapai 2 meter atau lebih. Tanaman beluntas (*Pluchea indica*) memiliki banyak cabang yang rusuknya halus dan memiliki rambut yang lembut. Daun tanaman beluntas (*Pluchea indica*) memiliki tangkai yang pendek, letak berselang-seling, helaian daun berbentuk bulat seperti telur, ujungnya lancip, tepi bergerigi, memiliki kelenjar, panjang 2,5-9 cm, lebar 1-5,5 cm, berwarna hijau terang, dan apabila diremas akan mengeluarkan bau harum. Bunga dari tanaman beluntas (*Pluchea indica*) keluar dari ketiak daun dan ujung tangkai, berbentuk bonggol, memiliki gagang, dan berwarna putih kekuningan hingga ungu. Buah dari tanaman beluntas (*Pluchea indica*) berbentuk gasing, berukuran kecil, dan berwarna coklat keputihan (Dalimartha, 2009).

2.1.3 Habitat dan Penyebaran Tanaman Beluntas (*Pluchea indica*)

Tanaman beluntas (*Pluchea indica*) biasanya tumbuh secara liar di daerah yang kondisinya kering dan tanahnya keras serta berbatu. Selain itu, tanaman beluntas (*Pluchea indica*) juga sering ditanam untuk digunakan sebagai tanaman pagar. Tanaman beluntas (*Pluchea indica*) memerlukan sinar matahari yang cukup atau sedikit naungan agar dapat tumbuh dengan baik. Tanaman ini sering dijumpai di daerah pantai hingga daerah dengan ketinggian 1000 m di atas permukaan laut (Dalimartha, 2009).

2.1.4 Kandungan Kimia Daun Beluntas (*Pluchea indica*)

2.1.4.1 Alkaloid

Alkaloid adalah molekul organik kompleks yang mengandung *heterocyclic nitrogen ring*. Senyawa alkaloid dapat diproduksi oleh berbagai macam organisme,

termasuk hewan dan mikroba, tapi senyawa alkaloid paling banyak diproduksi oleh tumbuhan sebagai metabolit sekunder. Tumbuhan menghasilkan alkaloid sebagai perlindungan terhadap organisme patogen (Murphy, 2017). Alkaloid memiliki efek antimikroba yaitu dengan cara menghambat sintesis asam nukleat. Hambatan sintesis asam nukleat terjadi karena alkaloid menghambat enzim dihidrofolat reduktase dan topoisomerase tipe 1. Selain itu, alkaloid juga merusak integritas membran sel bakteri (Cushnie *et al.*, 2014). Alkaloid dapat larut dalam etanol karena alkaloid bersifat polar, sama seperti etanol (Widyawati *et al.*, 2010).

2.1.4.2 Flavonoid

Flavonoid adalah senyawa fenol yang banyak ditemukan di buah, sayuran, kacang-kacangan, biji-bijian, bunga, teh, *wine*, dan madu. Struktur dasar dari senyawa flavonoid adalah 2-phenyl-benzopyrane atau flavane nucleus, yang terdiri dari dua cincin benzena yang dihubungkan oleh *heterocyclic pyrane ring* (Savoia, 2012). Tanaman beluntas (*Pluchea indica*) memiliki kandungan flavonoid yaitu quercetin, myricetin, dan kaempferol. Di antara tiga jenis flavonoid tersebut, kandungan yang paling banyak adalah quercetin yaitu sebanyak 81%. Quercetin memiliki efek antimikroba yaitu dengan cara merusak DNA bakteri melalui hambatan pada enzim gyrase (Plaper *et al.*, 2003). Flavonoid dapat larut dalam etanol karena flavonoid bersifat polar, sama seperti etanol (Widyawati *et al.*, 2010).

2.1.4.3 Tanin

Tanin adalah senyawa metabolit sekunder dari tanaman yang diklasifikasikan ke dalam golongan fenol yang larut air, memiliki massa molar antara 300 sampai 3000, dan memiliki kemampuan untuk melakukan presipitasi terhadap alkaloid, gelatin, dan protein lain. Tanin memiliki efek antioksidan serta antimikroba yang

sudah diteliti secara luas. Tanin memiliki efek antioksidan karena tanin memiliki kemampuan untuk menghambat enzim peroksidase dan memiliki *free radical-scavenging capacity* yang besar (Sieniawska *et al.*, 2017). Tanin memiliki efek antimikroba karena tanin memiliki kemampuan untuk menghambat proliferasi bakteri dengan cara menghambat enzim esensial yang diperlukan untuk metabolisme bakteri yaitu enzim proteolitik (Enwa *et al.*, 2014). Tanin dapat larut dalam etanol karena tanin bersifat polar, sama seperti etanol (Widyawati *et al.*, 2010).

2.2 *Proteus mirabilis*

Proteus mirabilis adalah bakteri batang Gram negatif dari famili Enterobacteriaceae yang bersifat fakultatif anaerob. Bakteri ini tersebar luas di air, tanah, dan saluran pencernaan manusia. *Proteus mirabilis* memiliki dua bentuk yaitu *vegetative cell* dan *swarmer cell*. *Swarmer cell* adalah sel bakteri yang *multinucleated*, berbentuk panjang dengan ukuran antara 60-80 μm , dan memiliki ribuan flagel yang berfungsi dalam motilitas bakteri. *Swarmer cell* terbentuk dari diferensiasi *vegetative cell* saat bakteri menempel pada epitel saluran kemih atau kateter (Foxmoon *et al.*, 2015).

Dua spesies paling umum dari genus *Proteus* adalah *Proteus mirabilis* dan *Proteus vulgaris*. Dua spesies tersebut memiliki karakteristik yaitu dapat membentuk hydrogen sulfide (H_2S) dari natrium thiosulfate serta mampu membentuk urease kuat yang mampu menghidrolisis urea menjadi ammonia dan karbon dioksida. *Proteus mirabilis* memiliki karakteristik tidak dapat membentuk indol dari triptofan sehingga *Proteus mirabilis* termasuk dalam *indole-negative Proteus* (Noorhamdani dkk., 2015). Perbedaan dari *Proteus mirabilis* dan *Proteus vulgaris* dapat dilihat melalui kemampuannya dalam memfermentasi glukosa,

sukrosa, dan maltose. *Proteus vulgaris* dapat memfermentasikan glukosa, sukrosa, dan maltosa. Sedangkan *Proteus mirabilis* dapat memfermentasikan glukosa, memfermentasikan sukrosa secara lambat, dan tidak mampu memfermentasikan maltosa (O'Hara *et al.*, 2000).



Gambar 2.1 Hasil Pewarnaan Gram *Proteus mirabilis* menunjukkan gambaran batang gram negatif (Kaiser, 2017)

2.2.1 Taksonomi *Proteus mirabilis*

Taksonomi *Proteus mirabilis* menurut *Integrated Taxonomic Information*

System adalah :

Kingdom : Bacteria

Subkingdom : Negibacteria

Phylum : Proteobacteria

Class : Gammaproteobacteria

Order : Enterobacteriales

Family : Enterobacteriaceae

Genus : *Proteus*

Species : *Proteus mirabilis*

2.2.2 Struktur Antigen

Proteus mirabilis merupakan bakteri yang termasuk dalam famili Enterobacteriaceae sehingga bakteri ini memiliki struktur antigen yang kompleks.

Struktur antigen dari famili Enterobacteriaceae diklasifikasikan menjadi lebih dari 150 jenis antigen O (lipopolisakarida), 100 jenis antigen K (kapsul), dan 50 jenis antigen H (flagel).

