

**PENGARUH FRAKSI-FRAKSI EKSTRAK ETANOL HERBA
SAMBILOTO (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees.)
TERHADAP SISTEM PENGHAMBATAN *QUORUM SENSING*
BAKTERI *Escherichia coli***

**EFFECT FRACTIONS OF SAMBILOTO HERBS
(*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees.) ETHANOLIC
EXTRACT AGAINST *QUORUM SENSING* INHIBITION
SYSTEM OF *Escherichia coli***

**NUR FITRIANA CHAIRUNNISA
N111 12 255**



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2019**



**PENGARUH FRAKSI-FRAKSI EKSTRAK ETANOL HERBA
SAMBILOTO (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees.)
TERHADAP SISTEM PENGHAMBATAN *QUORUM SENSING*
BAKTERI *Escherichia coli***

**EFFECT FRACTIONS OF SAMBILOTO HERBS
(*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees.) ETHANOLIC
EXTRACT AGAINST *QUORUM SENSING* INHIBITION
SYSTEM OF *Escherichia coli***

SKRIPSI

**Untuk melengkapi tugas-tugas dan memenuhi syarat-syarat
Untuk mencapai gelar sarjana**

**NUR FITRIANA CHAIRUNNISA
N111 12 255**

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2019**



PERSETUJUAN

PENGARUH FRAKSI-FRAKSI EKSTRAK ETANOL
HERBA SAMBILOTO (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees.)
TERHADAP SISTEM PENGHAMBATAN QUORUM SENSING
BAKTERI *Escherichia coli*

NUR FITRIANA CHAIRUNNISA

N111 12 255



Disetujui oleh :
Pembimbing Utama,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Gemini Alam', is written over the text.

Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si., Apt.
NIP. 19641231 199002 1 005

Pembimbing Pertama,

Pembimbing Kedua,

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Arjuna', is written over the text.

Andi Arjuna, S.Si., M.Na.Sc.T., Apt. Dr. Herlina Rante, S.Si., M.Si., Apt.
NIP. 19850404 201012 1 005 NIP. 19771125 200212 2 003

Pada Tanggal : 28 Januari 2019



PENGESAHAN

PENGARUH FRAKSI-FRAKSI EKSTRAK ETANOL HERBA
SAMBILOTO (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees.)
TERHADAP SISTEM PENGHAMBATAN QUORUM SENSING
BAKTERI *Escherichia coli*

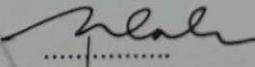
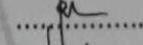
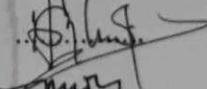
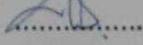
EFFECT FRACTIONS OF SAMBILOTO HERBS
(*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees.) ETHANOLIC
EXTRACT AGAINST QUORUM SENSING INHIBITION
SYSTEM OF *Escherichia coli*

Disusun dan diajukan oleh :

NUR FITRIANA CHAIRUNNISA
N111 12 255

telah dipertahankan di depan Panitia Penguji Skripsi
Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin
pada tanggal 28 Januari 2019
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Panitia Penguji Skripsi

- | | | |
|---------------|---|---|
| 1. Ketua | : Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si., Apt. |  |
| 2. Sekretaris | : Andi Arjuna, S.Si., M.Na.Sc.T., Apt. |  |
| 3. Anggota | : Dr. Herlina Rante, S.Si., M.Si., Apt. |  |
| 4. Anggota | : Prof. Dr. M. Natsir Djide, MS., Apt. |  |
| 5. Anggota | : Ismail, S.Si., M.Si., Apt. |  |

Mengetahui :
Dekan Fakultas Farmasi
Universitas Hasanuddin



Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si., Apt.
NIP. 19641231 199002 1 005



PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi ini benar-benar adalah hasil karya saya sendiri, tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu Perguruan Tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa pernyataan saya ini tidak benar, maka skripsi dan gelar yang diperoleh batal demi hukum.

Makassar, 23 Januari 2019

Yang menyatakan,



Nur Fitriana Chairunnisa
N111 12 255



UCAPAN TERIMA KASIH

Bismillahirrahmanirrahim. Kata terindah yang sangat patut terhaturkan dari lisan penulis yaitu kata “syukur” kepada Allah *Subhanahu Wa Ta’ala* yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini sebagai salah satu syarat dalam memperoleh gelar kesarjanaan pada Program Studi S1 Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin. Shalawat serta salam selalu tercurahkan kepada junjungan kita, *Nabiyullah* Muhammad *Shallallahu ‘alaihi Wasallam, khataamul ‘anbiyaa* dan Rasul pembawa *fathu* yang selalu menjadi guru dalam pejuang dan sebagai sosok yang lengkap tidak hanya dalam sisi akhlak dan karekturnya, tapi juga sisi perjalanan hidupnya.

Skripsi ini tidak akan dapat terselesaikan dengan segala hambatan penulis tanpa bantuan, dorongan, serta do’a dari berbagai pihak sehingga *Alhamdulillah* dapat terselesaikan dengan baik. Penulis sangat berterima kasih kepada semua pihak yang telah membantu :

1. Kepada Bapak Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si., Apt., selaku Dekan saat penulis menyelesaikan skripsi ini, seluruh jajarannya, staf dosen, laboran, serta pegawai Fakultas Farmasi UNHAS.
2. Kepada Bapak Prof. Dr. Gemini Alam, M.Si., Apt., selaku Pembimbing I, Bapak Andi Arjuna, S.Si., M.Na.Sc.T., Apt., selaku Pembimbing Pertama, dan Ibu Dr. Herlina Rante, S.Si., M.Si., Apt.,



selaku Pembimbing Kedua, yang telah begitu banyak memberikan motivasi dan keikhlasan dalam membimbing penulis.

