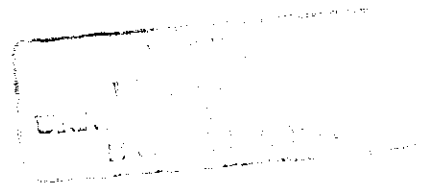


TESIS

**AKTIVITAS ANDROGRAFOLIDA
ISOLAT DARI *Andrographis paniculata* Nees.
TERHADAP BAKTERI *Enteroinvasive
Escherichia coli (EIEC) in vitro***

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS



NIKMAH MADJID

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2004**

TESIS

**AKTIVITAS ANDROGRAFOLIDA
ISOLAT DARI *Andrographis paniculata* Nees.
TERHADAP BAKTERI *Enteroinvasive
Escherichia coli (EIEC) in vitro***



**NIKMAH MADJID
NIM. 090114225M**

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2004**

**AKTIVITAS ANDROGRAFOLIDA
ISOLAT DARI *Andrographis paniculata* Nees.
TERHADAP BAKTERI *Enteroinvasive
Escherichia coli* (EIEC) *in vitro***

TESIS

Untuk memperoleh Gelar Magister
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar
pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga

Oleh

NIKMAH MADJID
NIM. 090114225M

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

Tanggal 12 Februari 2004

Lembar Pengesahan

TESIS INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL 12 FEBRUARI 2004

Oleh :

Pembimbing Ketua



Dr. H. Eddy Bagus Wasito, dr., MS., Sp.MK
NIP. 130676011

Pembimbing



Dra. Marijam Purwanta, M.Sc., Apt.
NIP. 131791033

Telah diuji pada

Tanggal 12 Februari 2004

PANITIA PENGUJI TESIS

Ketua : M.L. Inge Lusida, dr., M.Kes., Sp.MK., Ph.D

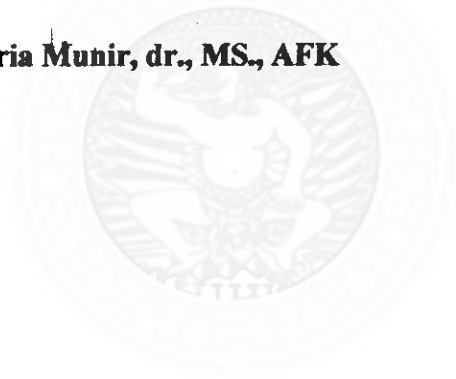
Anggota : Dr. H. Eddy Bagus Wasito, dr., MS., Sp.MK

Dra. Marijam Purwanta, M.Sc., Apt

Prof. Dr. H. Sarmanu, drh., MS

Lindawati Alimsardjono, dr., M.Kes., Sp.MK

Ratna Sofaria Munir, dr., MS., AFK



UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah, Wasyukurillah saya panjatkan kehadirat Illaahi Robbi, karena hanya dengan Rahmat dan izin-Nya jualah sehingga tesis yang berjudul “Aktivitas *Andrografolida* isolat dari *A. paniculata* Nees. Terhadap *EIEC in vitro*”, dapat diselesaikan dengan baik.

Ucapan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya sampaikan kepada Bapak Dr. H. Eddy Bagus Wasito, dr. MS., Sp.MK, selaku pembimbing ketua sekaligus dosen saya selama kuliah di Mikrobiologi, sebagai Ketua Minat Mikrobiologi Ilmu Kedokteran Dasar Program Pascasarjana Unair, dan juga sebagai Penanggung Jawab Laboratorium Gastroenteritis *Tropical Disease Center (TDC)* Unair tempat saya melakukan penelitian, beliau dengan sabar dan penuh perhatian membimbing, memotivasi, memberi saran dan meluangkan waktu setiap saya perlukan mulai dari penyusunan proposal hingga penulisan tesis ini selesai.

Terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya sampaikan kepada Ibu Dra. Marijam Purwanta, M.Sc.,Apt, selaku Pembimbing sekaligus dosen saya selama kuliah, yang selalu meluangkan waktu bila saya perlukan, memberi perhatian, motivasi, bimbingan dan saran, mulai dari penyusunan proposal hingga penyelesaian tesis ini.

Terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya sampaikan kepada:

Prof. Dr. H. Sarmanu, drh., MS, selaku konsultan dalam penelitian ini.

Ibu Ratna Sofaria Munir, dr., MS., AFK; Ibu Lindawati Alimsardjono, dr., M.Kes., Sp.MK; dan Ibu M.L. Inge Lusida, dr., M.Kes., Sp. MK., Ph.D., di tengah kesibukan beliau-beliau, dengan sabar membimbing, memotivai dan memasukkan saran, selama penulisan proposal hingga penulisan tesis ini.

Ucapan terima kasih dan penghargaan yang tulus saya sampaikan kepada Mas Sugeng, yang dengan segala pengorbanannya meluangkan waktu, membantu dan mendampingi saya selama penelitian "*true eksperiment design*" berlangsung.

Ucapan terima kasih tak lupa saya sampaikan kepada :

1. Rektor Unair Prof. DR. Med., dr., Puruhito, SpB.,TKV., atas kesempatan yang diberikan dan fasilitas yang disediakan untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan pada Program Magister di Unair.
2. Direktur Program Pascasarjana Unair, Prof. DR. H. Muhammad Amin, dr., SpP., dan seluruh stafnya, yang telah menerima dan memberikan kesempatan kepada saya menjadi mahasiswa Program Magister pada Program Pascasarjana Unair, Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar (IKD).
3. Ketua Program Studi IKD, Prof. Soetjipto, dr. MS.,Ph.D., telah banyak membantu selama saya mengikuti pendidikan di Pascasarjana Unair.
4. Seluruh Dosen Minat Mikrobiologi, dan Dosen pada Program Pascasarjana Unair, yang telah mengajar, membimbing, memotivasi saya selama mengikuti kuliah.
5. Ketua laboratorium TDC dan stafnya yang telah banyak membantu menyediakan fasilitas sehubungan dengan penelitian ini.

6. Rektor, Dekan FKIP, Ketua Jurusan MIPA dan Ketua Program Studi Biologi Universitas Nusa Cendana Kupang tempat saya bekerja, yang telah memberikan izin dan motivasi buat saya untuk melanjutkan studi pada Program Magister Pascasarjana Unair Surabaya.

Terima kasih yang sebesar-besarnya saya sampaikan kepada orang tua tercinta Ayahanda BM. Diah, yang telah mengasuh, membimbing hingga menjadi anak yang berguna, mendo'akan keberhasilan saya dan Ibunda Hj. Djuria (Alm) yang tidak sempat menyaksikan keberhasilan saya. Saudara-saudaraku di Palu Sulawesi Tengah telah banyak memotivasi dan memberi bantuan baik moril maupun materil.

Terima kasih yang tak terhingga khususnya buat sang suami tercinta Abdul. Madjid Drs., yang selalu bersama dalam suka maupun duka, memotivasi, membantu baik moril maupun material, juga buat anak-anakku tersayang yang menjadi inspirasiku dan motivasiku; Muhammad Abni Setiawan (Abi) dan Syahrurromadhon (Arul) yang penuh kesabaran, ketabahan, pengertian dan kerelaan untuk selalu saya tinggalkan mengikuti kesibukkan kuliah dan penelitian hingga pendidikan saya selesai.

Kepada teman-teman seminat studi angkatan tahun 2001:

Bambang Susilo, dr., M.Kes, Sp.MK; Dewi Santosaningsih, dr., M.Kes; Rosmelati Situmeang, drh., M.Kes; Yunita Arliny, dr., M.Kes; Retno Budiarty, dr., M.Kes; Indira, drg., M.Kes; Ahmad Muhlisin, S.Pd, M.Kes; Erni Yohani Mahtuti, S.Pd, M.Kes; Laksmi Kadir S.Pd, M.Kes; Atik, drg., M.Kes, dan Dharwin S, drh., atas

kerjasama yang baik selama kuliah tidak akan saya lupakan selamanya, terima kasih semuanya.

Akhirnya saya menyampaikan permohonan maaf atas segala kesalahan dan kekhilafan selama mengikuti pendidikan pada Program Magister Unair. Semoga Allah SWT. senantiasa melimpahkan Rahmat dan perlindunganNya kepada kita sekalian, Amin.



RINGKASAN

AKTIVITAS ANDROGRAFOLIDA ISOLAT DARI *Andrographis paniculata* Nees. TERHADAP BAKTERI *Enteroinvasive Escherichia coli* (EIEC) *in vitro*

Nikmah Madjid

Enteroinvasive Escherichia coli (EIEC) adalah bakteri yang tergolong dalam kelompok suku *Enterobacteriaceae*, salah satu bakteri yang menimbulkan gejala klinis mirip *Shigella* yaitu menyebabkan penyakit diare berdarah (*bloody diarrhoea*). Pada beberapa negara berkembang termasuk Indonesia, kira-kira 10% dari episode diare pada anak yang berumur di bawah 5 tahun adalah diare berdarah, dan dibanding dengan "*watery diarrhoea*", umumnya "*bloody diarrhoea*" waktunya lebih lama, lebih banyak komplikasi serta menyebabkan lebih banyak masalah gangguan pertumbuhan pada anak dan menimbulkan lebih tinggi angka kematian.

Upaya untuk kelangsungan hidup manusia terutama anak, termasuk pemberantasan penyakit diare merupakan program prioritas. Upaya ini diwujudkan melalui penurunan angka kematian dan pencegahan penyakit diare.