1) Antigen O (lipopolisakarida)

Antigen O adalah bagian terluar dari dinding sel lipopolisakarida yang tersusun dari banyak polisakarida. Beberapa polisakarida tersebut memiliki struktur gula yang unik. Antigen O memiliki sifat resisten terhadap panas dan alkohol dan biasanya dapat dideteksi dengan aglutinasi bakteri.

Antibodi yang predominan untuk antigen O adalah IgM. Tiap bakteri dari famili Enterobacteriaceae memiliki bermacam-macam antigen O sehingga memungkinkan terjadinya reaksi silang.

2) Antigen K (kapsul)

Pada sebagian bakteri dari famili Enterobacteriaceae, antigen K terletak di bagian luar antigen O. Antigen K dapat tersusun dari lipopolisakarida maupun protein. Antigen K dapat mengganggu proses aglutinasi oleh antisera O dan sering dikaitkan dengan faktor virulensi dari bakteri. Infeksi saluran pernapasan pada manusia disebabkan oleh antigen K tipe 1 dan 2. Sedangkan infeksi saluran kemih pada manusia disebabkan oleh antigen K tipe 8, 9, 10, dan 24.

3) Antigen H (flagel)

Antigen H terletak pada flagella dan dapat didenaturasi atau dihilangkan dengan alkohol atau panas. Antigen ini dapat diawetkan

dengan pemberian formalin pada bakteri yang motil. Antigen H dapat mengaglutinasi antibodi anti-H yaitu IgG (Brooks *et al.*, 2013)

2.2.3 Ciri-ciri pada Media Perkembangbiakan

Proteus mirabilis termasuk dalam genus *Proteus*, sehingga memiliki karakteristik yaitu dapat melakukan deaminasi pada fenilalanin, motil, dapat tumbuh dalam medium kalium sianida (KCN), dan dapat memfermentasikan xyloso. Bakteri dalam genus *Proteus* dapat bergerak sangat aktif dalam medium karena memiliki *peritrichous* flagella. Pergerakan yang sangat aktif tersebut akan menghasilkan pola *swarming* di medium padat asalkan pergerakan *swarming* tersebut tidak dihambat oleh bahan kimia seperti feniletanol atau CLED (cysteine-lactose-electrolyte-deficient) medium (Brooks *et al.*, 2013).



Gambar 2.2 Pola *swarming* dari *Proteus mirabilis* pada medium *Nutrient Agar Plate* (Tortora *et al.*, 2012)

2.2.4 Kepentingan Klinis *Proteus mirabilis*

Proteus mirabilis akan menimbulkan infeksi pada manusia jika bakteri tersebut keluar dari saluran pencernaan. Bakteri ini dapat menyebabkan infeksi saluran kemih dan menyebabkan bakteremia, pneumonia, dan lesi fokal pada

pasien yang lemah atau pada pasien yang menerima infus intravena yang terkontaminasi. Bakteri dari genus *Proteus* menghasilkan urease yang mengalami hidrolisis dengan cepat dan menghasilkan amonia. Oleh karena itu pada pasien infeksi saluran kemih yang disebabkan oleh *Proteus mirabilis*, urin pasien menjadi bersifat alkali sehingga mudah untuk terbentuk batu pada saluran kemih. *Proteus mirabilis* memiliki motilitas yang tinggi sehingga bakteri dapat dengan mudah menimbulkan infeksi saluran kemih (Brooks *et al.*, 2013). *Proteus mirabilis* sensitif terhadap beberapa antibiotik seperti ampicillin, *broad-spectrum* penicillin, cephalosporin (generasi satu, generasi dua, dan generasi tiga), imipenem, dan aztreonam (Tsai *et al.*, 2014).

2.3 Mekanisme Antimikroba

2.3.1 Merubah Permeabilitas Membran Sel

Membran plasma bakteri yang terletak tepat di bagian dalam dinding sel bakteri merupakan target dari beberapa agen antimikroba. Membran plasma bakteri berfungsi untuk mengatur masuknya nutrisi yang dibutuhkan bakteri dari luar sel serta mengatur pembuangan bahan sisa metabolisme bakteri. Agen antimikroba tertentu merusak struktur lipid atau protein pada membran plasma bakteri sehingga isi dari sel bakteri bocor keluar sehingga pertumbuhan bakteri terganggu.

2.3.2 Merusak Protein dan Asam Nukleat

Sel bakteri mengandung berbagai macam enzim yang tersusun dari protein. Senyawa protein tersebut berikatan satu dengan yang lain melalui ikatan hidrogen dan ikatan kovalen. Ikatan hidrogen dapat dirusak oleh panas dan bahan kimia tertentu. Jika ikatan hidrogen rusak maka protein akan mengalami denaturasi.

Ikatan kovalen lebih kuat daripada ikatan hidrogen tapi tetap mudah dirusak oleh panas dan bahan kimia tertentu.

Asam nukleat DNA dan RNA merupakan pembawa informasi genetik yang penting bagi bakteri. Kerusakan asam nukleat yang disebabkan oleh panas, radiasi, atau bahan kimia akan menimbulkan kematian sel bakteri karena sel tersebut tidak bisa melakukan replikasi ataupun menjalankan fungsi metabolisme yang normal (Tortora *et al.*, 2012).

2.3.3 Menghambat Metabolisme Bakteri

Beberapa antimikroba bekerja dengan cara antagonis terhadap enzim yang diperlukan dalam metabolisme bakteri. Bahan kimia antagonis akan berikatan dengan sisi aktif enzim sehingga substrat tidak dapat berikatan dengan enzim tersebut dan tidak terjadi metabolisme. Selain antagonis enzim, beberapa antimikroba dapat bersifat analog terhadap bahan-bahan yang dibutuhkan sel dalam sintesis protein maupun asam nukleat. Dalam beberapa kasus, analog tersebut akan mencegah terbentuknya metabolit yang normal dan pada kasus lain analog tersebut akan menggantikan metabolit yang normal sehingga metabolit tersebut menjadi non fungsional (Brooks *et al.*, 2013).

2.4 Uji Kepekaan Terhadap Antimikroba secara *In Vitro*

Pengujian kepekaan bakteri patogen terhadap suatu agen antimikroba dapat dilakukan dengan 2 cara yaitu :

2.4.1 Metode Difusi

Terdapat 2 jenis metode difusi yaitu difusi cakram dan difusi sumuran.

Metode yang paling banyak digunakan adalah metode difusi cakram. Metode difusi cakram dilakukan dengan cara menginokulasi organisme yang akan diuji secara

merata pada medium agar yang berada di cawan petri. Kemudian cakram kertas saring berbentuk lingkaran yang mengandung agen antimikroba dengan konsentrasi tertentu diletakkan pada permukaan medium agar lalu diinkubasi. Selama inkubasi, agen antimikroba yang ada di kertas saring akan berdifusi dari kertas saring ke medium agar. Semakin jauh jaraknya dari kertas saring, konsentrasi antimikroba semakin kecil. Jika agen antimikroba efektif, maka setelah inkubasi akan timbul zona inhibisi di sekitar kertas saring. Zona inhibisi itu kemudian diukur diameternya lalu dibandingkan dengan tabel standar dari CLSI untuk menentukan apakah organisme tersebut sensitif atau resisten terhadap agen antimikroba tersebut. Metode difusi cakram memiliki kelemahan yaitu tidak bisa menentukan apakah agen antimikroba bersifat bakteriostatik atau bakterisidal. (Tortora *et al.*, 2012). Prosedur metode difusi sumuran tidak terlalu berbeda dengan difusi cakram. Perbedaannya, pada difusi sumuran cakram diganti lubang sumuran yang diisi dengan bahan antimikroba yang akan diuji. Bahan antimikroba akan berdifusi dan menghambat pertumbuhan bakteri sehingga timbul zona inhibisi di sekitar lubang sumuran. Metode ini sering digunakan untuk skrining efek antimikroba dari suatu ekstrak tumbuhan (Valgas *et al.*, 2007).