3. Kepada Bapak Prof. Dr. M. Natsir Djide, MS., Apt. dan Ismail, S.Si., M.Si., Apt. selaku penguji yang telah banyak memberikan masukan dalam penyelesaian skripsi penulis.
4. Kepada Bapak Prof. Dr. M. Natsir Djide, M.Si., Apt., selaku penasihat akademik selama penulis menginjakkan kaki di Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin, yang senantiasa memberikan nasihat tentang akademik penulis.
5. Saudariku tercinta; Uci, Eka, Arni, Nini, Vivi, Ayu, Gina, Nova, dan Linda, yang selaku mentor, penyuplai semangat, do'a, dan berbagai nasihatnya.
6. Teman-teman seperjuangan skripsi di Desin Dikit Lagi; Ridho, Sakinah, Rosdiana, Citra, Wahyu, Alfath, dan lainnya atas dukungan semangatnya kepada penulis.
7. Saudara-saudariku di keluarga kecil Desintegrato12 (Farmasi UH angkatan 2012).
8. Anggota KEMAFAR-UH.

Tak lupa pula penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada kedua orang tua yang tercinta, Ayahanda, Arjun D. Sadiawan dan dan Ibunda, Iseu Rahmawati, serta saudara-saudariku;

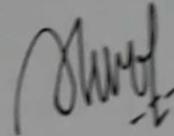
Amad Fathoni Pratakusumah dan adik Fauziah Nur Hasanah,



yang telah memberiku dorongan semangat, cinta dan kasih sayang untuk menggapai cita demi masa depan.

Penulis sangat menyadari, dalam penyusunan skripsi ini masih banyak kekurangan dan jauh dari bentuk kesempurnaan, sehingga saran serta kritik yang membangun sangat diharapkan oleh penulis kedepannya. Akhir kata semoga apa yang penulis persembahkan ini dapat memberikan manfaat bagi ilmu pengetahuan kedepannya. *Allahuma Amin.*

Makassar, 23 Januari 2019



Nur Fitriana Chairunnisa



ABSTRAK

NUR FITRIANA CHAIRUNNISA. Pengaruh Fraksi-Fraksi Ekstrak Etanol Herba Sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees.) terhadap Sistem Penghambatan *Quorum Sensing* Bakteri *Escherichia coli* (Dibimbing oleh Gemini Alam, Andi Arjuna, dan Herlina Rante)

Sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees.) merupakan salah satu tanaman yang memiliki aktivitas antibiofilm terhadap beberapa bakteri, seperti *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus aureus*. Namun belum ada diketahui aktivitas antibiofilm dari fraksi-fraksinya terhadap *Escherichia coli*. Oleh karena itu, pengaruh fraksi ekstrak etanol herba sambiloto terhadap sistem penghambatan quorum sensing pada *Escherichia coli* melalui penghambatan biofilmnya telah dilakukan. Fraksi yang digunakan adalah fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air. Tiap fraksi diuji penghambatan biofilm pada konsentrasi 0,5%, 1%, dan 2% dengan metode uji plat mikrotiter. Amoksisilin 0,05% digunakan sebagai kontrol positif. Hasil pengamatan menunjukkan pada konsentrasi 2% dari fraksi n-heksan memiliki aktivitas penghambatan biofilm sebesar $8,50 \pm 7,48\%$; fraksi etil asetat sebesar $24,49 \pm 1,77\%$; dan fraksi air sebesar $3,06 \pm 5,10\%$. Sedangkan Amoksisilin 0,05% memiliki aktivitas penghambatan biofilm sebesar $37,41 \pm 1,59\%$. Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa adanya pengaruh dari fraksi ekstrak etanol herba Sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees.) terhadap sistem penghambatan quorum sensing *Escherichia coli* dimana aktivitas penghambatan biofilm dari fraksi etil asetat lebih baik dibandingkan dengan fraksi n-heksan dan fraksi air terhadap biofilm *Escherichia coli*.

Kata Kunci : *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees, biofilm, *Escherichia coli*, fraksi, quorum sensing



ABSTRACT

NUR FITRIANA CHAIRUNNISA. Effect fractions of Sambiloto herbs (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees.) ethanolic extract against quorum sensing inhibition system of *Escherichia coli* (Supervised by Gemini Alam, Andi Arjuna, and Herlina Rante)

Sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees.) is one of the plants that has antibacterial and antibiofilm activity against some bacteria, such as *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. But, antibiofilm activity from its fraction against *Escherichia coli* is unknown. Therefore, the effect fraction of Sambiloto herbs ethanolic extract against quorum sensing inhibition system of *Escherichia coli* through biofilm inhibition has been conducted. Fractions used were n-hexane, ethyl acetate, and water fractions. Each fractions was tested for biofilm inhibition at concentrations of 0,5%, 1%, and 2% using microtiter plate assay. 0,05% Amoxicillin was used as positive. As the result showed that at concentration of 2%, n-hexane fraction had biofilm inhibitory activity of $8,50\pm 7,48\%$; ethyl acetate fraction of $24,49\pm 1,77\%$; and water fraction of $3,06\pm 5,10\%$. While amoxicillin 0,05% had biofilm inhibitory activity of $37,41\pm 1,59\%$. Therefore, it can be concluded that there is an effect fraction of Sambiloto herbs (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees.) ethanolic extract against quorum sensing inhibition system of *Escherichia coli* where biofilm inhibitory activity of ethyl acetate fraction is better than n-hexane and water fractions against *Escherichia coli* biofilms.