Dengan memperhatikan beberapa aspek terapi diare dengan antibiotik yang lazim digunakan, apalagi penggunaan antibiotik yang harus dengan resep dan mahal, dan upaya menunjang penanganan diare di rumah sakit, penulis berkeinginan melakukan penelitian tentang aktivitas tanaman obat-obatan sebagai antidiare.

Di seluruh dunia terdapat lebih kurang 600.000 jenis tumbuh-tumbuhan, lebih kurang 400.000 diantaranya merupakan tanaman tinggi, tetapi baru sekitar 10% diantaranya telah diteliti secara kimia dan farmakologi. Salah satu tanaman yang banyak digunakan masyarakat sebagai obat tradisional adalah *Andrographis paniculata* Nees. atau lebih dikenal sebagai Sambiloto.

Telah diketahui khasiat tanaman *Andrographis paniculata* Nees. sebagai antimalaria, *tonicum* (penambah nafsu makan), *anodyne* (pemati rasa nyeri), *astringent* (zat yang menciutkan), diabetes, influenza, bronkitis, piles (wasir), *gonorrhoea*, hepatomegali, penyakit kulit, demam dan cacingan, bahkan berguna sebagai antidiare, antidisentri dan menyembuhkan kolera yang merupakan penyakit yang menyerang sistem gastrointestinal.

Andrografolida ($C_{20}H_{30}O_5$) adalah senyawa diterpenoid lakton, yang merupakan kandungan kimia utama dari *A. paniculata* Nees., berbentuk serbuk kristal berwarna putih, terasa pahit, dan berbentuk lempeng segi empat dengan titik lebur / leleh (t.l.) $230^{\circ}C - 239^{\circ}C$, mempunyai berat molekul 350, praktis tidak larut dalam air (0.004% atau 1 : 25.000) tapi larut dalam pelarut organik seperti metanol, etanol, aseton, kloroform dan eter. Gugus lakton pada andrografolida merupakan gugus yang aktif. Dari penelitian yang telah dilakukan diperoleh informasi bahwa andrografolida mempunyai daya schizontosida dengan cara

menghambat pertumbuhan *Plasmodium falciparum* stadium gametosit *in vitro*, bahkan tidak berbeda secara bermakna dengan primakuin, tapi khasiat andrografolida sebagai antibakteri belum diketahui.

Berdasarkan uraian di atas, ada kemungkinan andrografolida mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Enteroinvasive Escherichia coli (EIEC)*.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari senyawa andrografolida terhadap pertumbuhan bakteri *Enteroinvasive Escherichia coli (EIEC)* secara *in vitro*.

Senyawa andrografolida dibuat empat konsentrasi perlakuan yaitu; 1250, 2500, 5000, dan 10.000 µg/ml. Perlakuan andrografolida dari empat konsentrasi masing-masing dilakukan 8 (delapan) kali replikasi. Sehingga jumlah perlakuan secara keseluruhan sebanyak 32. Untuk empat konsentrasi tersebut diuji dengan metode dilusi (pengenceran), yang selanjutnya ditanam pada media agar dengan metode *dropt* untuk mendapatkan jumlah bakteri hidup dalam CFU/ml. Jumlah bakteri yang boleh dihitung hanya bakteri dengan jumlah antara 30 sampai 300. Di atas dari 300 dianggap jumlah bakteri terlalu banyak untuk dihitung (TBUD), sedangkan di bawah 30 hanya jumlah koloni yang terendah yang dihitung, hasilnya dilaporkan sebagai kurang dari 30 dikalikan dengan besarnya pengenceran, tetapi jumlah sebenarnya harus dicantumkan dalam tanda kurung.

Aktivitas senyawa andrografolida yang diharapkan adalah aktivitas pada Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) dan Konsentrasi Bakterisida Minimal (KBM) yaitu konsentrasi terendah yang mampu mematikan bakteri (ditetapkan sebagai penurunan 99,9% inokulum).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ternyata antara perlakuan pada konsentrasi 1250, 2500 dan 5000 µg/ml rata-rata memperlihatkan jumlah bakteri terlalu banyak untuk dihitung (TBUD) (jumlah bakteri di atas 300), tetapi pada konsentrasi 10.000 µg/ml menunjukkan jumlah bakteri hidup di bawah 30 sehingga secara mikrobiologis dalam penelitian ini tidak diperoleh data secara kuantitatif. Dengan demikian data hasil penelitian ini tidak dapat dianalisis secara statistik.

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa senyawa andrografolida mempunyai aktivitas sebagai antibakteri dengan menghambat pertumbuhan bakteri *EIEC*. Aktivitas KHM senyawa andrografolida dalam penelitian ini terletak pada konsentrasi 10.000 µg/ml.

SUMMARY

THE ACTIVITY ANDROGRAPHOLIDE ISOLAT FROM *Andrographis paniculata* Nees. AGAINST THE BACTERIA *Enteroinvasive Escherichia coli* (EIEC) *in vitro*

Nikmah Madjid

Enteroinvasive Escherichia coli (EIEC) is a bacteria which belongs to the group *Enterobacteriaceae*, one of the bacteria which has a clinical symptom similar to *Shigella* which causes bloody diarrhea (*bloody diarrhoea*). In some developing countries including Indonesia about 10% of the diarrhea episode among children under 5 is bloody diarrhea which is compared to "watery diarrhoea", generally "bloody diarrhoea" takes longer period, has more complications, causes more problems in growth disturbance in children and has higher mortal rate.

Efforts to life prolongation especially for children, including those to eliminate diarrhea is a priority program. This efforts are realized the decrease of mortal rate and the eradication of diarrhea.

Considering some aspects in diarrhea therapy by antibiotics which commonly used although expensive, and efforts to support the treatment of the diarrhea in hospital, the writer intends to do a research on the activities of herbal medicines as ant diarrhea.

In all over the world there are about 600.000 kinds of plants, of which 400.000 are tall plants. However only about 10% has been chemically and pharmacologically studied. One of the plants which is widely used by the community as traditional medicines is *Andrographis paniculata* Nees. or more known as Sambiloto.

The values of *Andrographis paniculata* Nees. has been known as antimalaria, tonicum (increasing appetite), anodyne (pain killer), astringent (substance making something contracted), diabetes, influenza, bronchitis, haemovoid, gonorrhoea, hepatomegaly, skin disease, cold and ascaris disease, even beneficial as antidiarrhoea, antidysentri, and it remedies cholera a disease which attacks gastrointestinal.

Andrographolide (C₂₀ H₃₀ O₅) is compound of diterpenoid lactone which is the main chemical content of *A. paniculata* Nees. which is the form of white crystal power, bitter, square plate with its melting point 230°-239°C, has molecule weight 350. It does practically dissolve in organic dissolution like metanol, etanol, aseton, kloroform, and ether. The lactone group in Andrographolide is an active group. From the research it shows that Andrographolide has schizontosida power by inhibiting the growth of *Plasmodium falciparum* gametosit stadium *in vitro* which is not even

significantly different from primakuin. However, the value of Andrographolide as antibacteria is not known yet.

Based on the above description there is a possibility that Andrographolide is able to inhibit the growth of *Enteroinvasive Escherichia coli* (EIEC).

This research is to find out the activity of antibacteria from the compound of Andrographolide against the growth of *Enteroinvasive Escherichia coli* (EIEC) *in vitro*.

The compound of Andrographolide was made into four concentrations of treatment: 1250, 2500, 5000, and 10.000 µg/ml. The treatment of Andrographolide from each of the four concentrations was made into 8 (eight) replication, so that the total number of the treatments is 32. The four concentrations were tested with dilution method, which were further planted on media so by using dropt method living bacteria in CFU/ml were obtained. The number of bacteria which may be counted were those between 30 up to 300. The bacteria which were over 300 were considered too many to be counted, whereas those under 30 only the lowest colony which were counted and the result was reported as less than 30 which were multiplied by the amount of dilution, but the real number must be put in parentheses.

The activity of Andrographolide compound, which was expected, is that at the Minimal Inhibited Concentration (MIC) and Minimal Bactericide Concentration (MBC) that is the lowest concentration which was able to kill bacteria (decided as the decrease of 99,9% inokulum).

The finding shows that among the treatments at the concentration 1250, 2500, and 5000 µg/ml on the average the number of bacteria were too many to be counted (the number of bacteria is over 300), but as the concentration 10.000 µg/ml it shows that the number of living bacteria was under 30 so that microbiologically in this research quantitative data was not obtained. Consequently, the finding cannot be statistically analyzed.

Based on the findings it can be concluded that Andrographolide compound has the activity as antibacterial by inhibiting the growth of EIEC bacteria. The activity Andrographolide compound at MIC in this research is at the concentration 10.000 µg/ml.

ABSTRACT

THE ACTIVITY ANDROGRAPHOLIDE ISOLAT FROM *Andrographis paniculata* Nees. AGAINST THE BACTERIA *Enteroinvasive Escherichia coli* (EIEC) *in vitro*

Nikmah Madjid

This research is to find out the activity of the compound Andrographolide isolat from *Andrographis paniculata* Nees. against the bacteria *Enteroinvasive Escherichia coli* (EIEC) *in vitro*.

This research is a True Experiment Design using Completely Randomized Design with the pattern The Post Test-Only Control Group Design. The sample of Andrographolide which was tested in 4 concentrated treatments namely $A_1= 10.000 \mu\text{g/ml}$, $A_2= 5000 \mu\text{g/ml}$, $A_3= 2500 \mu\text{g/ml}$, and $A_4= 1250 \mu\text{g/ml}$. Treatment Andrographolide (A) was done respectly 8 (eight) times of replication so that the total number of treatments is 32. The function of the Minimal Inhibited Concentration (MIC) and Minimal Bactericide Concentration (MBC) EIEC bacteria was tested by using dilution method which was continued by counting the number of living bacteria (Viable Count) growing on media "agar" using dropt methods.