2.4.2 Metode Dilusi

Metode dilusi sering digunakan untuk menentukan Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM). Metode dilusi dibagi menjadi 2 tahap yaitu dilusi tabung untuk menentukan KHM dan dilusi agar untuk menentukan KBM. Metode dilusi dilakukan dengan cara mengisi berbagai macam tabung reaksi dengan berbagai macam konsentrasi agen antimikroba kemudian bakteri yang akan diuji dimasukkan ke dalam tabung-tabung tersebut.

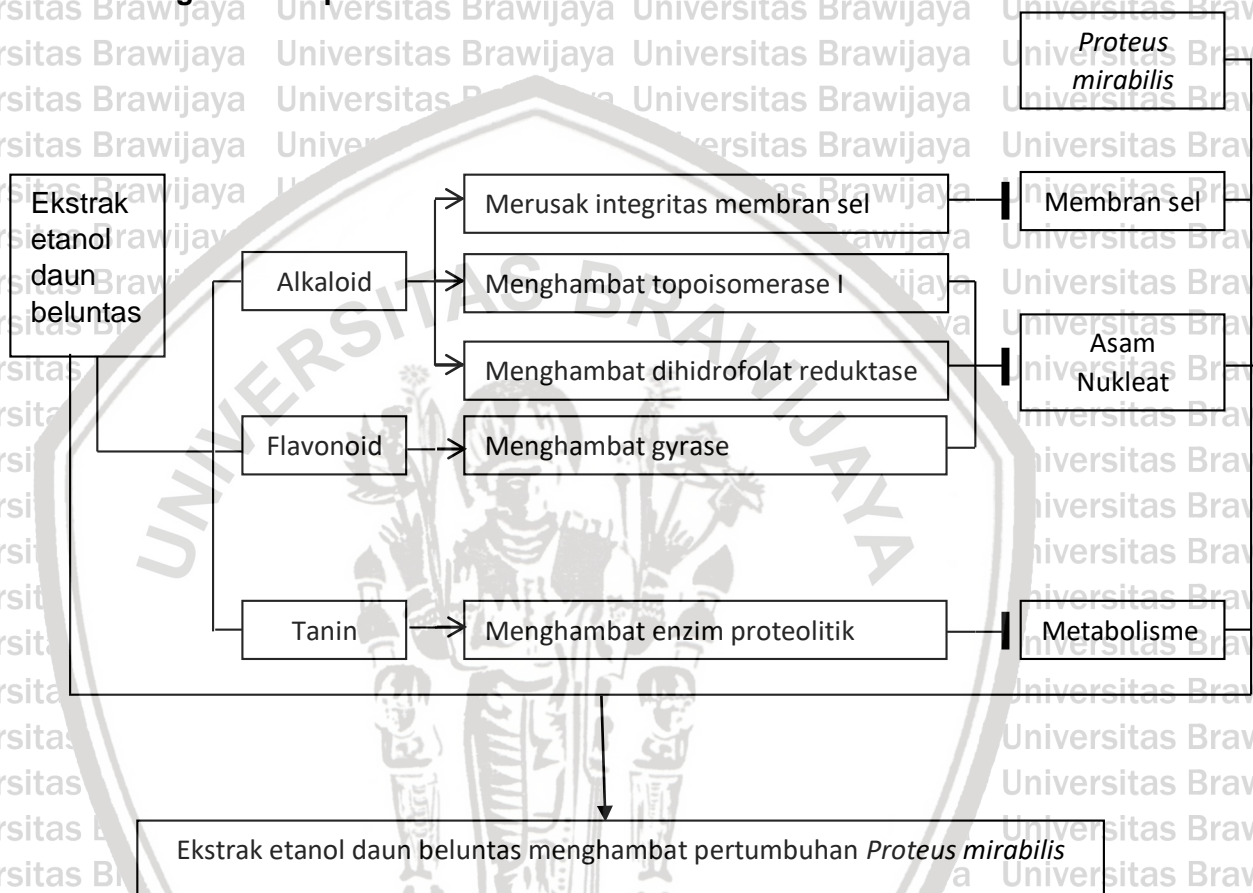
Kemudian tabung diamati untuk menentukan KHM dengan cara melihat tabung dengan konsentrasi terkecil dan paling jenih. Kemudian bakteri dari tabung tersebut dan tabung dengan konsentrasi yang lebih tinggi ditanamkan pada medium agar untuk menentukan KBM (Tortora *et al.*, 2012).



BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

→ : mekanisme kerja zat aktif

—| : target dari mekanisme antibakteri zat aktif

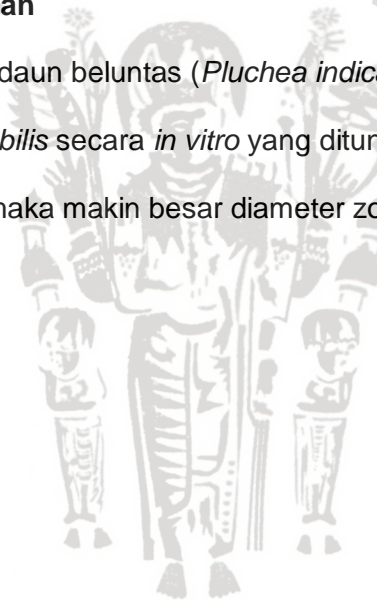
Penjelasan kerangka konsep :

Ekstrak etanol daun beluntas memiliki kandungan bahan aktif antimikroba yaitu alkaloid, flavonoid, dan tanin (Widyawati et al., 2010). Alkaloid memiliki kemampuan untuk merusak integritas membran sel, menghambat enzim topoisomerase I, dan menghambat enzim dihidrofolat reduktase sehingga terjadi

kerusakan pada asam nukleat *Proteus mirabilis* (Cushnie *et al.*, 2014). Senyawa flavonoid yang paling banyak terkandung dalam ekstrak etanol daun beluntas (*Pluchea indica*), quercetin, juga dapat merusak asam nukleat tapi dengan mekanisme yang berbeda yaitu dengan cara menghambat enzim gyrase (Plaper *et al.*, 2003). Tanin menghambat proliferasi bakteri dengan cara menghambat enzim proteolitik bakteri sehingga metabolisme protein bakteri terganggu (Enwa *et al.*, 2014). Sehingga dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak etanol daun beluntas (*Pluchea indica*) dapat menghambat pertumbuhan *Proteus mirabilis*.

3.2 Hipotesis Penelitian

Ekstrak etanol daun beluntas (*Pluchea indica*) memiliki efek antimikroba terhadap *Proteus mirabilis* secara *in vitro* yang ditunjukkan dengan makin tinggi dosis yang diberikan maka makin besar diameter zona inhibisi yang terbentuk.



BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan menggunakan metode difusi sumuran untuk mengamati efek ekstrak etanol daun beluntas (*Pluchea indica*) sebagai antimikroba terhadap *Proteus mirabilis* secara *in vitro*. Efek antimikroba diamati dengan cara mengukur diameter zona inhibisi yang terbentuk di sekitar lubang sumuran. Uji identifikasi mikroba dilakukan dengan menggunakan alat VITEK di Laboratorium Mikrobiologi Rumah Sakit Umum Dr, Saiful Anwar Malang.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang dan dilakukan pada Bulan April sampai Bulan Juli 2018.

4.3 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun beluntas (*Pluchea indica*) dan *Proteus mirabilis* yang didapat dari Laboratorium Mikrobiologi Rumah Sakit Umum Dr. Saiful Anwar Malang.

