

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Telaah Pustaka

1. Tumbuhan Kelubut

a. Klasifikasi



Gambar 2. 1 Tumbuhan Kelubut (*Passiflora foetida* L.)
(gambar; sumber primer)

Kerajaan	: <i>Plantae</i>
Divisi	: <i>Spermatophyta</i>
Subdivision	: <i>Angiospermae</i>
Kelas	: <i>Dicotyledoneae</i>
Ordo	: <i>Violales</i>
Family	: <i>Passifloraceae</i>
Genus	: <i>Passiflora</i>
Spesies	: <i>Passiflora foetida</i> L.

b. Morfologi Tumbuhan

Karakteristik daun kelubut (*Passiflora foetida* L) adalah tanpa stipula dan termasuk jenis daun majemuk tidak lengkap, karena memiliki tangkai dan helaian. Bentuknya segitiga dan memiliki tepi yang berombak, dengan pangkal daun berlekuk, dan ujungnya meruncing. Permukaannya berbulu halus dan

rapat, dengan ukuran panjang berkisar antara 4,5 hingga 14,5 cm dan lebar 3,5 hingga 13 cm. Tangkai daunnya juga berbulu halus dan rapat, dengan panjang sekitar 2 hingga 10 cm. Daun ini berwarna hijau tua di bagian atas dan hijau muda di bagian bawahnya. Pola urat daunnya menjari, struktur urat daunnya mengingatkan pada susunan jari-jari. Jika diraba, terasa seperti tekstur beludru atau kain lembut (Tjitrosoepomo, 2007).

c. Sinonim Tumbuhan

Tumbuhan kelubut ini memiliki nama yang berbeda untuk setiap daerahnya, antara lain, tanaman rombusa, gegambo, lemanas, remulak (Sumatera), kacperek, kileuleueur, permot, pacean, tajutan, ceplukan blungsung (Jawa), bunga putih, moteti, buah pitri (Nusa Tenggara), cemot (Palangkaraya), Kelubut, Keleng (Kalimantan Timur) (Noor cahyati, 2012). Tumbuhan ini memiliki buah yang dikenal dengan berbagai nama setiap daerah diantaranya ceplukan blungsun, senthiet (Jawa), permot, rajutam, kacprek atau ki leuleu eur (Sunda), kambuik kambuik (Minangkabau), dan timun dengan atau timun padang (Melayu).

d. Deskripsi Tumbuhan

Tumbuhan kelubut atau disebut *Passiflora foetida* L adalah sejenis buah markisa yang mungil, anatomi dan morfologinya sedikit berbeda dengan spesies lainnya. Spesies ini memiliki akar tunggang (*radix primaria*), dengan tipe percabangan simpodial. Memiliki batang basah (*herbaceus*) dengan sedikit berkayu pada bagian bawahnya. Berbentuk bulat (*teres*) dan memiliki permukaan yang licin (*laevis*) dengan rambut halus (*pilosus*) di sekelilingnya. Arah tumbuh batang memanjat (*scandes*) dengan cabang pembelit (*sulur dahan*). Warna batang hijau dengan panjang 1,5-5 m serta tidak memiliki ruas (Tjitrosoepomo, 2007).

Salah satu tanaman yang berpotensi sebagai tanaman obat adalah tanaman kelubut (*Passiflora foetida* L.). Tanaman Kelubut atau Rambusa (*Passiflora foetida* L.) adalah salah satu jenis tanaman yang banyak ditemukan merambat pada tanaman lain. Tanaman ini biasanya ditemukan di daerah berair seperti rawa dan sungai. Rambusa memiliki aktivitas antiinflamasi, antitumor, antikanker, anti hepatotoksisitas dan antimikroba (Wardhani dan Antoni, 2022).

e. Kandungan kimia dan manfaat

Daun kelubut, yang secara botani dikenal sebagai *Passiflora foetida* L, menampilkan potensi dalam pengobatan alternatif terhadap kondisi seperti rematik, peradangan, gangguan perut, serta diare. Tanaman ini, yang dapat tumbuh secara liar, diyakini memiliki manfaat dalam mengatasi diabetes ketika semua bagian dari tumbuhan ini dibersihkan, direbus, dan airnya diminum. Di samping itu, tanaman kelubut (*Passiflora foetida* L) juga dimanfaatkan sebagai pengobatan untuk menyembuhkan berbagai masalah seperti masalah tulang, anemia, kanker, tekanan darah, keluhan pada gusi dan gigi, gangguan ginjal, serta untuk mengurangi stres, terutama dengan memanfaatkan buahnya. Buah kelubut memiliki kandungan kalsium, zat besi, antioksidan, mineral, dan vitamin C.

Dalam studi yang dijelaskan oleh Dhawan et al. (2004) yang dirujuk oleh Lim (2012), ditemukan bahwa tanaman kelubut (*Passiflora Foetida* L) mengandung berbagai senyawa fitokimia utama seperti alkaloid, fenol, glikosida, flavonoid, dan senyawa sianogenik yang memiliki potensi sebagai antioksidan. Perbedaan lokasi pertumbuhan tanaman kelubut dapat berpengaruh terhadap komposisi serta konsentrasi senyawa fitokimia yang hadir. Menurut studi Widyawati et al. (2014), senyawa fitokimia tersebut dikenal memiliki sifat antioksidan. Keberagaman komposisi senyawa fitokimia yang memiliki sifat

antioksidan dalam daun kelubut menunjukkan potensi daun kelubut sebagai sumber antioksidan.

f. Manfaat Tumbuhan

Daun kelubut (*Passiflora foetida* L.) diketahui memiliki banyak manfaat terutama sebagai senyawa golongan flavonoid memiliki sifat antioksidan. Potensi sifat antioksidan pada senyawa flavonoid ini terletak pada gugus hidroksil yang melekat pada struktur karbon cincin aromatiknya, memungkinkan senyawa tersebut untuk melawan dampak dari radikal bebas.

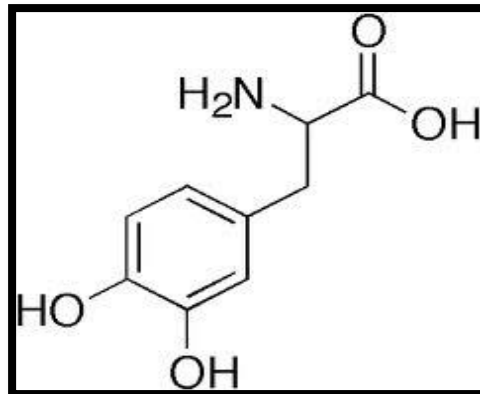
Tanaman kelubut (*Passiflora foetida* L) juga memiliki manfaat dalam pengobatan berbagai masalah kesehatan seperti gangguan tulang, anemia, kanker, tekanan darah, masalah pada gusi dan gigi, gangguan ginjal, serta kondisi stres, terutama dengan memanfaatkan buahnya. Hal ini disebabkan oleh kandungan nutrisi dalam buah kelubut yang mencakup kalsium, zat besi, antioksidan, mineral, dan vitamin C (Raden, dkk, 2022).