By observing the data model of the findings of the research which was between concentration 1250 up to 5000 $\mu\text{g/ml}$ on the average it shows that the number of bacteria was too many to count (TBUD) that is the number of living bacteria is over 300, so the quantitative data was not obtained. Whereas the treatment on the 10.000 $\mu\text{g/ml}$ shows that the number of living bacteria was smaller than 30 so that we can say that the data was not statistically computed. It can be concluded that "the compound Andrographolide isolat from *A. paniculata* Nees. functions as antibacteria against the bacteria EIEC *in vitro*". The activity (MIC) of the compound Andrographolide against the bacteria EIEC is at concentration 10.000 $\mu\text{g/ml}$.

Key Words: Activity, Andrographolide, EIEC, *in vitro*

ABSTRACT

THE ACTIVITY ANDROGRAPHOLIDE ISOLAT FROM *Andrographis paniculata* Nees. AGAINST THE BACTERIA *Enteroinvasive Escherichia coli (EIEC) In vitro*

Nikmah Madjid

This research is to find out the activity of the compound Andrographolide isolat from *Andrographis paniculata* Nees. against the bacteria *Enteroinvasive Escherichia coli (EIEC) in vitro*.

This research is a True Experiment Design using Completely Randomized Design with the pattern The Post Test-Only Control Group Design. The sample of Andrographolide which was tested in 4 concentrated treatments namely $A_1= 10.000 \mu\text{g/ml}$, $A_2= 5000 \mu\text{g/ml}$, $A_3= 2500 \mu\text{g/ml}$, and $A_4= 1250 \mu\text{g/ml}$. Treatment Andrographolide (A) was done respectively 8 (eight) times of replication so that the total number of treatments is 32. The function of the Minimal Inhibited Concentration (MIC) and Minimal Bactericide Concentration (MBC) *EIEC* bacteria was tested by using dilution method which was continued by counting the number of living bacteria (Viable Count) growing on media "agar" using dropt methods.

By observing the data model of the findings of the research which was between concentration 1250 up to 5000 $\mu\text{g/ml}$ on the average it shows that the number of bacteria was too many to count (TBUD) that is the number of living bacteria is over 300, so the quantitative data was not obtained. Whereas the treatment on the 10.000 $\mu\text{g/ml}$ shows that the number of living bacteria was smaller than 30 so that we can say that the data was not statistically computed. It can be concluded that "the compound Andrographolide isolat from *A. paniculata* Nees. functions as antibacteria against the bacteria *EIEC in vitro*". The activity (MIC) of the compound Andrographolide against the bacteria *EIEC* is at concentration 10.000 $\mu\text{g/ml}$.

Key Words: Activity, Andrographolide, *EIEC*, *in vitro*

DAFTAR ISI

	Halaman
SAMPUL DEPAN	i
SAMPUL DALAM	ii
PERSYARATAN GELAR	iii
PERSETUJUAN	iv
PENETAPAN PANITIA PENGUJI	v
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
RINGKASAN	x
SUMMARY	xii
ABSTRACT	xiv
DAFTAR ISI	xv
DAFTAR TABEL	xvii
DAFTAR GAMBAR	xviii
DAFTAR LAMPIRAN	xix
1. PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah	5
1.3. Tujuan	6
1.4. Manfaat	6
2. TINJAUAN PUSTAKA	8
2.1. Andrografolida	8
2.2. Bakteri <i>Escherichia coli</i>	12
2.3. Struktur Membran Biologis	14
2.4. Dinding Sel Bakteri	15
2.5. Aktivitas Obat dengan Biopolimer	18
2.6 Diare	19
2.7 Antimikroba	21

2.8 Cara Penentuan Aktivitas Antibakteri	22
3. KERANGKA KONSEPTUAL	26
4. MATERI DAN METODE PENELITIAN	29
4.1. Rancangan Penelitian	29
4.2. Sampel Penelitian	30
4.3. Variabel Penelitian	31
4.4. Bahan Penelitian	34
4.5. Instrumen Penelitian	34
4.6. Lokasi dan Waktu Penelitian	35
4.7. Prosedur Pengumpulan Data... ..	35
5. ANALISIS HASIL PENELITIAN	41
5.1. Preparasi Konsentrasi Andrografolida dan Kontrol untuk Uji Aktivitas	41
5.2. Uji Aktivitas Andrografolida terhadap Bakteri <i>EIEC</i>	42
6. PEMBAHASAN	46
7. PENUTUP	57
7.1. Kesimpulan	57
7.2. Saran	57
DAFTAR PUSTAKA	59
LAMPIRAN-LAMPIRAN	64

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 4.1 : <i>Mc Farland Nephelometer Standards</i>	33
Tabel 5.1 : Hasil pengamatan aktivitas <i>Andrografolida</i> terhadap bakteri uji (<i>EIEC</i>) dan <i>Escherichia coli</i>	43
Tabel 5.3 : Hasil pengamatan jumlah bakteri <i>EIEC</i> hidup (CFU/ml)...	44



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 : Struktur molekul andrografolida	8
Gambar 2.2 : Diagram struktur dinding sel dan membran luar bakteri Gram-negatif.	16
Gambar 3.1 : Kerangka konseptual penelitian	28
Gambar 4.1 : Bagan rancangan penelitian	29
Gambar 4.2 : Prosedur <i>Tube Dilution Method</i>	39
Gambar 4.3 : Bagan alur penelitian	40
Gambar 6.1 : Struktur molekul etanol dan DMSO	47
Gambar 6.2 : Serangan nukleofil gugus hidroksil serin enzim Transpeptidase Terhadap karbon karbonil cincin β -laktam	52
Gambar 6.3 : Kemungkinan serangan gugus hidroksil serin enzim transpeptidase terhadap karbon karbonil pada cincin aktif diterpenoid lakton yang bermuatan positif dari senyawa andrografolida.	53
Gambar 6.4 : Perbedaan penembusan antibiotik pada dinding sel bakteri Gram - positif dan Gram-negatif.	55

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 : Surat izin melaksanakan penelitian dari Pascasarjana Unair	64
Lampiran 2 : Surat izin menggunakan fasilitas alat di TDC	65
Lampiran 3 : Data hasil penelitian KBM bakteri <i>EIEC</i> hidup (<i>Viable Count</i>)	66
Lampiran 4 : Gambar pertumbuhan bakteri <i>EIEC</i> pada kontrol A (KA) dan kontrol B (KB) inkubasi 48 jam	67
Lampiran 5 : Gambar pertumbuhan bakteri <i>EIEC</i> dan <i>E. coli</i> (pembanding) pada konsentrasi senyawa andrografolida 10.000 µg/ml inkubasi 48 jam	68
Lampiran 6 : Gambar pertumbuhan bakteri <i>EIEC</i> pada konsentrasi Senyawa Andrografolida 10.000, 5000, 2500 dan 1250 µg/ml, pengenceran 10 x, inkubasi 48 jam	69
Lampiran 7 : Gambar pertumbuhan bakteri <i>EIEC</i> pada konsentrasi senyawa andrografolida 10.000, 5000, 2500 dan 1250 µg/ml, pengenceran 100 x, inkubasi 48 jam	70

BAB 1

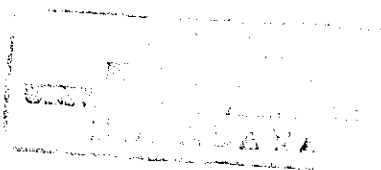
PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Enteroinvasive Escherichia coli (EIEC) adalah bakteri yang tergolong dalam kelompok famili *Enterobacteriaceae* (Holt *et al.*, 1994), salah satu bakteri yang menimbulkan gejala klinis mirip *Shigella* yaitu menyebabkan diare berdarah (*bloody diarrhoea*), suatu penyakit infeksi saluran pencernaan terutama pada anak (Rusli, 2001).

Meskipun mortalitas karena diare telah dapat ditekan, tetapi diare masih merupakan salah satu masalah kesehatan masyarakat yang utama pada beberapa negara berkembang termasuk Indonesia, khususnya masalah diare berdarah. Kira-kira 10 % dari episode diare pada anak yang berumur di bawah 5 tahun adalah diare berdarah, dan dibandingkan dengan "*watery diarrhoea*", umumnya "*bloody diarrhoea*" waktunya lebih lama, lebih banyak komplikasi serta menyebabkan lebih banyak masalah gangguan pertumbuhan pada anak dan menimbulkan lebih tinggi angka kematian (Sulastri, 2001).

Upaya pemberantasan diare untuk kelangsungan hidup manusia terutama anak, merupakan program prioritas. Upaya ini diwujudkan melalui penurunan angka kematian dan pencegahan diare. Pada diare akut dengan penyebab yang spesifik, selain kegiatan pengobatan untuk memperbaiki keadaan umum penderita seperti



penggantian cairan dan elektrolit, perlu pemberian atau terapi antibiotik secara rasional sebagai pengobatan kausal (Soetanto dkk., 2001).