Penelitian ini menggunakan 5 macam dosis konsentrasi yang berbeda yaitu 10%, 20%, 30%, 40%, dan 50%, kontrol negatif berupa aquades, dan kontrol positif berupa Ceftriaxone. Sehingga jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian ini dapat dihitung dengan rumus (Särndal *et al.*, 2003).

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

$$7(n - 7) \geq 15$$

$$7n - 7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 3,14 \approx 4$$

Keterangan :

n = jumlah pengulangan untuk tiap perlakuan

p = jumlah perlakuan (dosis ekstrak daun beluntas)

Berdasarkan perhitungan di atas, maka jumlah sampel atau banyaknya pengulangan yang perlu dilakukan untuk tiap perlakuan paling sedikit adalah 4.

4.4 Variabel Penelitian

Tabel 4.1 Variabel Penelitian

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Bebas	Konsentrasi ekstrak etanol daun beluntas (<i>Pluchea indica</i>)	Dengan menggunakan pipet	Ekstrak etanol daun beluntas (<i>Pluchea indica</i>) dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, dan 50%	Ordinal
Tergantung	Diameter zona inhibisi yang terbentuk pada medium agar	Dengan menggunakan penggaris	Diameter zona inhibisi dalam satuan millimeter (mm)	Rasio

4.5 Definisi Operasional

- a) Daun beluntas (*Pluchea indica*) yang digunakan dalam penelitian ini didapat dari Balai Materia Medika Kota Batu yang ditanam di perkebunan milik Balai Materia Medika Kota Batu.

b) Ekstrak etanol daun beluntas (*Pluchea indica*) adalah daun beluntas yang dikeringkan dan dibuat serbuk kemudian diekstraksi menggunakan etanol 96% dengan metode maserasi. Lalu ekstrak tersebut diencerkan hingga menjadi konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, dan 50%.

c) Isolat bakteri *Proteus mirabilis* yang digunakan dalam penelitian ini adalah satu isolat bakteri yang merupakan *stock culture* di Laboratorium Mikrobiologi Rumah Sakit Umum Dr. Saiful Anwar Malang dan isolat didapat dari swab pus.

d) Kontrol negatif adalah kelompok bakteri *Proteus mirabilis* yang diberi aquades.

e) Pembanding pada penelitian ini adalah bakteri *Proteus mirabilis* yang diberi antimikroba Ceftriaxone dengan konsentrasi 30 µg/50 µL.

f) Zona inhibisi adalah zona bening yang terbentuk di sekitar sumuran dan menunjukkan bahwa pertumbuhan bakteri terhambat oleh antimikroba yang diberikan pada sumuran. Semakin lebar diameter zona inhibisi maka semakin sensitif bakteri tersebut terhadap antimikroba. Diameter zona inhibisi diukur dalam satuan millimeter (mm).

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Beluntas

4.6.1.1 Alat

Alat yang digunakan dalam pembuatan ekstrak etanol daun beluntas antara lain : blender untuk menghaluskan daun beluntas, kertas saring untuk membungkus serbuk daun beluntas, gelas ekstraksi, seperangkat evaporator vakum, alat pemanas air, labu penampung hasil evaporasi, *rotatory evaporator*, tabung pendingin, pompa sirkulasi air

dingin, bak penampung air dingin, pompa vakum, tabung penampung etanol, cawan penguap, dan neraca analitik.

4.6.1.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam pembuatan ekstrak etanol daun beluntas antara lain : daun beluntas, etanol 96%, dan aquades.

4.6.2 Alat dan Bahan Untuk Uji Difusi Sumuran

4.6.2.1 Alat

Alat yang digunakan untuk uji difusi sumuran antara lain : cawan petri, alat pelubang sumuran, pipet mikro, inkubator, Bunsen burner, korek api, dan penggaris.

4.6.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan untuk uji difusi sumuran antara lain : ekstrak etanol daun beluntas (*Pluchea indica*), suspense bakteri *Proteus mirabilis* 10^8 bakteri/ml, Aquades, dan Agar *Mueller Hinton*.

4.7 Rancangan Operasional Penelitian

4.7.1 Pembuatan Sediaan Ekstrak Etanol Daun Beluntas

Pembuatan ekstrak etanol daun beluntas dengan metode maserasi terdiri dari 3 tahap yaitu tahap persiapan sampel daun beluntas kering kemudian dilanjutkan dengan tahap ekstraksi dan evaporasi.

4.7.2 Identifikasi Ulang Bakteri *Proteus mirabilis*

Sebelum digunakan untuk penelitian, isolat bakteri *Proteus mirabilis* diidentifikasi menggunakan alat VITEK di Laboratorium Mikrobiologi Rumah Sakit Dr. Saiful Anwar Malang.

4.7.3 Pembuatan Perbenihan Cair Bakteri Kepadatan 10^8 bakteri/ml

1) Ambil koloni *Proteus mirabilis* dari media *Nutrient Agar Plate* dengan menggunakan ose

2) Masukkan ke dalam tabung reaksi steril yang berisi *nutrient broth* kemudian lakukan spektrofotometri pada tabung reaksi tersebut dengan panjang gelombang 625 nm untuk mengetahui *optical density* (OD) dari suspensi tersebut

3) Untuk mendapat konsentrasi bakteri 10^8 /mL, yang setara dengan *optical density* (OD) 0,1 maka dilakukan penghitungan dengan rumus berikut :

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

Dengan ketentuan :

N_1 : Hasil spektrofotometri

V_1 : Volume bakteri yang akan ditambah dengan pengencer

N_2 : 0,1 (setara dengan 10^8 bakteri/mL)

V_2 : Volume suspensi bakteri (10 mL)

4) Sehingga dari rumus di atas akan diperoleh volume bakteri yang perlu diambil lalu ditambahkan pengencer hingga volumenya 15 mL dan kepadatannya 10^8 /mL