Pada umumnya tanaman kelubut (*Passiflora foetida* L.) digunakan untuk pengobatan tradisional sebagai obat penyakit kulit, diare, sakit tenggorokan, infeksi pada telinga, saluran pencernaan, infeksi saluran kemih, analgesic, antiinflamasi, serta antibakteri dan antimikroba (Arief, dkk. 2017)

g. Senyawa Kimia

Diketahui pada penelitian Raden Roro (2022) dengan melakukan skrining fitokimia bahwa pada tanaman kelubut (*Passiflora foetida* L.) terdiri dari senyawa metabolit sekunder seperti alkaloid, flavonoid, tannin, steroid, triterpenoid, dan saponin.

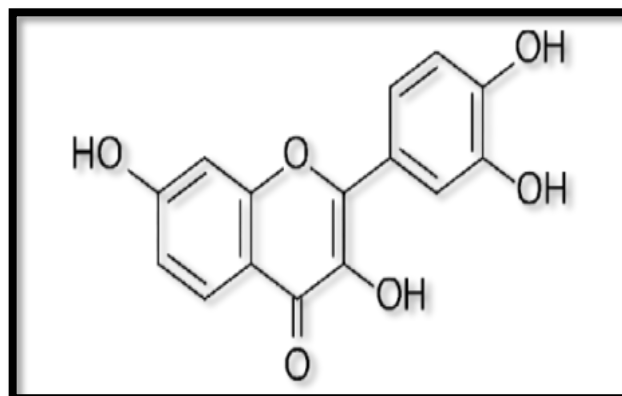
1) Alkaloid.



Gambar 2. 1. Struktur Alkaloid (Reinhard, dkk. 2018).

Alkaloid adalah jenis senyawa organik yang paling sering dijumpai, dengan mayoritasnya berasal dari sumber tumbuhan. Secara umum, alkaloid ditandai dengan keberadaan satu atau lebih atom nitrogen yang memberikan sifat basa, sehingga disebut sebagai zat alkaloid. Fungsi utama alkaloid dalam tanaman meliputi perlindungan terhadap penyakit, pengendalian serangan hama, pengaturan perkembangan, serta sebagai basa mineral yang mengatur keseimbangan ion berbagai bagian tanaman. Senyawa alkaloid ditemukan dan dihasilkan oleh tanaman termasuk kategori metabolit sekunder (Reinhard, dkk. 2018).

2) Flavonoid



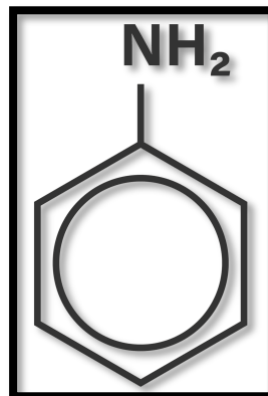
Gambar 2. 2. Struktur Flavonoid (IMade, 2016)

Flavonoid merupakan jenis senyawa fenol alami yang paling melimpah dalam tumbuhan. Senyawa ini memiliki inti

dasar yang terdiri dari 15 atom karbon. Flavonoid tersusun atas struktur konfigurasi C6-C3-C6 yang mencakup dua cincin aromatik dihubungkan oleh tiga atom karbon, mungkin membentuk atau tidak membentuk cincin ketiga (I Made, 2016).

Ragam senyawa, kandungan, serta aktivitas anti-oksidatif flavonoid, bagian dari kategori antioksidan alami dapat ditemukan dalam sereal, sayuran, dan buah-buahan, menjadi subjek publikasi yang luas. Flavonoid berperan sebagai agen anti-oksidan dengan cara memberikan atom hidrogen dalam mengikat logam, baik dalam bentuk glikosida (mengandung rantai samping glukosa) maupun bentuk aglikon bebas.

3) Fenol

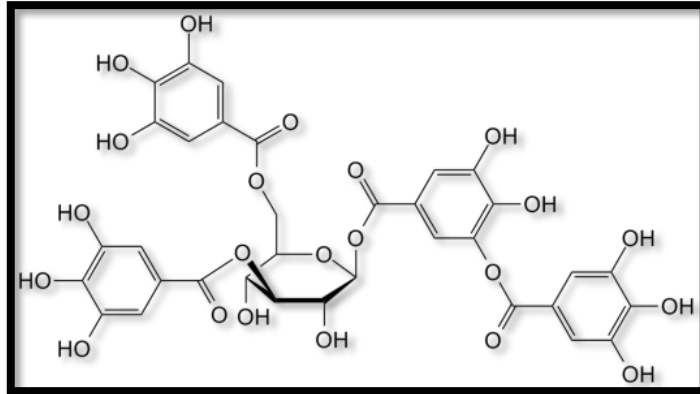


Gambar 2. 3. Struktur Fenol (Nurud, 2020)

Senyawa fenolik adalah jenis senyawa yang memiliki gugus hidroksil dan umumnya melimpah dalam berbagai jenis tumbuhan. Keanekaragaman struktural senyawa ini bervariasi, mulai dari fenol sederhana hingga struktur yang kompleks dan polimerisasi. Polifenol, yang memiliki sejumlah gugus fenol dalam molekulnya, menampilkan beragam spektrum dengan tingkat kelarutan yang bervariasi, serta menunjukkan berbagai fungsi biologis yang penting seperti melindungi stres oksidatif dan penyakit degeneratif dengan signifikansi. Senyawa ini mungkin secara tidak

langsung mempengaruhi kegiatan sistem pertahanan internal melalui proses modulasi sinyal-sinyal di dalam sel (Nurud, 2020).