Keywords : *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees, biofilm, *Escherichia coli*, fraction, quorum sensing



DAFTAR ISI

	halaman
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
BAB I PENDAHULUAN	1
I.1 Latar Belakang	1
I.2 Rumusan Masalah Penelitian	3
I.3 Tujuan Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	4
II.1 Quorum Sensing	4
II.2 Biofilm	5
II.3 <i>Autoinducer-2</i> (AI-2)	7
II.4 Uraian Tanaman	9
II.4.1 Klasifikasi	9



ma Daerah dan Nama Asing

10

orfologi

10

II.4.4 Tempat Tumbuh	11
II.4.5 Kandungan Kimia	11
II.4.6 Andrografolida	11
II.5 Uraian Bakteri Uji	13
II.5.1 Klasifikasi	13
II.5.2 Morfologi	13
II.6 Ekstraksi dan Fraksinasi	14
II.6.1 Ekstraksi	14
II.6.2 Fraksinasi (Ekstraksi Cair-Cair)	15
II.7 Kromatografi Lapis Tipis	16
II.8 Uji Plat Mikrotiter (<i>Microtiter Plate Assay</i>)	17
II.9 <i>Microplate Reader</i>	18
BAB III METODE PENELITIAN	20
III.1 Alat dan Bahan	20
III.2 Penyiapan Sampel, Ekstraksi, dan Fraksinasi	20
III.2.1 Penyiapan Sampel	20
III.2.2 Ekstraksi dan Fraksinasi	21
III.3. Sterilisasi Alat	21
III.4 Pembuatan Medium	22
III.4.1 Nutrient Agar	22
III.4.2 Nutrient Broth	22
Pembuatan Larutan 0,5 McFarland	22
Penyiapan Bakteri Uji	22
Pembuatan Larutan Stok	23



III.8 Pengujian Pembentukan Biofilm <i>Escherichia coli</i>	23
III.9 Pengujian Penghambatan Biofilm <i>Escherichia coli</i>	23
III.10 Analisis Data, Pembahasan dan Penarikan Kesimpulan	24
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	25
IV.1 Ekstraksi dan Fraksinasi	25
IV.2 Pembentukan Biofilm <i>Escherichia coli</i>	28
IV.3 Penghambatan Biofilm <i>Escherichia coli</i>	29
BAB V PENUTUP	33
V.1 Kesimpulan	33
V.2 Saran	33
DAFTAR PUSTAKA	34
LAMPIRAN	39



DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1. Berat ekstrak etanol dan hasil fraksinasi	26
2. Persentase penghambatan biofilm <i>Escherichia coli</i> dari fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air herba Sambiloto	29
3. Hasil pengukuran nilai absorbansi penghambatan biofilm <i>Escherichia coli</i> dari fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air herba Sambiloto	41
4. Hasil perhitungan persentase penghambatan biofilm <i>Escherichia coli</i> dari fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air herba Sambiloto	44
5. Hasil ANOVA <i>One Way</i> persentase penghambatan biofilm <i>Escherichia coli</i> dari fraksi n-heksan herba Sambiloto	46
6. Hasil ANOVA <i>One Way</i> persentase penghambatan biofilm <i>Escherichia coli</i> dari fraksi etil asetat herba Sambiloto	46
7. Hasil ANOVA <i>One Way</i> persentase penghambatan biofilm <i>Escherichia coli</i> dari fraksi air herba Sambiloto	47



DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Pengaruh quorum sensing terhadap siklus pengembangan biofilm	4
2. Proses pembentukan biofilm	5
3. Sistem <i>quorum sensing</i> pada <i>Escherichia coli</i>	8
4. Sambiloto (<i>Andrographis paniculata</i> (Burm.f) Nees.)	9
5. Struktur molekul andrografolida	11
6. Biosintesis andrografolida	12
7. Gambar kromatogram fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air dengan campuran eluen n-heksan : etil asetat (1:1)	27
8. Gambar kromatogram fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air dengan campuran eluen metanol : kloroform (1:9)	27
9. Hasil pewarnaan pada wells untuk pembentukan biofilm	28
10. Grafik persentase penghambatan biofilm <i>Escherichia coli</i> dari fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air herba Sambiloto	30
11. Hasil fraksinasi ekstrak etanol herba Sambiloto	48
12. Hasil pengujian pembentukan dan penghambatan biofilm <i>Escherichia coli</i> pada <i>microplate</i>	48



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Skema kerja	39
2. Hasil pengukuran	41
3. Perhitungan	42
4. Dokumentasi penelitian	48
5. Kunci determinasi tanaman	49



BAB I

PENDAHULUAN

I.1 Latar Belakang

Bakteri berkomunikasi dengan satu sama lain menggunakan molekul sinyal organik yang disebut *autoinducer*. Komunikasi antarsel bakteri berdasarkan *autoinducer* dapat disebut sebagai *quorum sensing* (Li dkk, 2007). Quorum sensing adalah proses dimana bakteri memproduksi dan mendeteksi molekul sinyal yang mengkoordinasikan perilakunya dalam kepadatan sel, salah satunya adalah pembentukan biofilm. Ada tiga sistem quorum sensing utama yaitu : *acylhomoserine lactone* (AHL), *autoinducing peptide* (AIP), dan *autoinducer-2* (AI-2) (Brackman dan Coenye, 2015).

Escherichia coli merupakan bakteri anaerobik fakultatif pada saluran gastrointestinal yang menggunakan sistem quorum sensing dengan *autoinducer-2* (AI-2) (Beloin dkk, 2008). Selain pembentukan biofilm, AI-2 ini juga mengontrol kemotaksis, sintesis flagela, motilitas, dan faktor virulensi pada *Escherichia coli* (Barrios dkk, 2006).

Senyawa alami tertentu dari suatu tanaman telah lama dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri, misalnya pada sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees.). Sambiloto merupakan salah satu dari ~~sebilan~~ tanaman obat tradisional yang diunggulkan untuk dikaji sampai uji klinis. Kandungan zat aktif dari tanaman ini adalah ~~afolida~~, yang berasal dari komponen lakton. Efek farmakologi dari



sambiloto diantaranya sebagai antioksidan, antidiabetik, antifertilitas, antimalarial, antidiare, dan hepatoprotektif (Widyawati, 2007).