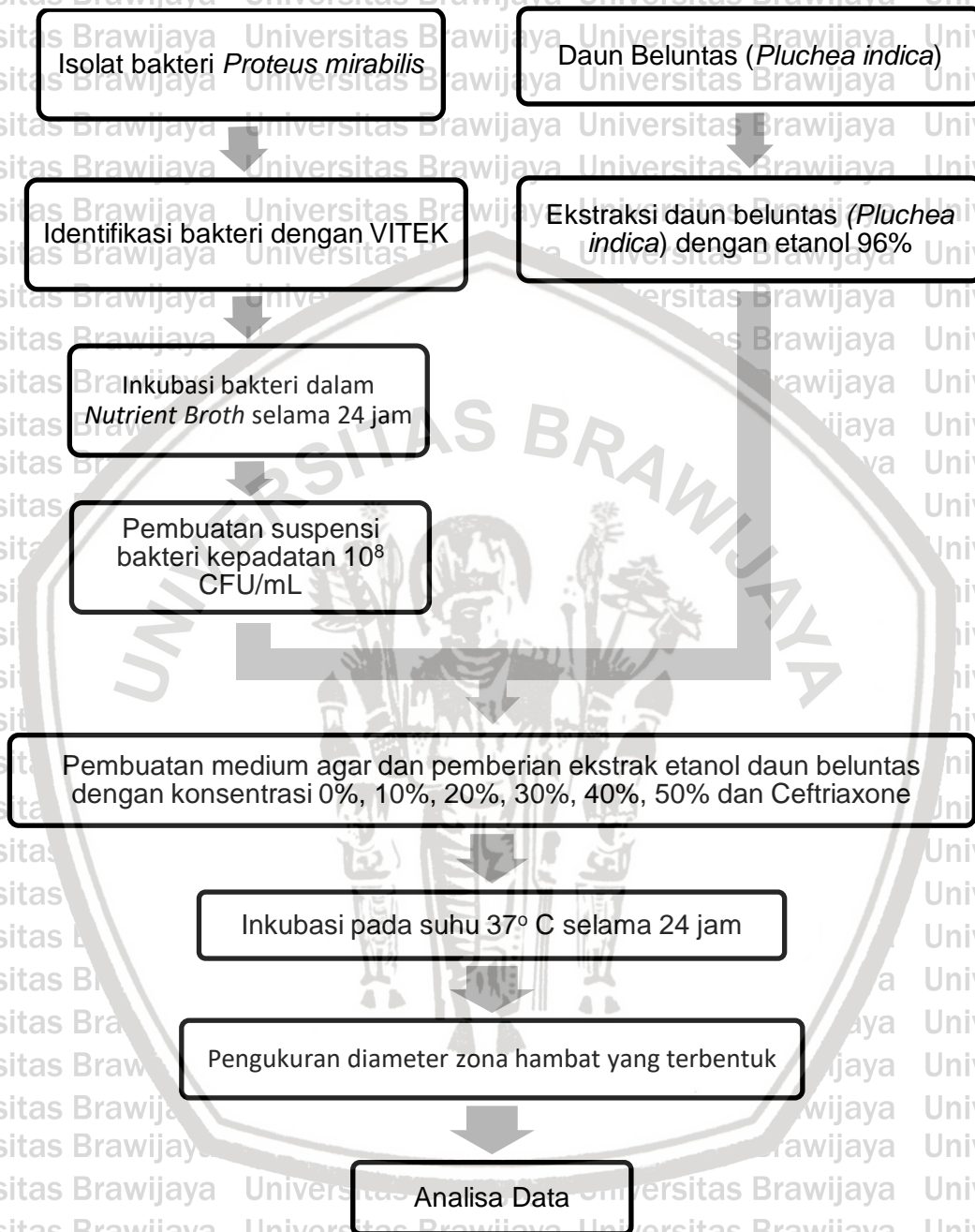
4.7.4 Uji Efek Antimikroba Ekstrak Etanol Daun Beluntas

1) Ekstrak etanol daun beluntas dikocok terlebih dahulu agar homogen dan tidak mengendap lalu ambil larutannya

2) Menyiapkan cawan petri sebanyak 7 buah dengan rincian, 1 untuk kontrol negatif (-), 1 untuk kontrol positif (+), dan 5 cawan petri sisanya diberi tanda sesuai konsentrasi ekstrak etanol daun beluntas yang diberikan pada cawan tersebut.

- 3) Masukkan suspensi bakteri sesuai perhitungan untuk mendapat konsentrasi 10^8 bakteri/mL dan tambahkan agar cair *Mueller Hinton* hingga 15 mL lalu tuangkan ke cawan petri.
- 4) Menggoyangkan cawan petri supaya campuran agar tercampur dengan baik dan tersebar merata. Kemudian diamkan beberapa saat hingga agar mengeras.
- 5) Setelah agar mengeras, membuat lubang sebanyak 4 di setiap cawan petri dengan menggunakan alat pelubang sumuran.
- 6) Mengisi lubang sumuran untuk kontrol negatif dengan 30 μ L aquades, lubang sumuran kontrol positif dengan 30 μ L Ceftriaxone, dan cawan petri sisanya diisi dengan 30 μ L ekstrak etanol daun beluntas dengan konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, dan 50%.
- 7) Cawan petri dimasukkan ke dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 18-24 jam.
- 8) Mengukur diameter zona inhibisi yang terbentuk dengan menggunakan penggaris dalam satuan millimeter (mm). Diameter diukur dari tepi zona inhibisi terluar satu sisi ke satu sisi lainnya.

4.7.5 Skema Prosedur Penelitian



Gambar 4.1 Skema Alur Penelitian Efek Antimikroba Ekstrak Etanol Daun Beluntas terhadap *Proteus mirabilis*

4.8 Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan uji statistik *One Way ANOVA* untuk mengetahui adanya pengaruh perbedaan konsentrasi ekstrak etanol daun beluntas terhadap banyaknya koloni *Proteus mirabilis*. Data banyaknya koloni bakteri diuji terlebih dahulu untuk melihat homogenitas serta normalitasnya untuk menentukan apakah bisa dilakukan uji beda parametrik *One Way ANOVA*. Jika dari hasil uji normalitas menunjukkan distribusi data yang normal ($p > 0,05$) dan uji homogenitas menunjukkan bahwa data homogen ($p > 0,05$) maka dapat dilakukan uji beda parametrik *One Way ANOVA*. Jika hasil uji normalitas dan homogenitas tidak memenuhi syarat, maka tidak dapat dilakukan uji parametrik *One Way Anova* tapi analisis akan dilakukan dengan uji non-parametrik *Kruskal Wallis*.

Uji korelasi dilakukan untuk melihat pengaruh peningkatan konsentrasi ekstrak etanol daun beluntas terhadap pertumbuhan koloni bakteri *Proteus mirabilis*. Data pada penelitian ini adalah data ordinal dan rasio sehingga uji korelasi yang digunakan adalah uji korelasi *Spearman*. Lalu dilakukan uji regresi untuk mengetahui pengaruh dan kontribusi ekstrak etanol daun beluntas dalam pembentukan zona inhibisi.

BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian

5.1.1 Hasil Identifikasi Bakteri

Penelitian ini menggunakan sampel berupa 1 isolat *Proteus mirabilis* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Rumah Sakit Dr. Saiful Anwar Malang.

Uji identifikasi dilakukan dengan menggunakan alat VITEK. Hasil dari identifikasi dengan VITEK menunjukkan bahwa bakteri adalah *Proteus mirabilis* dan bakteri masih sensitif terhadap beberapa antimikroba, termasuk Ceftriaxone.

Identification Information	Analysis Time: 4.00 hours	Status: Final
Selected Organism	100% Probability: <i>Proteus mirabilis</i>	
IID Analysis Messages	BiNumber: 0011000340042211	

Susceptibility Information			Analysis Time: 8.25 hours			Status: Final		
Antimicrobial	MIC	Interpretation	Antimicrobial	MIC	Interpretation			
ESBL			Ertapenem	<= 0.5	S			
Ampicillin	<= 2	S	Meropenem	<= 0.25	S			
Ampicillin/Sulbactam	<= 2	S	Amikacin	4	S			
Piperacillin/Tazobactam	<= 4	S	Gentamicin	<= 1	S			
Cefazolin	<= 4	S	Ciprofloxacin	<= 0.25	S			
Ceftazidime	<= 1	S	Tigecycline	4	*R			
Ceftriaxone	<= 1	S	Nitrofurantoin	128	R			
Cefepime	<= 1	S	Trimethoprim/Sulfamethoxazole	<= 20	S			
Aztreonam	<= 1	S						

† = Deduced drug * = ACS modified ** = User modified

Gambar 5.1 Hasil identifikasi bakteri dengan VITEK

5.1.2 Hasil Uji Sensitivitas Antimikroba

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan berbagai macam konsentrasi ekstrak etanol daun beluntas, yaitu 10%, 20%, 30%, 40%, dan 50%.

Selain itu bakteri diberi aquades sebagai kontrol negatif dan antimikroba

Ceftriaxone sebagai kontrol positif. Uji sensitivitas antimikroba dilakukan dengan

menggunakan metode difusi sumuran. Sensitivitas mikroba dinilai dari diameter zona inhibisi yang terbentuk di sekitar lubang sumuran dan diukur dalam satuan millimeter (mm).