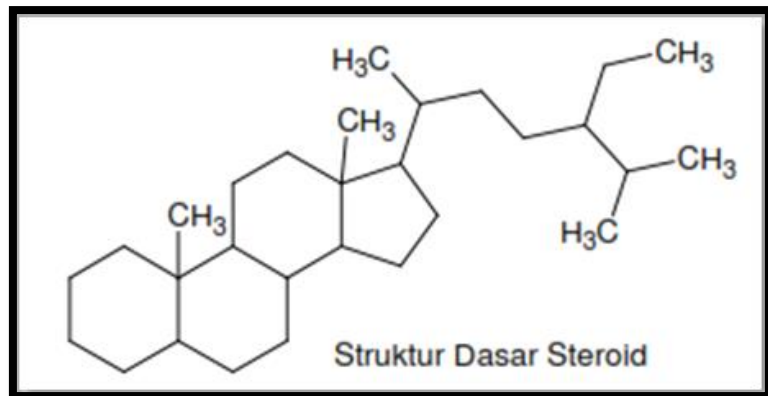
4) Tanin



Gambar 2. 4. Struktur Tanin (Rohma, 2020)

Tanin adalah jenis senyawa polifenol dengan bobot molekul yang tinggi, biasanya berkisar antara 500 hingga 3000 Da (Dalton). Senyawa ini memiliki sifat larut dalam air serta dapat larut dalam berbagai pelarut organik seperti etanol, metanol, atau aseton. Salah satu sifat utama tanin adalah kemampuannya untuk mengendapkan protein. Senyawa tanin ditemukan pada berbagai bagian tanaman seperti akar, tunas, benih, daun, dan batang. Tanin memiliki berbagai manfaat dalam bidang kedokteran, termasuk penggunaannya sebagai zat astringen, pengobatan diare, diuretik, pengobatan masalah lambung, tumor duodenum, serta sifat antiinflamasi, antiseptik, antibakteri, antivirus, dan obat hemostatik (Rohma, 2020).

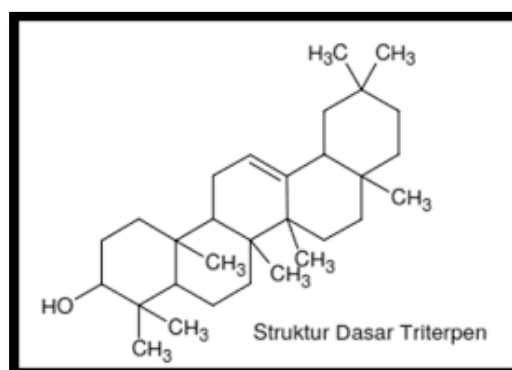
5) Steroid dan Triterpenoid



Gambar 2. 5. Struktur Steroid (Nasrudin, dkk, 2017)

Steroid merupakan lipida terpenoid yang dikenal karena memiliki struktur dasar rangkaian karbon yang menggabungkan empat cincin. Struktur kimia senyawa tersebut sangat bervariasi. Perbedaan struktur ini disebabkan oleh variasi gugus fungsi terikat pada cincin serta proses oksidasi pada cincin karbonnya (Nasrudin, et al., 2017).

Steroid memiliki peran krusial dalam tubuh manusia dengan mengendalikan keseimbangan garam, mengatur metabolisme, serta berperan dalam fungsi organ seksual dan perbedaan biologis antara jenis kelamin. Tubuh manusia secara alami menghasilkan steroid yang terlibat dalam beberapa proses metabolisme (Nasrudin, dkk, 2017).

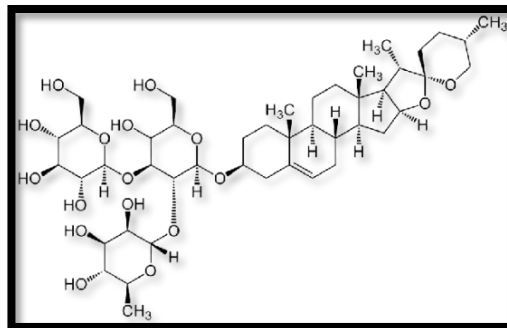


Gambar 2. 6. Struktur Triterpenoid (Ragaya, dkk. 2013)

Triterpenoid merupakan senyawa metabolit sekunder yang berasal dari kelompok terpenoid, dimana struktur rangkanya terdiri enam unit isoprena (2-methylbuta-1,3-diene). Struktur ini dibentuk oleh gabungan enam unit C5 dan diturunkan dari hidrokarbon siklik C30 yang dikenal sebagai skualena. Senyawa ini dapat berbentuk siklik atau tidak siklik serta mengandung gugus seperti alkohol, aldehida, atau asam karboksilat (Ragaya, et al., 2013).

Senyawa dari kelompok triterpenoid menunjukkan kegiatan farmakologis yang penting, seperti kemampuan antiviral, antibakteri, antiinflamasi, penghambatan sintesis kolesterol, serta potensi sebagai agen antikanker. Sementara bagi tanaman mengandung senyawa triterpenoid, ada nilai ekologis karena senyawa ini berperan sebagai agen antifungal, insektisida, anti-predator, antibakteri, dan antivirus (Ragaya, et al., 2013).

6) Saponin



Gambar 2. 7. Struktur Saponin (Fulka, dkk. 2018)

Saponin adalah jenis glikosida dengan bagian aglikonnya yang berupa sapogenin. Sifat saponin membuat penurunan tegangan permukaan air, sehingga setelah terkocok, air akan membentuk buih di atas permukaannya. Karakteristik ini menyerupai sifat surfaktan. Penurunan tegangan permukaan disebabkan oleh senyawa sabun yang mengganggu ikatan hidrogen dalam air. Senyawa sabun ini memiliki dua bagian yang memiliki sifat yang berbeda.

Komposisi kimia saponin terdiri dari dua bagian utama, yakni glikosida terdiri atas glikon dan aglikon. Glikon memuat berbagai gugus gula seperti glukosa, fruktosa, dan variasi gula lainnya. Aglikonnya dikenal sebagai saponin. Kondisi amfifilik ini memungkinkan sifat bahan alami yang memiliki saponin berperan sebagai surfaktan (Fulka, et al., 2018).

2. Ekstraksi

Ekstraksi merujuk pada sebuah proses pemisahan di mana suatu komponen mengalami perubahan massa dari padatan ke dalam cairan atau dari satu cairan ke cairan lain yang berperan sebagai pelarut (Anjaswati et al., 2021).

Beberapa ragam metode ekstraksi yang tersedia meliputi:

a. Cara Dingin

1) Maserasi

Teknik maserasi adalah metode umum sering digunakan dalam riset. Metode ini efektif baik dalam skala kecil maupun industri. Prosedurnya melibatkan penempatan bubuk tanaman dan pelarut sesuai dalam wadah kedap udara pada suhu ruangan. Ekstraksi dilakukan hingga terjadi kesetimbangan antara konsentrasi zat kimia pelarut dan konsentrasi sel tanaman. Setelah proses ekstraksi, penyaringan digunakan untuk memisahkan pelarut dari sampel. Metode maserasi memiliki kekurangan terkait waktu yang diperlukan, konsumsi pelarut cukup besar, serta potensi kehilangan beberapa senyawa. Beberapa senyawa mungkin sulit diekstraksi pada suhu ruangan. Namun, pendekatan ini membantu mencegah kerusakan senyawa yang rentan terhadap panas (Tetti, 2014).