Mishra dkk (2009) telah melakukan penelitian terhadap ekstrak etanol dari sambiloto dalam menghambat pertumbuhan *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella boydii*, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhimurium*, dan *Vibrio cholerae*. Sawitti dkk (2013) menyebutkan bahwa perasan daun sambiloto secara signifikan mampu menghambat pertumbuhan *Escherichia coli*. Septian dkk (2016) telah melakukan penelitian terhadap fraksi etil asetat daun sambiloto terhadap *Escherichia coli*. Banji dkk (2017) juga telah melakukan penelitian aktivitas antimikroba dari ekstrak metanol daun sambiloto dan fraksi-fraksinya terhadap *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, dan *Candida albicans*. Banerjee dkk (2017) telah melakukan penelitian tentang *Andro* (andrografolida), senyawa diterpenoid lakton dari sambiloto yang menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Escherichia coli*.

Sambiloto juga diketahui memiliki aktivitas antibiofilm yang potensial. Murugan dkk (2013) menyebutkan bahwa ekstrak sambiloto terbukti memiliki aktivitas penghambatan pertumbuhan dan biofilm terhadap isolat klinis *Pseudomonas aeruginosa* dari pasien *cystic fibrosis*.

Arjuna (2016) telah melakukan penelitian tentang aktivitas antibiofilm

sambiloto terhadap MDR *Staphylococcus aureus* dari mekanisme penghambatan quorum sensing.



Namun, dari penelitian-penelitian di atas diketahui bahwa belum ada yang melakukan penelitian tentang fraksi dari ekstrak etanol herba sambiloto terhadap aktivitas penghambatan biofilm pada *Escherichia coli*.

I.2 Rumusan Masalah Penelitian

Bagaimana pengaruh fraksi dari ekstrak etanol herba sambiloto terhadap penghambatan *quorum sensing Escherichia coli*?

I.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui pengaruh fraksi dari ekstrak etanol herba sambiloto terhadap penghambatan *quorum sensing Escherichia coli* dilihat dari persentase penghambatan biofilm.

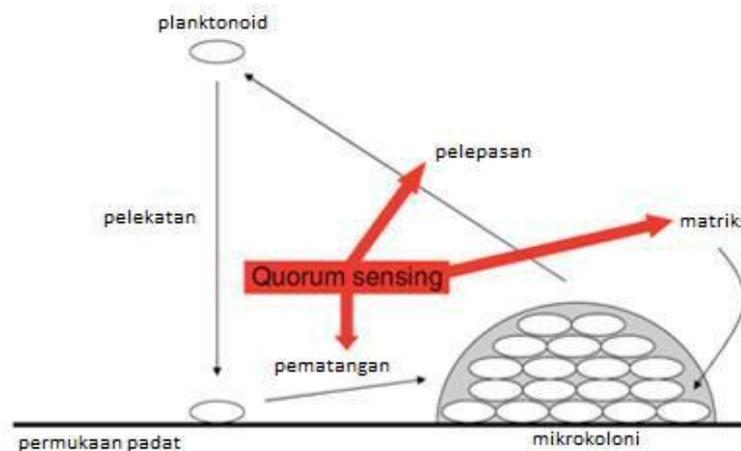


BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 Quorum Sensing

Quorum sensing (QS) adalah proses dimana bakteri memproduksi dan mendeteksi molekul sinyal dan dengan demikian mengkoordinasikan perilakunya dalam kepadatan sel (Brackman dan Coenye, 2015). QS dapat berfungsi untuk mengendalikan ukuran populasi dalam biofilm. Pembentukan biofilm telah digambarkan sebagai siklus pengembangan (Gambar 1). Untuk spesies nonmotil, QS mungkin berfungsi untuk mengatur kepadatan populasi sel dalam biofilm dengan menggunakan mekanisme yang berbeda. Beberapa bakteri Gram positif melakukan autolisis sebagai respons untuk mencapai kuorum (Irie dan Parsek, 2008).



Gambar 1. Pengaruh quorum sensing terhadap siklus pengembangan biofilm

(Irie dan Parsek, 2008)



akhirnya, QS dapat menginduksi perilaku dalam sel biofilm yang
ah jalannya pengembangan biofilm. Sebagai alternatif, QS dapat

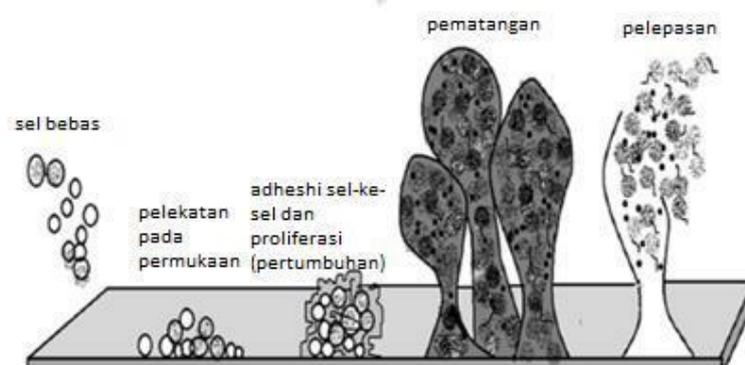
menginduksi atau menekan aktivitas kelompok seperti permukaan motilitas, yang pada gilirannya bisa memiliki dampak besar pada struktur biofilm (Irie dan Parsek, 2008).

II.2 Biofilm

Biofilm adalah asosiasi mikroorganisme dimana sel saling menempel pada permukaan yang terbungkus matriks zat polimer ekstraselular yang disebut EPS, seperti protein (<1-2%), DNA (<1%), polisakarida (1-2%) dan di samping komponen ini, air (sampai 97%) adalah bagian utama dari biofilm yang bertanggung jawab atas aliran nutrisi di dalam matriks biofilm (Jamal dkk, 2015).