Selanjutnya dikatakan terapi antibiotik selain memperpendek perjalanan diare dan ekskresi bakteri patogen, juga dapat mengurangi cairan rehidrasi yang diperlukan, serta mengurangi resiko penularan penyakit oleh karier. Permasalahannya dalam terapi antibiotik pada diare sulit menentukan jenis antibiotik yang tepat karena beraneka ragamnya etiologi diare dan tidak semua laboratorium rumah sakit memiliki kemampuan untuk menemukan seluruh penyebab diare tersebut. Hal ini semakin dipersulit lagi dengan semakin meningkatnya resistensi mikroba penyebab diare terhadap antibiotik akibat pemakaiannya secara tidak tepat. Diduga tingkat resistensi tersebut semakin tinggi saat memasuki milenium ketiga ini (Sutanto dkk., 2001)

Dengan memperhatikan beberapa aspek terapi diare dengan antibiotik yang lazim digunakan dan upaya menunjang penanganan diare di rumah sakit, penulis berkeinginan melakukan penelitian tentang aktivitas tanaman obat-obatan sebagai antidiare. Dari berbagai survey, diantaranya survey Kesehatan Rumah Tangga, survey penggunaan Obat Tradisional di masyarakat Sulawesi dan Kalimantan Timur, di Aceh dan Madura, survey Etnobotani di daerah oleh Puslitbang Biologi LIPI, dapat disimpulkan bahwa masyarakat masih mengandalkan alam sekitarnya untuk menanggulangi penyakit yang mungkin sekali disebabkan oleh bakteri. Terlihat cara ini kuno, tetapi hal demikian terjadi karena selain obat modern belum dapat mencapai daerah jauh, penggunaan antibiotik harus dengan resep dan mahal,

sehingga masyarakat harus puas dengan keadaan demikian (Dzulkarnaen dkk., 1996).

Olehnya sebagai pengobat, Dokter hendaknya memberikan nasehat dan petunjuk penggunaan obat tradisional yang mungkin ingin dimanfaatkan oleh pasien sebagai alternatif pengobatan. Dan tentu saja Dokter dapat meresepkan obat tradisional yang telah diijinkan untuk disediakan pada sarana pelayanan formal. Dilain pihak sebagai Manajer sarana pelayanan kesehatan formal hendaknya seorang Dokter dapat mengupayakan pengadaan obat tradisional yang telah memenuhi persyaratan (Almatsier, 2000).

Di seluruh dunia terdapat lebih kurang 600.000 jenis tumbuh-tumbuhan, lebih kurang 400.000 diantaranya merupakan tanaman tinggi, tetapi baru sekitar 10% diantara 600.000 jenis tersebut telah diteliti secara kimia dan farmakologi. Sumber yang masih potensial ini diharapkan sebagai lapangan penelitian dalam usaha mencari dan menemukan obat baru (Siswandono dan Soekardjo, 2000). Salah satu tanaman yang banyak digunakan masyarakat sebagai obat tradisional adalah *Andrographis paniculata* Nees. atau lebih dikenal sebagai Sambiloto.

Anonim² (2003) melaporkan herba *A. paniculata* mempunyai khasiat sebagai tonikum (penambah nafsu makan), *anodyne* (pemati rasa nyeri), *astringent* (zat yang menciutkan), dan berguna untuk disentri, kolera, menyembuhkan diabetes mellitus, influenza, bronkitis, piles (wasir), *gonorrhoea*, hepatomegali, penyakit kulit, demam dan cacingan. Tanaman ini juga berguna untuk luka, perasaan terbakar,

borok/bisul, bronkitis kronik, lepra/kusta, pruritus (gatal), kembung perut, kolik (mulas mendadak dan hebat), dan diare.

Wijayakusuma dkk., (1996) menyatakan bahwa tanaman ini dapat digunakan sebagai obat disentri, diare, hepatitis, infeksi saluran empedu, anti radang, TBC paru, gigitan ular, luka bakar, tumor paru, kanker dan hipertensi. Sedangkan Heyne (1987); Aliadi dan Sudibyo (1996) menyatakan secara empiris herba sambiloto digunakan untuk menyembuhkan demam, gatal-gatal, tonsilitis, bisul, anti radang, tipus, bila digigit serangga dan ular berbisa.

Andrografolida merupakan salah satu kandungan kimia atau merupakan kandungan makro dari *Andrographis paniculata* Nees. disamping kandungan kimia mikro lainnya. Dari penelitian yang telah dilakukan diperoleh informasi bahwa andrografolida mempunyai daya schizontosida dengan cara menghambat pertumbuhan *Plasmodium falciparum* (Wiranti, 2001), sedangkan pada penelitian lain menyatakan andrografolida mempunyai efek aktivitas antimalaria dengan cara menghambat pertumbuhan *Plasmodium falciparum* stadium gametosit *in vitro* (Wahyuni, 2001), bahkan tidak berbeda secara bermakna dengan primakuin (Widyowati, 2001). Selain itu pula andrografolida juga menunjukkan bioaktifitas sebagai bahan obat anti kanker/tumor yang menginduksi diferensiasi sel myeloid, dan pada studi klinis membuktikan bahwa andrografolida mempunyai aktivitas anti koriokarsinoma dan *malignant hydatiform mole* (Matsuda, *et al.*, 1994). Namun informasi tentang efek senyawa andrografolida yang diperoleh dari hasil ekstraksi *Andrographis paniculata* Ness. terhadap bakteri belum diketahui. Untuk

membuktikan keefektifan dan keamanan tanaman sebagai obat tradisional diperlukan penelitian tentang khasiat tanaman sehingga diperoleh informasi yang dapat dipertanggung jawabkan untuk keamanan para pemakai.

Berdasarkan khasiat tanaman *Andrographis paniculata* Nees. atau sambiloto sebagai antidiare, antidisentri dan menyembuhkan kolera, ada kemungkinan andrografolida yang merupakan kandungan yang besar dari tanaman ini mampu menghambat pertumbuhan bakteri *EIEC* secara *in vitro*. Dipilihnya bakteri *EIEC* karena bakteri tersebut mempunyai gejala klinis yang menyebabkan *bloody diarrhoea*, termasuk penyakit diare yang bisa disembuhkan menggunakan sambiloto.

1.2 Rumusan Masalah

- 1.2.1 Apakah pertumbuhan bakteri *EIEC* dapat dihambat oleh senyawa andrografolida ?
- 1.2.2 Apakah bakteri *EIEC* dapat dimatikan oleh senyawa andrografolida ?
- 1.2.3 Berapa konsentrasi hambat minimal (KHM) senyawa andrografolida terhadap pertumbuhan bakteri *EIEC* tersebut ?
- 1.2.4 Berapa konsentrasi bakterisidal minimal (KBM) senyawa andrografolida terhadap bakteri *EIEC* tersebut ?

1.3 Tujuan

1.3.1 Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri dari senyawa andrografolida terhadap pertumbuhan bakteri *EIEC* secara *in vitro*.

1.3.2 Tujuan Khusus

1.3.2.1 Untuk mengetahui sifat bakteriostatik senyawa andrografolida terhadap pertumbuhan bakteri *EIEC*.

1.3.2.2 Untuk mengetahui sifat bakterisidal senyawa andrografolida terhadap bakteri *EIEC*.

1.3.2.3 Untuk menentukan konsentrasi yang tepat andrografolida dapat menghambat pertumbuhan bakteri *EIEC*.

1.3.2.4 Untuk menentukan konsentrasi yang tepat andrografolida dapat mematikan bakteri *EIEC*.

1.4 Manfaat

1.4.1 Memberikan informasi pada kalangan pengusaha obat tradisional tentang manfaat andrografolida sebagai ekstrak murni tanaman *Andrographis paniculata* Nees. terhadap kehidupan bakteri *EIEC*.

1.4.2 Memberikan informasi tentang sensitifitas bakteri *EIEC* sebagai penyebab diare berdarah terhadap senyawa andrografolida.

1.4.3 **Menunjang perkembangan ilmu kedokteran khususnya dalam hubungannya dengan terapi terhadap penyakit diare berdarah yang disebabkan oleh bakteri *EIEC*.**



BAB 2

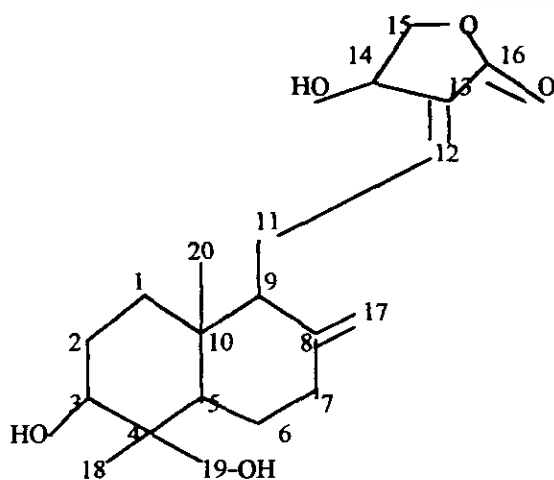
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Andrografolida

2.1.1 Definisi

Andrografolida ($C_{20}H_{30}O_5$) merupakan senyawa diterpenoid lakton, berbentuk serbuk kristal berwarna putih, terasa pahit, dan berbentuk lempeng segi empat dengan titik lebur / leleh (t.l.) $230^{\circ}C - 239^{\circ}C$ (Saxena, 1998), mempunyai berat molekul 350, praktis tidak larut dalam air (0.004 % atau 1 : 25.000) tetapi larut dalam pelarut organik seperti metanol, etanol, aseton, kloroform dan eter (Matsuda *et al.*, 1994; Radjaram dkk., 2000).

Gugus lakton pada andrografolida merupakan gugus yang aktif seperti halnya senyawa terpenoid lainnya. Kadar zat aktif tersebut 2.5 - 4.6 % dari bobot kering senyawanya (Santa, 1996)



Gambar 2.1 Struktur Molekul Andrografolida ($C_{20}H_{30}O_5$)
(Sumber : Anonim², 2003. COA of the Andrographolide 95 %).