2) Perkolasi

Metode perkolasi melibatkan langkah basahi serbuk sampel secara bertahap dalam sebuah wadah silinder dilengkapi keran di bagian bawahnya, yang disebut perkolator. Pelarut

dituangkan diatas serbuk sampel dan meresap perlahan melalui bagian bawahnya. Salah satu keunggulan dari metode perkolasi adalah aliran terus-menerus pelarut baru yang melewati sampel. Namun, metode ini memiliki kelemahan ketika sampel dalam perkolator tidak merata, sehingga pelarut sulit menjangkau semua bagian sampel, mengakibatkan penggunaan pelarut banyak dan membutuhkan waktu cukup lama (Tetti, 2014).

b. Cara Panas

1) Soxhlet

Prosedur soxhlet dilakukan dengan cara menaruh sampel dalam sarung selulosa (seperti kertas saring) di dalam klosong yang diletakkan dalam labu, yang terhubung dengan kondensor. Pelarut yang cocok dimasukkan ke dalam labu dan suhu pemanasan dijaga di bawah titik didih pelarut. Metode ini memiliki keunggulan dalam ekstraksi berkelanjutan; sampel diekstraksi oleh pelarut yang murni hasil kondensasi, mengurangi jumlah pelarut dibutuhkan dan waktu diperlukan. Namun, kelemahan dari metode ini adalah adanya risiko degradasi senyawa yang sensitif terhadap suhu tinggi karena ekstraksi yang berlangsung lanjutan pada titik didih pelarut (Tetti, 2014).

2) Refluks dan Destilasi Uap

Pada prosedur reflux, sampel dan zat pelarut diletakkan bersama di dalam labu yang dihubungkan dengan sebuah kondensor. Pelarut tersebut dipanaskan hingga mencapai titik didihnya. Kemudian, uap yang terbentuk akan mengalami kondensasi kembali ke dalam labu.

Proses destilasi uap memiliki prinsip yang serupa dan sering digunakan untuk mengekstraksi minyak esensial, di mana campuran senyawa berbagai jenis menguap. Saat dipanaskan, uap mengalami kondensasi, dan hasil destilasi

terpisah dalam dua bagian yang tidak bercampur, kemudian dikumpulkan dalam wadah yang terhubung dengan kondensor. Salah satu kelemahan dari kedua metode ini adalah potensi degradasi senyawa yang sensitif terhadap panas (Tetti, 2014).

3. Fraksinasi

Fraksinasi merujuk pada metode yang bertujuan memisahkan senyawa berdasarkan karakteristik kepolarannya, di mana senyawa polar akan tertarik ke dalam pelarut polar, sedangkan senyawa non-polar cenderung masuk ke dalam pelarut non-polar. Dalam proses fraksinasi, digunakan beberapa jenis pelarut dengan sifat polaritas berbeda, seperti N-butanol sebagai pelarut non-polar, etil asetat sebagai pelarut semi-polar, dan air sebagai pelarut polar. Senyawa metabolit tertentu, seperti senyawa polifenol, flavonoid, alkaloid, dan lainnya, memiliki afinitas terhadap pelarut polar. Sedangkan senyawa seperti flavonoid, saponin, alkaloid, minyak atsiri, lemak, asam lemak tinggi, steroid, dan triterpenoid, memiliki kecenderungan tertentu untuk larut dalam pelarut semi-polar. Senyawa-senyawa tertentu yang tergolong dalam garam alkaloid, minyak menguap, glikosida, tanin, saponin, gula, gom, pati, protein, enzim, lilin, zat warna, dan asam organik, cenderung larut dalam pelarut polar (Anjaswati et al., 2021).

Jenis-jenis metode fraksinasi bervariasi:

a. Metode Cair-cair atau Kromatografi Cair Vakum (KCV)

Metode kromatografi cair-cair (KCV) atau kromatografi cair vakum adalah sebuah teknik pemisahan kromatografi yang memanfaatkan penggunaan vakum untuk mempercepat aliran fase gerak. Keunggulan KCV meliputi kesederhanaan peralatan yang digunakan pemisahan yang cepat, resolusi yang lebih baik, dan kapasitas pemisahan besar. KCV menggunakan kolom berukuran pendek, kolom kromatografi dikemas dengan *dry*

adsorbent. Kolom kromatografi yang kering dikondisikan dalam keadaan vakum agar diperoleh kerabat kemasan maksimum. Vakum dihentikan, pelarut yang kepolaran rendah dituangkan ke permukaan penyerap lalu di vakum lagi. Kolom dihisap sampai kering dan siap digunakan. Cuplikasi dilarutkan dalam pelarut yang cocok, dimulai dengan pelarut yang kepolaran rendah lalu ditingkatkan kepolarannya secara perlahan-lahan kemudian kolom dihisap sampai kering pada setiap pengumpulan fraksi (Prameswari, 2017)

b. Kromatografi Kolom (KK)

kromatografi kolom merupakan suatu metode pemisahan preparatif. Metode ini memungkinkan untuk melakukan pemisahan suatu sampel yang berupa campuran dengan berat berapa gram. Pada prinsipnya kromatografi kolom adalah suatu teknik pemisahan yang didasarkan pada peristiwa adsorpsi. Sampel yang biasanya berupa larutan pekat diletakkan pada ujung atas kolom. Komponen tunggal yang ada pada sampel diserap oleh fase diam yang telah dibentuk atau biasa digunakan silica gel yang terdapat pada kolom, namun apabila dialirkan pelarut secara kontinyu maka akan terjadi migrasi senyawa dan senyawa tersebut terbawa oleh pelarut sesuai dengan polaritasnya. Kecepatan elusi sebaiknya dibuat konstan. Jika kecepatan elusi terlalu kecil maka senyawa-senyawa akan berdifusi ke dalam elusi dan akan menyebabkan pita makin melebar yang akibatnya pemisahan tidak dapat berlangsung dengan baik. Dan apabila kecepatan elusi terlalu besar maka pemisahan kurang baik dan tidak berdasarkan tingkat polaritasnya sehingga akan diperoleh fraksi yang sama dan menyebabkan fase diam cepat menjadi kering dan dikhawatirkan terjadi cracking. Permukaan adsorben harus benar-benar horizontal, hal ini dilakukan untuk menghindari terjadinya cacat yang dapat terjadi selama proses elusi berjalan. Cara kerja

kromatografi kolom adalah komponen tunggal ditahan pada fase diam berupa adsorben karena telah terikat. Ketika eluen dialirkan, maka senyawa akan melakukan migrasi, terbawa oleh eluen sesuai dengan kesesuaian kepolaran.

c. Size – Exclusion Chromatography (SEC)