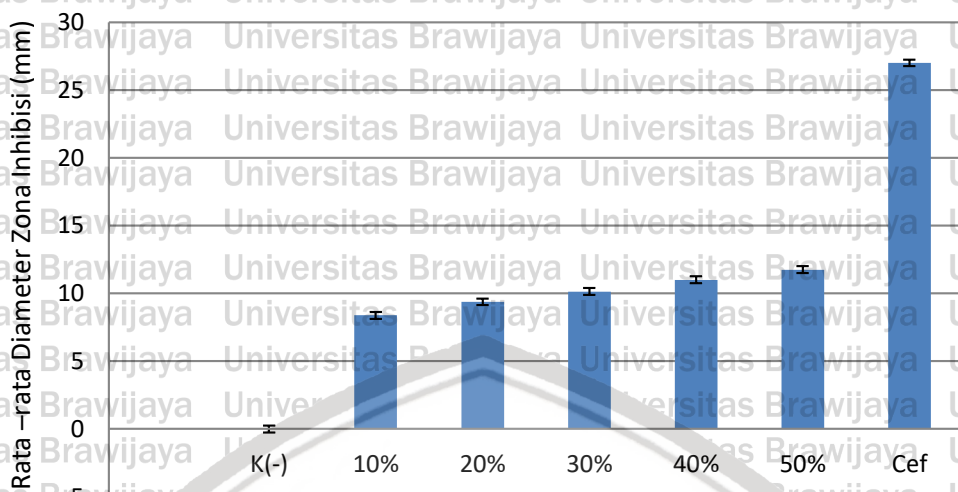
Gambar 5.2 Hasil Pengamatan Uji Difusi Sumuran Ekstrak Etanol Daun Beluntas pada konsentrasi a) 10%, b) 20%, c) 30%, d) 40%, e) 50%, f) kontrol negatif dan g) Ceftriaxone 30 µg/50 µL

Hasil pengamatan pada cawan petri setelah dilakukan inkubasi pada suhu 37° C selama 18-24 jam didapatkan bahwa zona inhibisi dapat terlihat pada konsentrasi ekstrak etanol daun beluntas 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, dan kontrol

positif. Pada kontrol negatif tidak didapatkan adanya zona inhibisi. Diameter zona inhibisi terbesar didapat pada kontrol positif. Dengan perlakuan berupa pemberian ekstrak etanol daun beluntas terjadi peningkatan diameter zona inhibisi seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak etanol daun beluntas. Hal ini menunjukkan bahwa terjadi hambatan pertumbuhan *Proteus mirabilis* pada cawan yang diberi ekstrak etanol daun beluntas dan semakin besar konsentrasi ekstrak maka pertumbuhan bakteri semakin terhambat. Hasil pengukuran diameter zona inhibisi dari uji difusi sumuran dapat dilihat pada tabel 5.1 di bawah ini dan grafik pengaruh ekstrak etanol daun beluntas terhadap diameter zona inhibisi dapat dilihat pada Gambar 5.3 di bawah ini.

Tabel 5.1 Diameter Zona Inhibisi yang Terbentuk di sekitar Sumuran dalam Pemberian Ekstrak Etanol Daun Beluntas terhadap *Proteus mirabilis*

Konsentrasi	Pengulangan				Rata-rata ± SD (mm)
	1	2	3	4	
K(-)	0	0	0	0	0 ± 0
10%	8	8.5	8.5	8.5	8.375 ± 0,25
20%	9	9.5	9.5	9.5	9.375 ± 0,25
30%	10	10.5	10	10	10.125 ± 0,25
40%	11	11	11	11	11 ± 0
50%	12	11.5	12	11.5	11.75 ± 0,29
Ceftriaxone	27	27	27	27	27 ± 0



Gambar 5.3 Rerata Diameter Zona Inhibisi yang Terbentuk di sekitar Sumuran Setelah Perlakuan Berbagai Konsentrasi Ekstrak Daun Beluntas

5.2 Analisis Data

Analisis data yang pertama kali dilakukan adalah uji normalitas dengan menggunakan *Shapiro-Wilk Test* untuk mengetahui bahwa data sampel penelitian terdistribusi secara normal. Hasil uji normalitas menunjukkan nilai signifikansi 0.400 ($p > 0.05$) maka dapat disimpulkan bahwa data terdistribusi secara normal.

Kemudian dilakukan uji homogenitas varian untuk mengetahui bahwa dua kelompok atau lebih kelompok data sampel berasal dari populasi yang memiliki variasi yang sama. Hasil uji homogenitas menggunakan *Levene Test of Homogeneity Variance* menunjukkan nilai signifikansi 0.052 ($p > 0.05$) maka dapat disimpulkan bahwa variasi tiap sampel bersifat homogen.

Hasil uji normalitas dan homogenitas menunjukkan bahwa data sampel terdistribusi secara normal dan sampel bersifat homogen sehingga memenuhi syarat untuk dilakukan uji parametrik yaitu *One-way ANOVA Test* untuk mengetahui adanya perbedaan yang signifikan pemberian ekstrak etanol daun beluntas terhadap diameter zona inhibisi. Hasil *One-way ANOVA Test*

menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0.000 ($p < 0.05$) maka dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh yang signifikan dari perubahan konsentrasi ekstrak etanol daun beluntas terhadap diameter zona inhibisi.

Setelah *One-way ANOVA Test*, dilakukan uji *Post Hoc Tukey Test* untuk mengetahui perbandingan dua sampel di antara kelompok kontrol negatif, kontrol positif, dan kelompok yang diberi ekstrak etanol daun beluntas. Hasil *Post Hoc Tukey Test* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan pada semua sampel karena nilai signifikansi sebesar 0.000 ($p < 0.05$).

Uji korelasi *Spearman* dilakukan untuk mengetahui hubungan antara perubahan konsentrasi ekstrak etanol daun beluntas terhadap diameter zona inhibisi. Hasil uji korelasi *Spearman* menunjukkan nilai signifikansi antara dua variable tersebut sebesar 0.000 ($p < 0.05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat hubungan yang signifikan antara perubahan konsentrasi ekstrak etanol daun beluntas terhadap diameter zona inhibisi. Selain itu uji korelasi *Spearman* juga menunjukkan bahwa koefisien korelasi antara dua variable tersebut sebesar 0.994. Angka ini positif sehingga menunjukkan adanya korelasi positif antara dua variabel tersebut yaitu semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol daun beluntas maka semakin besar diameter zona inhibisi dan sebaliknya. Nilai 0.994 cukup mendekati nilai 1.000 sehingga dapat disimpulkan bahwa hubungan antara dua variabel tersebut cukup kuat.

Uji regresi dilakukan untuk mengetahui pengaruh dan kontribusi dari ekstrak etanol daun beluntas terhadap diameter zona inhibisi. Hasil uji regresi menunjukkan nilai *R square* sebesar 0.700. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun beluntas memiliki kontribusi sebesar 70% terhadap terbentuknya zona inhibisi dan 30% sisanya dapat disebabkan oleh faktor lain yang tidak diteliti seperti

lama penyimpanan ekstrak etanol, suhu penyimpanan ekstrak, serta resistensi bakteri tersebut. Pengaruh kenaikan ekstrak etanol daun beluntas terhadap perubahan diameter zona inhibisi dapat dituliskan dalam rumus $Y = A + BX$. Y adalah diameter zona inhibisi dan X adalah konsentrasi ekstrak etanol daun beluntas. Hasil uji regresi menunjukkan bahwa konstanta A sebesar 3.625 dan koefisien B sebesar 0.193. Sehingga rumus hubungan antara konsentrasi ekstrak etanol daun beluntas dan diameter zona inhibisi dapat ditulis sebagai $Y = 3.625 + (0.193X)$. Berdasarkan rumus tersebut dapat disimpulkan bahwa bahkan dengan konsentrasi ekstrak etanol daun beluntas 100%, efek ekstrak etanol daun beluntas sebagai antimikroba masih belum dapat menyamai efek dari Ceftriaxone.



BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek antimikroba ekstrak etanol daun beluntas terhadap bakteri *Proteus mirabilis* secara *in vitro*. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah difusi sumuran. Metode ini digunakan untuk mengamati efek antimikroba ekstrak etanol daun beluntas dengan cara mengukur diameter zona inhibisi yang terbentuk di sekitar lubang sumuran. Zona inhibisi adalah zona berwarna jernih yang terbentuk di sekitar lubang sumuran yang menandakan bahwa pertumbuhan *Proteus mirabilis* terhambat. Metode difusi sumuran tidak bisa digunakan untuk menentukan apakah suatu bahan antimikroba bersifat bakteristatik atau bakterisidal. Akan tetapi, metode ini sering digunakan untuk skrining efek antimikroba dari suatu ekstrak tanaman (Valgas *et al.*, 2007). Metode difusi sumuran sering digunakan untuk skrining potensi antimikroba suatu bahan karena dapat digunakan untuk menilai banyak sampel sekaligus, mudah dilakukan, dan murah. Untuk mendapat hasil yang akurat, uji aktivitas antimikroba dari suatu bahan sebaiknya didahului dengan metode difusi sumuran sebagai skrining potensi antimikroba kemudian dilanjutkan dengan metode difusi tabung untuk mendapatkan Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM) (Sandra *et al.*, 2016).

Rata-rata diameter zona inhibisi yang terbentuk pada kondisi pemberian perlakuan ekstrak etanol daun beluntas konsentrasi 10% sebesar 8,375 mm, konsentrasi 20% sebesar 9,375 mm, konsentrasi 30% sebesar 10,125 mm, konsentrasi 40% sebesar 11 mm, konsentrasi 50% sebesar 11,75 mm, kontrol negatif dengan pemberian aquades sebesar 0 mm, dan kontrol positif dengan

pemberian Ceftriaxone sebesar 27 mm. Dari data tersebut, dapat disimpulkan bahwa diameter zona inhibisi semakin meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak etanol daun beluntas, semakin besar konsentrasi ekstrak etanol daun beluntas maka semakin besar diameter zona inhibisi yang terbentuk di sekitar lubang sumuran. Berdasarkan hasil uji statistik, dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun beluntas memiliki efek antimikroba yang signifikan terhadap *Proteus mirabilis*. Akan tetapi, efek antimikroba dari ekstrak etanol daun Beluntas masih belum dapat menyamai efek dari Ceftriaxone sebagai antibiotik pembanding karena berdasarkan rumus yang didapat dari uji regresi, walaupun konsentrasi ekstrak etanol daun Beluntas 100%, diameter zona inhibisi yang terbentuk masih lebih kecil daripada diameter zona inhibisi yang terbentuk pada pemberian Ceftriaxone.

Efek hambatan pertumbuhan *Proteus mirabilis* disebabkan oleh senyawa-senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak etanol daun beluntas. Senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak etanol daun beluntas adalah senyawa alkaloid, flavonoid, dan tannin (Widyawati *et al.*, 2010). Alkaloid dapat menghambat pertumbuhan *Proteus mirabilis* dengan cara merusak integritas membran sel serta merusak asam nukleat bakteri melalui hambatan pada enzim topoisomerase I dan enzim dihidrofolat reduktase (Cushnie *et al.*, 2014). Senyawa flavonoid yang paling banyak terdapat dalam ekstrak etanol daun beluntas, Quercetin, menghambat pertumbuhan *Proteus mirabilis* dengan cara menghambat enzim gyrase sehingga terjadi kerusakan pada asam nukleat *Proteus mirabilis* (Plaper *et al.*, 2003). Tanin menghambat pertumbuhan *Proteus mirabilis* dengan cara menghambat enzim proteolitik sehingga metabolisme protein *Proteus mirabilis* terganggu (Enwa *et al.*, 2014).

Keterbatasan penelitian ini adalah lama penyimpanan ekstrak dapat menimbulkan perubahan efek antimikroba dari ekstrak karena perubahan kandungan bahan aktif ekstrak tersebut. Kandungan polifenol yaitu Tanin pada ekstrak etanol daun Beluntas akan berkurang hingga 30% setelah penyimpanan selama 20 hari pada suhu 4° C. Sedangkan kandungan flavonoid yaitu Quercetin akan berkurang hingga 68% setelah penyimpanan selama 20 hari (Baltacioglu et al., 2011). Penelitian ini hanya mengamati efek ekstrak antimikroba ekstrak etanol daun beluntas terhadap *Proteus mirabilis* sehingga dari penelitian ini tidak dapat ditentukan kandungan senyawa aktif apa yang memiliki efek antimikroba paling besar. Pada lubang sumuran terdapat sedikit endapan ekstrak. Endapan ekstrak tersebut tidak dapat berdifusi ke medium agar sehingga memungkinkan hasil zona inhibisi yang terbentuk tidak sesuai dengan yang sebenarnya. Selain itu, karena ketersediaan sampel yang terbatas, maka penelitian ini hanya menggunakan 1 isolat bakteri *Proteus mirabilis* yang digunakan sebanyak 4 kali untuk pengulangan. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode difusi sumuran yang digunakan untuk skrining efek antimikroba suatu ekstrak tumbuhan sehingga dari metode ini tidak didapatkan Kadar Hambat Minimal (KHM) maupun Kadar Bunuh Minimal (KBM) dari ekstrak etanol daun beluntas. Metode dilusi tabung perlu dilakukan untuk menentukan Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM) ekstrak etanol daun beluntas terhadap *Proteus mirabilis*. Selain itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut secara *in vitro* maupun *in vivo* untuk mengetahui dosis efektif, toksisitas, serta efek samping yang dapat ditimbulkan pada penggunaan ekstrak etanol daun beluntas sebagai antimikroba terhadap *Proteus mirabilis*. Penelitian lanjutan tersebut diharapkan dapat membantu perkembangan penggunaan ekstrak etanol daun beluntas sebagai

antimikroba terhadap *Proteus mirabilis* sebelum diterapkan sebagai terapi alternatif infeksi *Proteus mirabilis* pada manusia.



BAB 7 PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa:

1. Ekstrak etanol daun beluntas (*Pluchea indica* L.) memiliki efek antimikroba terhadap bakteri *Proteus mirabilis* secara *in vitro* yang ditunjukkan dengan semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol daun beluntas (*Pluchea indica* L.) yang diberikan, maka semakin besar diameter zona inhibisi yang terbentuk di sekitar lubang sumuran.
2. Sebagai hasil tambahan, efek antimikroba ekstrak etanol daun Beluntas (*Pluchea indica* L.) masih belum dapat menyamai efek dari Ceftriaxone 30 µg/50 µL sebagai pembanding.

7.2 Saran

Adapun saran yang dapat diberikan pada penelitian ini adalah :

- a) Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang efek antimikroba ekstrak etanol daun beluntas (*Pluchea indica* L.) menggunakan metode uji sensitivitas antimikroba yang lain seperti dilusi tabung untuk mengetahui Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM).
- b) Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut secara *in vitro* maupun *in vivo* untuk mengetahui dosis efektif, toksisitas, serta efek samping penggunaan ekstrak etanol daun beluntas (*Pluchea indica* L.) sebagai antimikroba sebelum digunakan sebagai alternatif terapi pengobatan infeksi *Proteus mirabilis* pada pasien.

c) Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai kandungan senyawa aktif dalam daun Beluntas yang dapat berperan sebagai antimikroba.

d) Perlu dilakukan penelitian dengan jumlah isolat yang lebih banyak untuk memenuhi persyaratan jumlah sampel.