Andrografolida diperoleh dari tanaman *Andrographis paniculata* Nees. yang dikenal dengan nama daerah Sambiloto. Klasifikasi tanaman tersebut adalah sebagai berikut :

Divisi : Spermatophyta
 Anak Divisi : Angiospermae
 Kelas : Dicotyledoneae
 Anak Kelas : Sympetalae / Metaclamydeae
 Bangsa : Tubiflorae / Solanales
 Suku : Acanthaceae
 Marga : *Andrographis*
 Jenis : *Andrographis paniculata* Nees.

(Santa, 1996).

Saxena (1998) menyatakan selain andrografolida sebagai kandungan utamanya yang terasa pahit, tanaman ini juga mengandung komponen lakton lain yang juga terasa pahit yaitu 14-deoksi-11-oxoandrografolida ($C_{20}H_{28}O_5$), titik leleh (t.l) $98-100^{\circ}C$; 14-deoksi-11-12-didehidroandrografolida ($C_{20}H_{30}O_4$), t.l. $203-204^{\circ}C$; 14-deoksiandrografolida ($C_{20}H_{30}O_4$), t.l. $175^{\circ}C$, sedangkan kandungan minor tanaman ini yang tidak pahit adalah neoandrografolida ($C_{26}H_{40}O_8$); t.l. $167-168^{\circ}C$.

Selanjutnya juga dikatakan dari ekstrak ether petroleum daun *A. paniculata* dari Bangladesh telah diisolasi : α - β -lakton yang tidak jenuh, seperti : homoandrografolida ($C_{22}H_{32}O_9$); t.l. $115^{\circ}C$, andrografosterol ($C_{23}H_{38}O$); t.l. $135^{\circ}C$, andrografana ($C_{40}H_{82}$); t.l. $67-68^{\circ}C$, andrografona ($C_{32}H_{64}O$); t.l. $85^{\circ}C$, lilin dan 2 ester mengandung gugus hidroksi.

Terakhir dikatakan pada akar herba ini mengandung epigenin 7,4-di-o-metil eter, andrografolida dan flavon alami lainnya, 5-hidroksi 7,8,2,3-tetrametoksi flavon ($C_{19}H_{18}O_7$); t.l. 150-151^oC. Juga mengandung monohidroksi trimetil flavon, andrografin ($C_{18}H_{16}O_6$); t l. 190-191^oC dan dihidroksi-di-metoksiflavon, panikolin ($C_{17}H_{14}O_6$); t l. 263-264^oC. Kehadiran α -sitosterol juga telah dilaporkan .

2.1.2 Penelitian-Penelitian Terhadap Bioaktivitas Andrografolida (Ekstrak Murni Dari *A. paniculata* Nees)

Secara tradisional di Indonesia herba tanaman sambiloto atau *Andrographis paniculata* Nees. telah digunakan oleh masyarakat. Dari penelitian yang telah dilakukan diperoleh informasi bahwa sambiloto dapat digunakan sebagai obat anti malaria (Widyawaruyanti, 1999), obat anti kanker (Dwiputro, 2000), sedangkan Heyne (1987) melaporkan tanaman ini sebagai obat tonsillitis, bisul, keracunan, tifus, demam, gatal-gatal, digigit serangga atau ular berbisa, kencing manis, disentri, radang telinga, eksema, radang usus buntu, masuk angin, difteri, ayun, kencing nanah, anti malaria, penurun tekanan darah, keputihan dan penambah nafsu makan. Chang and Bur (1965) menyatakan herba tanaman ini mempunyai efek antidiare, dimana sediaan ekstrak dapat menghambat pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Proteus vulgaris* dan *Shigella dysenteriae*, sedangkan penelitian mengenai bioaktivitas dari senyawa murni andrografolida yang diperoleh dari herba tanaman ini juga telah banyak dilakukan.

Dari berbagai laporan penelitian bioaktivitas menyebutkan bahwa andrografolida mempunyai berbagai efek farmakologi, antara lain sebagai imunomodulator yaitu menstimulasi produksi antibodi dan penurunan reaksi alergi (Widyawaruyanti, 1999; Puri *et al*, 1993; Hariati, 1991)). Isolat andrografolida juga merupakan imunostimulan terhadap sekresi IFN- γ oleh subset limfosit T Helper (TH₁) dan imunosupresan terhadap sekresi TNF- α oleh subset limfosit TH₁ dari mencit (Widyawaruyanti, 1998). Selain itu senyawa andrografolida mempunyai efek sitotoksisitas pada kultur sel rbdmiosarkoma (Dwiputro, 2000) tetapi tidak menimbulkan teratogenik pada mencit (Rahmawati, 2001). Senyawa andrografolida dan diterpen lainnya dari *A. paniculata* Nees. menunjukkan aktivitas yang potensial sebagai *differentiation inducing* sel terhadap sel mieloid tikus (Matsuda, *et al.*, 1994). Juga telah dilaporkan bahwa senyawa andrografolida yang merupakan hasil isolasi dari tanaman *A. paniculata* Nees. mempunyai aktivitas antimalaria dengan cara menghambat pertumbuhan *Plasmodium falciparum* stadium gametosit *in vitro* (Wahyuni, 2001) bahkan tidak berbeda secara bermakna dengan primakuin (Widyowati, 2001).

Meskipun percobaan pendahuluan untuk menentukan daya antibakteri sudah dilakukan dengan menggunakan ekstrak dari herba tanaman *Andrographis paniculata* Nees. namun penelitian tentang khasiat zat aktif dari tanaman ini yaitu senyawa andrografolida sebagai antibakteri masih perlu dilakukan. Untuk itu dalam

penelitian ini akan mencoba membuktikan daya zat aktif andrografolida melalui eksperimen yang menjurus kepada khasiat antibakteri.

2.2 Bakteri *Escherichia coli*

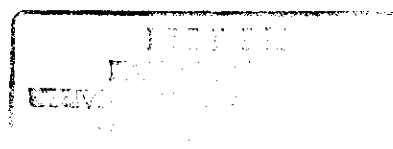
Escherichia coli adalah bakteri komensal yang banyak ditemukan di usus besar manusia. Sifatnya unik karena mempunyai kemampuan untuk menimbulkan infeksi pada jaringan lain dan galur diaregenik dapat menyebabkan infeksi primer pada usus (Stricland, 1991).

Bakteri ini berbentuk batang pendek (kokobasili), gram negatif, ukuran 0.4 – 0.7 μm x 1.4 μm , sebagian besar bergerak aktif dan beberapa strain punya kapsul (Staf Pengajar FKUI., 1994).

Menurut Stricland (1991) *Escherichia coli* yang menyebabkan diare dapat dibagi dalam 5 kategori utama :

- *Enterotoxigenic E. coli* (ETEC)
- *Enteroinvasive E. coli* (EIEC)
- *Enteropathogenic E. coli* (EPEC)
- *Enterohemorrhagic E. coli* (EHEC)
- *Enteraggagative E. coli* (EaggEC)

Masing-masing kategori *E. coli* diaregenik tersebut mempunyai patogenesis yang berbeda, mempunyai sifat virulen yang jelas, terdiri dari serotipe O:H yang terpisah, biasanya menunjukkan sifat sindroma klinik yang berbeda, dan memperlihatkan pola epidemiologi yang khusus.



EIEC merupakan salah satu *E. coli* penyebab diare berdarah yang mempunyai gejala klinis yang mirip sekali dengan shigellosis. Sejak tahun 1970 diketahui menyebabkan diare dan disentri (Rusli, 2001), tetapi sangat jarang menimbulkan penyakit di USA dibandingkan *EPEC* dan *ETEC* (Murray *et al.*, 2003).

2.2.1 Identifikasi *EIEC*

EIEC memiliki kesamaan atau mirip dengan *Shigella* yang secara klinik menyebabkan disentri. *EIEC* mempunyai plasmid 140 mD (mega Dalton), merupakan faktor penting sifat enteroinvasifnya untuk menyerbu sel epitel. *EIEC* meliputi serotipe-serotipe O28ac, O29, O112, O124, O136, O143, O144, O152, O164, dan O167. Banyak juga *EIEC* yang mirip dengan *Shigella* karena ketidakmampuan mereka meragi laktosa (Strickland, 1991).

EIEC dapat diidentifikasi melalui bermacam-macam uji *in vivo*, immunoassay, dan uji asam nukleat didasarkan pada sifat invasifnya. Banyak tersedia uji invasi kultur sel atau uji didasarkan DNA yang berkaitan dengan invasi yaitu ipa (*invasion plasmid antigen*) C atau ipaH. Pada prakteknya elektroforesis DNA plasmid yang besarnya 120-140 mD yang berhubungan dengan invasi sukar dilakukan karena plasmid ini mudah hilang ketika isolat disubkultur (Murray *et al.*, 2003).

2.2.2 Patogenesis Diare oleh *EIEC*

EIEC ditularkan melalui makanan yang terkontaminasi.

EIEC mempunyai kegemaran berkolonisasi pada mukosa sebagai interaksi parasit inang. Plasmid yang besarnya 140 mD mengkode protein membran luar bakteri *EIEC* pada proses invasi memasuki enterosit. Setelah invasi, *EIEC* berproliferasi, mengkolonisasi usus yang pada akhirnya menyebabkan kematian sel enterosit. Infeksi *EIEC* dicirikan oleh penyusupan leukosit polimorphonuklear yang banyak ke dalam mukosa yang terkolonisasi bakteri (Anonim¹, 2002).