Metode fraksi *Size – Exclusion Chromatography* (SEC) didasarkan pada ukuran berat molekul. Prinsip kerja SEC adalah analit akan melewati fase diam yang berpori. Molekul dengan ukuran lebih besar dari fase diam akan terelusi keluar dari kolom lebih kecil akan masuk ke dalam pori fase diam sehingga tertahan oleh kolom tergantung dari ukuran molekulnya. Pemisahan ini dimungkinkan akibat penahanan ukuran yang terjadi dalam partikel gel. Metode ini dikelompokkan menjadi dua macam yaitu kromatografi permeasi gel yang mengacu pada pemisahan makromolekul yang larut dalam air dan kromatografi filtrasi gel untuk makromolekul yang larut dalam pelarut organik. Untuk bekerja dalam medium tidak berair, gel yang tepat digunakan adalah *Sephadex LH-20*.

d. Solid – Phase Extraction (SPE)

Solid-Phase Extraction (SPE) merupakan metode yang lebih efisien dan ekonomis dalam mengurangi volume pelarut organik yang dibutuhkan secara signifikan. Proses SPE terdiri dari empat tahap prosedur:

- 1) Pengkondisian Cartridge (Penjerap) yang melibatkan aliran pelarut sampel untuk merendam permukaan penjerap dan menciptakan nilai pH seragam, sehingga perubahan kimia yang tidak diinginkan pada saat sampel dimasukkan dapat dihindari.
- 2) Retensi sampel, di mana larutan sampel dilewatkan ke Cartridge untuk menahan analit yang diinginkan sementara komponen lain terelusi atau menahan komponen yang tidak diharapkan sementara analit yang diinginkan terelusi.

- 3) Pembilasan, yang bertujuan menghilangkan komponen yang tidak tertahan oleh penjerap selama proses retensi.
- 4) Elusi, sebagai tahap pengambilan analit yang diinginkan jika analit tersebut tertahan pada penjerap (Silva, 2012).

4. Mikroorganisme

a. *Pseudomonas aeruginosa*

1) Klasifikasi

Klasifikasi *Pseudomonas aeruginosa* adalah:

Kerajaan : *Prokaryota*

Divisi : *Protophyt*

Subdivisi : *Schizomycetes*

Kelas : *Schizomycetes*

Ordo : *Pseudomonadales*

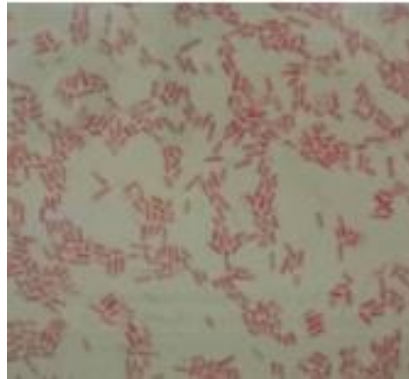
Family : *Pseudomonadaceae*

Genus : *Pseudomonas*

Spesies : *Pseudomonas aeruginosa* (Radji, 2010)

2) Morfologi

Pseudomonas aeruginosa adalah bakteri dengan sifat gram-negatif, berbentuk basil, memiliki dimensi sekitar 0,5 – 1 μm x 3 – 4 μm , dan memiliki 2 – 3 flagel tunggal yang terletak di kutubnya. Bakteri ini memiliki kemampuan untuk menghasilkan pigmen piosianin yang memberikan warna biru kehijauan, serta pigmen fluorescent yang memberikan warna kehijauan.



Gambar 2. 8. Pseudomonas aeruginosa (Nugroho, 2010)

3) Infeksi *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa merupakan patogen yang memanfaatkan kerentanan sistem pertahanan tubuh untuk memicu infeksi, dikenal sebagai patogen oportunistik. Bakteri ini mengakibatkan berbagai jenis infeksi termasuk saluran kemih, saluran pernapasan, dermatitis, infeksi jaringan lunak, bakteremia, infeksi pada tulang dan sendi, infeksi pada saluran pencernaan, dan berbagai jenis infeksi sistemik. Infeksi ini terutama mengancam pada pasien dengan kondisi kesehatan yang rentan, seperti luka bakar parah, kanker, dan orang dengan sistem kekebalan tubuh lemah seperti pada penderita AIDS. Kasus infeksi *Pseudomonas aeruginosa* menyebabkan kekhawatiran serius pada pasien yang berada di lingkungan rumah sakit, terutama pada mereka yang menderita kanker, fibrosis kistik, dan luka bakar. Tingkat kematian pada kasus tersebut mencapai 50%. Bakteri ini juga sering menjadi penyebab sepsis pada pasien rawat di unit perawatan intensif (Mayasari, 2006).

4) Biofilm *Pseudomonas aeruginosa*

Kolonisasi paru-paru pasien *cystic fibrosis* (CF) oleh *P.aeruginosa* adalah alasan utama morbiditas dan mortalitas populasi CF. Infeksi ini umumnya bertahan meskipun penggunaan terapi antimikroba agresif jangka panjang dan

telah dikaitkan dengan pembentukan biofilm resisten antibiotik, dimana komunitas bakteri membentuk mikrokoloni tertanam dalam matriks EPS terhidrasi. Kepentingan relatif matriks EPS bergantung pada latar belakang genetik galur, kondisi nutrisi, dan fase perkembangan biofilm. Secara umum diketahui bahwa EPS dari biofilm berfungsi baik sebagai perancah struktural dan/atau penghalang pelindung terhadap lingkungan yang keras. Setidaknya tiga polisakarida (Psl, Pel dan alginat) telah diidentifikasi *Pseudomonas aeruginosa* yang memainkan peran penting dalam pemeliharaan struktur dan resistensi antibiotik biofilm. Sifat dan fungsi masing-masing dalam pembentukan biofilm dan pengembangan komponen matriks biofilm termasuk eksopolisakarida (Psl, Pel, dan alginat), eDNA, protein, dan pelengkap permukaan protein seperti fimbriae, pili type IV (T4P), dan flagel (Wei dan Ma, 2013).

b. *Escherichia coli*

1) Klasifikasi

Menurut Jawetz (2008), klasifikasi *Escherichia coli* adalah:

Kerajaan : *Prokaryotae*
 Divisi : *Gracilicutes*
 Kelas : *Schizomycetes*
 Ordo : *Eubacteriales*
 Famili : *Enterobacteriaceae*
 Genus : *Escherichia*
 Spesies : *Escherichia coli*

2) Morfologi

Penemuan *Escherichia coli* dilakukan pertama kali oleh Theodor Escherich dari sampel tinja seorang anak pada tahun 1885. Karakteristik unik dari *Escherichia coli* adalah kemampuannya dalam menyebabkan infeksi utama di dalam usus, seperti diare, dan juga mampu menyebabkan infeksi

pada bagian tubuh lain di luar sistem pencernaan. Bakteri *Escherichia coli* termasuk dalam kategori bakteri yang dapat hidup baik dengan atau tanpa keberadaan oksigen, memiliki ukuran sekitar $0,4-0,7 \times 1,0-3,0 \mu\text{m}$, biasanya terdapat secara tunggal atau berpasangan, tidak membentuk spora, menggunakan flagela untuk bergerak, dan umumnya memiliki kemampuan untuk bergerak. *Escherichia coli* terbagi menjadi beberapa jenis berdasarkan jenis antigen utama yang terdapat pada permukaannya, seperti antigen kapsul (K), antigen somatik (O), dan antigen flagela (H).