Pembentukan biofilm terdiri dari beberapa langkah penting seperti

1) pelekatan pada permukaan; 2) pembentukan mikrokoloni, 3) pembentukan struktur yang luas, dan 4) pembentukan biofilm, pematangan dan pelepasan (penyebaran) (Jamal dkk, 2015).



Gambar 2. Proses pembentukan biofilm (Jamal dkk, 2015)

enurut Sharma dkk (2016), ada empat langkah utama yang alam pembentukan biofilm : (i) adhesi awal atau pelekatan



(reversibel); (ii) pengembangan struktur biofilm awal (ireversibel); (iii) pematangan dari biofilm yang dikembangkan dan (iv) pelepasan sel dari biofilm kembali ke keadaan planktonoid.

1. Adhesi awal

Biofilm dapat terbentuk di lingkungan menguntungkan dengan kondisi nutrisi yang tepat. Permukaan untuk melekat bagi sel dapat berupa abiotik seperti logam, kaca, plastik, implant medis, *stainless steel* atau biotik seperti sel epitel, kulit manusia dan jaringan hewan. Selain kondisi lingkungan seperti suhu, pH dan kekuatan ionik mediumnya, ada juga elektrostatis yang mematenkan dan kekuatan hidrodinamik di lingkungan cair yang menghambat pembentukan biofilm. Motilitas merupakan faktor penting untuk adhesi tapi bakteri nonmotil juga bisa melekat ke permukaan dengan ekspresi faktor adhesi yang kuat.

2. Pengembangan awal biofilm

Selama fase awal pengembangan biofilm, sintesis dari flagela ditekan sebagai pelekatan ke permukaan membuat sel yang melekat dalam keadaan sesil. Organel pelekatan seperti tipe 1 fimbriae dan curli fimbriae memainkan peran besar dalam ikatan *Escherichia coli* yang ireversibel ke permukaan (Wood, 2009). Tipe 1 fimbriae atau pili, ditemukan di *Escherichia coli*, penting untuk

pelekatan awal pada permukaan abiotik dan dikodekan oleh gen *fliC*. Ekspresi gen ini diinduksi oleh adhesi dan perkembangan awal



biofilm. Curli fimbriae, dikodekan oleh gen *csg*, adalah struktur ekstraselular yang melekat pada protein matriks ekstraselular. Gen ini juga menyediakan adhesi untuk permukaan abiotik dengan meningkatkan interaksi sel-ke-permukaan kemudian memfasilitasi komunikasi sel-ke-sel (Beloin dkk, 2008).

3. Pematangan

Begitu sel-sel melekat dengan kuat ke permukaan, mereka mulai bergabung melalui interaksi sel-ke-sel. Bakteri dalam fase pematangan juga menghasilkan matriks ekstraselular yang menyediakan struktur tiga dimensi untuk biofilm. Autotransporter (untuk interaksi sel-ke-sel) dan EPS (untuk pembentukan matriks) penting untuk pematangan biofilm.

4. Penyebaran

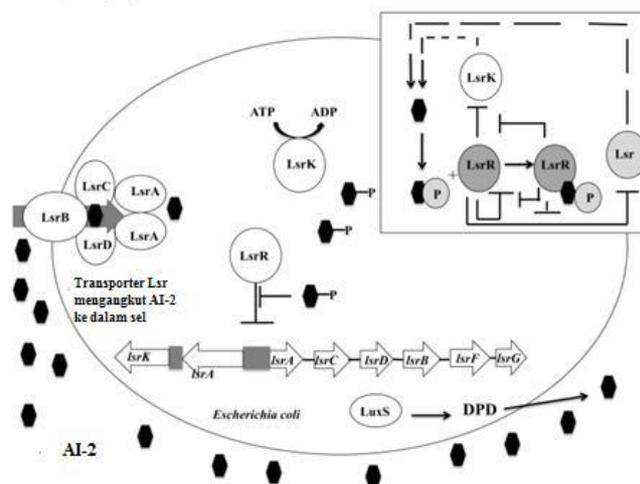
Langkah terakhir ini meliputi pelepasan bakteri dari biofilm matang dan penyebarannya, yaitu transmisi dari bakteri ke keadaan planktonoid, yang bisa masuk di tempat yang jauh dan membentuk biofilm. Pelepasan bisa terjadi sebagai hasil dari degradasi enzimatik dari matriks biofilm dan QS dalam merespon perubahan lingkungan yang terkait dengan tingkat gizi dan penipisan oksigen oleh beberapa kekuatan eksternal.

II.3 Autoinducer-2 (AI-2)

Autoinducer-2 (AI-2) terbentuk dari reaksi pembelahan terkatalisis dari S-ribosilhomosistein menjadi 4,5-dihidroksi-2,3-pentanedion



(DPD) dan homosistein. Sistem *LuxS* di *Escherichia coli* memiliki AI-2 sebagai perantara molekul *quorum sensing*. Sistem *LuxS* mungkin juga memiliki peran dalam metabolisme sel melalui siklus metil teraktivasi intraseluler, bersama dengan naik dan turunnya gen yang berhubungan dengan *quorum sensing*.



Gambar 3. Sistem *quorum sensing* pada *Escherichia coli* (Lavery dkk, 2014)

Konsentrasi AI-2 ekstraseluler mencapai puncaknya pada fase eksponensial menengah hingga akhir dengan penurunan besar ketika bakteri memasuki fase stasioner, tetapi tidak ada penurunan relatif kadar protein *Lux* pada fase pertumbuhan stasioner. Penurunan konsentrasi AI-2 pada awal fase stasioner, sesuai dengan peningkatan penyerapan AI-2 ke dalam sel melalui pengikat ATP yang dianggap sebagai transporter *Lsr* yang dengan sendirinya diatur oleh *LuxS*. Penyerapan AI-2, melalui mekanisme transpor aktif alternatif atau difusi, mungkin disebabkan oleh faktor yang membutuhkan AI-2 untuk mengatur ekspresi gen dan yang mematikan respons metabolik dan seluler eksternal.