2.3 Struktur Membran Biologis

Membran sitoplasma terdiri dari lipid lapis rangkap (biomolekul). Di dalam lapisan rangkap ini disisipkan protein ukuran besar, yaitu protein integral, dan protein lain berukuran kecil tersemat pada membran dinamakan protein perifer. Protein bersifat ampifil karena mengandung gugus hidrofil dan hidrofob. ((Schlegel and Karin, 1994))

Pada membran juga terdapat mukopolisakarida dengan jumlah kecil dengan strukturnya tidak dalam keadaan bebas tetapi dalam bentuk kombinasi dengan lemak seperti glikolipid, atau dengan protein seperti glikoprotein. Mukopolisakarida berperan untuk pengenalan sel dan interaksi antigen antibodi. (Schlegel and Karin, 1994).

Membran mempunyai fungsi metabolisme tertentu, yang mempunyai dua fungsi utama yaitu; sebagai penghalang dengan sifat permeabilitas yang khas (perintang osmosis dari sel), dan sebagai tempat untuk biotransformasi energi,

dimana lapisan tipis lipid diisi oleh jembatan protein integral yang merupakan pori-pori yang menjalankan pengaturan transpor (keluar masuknya) berbagai zat (Schlegel and Karin, 1994).

Enzim transpor elektron dan fosforilasi oksidatif, yang pada eukaryot berada dalam mitokondria, pada bakteri bertempat di dalam membran. Sitokrom, protein S-Fe dan komponen lain dari transpor elektron hanya didapati di dalam membran. Sitokrom C berada pada sisi luar membran sedangkan ATP sintase berada pada sisi dalam membran. Juga proses biosintesis lain, seperti sintesis komponen dinding sel dan kapsulnya, dan sekresi berbagai eksoenzim nampaknya mungkin merupakan fungsi membran. Akhirnya amat mungkin bahwa pusat replikasi DNA terletak pada membran (Schlegel and Karin, 1994).

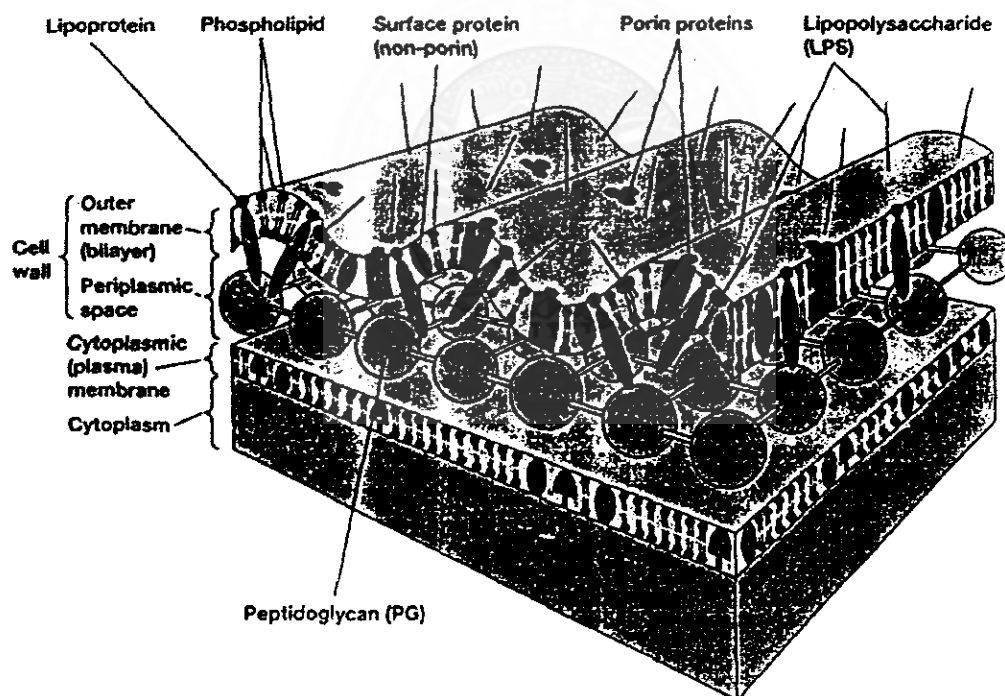
2.4 Dinding Sel Bakteri

Apabila membran sitoplasma bekerja sebagai perintang osmosis; membran ini bersifat semipermeabel dan mengendalikan keluar masuk zat-zat terlarut, maka sebaliknya dinding sel dapat dilalui oleh garam-garam dan sejumlah besar zat yang berbobot molekul (BM) kecil (Schlegel and Karin, 1994)

Kerangka penunjang dari dinding sel bakteri terdiri atas satuan polimer-polimer seragam, yaitu suatu peptidoglikan murein. Makromolekul ini adalah suatu heteropolimer dan terdiri dari rantai-rantai yang merupakan penyambungan silih berganti secara β -1,4-glikosidik dari-asetilglukosamina (G1cNAc), dan suatu ester asam laktat dari N-asetilglukosamina yaitu asam N-asetilmuraminat. Komponen asam

muraminat melalui gugus laktatnya dihubungkan dengan ikatan peptida pada asam-asam amino. Rantai-rantai heteropolimer bersambungan oleh ikatan peptida dan membentuk molekul raksasa berupa kantong, yaitu Sacculus-murein (Schlegel and Karin, 1994).

Pada bakteri Gram-negatif: Dinding selnya mengandung tiga polimer yang terletak di luar lapisan peptidoglikan (PG): lipoprotein (LP), selaput luar, dan lipopolisakarida (LPS), (Gambar 2.2).



Gambar 2.2 Diagram struktur dinding sel dan membran luar bakteri Gram negatif. (Sumber: Baron *et al.*, 1994. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology, p.198)

Lipoprotein merupakan protein paling banyak pada sel gram negatif yang menstabilkan selaput luar dan mengikatkannya pada lapisan peptidoglikan. Selaput luar memiliki saluran khusus, yang mengandung molekul protein yang disebut porin, yang memudahkan difusi pasif senyawa hidrofilik dengan BM rendah seperti gula, asam amino, dan ion-ion tertentu. Molekul antibiotik yang besar menembusnya relatif lambat, hal ini menerangkan mengapa bakteri gram negatif relatif lebih resisten terhadap antibiotik (Brooks *et al.*, 1996), sedangkan LPS telah ditentukan mempunyai tiga bagian: lipid A, daerah inti, dan rantai samping yang dinamakan antigen O. Hal ini mempunyai makna amat penting pada penentuan diagnosis bakteriologik dan deteksi penyakit menular. Peptidoglikan/murein berlapis tunggal dan kadarnya hanya kurang dari 10% massa kering dinding sel, yang umumnya hanya mengandung asam meso-diaminopimelinat, tidak ada lisin, dan tidak terdapat jembatan-jembatan interpeptida (Schlegel and Karin, 1994).

Biosintesis dan pemasukan komponen murein ke dalam kerangka peptidoglikan menurut Schlegel and Karin (1994) dapat dibagi tiga tahap:

1. Berlangsung dalam sitoplasma. Di tempat ini terbentuk asam muraminat pentapeptida.
2. Berlangsung pada membran sel. Asam muraminat pentapeptida disambungkan pada N-asetilglukosamin dan dikaitkan lima residu glisil.
3. Terjadi pemasukan asam amino lain ke dalam kerangka peptidoglikan dan penyambungan ikatan peptida.

2.5 Aktivitas Obat dengan Biopolimer

Semua molekul organik asing yang masuk ke tubuh, kemungkinan besar berikatan dengan konstituen jaringan atau biopolimer seperti protein, lemak, asam nukleat, mukopolisakarida, enzim biotransformasi dan reseptor. Reseptor obat adalah suatu makromolekul sel hidup, mengandung gugus fungsional atau atom-atom terorganisasi, reaktif secara kimia dan bersifat khas, yang dapat berinteraksi secara terpuhkan dengan molekul obat yang mengandung gugus fungsional khas, menghasilkan respons biologis tertentu. Reseptor obat bukan suatu enzim, tetapi sifatnya mirip dengan enzim dan merupakan bagian lengkap dan terorganisasi dalam struktur sel (Tri Purwanto dan Sondakh, 2000).

Aktivitas biologis pada percobaan/studi obat secara *in vitro*, pengaruh transpor, perubahan kimia, metabolisme dan ekskresi obat menjadi minimal dan distribusi menjadi lebih sederhana dibanding secara *in vivo*, sehingga diharapkan hubungan struktur aktivitas menjadi lebih jelas. Dengan sistem uji *in vitro* yang baik, akan didapat informasi tentang kimia obat yang berperan terhadap aktivitas, baik struktur molekul obat yang berinteraksi dengan reseptor (gugus fungsi) dan penyebab dari efek sifat kimia obat merupakan bagian yang penting untuk terjadinya efek biologis. Untuk memberikan efek biologis, obat dalam bentuk aktifnya harus berinteraksi dengan reseptor atau tempat aksi atau sel target, dengan kadar yang cukup tinggi (Siswandono dan Soekardjo, 1998).

2.6 Diare

Diare sampai saat ini masih merupakan masalah kesehatan masyarakat di Indonesia bila ditinjau dari angka kesakitan dan kematian. Dari data berdasarkan kajian analisis dari beberapa survay yang pernah dilakukan bahwa angka kesakitan diare masih tinggi pada semua kelompok umur (280/1000 penduduk), sedangkan pada usia balita episode diare 1,5 kali pertahun. Secara etiologi penyebab diare ada dalam kelompok 6 besar, yaitu : infeksi, malabsorbasi, alergi, keracunan, immu, defisiensi dan sebab-sebab lain (Purwanto, 2001).