Tidak ada spora yang terdeteksi, sel *Escherichia coli* dapat hadir secara tunggal, berpasangan, atau membentuk rantai pendek. Biasanya, sel-selnya tidak memiliki kapsul. *Escherichia coli* membentuk koloni dengan bentuk bundar, permukaan cembung, dan halus dengan batas yang jelas (Jawetz et al., 2008).

Bakteri ini tidak memiliki inti sel, struktur yang dibungkus membran, atau kerangka sel. *Escherichia coli* memiliki bagian luar sel yang dikenal sebagai pili yang berupa filamen tipis yang berfungsi untuk menangkap zat tertentu, serta flagel yang merupakan filamen tipis dan lebih panjang yang digunakan untuk bergerak secara berenang. Proses reproduksi bakteri *Escherichia coli* bisa terjadi baik dalam lingkungan beroksigen maupun tanpa oksigen, dan pertumbuhannya paling optimal pada suhu sekitar 37°C .



Gambar 2. 9. *Escherichia coli* (Anggraeni, 2015)

3) Infeksi *Escherichia coli*

Strain patogen *Escherichia coli* umumnya menimbulkan gejala klinis yang berbeda, yang terdiri dari tiga jenis infeksi utama pada manusia. Pertama, infeksi pada saluran pencernaan yang memicu terjadinya diare, kedua, infeksi pada saluran kemih, dan ketiga, meningitis neonatal. Infeksi pada saluran pencernaan yang sering dikaitkan dengan makanan disebabkan oleh berbagai kelompok *Escherichia coli* yang menyebabkan diare seperti EHEC, ETEC, EIEC yang terkait dengan kasus diare yang bersifat akut dan serius. Sementara itu, kelompok EPEC, EAEC, dan DAEC berkaitan dengan diare yang bersifat menengah hingga kronis. Infeksi saluran kemih diakibatkan oleh kelompok *Escherichia coli* uropatogenik (UPEC), sedangkan meningitis diakibatkan oleh kelompok *Escherichia coli* neonatal (NMEC).

Infeksi *Escherichia coli* seringkali menjadi penyebab diare dengan dampak kerusakan pada struktur sel, khususnya penurunan integritas junction (sambungan) yang kuat antar sel (tight junction). Perusakan sambungan sel oleh EspF mengakibatkan hilangnya kemampuan sel untuk menjaga kekuatan struktural dan menginisiasi kematian sel inang melalui proses apoptosis.

4) Biofilm *Escherichia coli*

Escherichia coli memiliki kemampuan untuk membentuk biofilm sebagai strategi pertahanan dalam kondisi lingkungan yang kurang menguntungkan, seperti kekurangan nutrisi, oksigen, dan paparan antibiotik (Soto et al., 2011). Proses ini melibatkan pembentukan matriks ekstraseluler polisakarida (EPS). Dengan demikian, bakteri *Escherichia coli* yang membentuk biofilm memiliki tingkat ketahanan yang lebih tinggi terhadap antibiotik dan

disinfektan jika dibandingkan dengan yang hidup di fase planktonik.

Ketidakkampuan dapat dihadapi dengan menggunakan agen antimikroba yang memiliki kapasitas untuk mengurai biofilm melalui mekanisme yang berbeda dari antibiotik dan disinfektan. Salah satu cara efektif untuk mengontrol pertumbuhan biofilm adalah dengan memanfaatkan bakteriofag. Bakteriofag memiliki sifat yang diinginkan, termasuk ketidaktoksikan, spesifik, dan efektif, sehingga memenuhi syarat sebagai agen antibiofilm. Berdasarkan beberapa penelitian, bakteriofag dianggap sebagai cara yang efisien untuk mengurai komponen polisakarida yang membentuk matriks polimer ekstraseluler dalam biofilm.

Dengan mempertimbangkan keunggulan fag dibandingkan dengan antibiotik dan desinfektan, serta potensi fag dalam mengurai biofilm bakteri targetnya dan mengurangi kemampuan biofilm untuk memperbaiki diri, dilakukan penelitian untuk menguji aktivitas antibiofilm dari isolat bakteriofag EC RTH 04 terhadap biofilm *Escherichia coli* dari isolat EC 3. Penelitian bertujuan untuk menentukan konsentrasi efektif/optimal yang dibutuhkan. Bakteriofag spesifik sebagai antibiofilm dapat menjadi solusi untuk terapi penyakit yang disebabkan bakteri tertentu, yang sulit dieradikasi menggunakan antibiotik dan disinfektan yang umum digunakan.

5. Biofilm

a. Deskripsi

Biofilm merupakan komunitas mikroorganisme yang terdiri dari sel-sel mikroba yang saling terkoneksi dalam matriks yang mereka hasilkan sendiri. Struktur ini terbentuk dari elemen polimer ekstraseluler yang ada pada atau di dalam organisme

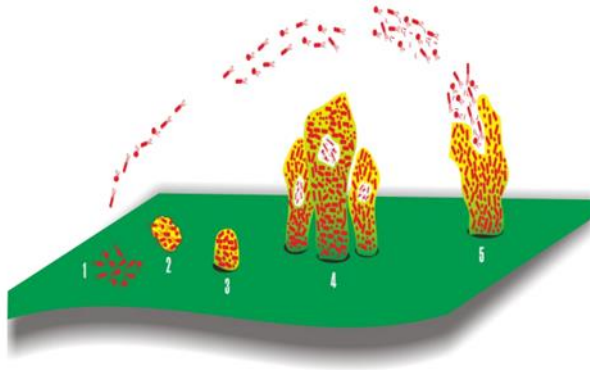
tuan rumah. Kemampuan biofilm untuk berkembang terjadi pada hampir semua permukaan atau lingkungan di mana bakteri berada. Film ini terbentuk melalui gabungan bakteri permukaan dengan materi organik atau anorganik yang ada di sekitarnya. Baik zat organik maupun anorganik, substrat ini naik ke atas permukaan melalui difusi atau dibawa oleh arus cairan. Dibandingkan dengan cairan, biofilm memiliki keunggulan dalam menyampaikan nutrisi karena kapabilitasnya yang lebih baik (Reimann, 2006; Jamal, 2015).