Transporter *Lsr* dikodekan oleh operon *IsrABCD*, dimana *LsrB* diperlukan untuk transpor AI-2 ke dalam sel, yang transkripsinya sendiri diatur melalui protein *LsrK* dan *LsrR* (ditranskripsi dari operon *IsrRK*). *LsrK*, hadir dalam sitoplasma, adalah kinase yang menyumbangkan gugus fosfat ke AI-2, yang memungkinkan AI-2 terfosforilasi untuk berikatan dengan *LsrR* (Gambar 3) (Lavery dkk, 2014).

II.4 Uraian Tanaman

II.4.1 Klasifikasi

Kingdom : Plantae
Divisi : Angiospermae
Kelas : Dicotyledoneae
Ordo : Personales
Famili : Acanthaceae
Genus : *Andrographis*
Spesies : *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees. (Elumalai dkk, 2016)



Gambar 4. Sambiloto (*Andrographis paniculata* (Burm.f.) Nees)
(Dokumentasi peneliti)



II.4.2 Nama Daerah dan Nama Asing

Sambiloto dikenal dengan berbagai nama. Masyarakat Jawa Tengah dan Jawa Timur menyebutnya dengan nama bidara, sambitroto, sandiroto, sadilata, takilo, dan paitan. Di Jawa Barat disebut ki oray, takila, atau ki peurat. Di Bali lebih dikenal dengan nama sambiroto. Masyarakat Sumatera dan sebagian masyarakat Melayu menyebutnya dengan pepaitan atau ampadu. Sementara itu nama-nama asing sambiloto adalah *chuan xin lian*, *yi xian xi*, dan *lan he lian* (China), *kalmegh*, *kirayat*, dan *kirata* (India), *nilavenbu* (Tamil), *xuyen tam lien* dan *cong-cong* (Vietnam), *quasabhuvu* (Arab), *nainehavandi* (Persia), *green chirreta* dan *king of bitter* (Inggris) (Rosidah, 2010).

II.4.3 Morfologi

Sambiloto tergolong terna (herba), tumbuh tegak, tinggi sekitar 50 cm; tanaman semusim; dan rasa sangat pahit. Batang berkayu, pangkal bulat, bentuk segi empat saat muda, dan bulat setelah tua, percabangan monopodial, berwarna hijau. Daun tunggal, berhadapan, bentuk lanset, tepi rata (interger), ujung dan pangkal tajam atau runcing, daun bagian atas dari batang berbentuk seperti braktea, permukaan halus, berwarna hijau tidak ada stipula (daun penumpu), berukuran 3-12 cm x 1-3 cm. Bunga kecil; biseksual; zigomorf; sepal (daun kelopak) 5 buah, petal (taiuk) 5 buah (Wijayakusuma, 1992).



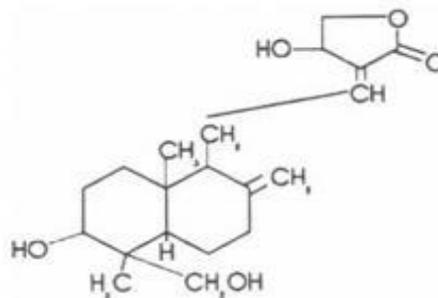
II.4.4 Tempat Tumbuh

Sambiloto mampu tumbuh di ketinggian 1-1600 m di atas permukaan laut atau dari dataran rendah sampai daerah pegunungan. Sambiloto dapat tumbuh pada semua jenis tanah yang subur, mengandung banyak humus, tata udara dan pengairan yang baik. Sambiloto tumbuh optimal pada tingkat kemasaman tanah 6-7 (netral) (Wijayakusuma, 1992).

II.4.5 Kandungan Kimia

Ekstrak tanaman Sambiloto diketahui mengandung diterpen, flavonoid dan stigmasterols. Flavonoid hadir lebih banyak di akar dan daun. Dari fraksi terlarut ekstrak etanol atau metanol, 5-hidroksi-7,8-dimetoksiflavan, 5-hidroksi-7,8,2',5'-tetrametoksiflavan, 5-hidroksi-7,8,2'-trimetoksiflavan, 7-O-metilwogonin dan 2'-metil eter diisolasi sebagai flavonoid utama (Elumalai dkk, 2016).