Diare berdarah (*bloody diarrhoea*) adalah suatu keadaan klinik dari episode diare dimana feses secara jelas bercampur darah. Pada umumnya diare berdarah sering bersamaan dengan sindrom disentri, karena merupakan suatu sindrom akibat proses inflamasi pada usus. Karakteristik diare ini kebanyakan terdiri dari mukus dan leukosit yang bercampur darah atau bercak darah serta diikuti dengan gejala demam, mulas, atau kramp perut serta tenesmus dengan lendir dan darah dalam tinja (Sulastri, 2001).

Diare ini tergolong potensial menjadi diare yang persisten dan cenderung bersifat fatal, khususnya pada pasien malnutrisi dengan imunitas yang rendah. Pada masa globalisasi ini, serta maraknya produksi makanan berskala besar dan distribusi yang luas, insiden diare ini makin meningkat (Kamaruddin, 2001).

Selanjutnya dinyatakan bahwa etiologi diare berdarah sangat beragam, baik yang disebabkan oleh infeksi bakteri atau oleh infestasi parasit. Penyebab infeksi bakteri adalah *Shigella* (*S. dysenteriae* tipe 1 paling infeksius karena memproduksi

shiga toksin), *Escherichia coli* (penyebab diare berdarah adalah *EIEC* dan *EHEC*), *Salmonella enteritidis*, *Vibrio parahemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, dan *Clostridium difficile*.

Menurut Rusli (2001) patogenesis diare berdarah, pada umumnya melalui dua mekanisme, yaitu : produksi sitotoksin dan invasi.

a. Produksi Toksin

Beberapa bakteri yang menghasilkan toksin akan merusak sel epitel usus dan endotel mikrovaskuler. Toksin ini secara spesifik terikat pada membran mikrovilus pada reseptor *Glikolipid Globatrinosisil Ceranide* yang secara enzimatik akan menghambat sintesa protein pada dinding sel. Dengan analisis histopatologis diketahui bahwa target toksin juga endotel vaskuler. Kejadian lesi vaskuler ini dapat menimbulkan sindrom uremik hemolisis, trombositopenik purpura dan koagulasi intravaskular diseminata. Akibat gangguan sintesa protein pada sel mukosa akan terjadi destruksi, diikuti inflamasi, selanjutnya nekrosis, ulserasi dan terbentuk ulkus. *Shigella dysenteriae* tipe 1 menghasilkan shiga toksin dan dapat menimbulkan manifestasi ekstra intestinal. *E. coli* 0157 H7 memproduksi verotoksin (*Shiga like toxin*) yang secara struktur, imunologis dan konsekwensi klinis mirip dengan *Shiga toxin* (Rusli, 2001).

b. Invasi

Beberapa jenis bakteri bersifat invasif ke dalam mukosa. *Shigella* jarang bersifat sistemik dan hanya kira-kira 3-6 % dapat menginvasi sampai ke sistem vaskuler terutama pada neonatus dan pasien dengan imunitas rendah. Kemampuan

invasi ini berhubungan dengan derajat virulensi bakteri yang ditunjukkan oleh sifat kromosom serta memiliki plasmid yang besar (120-140 mD). Bakteri yang sudah teridentifikasi dengan sifat invasif ini yakni *S. sonnei*, *S. flekseneri* dan *EIEC* (Rusli, 2001).

2.7 Antimikroba

Antimikroba adalah suatu bahan kimia yang dapat mematikan atau menghambat pertumbuhan sel mikroorganisme. Daya kerja senyawa-senyawa tersebut ditujukan pada fungsi atau kegiatan sel-sel mikroba untuk kelangsungan hidupnya (Brooks *et al.*, 1996).

Bakterisida adalah suatu bahan antibakteri yang memiliki kemampuan untuk membunuh atau mematikan bentuk-bentuk vegetatif bakteri (kata sifat bakterisidal) (Pelczar and Chan, 1988; Lay and Hastowo, 1993), sedangkan zat bakterisida dan zat bakteriostatik adalah keduanya tergolong dalam antibakteri. Zat bakterisida (Cedere = mematikan) adalah zat yang pada dosis biasa berkhasiat mematikan bakteri (Brooks *et al.*, 1996).

Lay dan Hastowo (1993) menyatakan bahwa daya bakterisidal berbeda dengan bakteriostatika oleh karena prosesnya hanya berjalan searah yaitu bakteri yang telah mati ini tidak dapat berkembang biak kembali meskipun bahan bakterisida dihilangkan.

2.8 Cara Penentuan Aktivitas Antibakteri

Berghe and Vlietinck (1991) dan Paxton (1991) menyatakan bahwa penentuan aktivitas antimikroba dapat dilakukan dengan salah satu dari tiga metode pokok yaitu dilusi, difusi dan bioautografi.

2.8.1 Metode Penyebaran (*diffusion method*) (Berghe and Vlietinck, 1991; Paxton, 1991)

Metode penyebaran terdiri dari:

- a. Metode cakram kertas (*paper disk method*)
- b. Metode cairan dalam cincin (*Ring diffusion method*)
- c. Metode lubang (*Hole plate method*)

Metode ini dilakukan dengan cara menanam bakteri pada lempeng agar yang sesuai, kemudian cakram/silinder yang telah ditetesi dengan bahan uji diletakkan pada permukaan agar, atau dapat juga bahan uji dimasukkan dalam lubang/cangkir agar, yang telah dibuat pada media. Media yang berisi inokulum bakteri dan bahan uji diinkubasi pada suhu 36-37⁰C, selama 12-24 jam. Aktivitas antibakteri dapat dilihat dengan mengukur diameter zona hambatan pertumbuhan bakteri disekitar cakram, lubang atau cangkir agar. Makin besar daerah hambatan pertumbuhan tersebut berarti aktivitas bahan uji terhadap bakteri makin nyata. Keuntungan metode difusi adalah jumlah sampel sedikit dan dapat dikerjakan dalam satu petri dish 5-6 sampel sekaligus untuk satu jenis mikroorganisme. Bilamana perlu luas zona hambatan dapat dibandingkan dengan antibiotik tertentu untuk mendapatkan gambaran sampai

seberapa potensi antimikroba dari bahan uji, tetapi hal ini tidak dapat memperlihatkan senyawa yang terkandung dalam bahan uji tersebut.

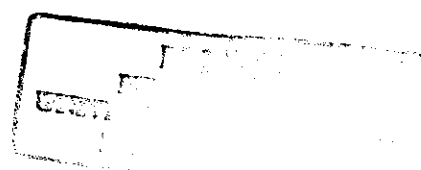
2.8.2 Metode Pengenceran (*Dilution method*) (Berghe and Vlietinck, 1991; Paxton, 1991)

Metode pengenceran terdiri dari:

- a. Metode pengenceran agar (*Agar dilution method*)
- b. Metode pengenceran tabung (*Tube dilution method*)
- c. Metode pengenceran mikro (*Micro dilution method*)

Metode pengenceran untuk penentuan kerentanan mikroorganisme terhadap agen antimikroba ini, dilakukan dengan cara : sejumlah antibiotik dipersiapkan dalam konsentrasi cair (broth) atau padat (agar) yang menurun melalui teknik pengenceran serial, kemudian diinokulasi dengan suspensi bakteri yang diuji. Kerentanan mikroorganisme ditentukan setelah inkubasi melalui pengamatan pertumbuhan secara makroskopik/visual. Pertumbuhan tidak teramati pada konsentrasi obat antimikroba terendah merupakan pengukuran efek bakteristatik dan umumnya disebut sebagai kadar hambat minimal (KHM) atau *Minimal Inhibitory Concentration (MIC)*. Dengan menggunakan media agar, teknik ini dapat diteruskan dengan penentuan pengaruh bakterisidal dari antimikroba atau kadar bakterisidal minimal (KBM) atau *Minimal Bactericidal Concentration (MBC)* (Baron, et al, 1982).

Cara pengenceran dalam tabung dapat dilakukan dengan mengencerkan bahan uji dengan media cair menjadi kelipatan dua secara bertahap sehingga didapatkan



beberapa konsentrasi dengan kelipatan setengahnya, sedangkan pada pengenceran agar menggunakan satu seri lempeng agar dengan konsentrasi bahan uji yang berbeda. Selanjutnya diinokulasi dengan suspensi bakteri dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 36 - 37⁰C, kemudian diamati hambatan pertumbuhan bakteri dengan membandingkan kekeruhan atau pertumbuhan dengan kontrol media yang mengandung bakteri. Konsentrasi penghambatan minimal didapatkan pada tabung yang jernih pada pengenceran tertinggi. Metode ini digunakan untuk mengetahui harga kadar hambat minimal suatu bahan antibakteri.

2.8.3 Metode bioautografi (*Bioautography Method*) (Berghe and Vlietinck, 1991; Paxton, 1991)

Metode ini sangat berguna untuk mengetahui senyawa baru atau senyawa yang belum diketahui aktivitas antibakterinya. Bahan uji dipindahkan ke dalam cawan petri yang berisi agar dan inokulum bakteri melalui proses difusi, yang terdiri dari:

- a. Metode bioautografi kontak (*contact bioautography method*)
- b. Metode bioautografi langsung (*direct bioautography method*)
- c. Metode bioautografi pencelupan (*Immersion method*)

2.8.3.1 Metode bioautografi kontak (*contact bioautography*)

Bioautografi kontak menggunakan prinsip difusi senyawa yang terpisah dengan kromatografi lapis tipis atau kromatografi kertas. Lempeng kromatografi diletakan pada permukaan agar yang telah diinokulasi bakteri. Setelah kurang lebih

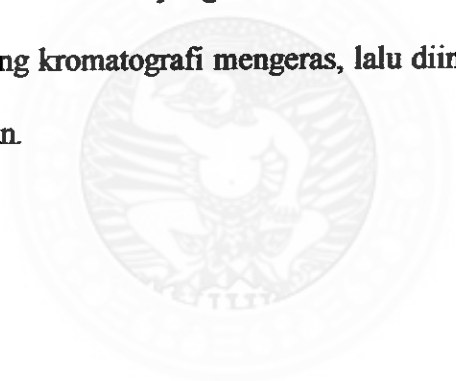
30 menit lempeng dipindahkan, diinkubasi dan diamati senyawa antibakteri yang akan berdifusi pada lapisan agar dan menghambat pertumbuhan bakteri.