Biofilm dapat bertindak sebagai perisai, melindungi mikroorganisme di dalamnya dari sistem kekebalan sel inang dan membuatnya resisten terhadap antimikroba standar. Ketika jumlah sel inang yang terinfeksi meningkat selama infeksi klinis, biofilm terbentuk dan meningkatkan virulensi dan resistensi. Kehadiran serum dan air liur di lingkungan dapat mendorong perkembangan biofilm (Hamzah, 2021).

b. Struktur Biofilm

Interaksi fisiologis mikrokoloni dalam biofilm dewasa dapat dijelaskan oleh komponen struktural biofilm dalam bentuk kumpulan kecil sel mikroorganisme serta tahapan fundamental pertumbuhan biofilm, seperti sistem pengenalan berbasis populasi, ketahanan terhadap zat antimikroba, dan penempelan pada permukaan substrat. Materi matriks membentuk 85% dari volume biofilm, sedangkan kelompok sel bakteri membentuk 15%. Extracellular Polymeric Substances (EPS), yang terdiri dari 50% hingga 90% biofilm karbon organik, sebagai substansi utama dalam matriks, dapat diklasifikasikan sebagai bahan yang dominan. Komposisi EPS bervariasi dalam sifat fisik dan kimia, utamanya terdiri dari polisakarida. Karakter hidrofilik dari EPS menyebabkannya mampu menyerap sejumlah besar air, dengan tingkat kelarutan yang bervariasi (Hamzah, 2021).

c. Mekanisme Pembentukan Biofilm



Gambar 2. 10. Proses Pembentukan Biofilm (Hamzah, 2021)

Indikator :

- 1) Bakteri menempel pada permukaan (kondisi sementara)
- 2) Eksopolimer mulai terbentuk
- 3) Pembentukan mikrokoloni dan awal terbentuknya biofilm
- 4) Biofilm terus bertambah jumlahnya
- 5) Dispersi sel mengakibatkan perpindahan sel dan pembentukan biofilm baru

Ada lima langkah dalam pembuatan biofilm yang dapat dilihat dari gambar (Gambar 2.11). Pada langkah awal, gaya *Van der Waals* menyebabkan pada tahap ini keterikatan sel masih bersifat sementara, langkah kedua menunjukkan bahwa ketika polimer dan zat perekat yang lebih kuat terbentuk, adhesi sel bakteri menjadi lebih kuat. Pada langkah ketiga, pembentukan mikrokoloni dimulai, menyebabkan perkembangan awal biofilm. Langkah keempat menggambarkan pertumbuhan biofilm yang terus berlanjut, membentuk struktur tiga dimensi yang kompleks dengan sel-sel yang terorganisir dalam kelompok dan terhubung satu sama lain. Tahap terakhir menunjukkan bagaimana struktur biofilm yang berkembang mengakibatkan dispersi sel-sel tersebut dari biofilm, menyebabkan sel-sel tersebut melepaskan diri dan menempel pada substrat baru untuk membentuk biofilm baru (Hamzah, 2021).

6. Fungsi biofilm terhadap resistensi bakteri

Pertumbuhan bakteri ditingkatkan dan mekanisme pertahanan didukung oleh penciptaan biofilm. Berdasarkan empat peran yang dimainkan biofilm, berikut ini.

a. Pertahanan

Biofilm adalah mekanisme pertahanan bakteri yang membantu kuman agar tidak terbunuh oleh hal-hal seperti fagositosis sel kekebalan, antibiotik, dan pembentukan sel bakteri yang tidak patuh. Bakteri pembentuk biofilm 10.000-1.000 kali lebih tahan dibandingkan bakteri non-biofilm.

b. Pelekatan

Bakteri dapat melekat pada permukaan yang kaya nutrisi, seperti jaringan hewan, atau pada substrat di dalam aliran sistem, misalnya pada permukaan batuan di dalam air yang mengalir ketika terbentuk biofilm.

c. Kolonisasi

Ketika bakteri menghasilkan biofilm, mereka dapat tetap berdekatan dan membentuk koloni. Menggunakan kemampuannya untuk berkembang biak, berkolonisasi, dan membangun biofilm, *S. typhi* mampu berkomunikasi dengan sel inang dan memberi sinyal pada molekul, sehingga membuka pintu bagi pertukaran genetik.

d. Cara hidup alami bakteri

Biofilm merupakan kondisi umum bagi beberapa jenis bakteri yang muncul dari kondisi di mana bakteri tidak dapat menempel karena asupan makanan yang tidak mencukupi (Fadly, 2019).

7. Peran biofilm terhadap mikroba

Biofilm memiliki peran terhadap mikroba yaitu:

a. Nutrisi

Berbeda dengan sel planktonik, bakteri dalam biofilm terlibat dalam proses metabolisme yang berbeda. Bakteri dalam biofilm memiliki sedikit oksigen dan sedikit akses terhadap nutrisi.

b. Variasi genetik

Manipulasi genetika pada mikroorganisme memungkinkan perpindahan gen di antara berbagai populasi, yang dapat menimbulkan keprihatinan yang signifikan terkait kemungkinan munculnya bakteri yang kebal terhadap antibiotik.

c. Perlindungan

Eksopolisakarida adalah molekul ekstra-polimer penting yang disekresikan oleh bakteri. Tanpa mengurangi akses bakteri terhadap nutrisi, matriks ini melindungi bakteri dari pengaruh faktor eksternal seperti perubahan suhu, pergerakan osmotik, radiasi UV, dan pengeringan (Hamzah, 2021)