II.4.6 Andrografolida

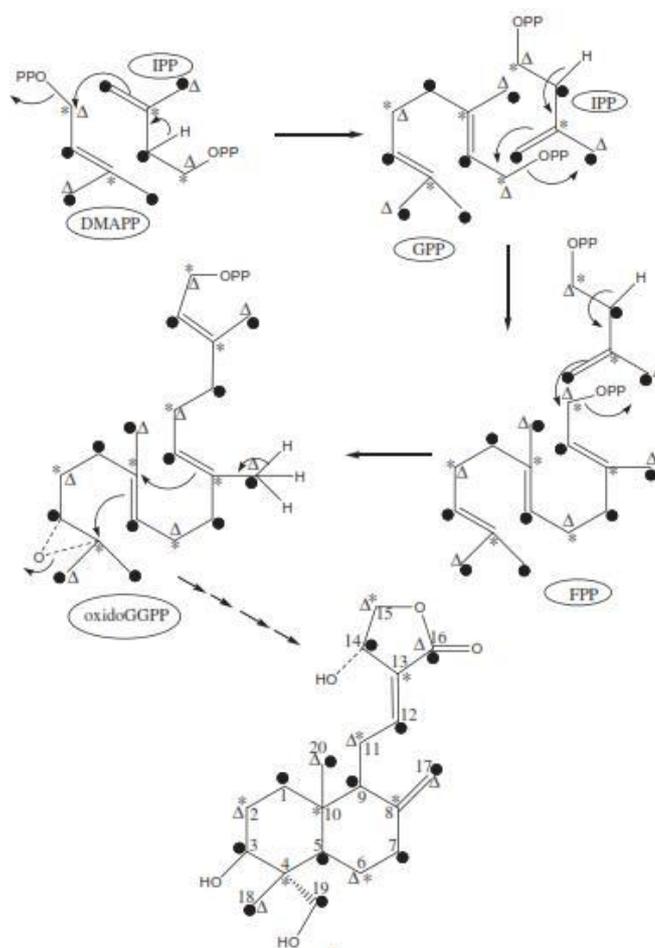


Gambar 5. Struktur molekul andrografolida (Elumalai dkk, 2016)

Andrografolida (Gambar 5) adalah konstituen utama yang memiliki molekul sebagai $C_{20}H_{30}O_5$, dan diyakini sebagai penyusun aktif



untuk aktivitas biologis dan mewakili sebagai indikator identitas tanaman.
(Elumalai dkk, 2016).



Gambar 6. Rute biosintesis dari andrografolida (Srivastava dan Akhila, 2010).

Biosintesis andrografolida (Gambar 6) dimulai dengan penambahan isopentenil pirofosfat (IPP) ke dimetilalil pirofosfat (DMAPP) dimana IPP dan DMAPP merupakan prekursor dari isoprenoid yang disintesis melalui jalur asam mevalonat (MVA) atau jalur deoksixilulosa (DXP) sehingga membentuk geranyl pirofosfat (GPP). Molekul lain dari IPP kemudian

menyusul, menghasilkan farnesil pirofosfat (FPP). Molekul IPP akhirnya berikatan ke tulang punggung diterpen. Ikatan rangkap yang berasal



dari DMAPP dioksidasi menjadi epoksida sebelum kaskade penutupan cincin yang membentuk dua cincin beranggotakan enam. Serangkaian oksidasi membentuk lakton beranggota lima selain menambahkan pada kelompok alkohol (Srivastava dan Akhila, 2010).

II.5 Uraian Bakteri Uji

II.5.1 Klasifikasi

Domain : Bacteria
 Filum : Proteobacteria
 Kelas : Gammaproteobacteria
 Ordo : Enterobacteriales
 Famili : Enterobacteriaceae
 Genus : *Escherichia*
 Spesies : *Escherichia coli*

II.5.2 Morfologi

Escherichia coli merupakan bakteri berbentuk batang, tipe Gram negatif, tidak berkapsul, umumnya mempunyai fibria dan bersifat motil. Sel *Escherichia coli* mempunyai ukuran panjang 2,0-6,0 mm dan lebar 1,1-1,5 mm, tersusun tunggal atau berpasangan (Pelczar dan Chan, 1998).

Bakteri ini dapat tumbuh secara anaerob fakultatif (umumnya bersifat kemoheterotrof). Nilai pH umum untuk pertumbuhannya adalah

serta kisaran suhu optimum untuk pertumbuhannya adalah 37°C

(dkk, 1995).



II.6 Ekstraksi dan Fraksinasi

II.6.1 Ekstraksi

Ekstraksi adalah proses penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair. Dengan diketahui senyawa aktif yang dikandung simplisia akan mempermudah pemilihan pelarut dengan cara ekstraksi yang tepat (Ditjen POM, 1995).

Menurut Departemen Kesehatan RI (2000), beberapa metode ekstraksi dengan menggunakan pelarut yaitu :

a. Cara dingin

1. Maserasi adalah proses penyarian simplisia dengan cara perendaman menggunakan pelarut dengan sesekali pengadukan pada suhu kamar. Penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan terhadap maserat pertama dan seterusnya disebut remaserasi.

2. Perkolasi adalah proses penyarian simplisia dengan pelarut yang selalu baru sampai terjadi penyarian sempurna yang umumnya dilakukan pada temperatur kamar. Proses perkolasi terdiri dari tahap pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetesan/ penampungan ekstrak) terus menerus sampai diperoleh perkolat yang jumlahnya 1-5 kali bahan.



b. Cara panas

1. Refluks adalah proses penyarian simplisia dengan menggunakan alat pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik.
2. Digesti adalah proses penyarian dengan pengadukan kontinu pada temperatur lebih tinggi dari temperatur ruangan, yaitu secara umum dilakukan pada temperatur 40-50°C.
3. Sokletasi adalah proses penyarian dengan menggunakan pelarut yang selalu baru, dilakukan menggunakan alat soklet sehingga terjadi ekstraksi kontinu dengan pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik.
4. Infudansi adalah proses penyarian dengan menggunakan pelarut air pada temperatur 90°C selama 15 menit.
5. Dekoktasi adalah proses penyarian dengan menggunakan pelarut air pada temperatur 90°C selama 30 menit.

II.6.2 Fraksinasi (Ekstraksi Cair-Cair)

Fraksinasi adalah suatu metode pemisahan senyawa organik berdasarkan kelarutan senyawa-senyawa tersebut dalam dua pelarut yang tidak saling bercampur, biasanya antara pelarut air dan pelarut organik seperti metanol, etanol, etil asetat, *n*-heksana dan petroleum eter (Basset

4).



Teknik pemisahan ekstraksi cair-cair ini biasanya dilakukan dengan menggunakan corong pisah. Kedua pelarut yang saling tidak bercampur tersebut dimasukkan ke dalam corong pisah, kemudian digojok dan didiamkan. Solut atau senyawa organik akan terdistribusi ke dalam fasenya masing-masing bergantung pada kelarutannya terhadap fase tersebut dan kemudian akan terbentuk dua lapisan, yaitu lapisan atas dan lapisan bawah yang dapat dipisahkan dengan membuka kunci pipa corong pisah (Odugbemi, 2008).