DAFTAR PUSTAKA

- Andarwulan N., Batari R., Sandrasari D.A., Bolling B., Wijaya H. Flavonoid Content and Antioxidant Activity of Vegetables From Indonesia. *Journal of Food Chemistry*, 2010, 121 (4): 1231-1235.
- Ardiansyah. 2002. *Kajian Aktivitas Antimikroba Ekstrak Daun Beluntas (Pluchea indica L.)*. Tesis. Tidak diterbitkan. Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor.
- Baltacioglu C., Velioglu S., Karacabey E., Changes in Total Phenolic and Flavonoid Contents of Rowanberry Fruit During Postharvest Storage. *Journal of Food Quality*. 2011. 34 (4): 278-283.
- Biswas R., Dutta P.K., Achari B., Bandyopadhyay D., Mishra M., Pramanik K.C. *et al.* Isolation of Pure Compound R/J/3 from *Pluchea indica* (L.) Less and Its Anti-amoebic Activities Against *Entamoeba histolytica*. *Phytomedicine*, 2007, 14 (7): 534-537.
- Brooks G.F., Carrol K.C., Butel J.S., Morse S.A., Mietzner T.A., 2013, *Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology*, 26th Edition, McGraw-Hill Medical Inc., USA
- Cushnie T.P.T., Cushnie B., Lamb A.J., Alkaloids: An Overview of Their Antibacterial, Antibiotic-enhancing and Antivirulence Activities. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2014, 44 (5): 377-386.
- Dalimartha S., 2009, *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia*, Edisi 6, Puspa Swara, Jakarta. hal. 18-21.
- Enwa F.O., Omojate G.C., Jewo Augustina O., Eze Christopher O., Mechanism of Antimicrobial Actions of Phytochemical Against Enteric Pathogens – A Review, *Journal of Pharmaceutical, Chemical, and Biological Sciences*, 2014, 2 (2): 77-85.
- Foris LA, Snowden J. *Proteus Mirabilis* Infections. [Updated 2018 Oct 27]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK442017/>
- Foxmoon S.M., Shirliff M.E., 2015. *Molecular Medical Microbiology Volume 1*. Second Edition. Elsevier. Boston. p. 1389-1400.
- Garcia I.J., Torne E.E., Arriortua A.B., Vicente J.C.C, Soler P.G., Torre J.A.C. *et al.* Trends in Nosocomial Infections and Multidrug-Resistant

Microorganisms in Spanish Pediatric Intensive Care Units. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 2015, 34 (5): 286-292.

Gomes A., Saha A., Chatterjee I., Chakravarty A.K., Viper and Cobra Venom Neutralization by Betasterol and Stigmasterol Isolated From The Root Extract of *Pluchea indica* Less. (Asteraceae). *Phytomedicine*, 2007, 14 (9): 637-643.

Kaiser G.E. 2017. Microbiology Laboratory Manual. (Online). (<http://faculty.ccbcmd.edu/courses/bio141/labmanua/lab12/Pmirabilis.html>), diakses 13 Desember 2017)

Mohamad S., Zin N. M., Wahab H.A., Ibrahim P., Sulaiman S.F., Zahariluddin A.S. M. et al. Antituberculosis Potential of Some Ethnobotanically Selected Malaysian Plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 2011, 133 (3): 1021-1026.

Murphy D.J., Thomas B., Murray B.G., 2017, *Encyclopedia of Applied Plant Sciences Volume 2*, Second Edition, Elsevier, Oxford, p. 118-124.

Noorhamdani, Santoso S., Sumarno, Dzen SM, Roekistiningsih, Winarsih S. 2015. *Bakteriologi Medik*. Edisi Kedua. Malang: Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

Normala H. and Suhaimi M. I., Quantification of Total Phenolics in Different Parts of *Pluchea indica* (Less) Ethanolic and Water Extracts. *Pertanika J.Sci. & Technol.* 2011, 19 (1): 19-24.

O'Hara C.M., Brenner F.W., Miller J.M., Classification, Identification, and Clinical Significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. *Clinical Microbiology Reviews*, 2000, 13 (4): 534-546.

Plaper A., Golob M., Hafner I., Oblak M., Solmajer T., Jerala R.. Characterization of Quercetin Binding Site on DNA Gyrase. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 2003, 306 (2): 530-536.

Sandra M.O., Ana P.M., Daniel D.L.F., Ana D.P., Miguel A.F.M., Sancho M.T, Comparison of Method to Determine Antibacterial Activity of Honeys Against *Staphylococcus aureus*. *NJAS – Wageningen Journal of Life Sciences*. 2015.78: 29-33.

Sarndal C.E., Swensson B., Wretman J.. 2003. *Model Assisted Survey Sampling*. 1st Edition. Springer-Verlag New York Inc. New York.

Savoia D., Plant-derived Antimicrobial Compounds: Alternative to Antibiotics. *Future Microbiol.*, 2012, 7 (8): 979-990.

Sen T., Dhara A.K., Bhattacharjee S., Pal S., Chaudhuri A. K. Nag, Antioxidant Activity of The Methanol Fraction of *Pluchea indica* Root Extract. *Phytotherapy Research*, 2002, 16: 331-335.

Sieniawska E. and Baj T., 2017, *Pharmacognosy: Fundamentals, Applications, and Strategies*, Elsevier, USA, p. 199-232.

Sittiwet C., *In Vitro* Antimicrobial Activity of *Pluchea indica* Aqueous Extract: The Potential for Urinary Tract Infection Treatment. *Journal of Pharmacology and Toxicology*, 2009, 4 (2): 87-90.

Srisook K., Buapool D., Boonbai R., Simmasut P., Charoensuk Y., Srisook E., Antioxidant and Antiinflammatory Activities of Hot Water Extract From *Pluchea indica* Less. Herbal Tea. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2012, 6 (23): 4077-4081.

Sudarman A., Sumiati, Solikhah S. H., Performance and Meat Cholesterol Content of Broiler Chickens Fed *Pluchea indica* L. Leaf Meal Reared under Stress Condition. *Journal of Animal Science and Technology*, 2011, 34 (1): 64-68.

Tortora G.J., Funke B.R., Case C.L., 2012, *Microbiology: An Introduction*, 11th Edition, Pearson Education Inc., USA.

Tsai H.Y., Chen Y.H., Tang H.J., Huang C.H., Liao C.H., Chu F.Y., Chuang Y.C. *et al.*, Carbapenems and Piperacillin/Tazobactam for the Treatment of bacteremia caused by extended-spectrum β -lactamase-producing *Proteus mirabilis*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2014. 80: 222-226.

Valgas C., Souza S.M., Smania E.F.A. Jr., Smania A.. Screening Methods to Determine Antibacterial Activity of Natural Products. *Brazillian Journal of Microbiology*. 2007. 38: 369-380.

Vu T.T., Kim H., Tran V.K., Dang Q.L., Nguyen H.T., Kim H. *et al.* *In Vitro* Antibacterial Activity of Selected Medicinal Plants Traditionally Used in Vietnam Against Human Pathogenic Bacteria. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2016, 16: 32.

WHO. 2002. *Prevention of Hospital Acquired Infection: A Practical Guide*. 2nd Edition, Malta. 2002. hal. 4-7.

Widyawati P.S., Budianta T.D.W., Kusuma F.A., Wijaya E.L., Different of Solvent Polarity To Phytochemical Content and Antioxidant Activity of *Pluchea indica* Less Leaves Extracts. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 2014, 6 (4): 850-855.