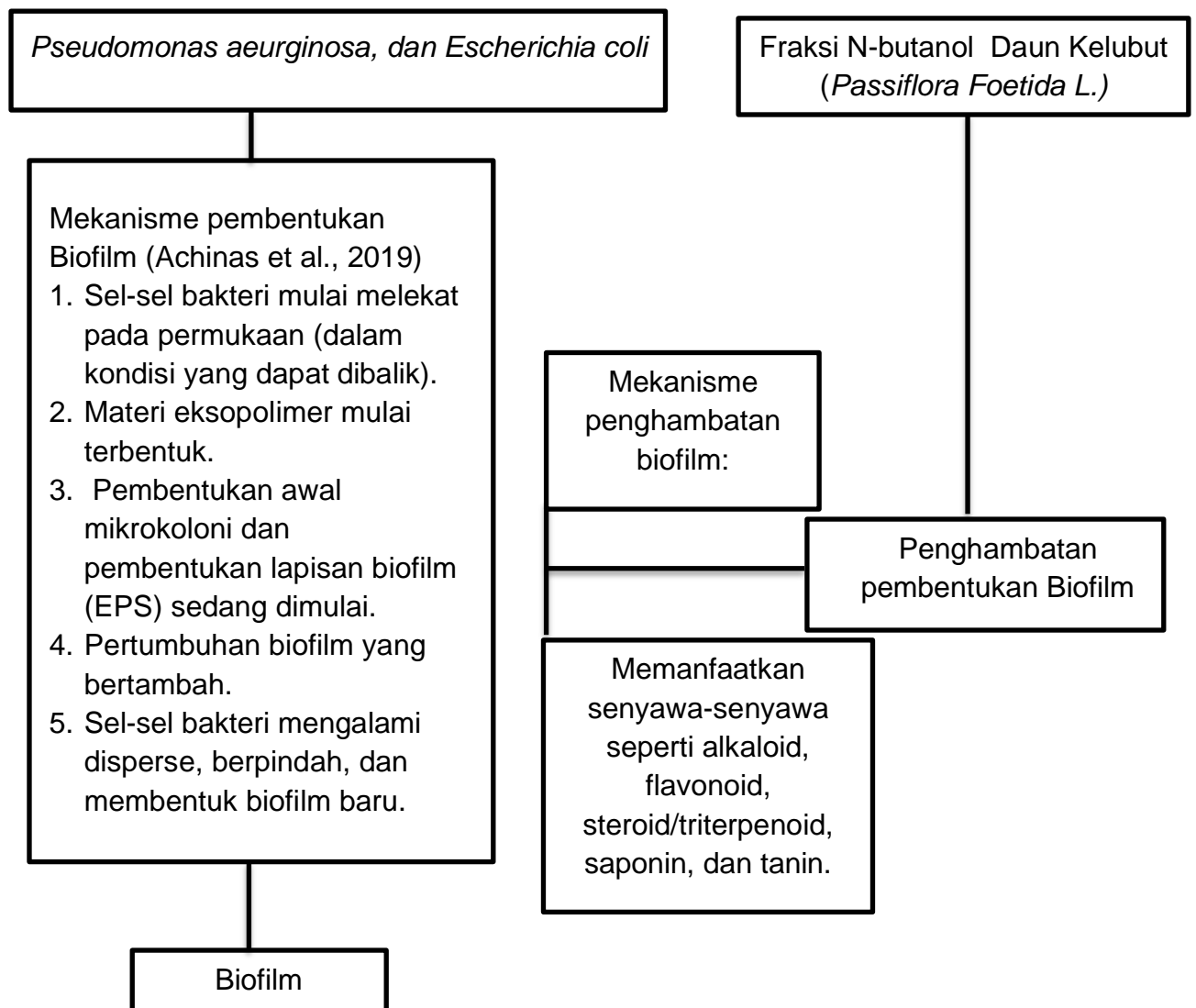
8. Pengujian Antibiofilm

Metode mikrodilusi digunakan untuk melakukan uji hambatan biofilm. Bakteri disiapkan dengan menghasilkan suspensi dalam media Brain Heart Infusion dan disesuaikan dengan standar McFarland V (15×10^5 CFU/mL). Kemudian, dilakukan pengenceran isolat masing-masing pada kadar 100 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, dan 25 $\mu\text{g/mL}$ menggunakan DMSO sebagai pelarut. Dalam uji ini, kontrol pelarutnya adalah DMSO, sementara kontrol positif yang digunakan adalah kloramfenikol. Larutan uji ditempatkan di dalam microplate berbentuk U bottom 96 wells, dengan volume total 100 μL di setiap sumur menggunakan mikropipet (Rollando, 2017).

Pengujian dilakukan pada satu cawan uji dan satu cawan kosong. Cawan uji mengandung campuran isolat uji yang dicampur dengan suspensi bakteri sebanyak 10% dari total volume, sementara cawan kosong hanya mengandung campuran isolat tanpa suspensi bakteri, tetapi dengan penambahan saline sebanyak 10% dari total volume. Microplate berbentuk U bottom dengan 96 sumuran tertutup menggunakan kertas parafilm, kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 36,6°C di dalam inkubator. Setelah itu, microplate tersebut diambil dari inkubator, bahan uji dibuang, dan dilakukan pencucian dengan aquades sebanyak 3 kali. Microplate dikeringkan,

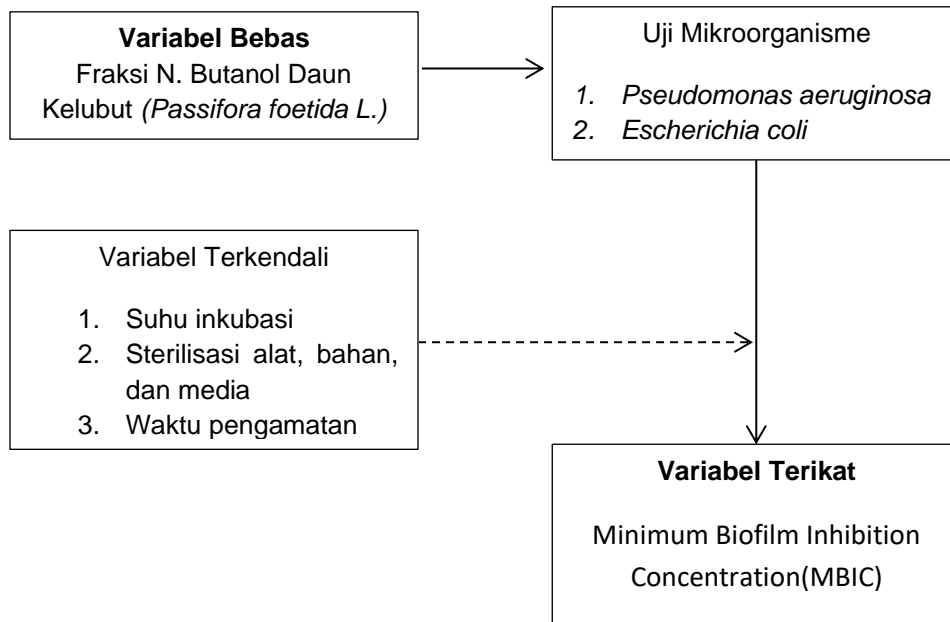
lalu ke dalam setiap sumuran ditambahkan pewarna kristal violet 1% dalam air distilasi sebanyak 125 μL , dan didiamkan selama 15 menit. Setelah pencucian kembali dengan air mengalir sebanyak 3 kali, didiamkan selama 15 menit, tambahan etanol 96% sebanyak 200 μL dimasukkan dan dibiarkan selama 15 menit (Rollando, 2017).

B. Kerangka Teori Penelitian



Gambar 2. 11. Kerangka Teori Penelitian

C. Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 2. 12. Kerangka Konsep Penelitian

D. Hipotesis Penelitian

Fraksi N-Butanol yang berasal dari daun *Passiflora Foetida L* menunjukkan aktivitas penghambatan mikroorganisme dan pengujian biofilm terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* serta *Escherichia coli*.