Sekilas ada banyak pelarut yang dapat digunakan untuk metode ini, namun ternyata ada banyak pelarut yang tidak memenuhi syarat. Pertama, pelarut harus tidak bercampur dengan air, mempunyai titik didih yang rendah (jika digunakan untuk evaporasi) dan sebaiknya memiliki densitas yang lebih rendah daripada air (untuk membentuk lapisan atas sehingga pemisahan lebih mudah dilakukan). Kedua, pelarut harus aman dan tidak merusak lingkungan jika digunakan. Banyak pelarut yang tidak aman digunakan karena berbagai alasan seperti dietil eter (mudah terbakar), toluen (memiliki titik didih yang tinggi), benzen (keamanan), dan pelarut klorida seperti diklorometana (berbahaya bagi lingkungan). Praktisnya, hanya ada beberapa pelarut saja yang biasa digunakan seperti n-heksana, metil tertier butil eter dan etil asetat (Venn, 2008).

II.7 Kromatografi Lapis Tipis



Kromatografi lapis tipis merupakan suatu teknik pemisahan dengan menggunakan adsorben (fase stasioner) berupa lapisan tipis seragam

yang disalutkan pada permukaan bidang datar berupa lempeng kaca, pelat aluminium atau pelat plastik dan pengembangan kromatografi terjadi ketika fase gerak tertapis melewati adsorben (Basset dkk, 1994)

Jarak pengembangan senyawa pada kromatogram biasanya dinyatakan dengan angka Rf (*Retardation factor*). Nilai Rf didefinisikan sebagai perbandingan antara jarak yang ditempuh senyawa dengan jarak yang ditempuh pelarut pengembang (Waksmundzka-Hajnos dkk, 2008).

$$Rf = \frac{\text{jarak yang ditempuh oleh senyawa}}{\text{jarak yang ditempuh eluen}} \times 100\%$$

II.8 Uji Plat Mikrotiter (*Microtiter Plate Assay*)

Uji plat mikrotiter adalah alat penting untuk mempelajari tahap awal pembentukan biofilm, dan telah diterapkan terutama untuk studi biofilm bakteri, meskipun pengujian ini juga telah digunakan untuk mempelajari pembentukan biofilm jamur. Karena pengujian ini menggunakan kondisi pertumbuhan statis, itu tidak memungkinkan untuk pembentukan biofilm yang matang yang biasanya terkait dengan sistem sel aliran. Namun pengujiannya telah dilakukan efektif dalam mengidentifikasi banyak faktor yang diperlukan untuk inisiasi pembentukan biofilm (yaitu flagella, fili, adhesin, enzim yang terlibat dalam pengikatan dan metabolisme siklik-di-GMP) dan juga gen yang terlibat dalam produksi polisakarida ekstraseluler. Selanjutnya karya yang diterbitkan menunjukkan biofilm yang ditanam pada plat mikrotiter memang mengembangkan beberapa sifat biofilm dewasa, seperti toleransi antibiotik dan ketahanan terhadap kekebalan tubuh (O'Toole, 2011).



Alat uji mikrotiter sederhana ini memungkinkan pembentukan biofilm di dinding dan/atau bagian bawah plat mikrotiter. Sifat *throughput* yang tinggi dari pengujian membuatnya berguna untuk layar genetik, serta pengujian pembentukan biofilm oleh beberapa strain di bawah berbagai kondisi pertumbuhan. Varian dari pengujian ini telah digunakan untuk menilai pembentukan biofilm awal untuk berbagai macam mikroba, termasuk tidak terbatas pada *Pseudomonas*, *Vibrio cholera*, *Escherichia coli*, *Staphylococci*, *Enterococci*, *Mycobacteria* dan jamur (O'Toole, 2011).

Plat mikrotiter (juga disebut *96-well plate*) untuk mempelajari pembentukan biofilm adalah metode yang memungkinkan pengamatan kepatuhan bakteri ke permukaan abiotik. Dalam pengujian ini, bakteri diinkubasi dengan plat vinil bawah "U" atau jenis plat mikrotiter *96-well* lainnya. Setelah inkubasi, bakteri planktonik dibilas, dan bakteri pengikutnya yang tersisa (biofilm) diwarnai dengan pewarna kristal violet, sehingga memungkinkan visualisasi biofilm. Jika kuantisasi diinginkan, biofilm yang diwarnai dilarutkan dan dipindahkan ke plat bawah datar *96-well* optikal untuk pengukuran dengan spektrofotometri (Coffey, 2014).

II.9 *Microplate Reader*

Microplate reader adalah suatu alat yang digunakan untuk membaca plat mikro (*microplate*), berupa spektrofotometer khusus yang telah dirancang berbeda dengan spektrofotometer konvensional yang

melitiasi pembacaan pada berbagai panjang gelombang. *Microplate* memiliki filter yang memberi batasan rentang panjang gelombang



yang umumnya digunakan antara 400-750 nm, namun ada beberapa yang beroperasi pada kisaran panjang gelombang antara 340-700 nm. Sistem optik yang banyak dimanfaatkan oleh banyak produsen menggunakan serat optik dalam menyuplai cahaya untuk sumuran plat mikro yang berisi sampel. Berkas cahaya yang melewati sampel memiliki diameter yang berkisar antara 1-3 mm. Suatu sistem deteksi mendeteksi cahaya dari sampel, menguatkan sinyal dan menentukan absorbansi sampel. Selanjutnya suatu sistem pembacaan mengubahnya menjadi data yang memungkinkan interpretasi hasil pengujian (WHO, 2008).