2.8.3.2 Metode bioautografi langsung (*direct bioautography*)

Pada bioautografi langsung, zona hambatan diamati secara langsung pada lempeng kromatografi yang telah disemprot suspensi bakteri dalam media cair, kemudian diinkubasi pada suhu dan waktu yang sesuai.

2.8.3.3 Metode bioautografi pencelupan (*Immersion bioautography*)

Dalam hal ini, ke dalam media yang telah diinokulasi bakteri, setelah media yang menempel pada lempeng kromatografi mengeras, lalu diinkubasi dan dilakukan pengamatan daerah hambatan.



BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL PENELITIAN

Penyakit infeksi mungkin merupakan penyakit yang banyak diderita masyarakat Indonesia sejak dulu. Pada waktu sekarang penyakit infeksi (seperti diare) dapat ditanggulangi menggunakan obat modern diantaranya antibiotik.

Permasalahan dalam terapi antibiotik pada penyakit diare adalah beraneka ragamnya etiologi diare sehingga tidak semua laboratorium rumah sakit memiliki kemampuan untuk menemukan seluruh penyebab diare tersebut, dan sulitnya menentukan jenis antibiotik yang tepat; hal ini disebabkan karena semakin resistensinya mikroba penyebab diare terhadap antibiotik akibat pemakaiannya secara tidak tepat (Soetanto dkk., 2001).

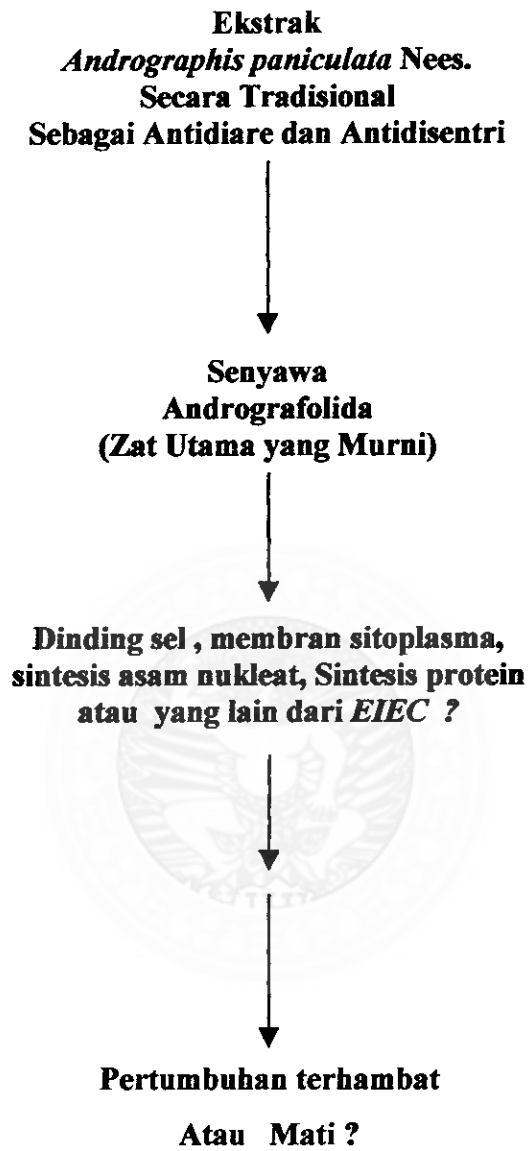
Bentuk zat aktif berbagai obat modern berasal dari alam contoh atropin, digitalis, antibiotika penisilin; maka dapat direnungkan bahwa obat dari alam yang digunakan secara tradisional mungkin saja mempunyai dasar kebenaran yang belum banyak diberkan.

Andrographis paniculata Nees. telah diketahui mempunyai khasiat dalam pengobatan anti malaria. Sebagai obat, ekstrak tanaman *A. paniculata* khususnya dalam pengobatan diare dan disentri juga telah diketahui, tetapi penggunaan andrografolida yang merupakan zat utama dari *A. paniculata* Nees. masih perlu dilakukan penyelidikan atau pembuktian. Untuk inilah akan dicoba membuktikan

melalui eksperimen khususnya pembuktian daya zat utama andrografolida yang menjurus kepada khasiat anti bakteri.

EIEC adalah bakteri yang invasif ke dalam mukosa usus. Kemampuan invasi ini berhubungan dengan virulensi bakteri ini yang memiliki plasmid besar (140 mD) yang mengkode protein membran luar untuk menyerang enterosit.

Sebagai anti bakteri diharapkan andrografolida dapat mempunyai peranan yang terlibat dalam penghambatan terhadap plasmid yang dimiliki bakteri *EIEC* untuk menyerang sel epitel enterosit pada mukosa usus. Dengan demikian andrografolida diharapkan akan terlibat dalam pengobatan khususnya pada infeksi enteritis secara langsung atau sebagai campuran obat-obatan, khususnya fungsi daya hambatnya terhadap bakteri *Enteroinvasive Escherichia coli (EIEC)*.



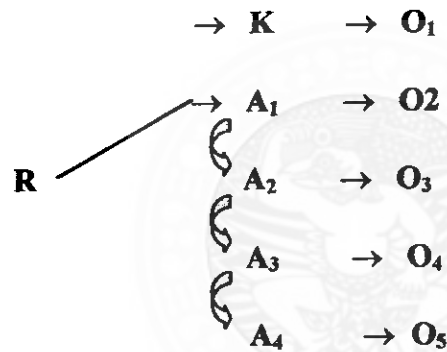
Gambar 3.1 Kerangka Konseptual Penelitian

BAB 4

MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan *True Experiment design* menggunakan *Completely Randomized Design* dengan pola *The Post Test - Only Control Group Design*. Rancangan tersebut dapat digambarkan sebagai berikut :



Gambar 4.1 Bagan Rancangan Penelitian

Keterangan Gambar:

R = Senyawa andrografolida

A₁, A₂, A₃, dan A₄ = Tingkat pengenceran andrografolida satu seri

K = Kontrol, dalam hal ini etanol dan DMSO tanpa andrografolida

O = Hasil pengamatan, baik kontrol (O₁) maupun perlakuan (O₂, O₃, O₄, O₅) setelah inkubasi 37⁰C selama 24 jam.

Rancangan penelitian ini dipilih dengan asumsi bahwa tiap unit dalam populasi adalah homogen, artinya semua karakteristik antar unit populasi adalah

sama, maka pengukuran awal tidak dilakukan, karena dianggap sama untuk semua kelompok yang berasal dari satu populasi.

Perlakuan (A) dari empat konsentrasi masing-masing dilakukan 8 (delapan) kali replikasi yang diperoleh dari rumus menurut Steel and Torrie (1980) berikut ini.

$$n \geq \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 \sigma^2}{\delta^2}$$

Keterangan:

n = Jumlah ulangan masing-masing kelompok

$\sigma^2/\delta^2 = 1$, (Steel and Torrie, 1980).

$Z_{\alpha/2} = Z_{0.025} = 1.96$ (dari tabel Z)

$Z_{\beta} = Z_{0.20} = 0.84$ (dari tabel Z)

sehingga jumlah perlakuan secara keseluruhan adalah 32.

4.2. Sampel Penelitian

4.2.1 Andrografolida

Bahan uji yang merupakan sampel dalam penelitian ini adalah senyawa Andrografolida 98 % ($C_{20}H_{30}O_5$, BM = 350) Standar (Aldrich No. Katalog 36-5645).

4.2.2 Bakteri uji

Bakteri uji yang merupakan sampel dalam penelitian ini adalah *Enteroinvasive Escherichia coli (EIEC) O28ac*, dalam bentuk suspensi bakteri diambil dari koloni pada media perbenihan secara acak.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Klasifikasi Variabel

4.3.1.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$) senyawa andrografolida, dan etanol sebagai kontrol.

4.3.1.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung adalah pertumbuhan bakteri *EIEC* berdasarkan *Viable count* atau jumlah bakteri hidup pada perbenihan *Nutrient Agar (NA)*.

4.3.1.3 Variabel Kendali.

Variabel kendali dalam penelitian ini meliputi :

- Jenis medium
- Jumlah inokulum
- Temperatur ruangan inkubasi
- Lama waktu inkubasi
- Umur bakteri uji
- Alat-alat yang digunakan

4.3.2 Definisi Operasional Variabel

4.3.2.1 Variabel Bebas.

Senyawa andrografolida 98% sebanyak 10 mg dilarutkan dalam 200 μl etanol 96% dan 50 μl DMSO, kemudian diencerkan dengan kaldu steril yaitu TSB menjadi konsentrasi 10.000 (A_1), 5000 (A_2), 2500 (A_3), 1250 (A_4) $\mu\text{g/ml}$.

Sebagai kontrol adalah senyawa etanol dan DMSO, yang juga merupakan pelarut andrografolida. Etanol yang digunakan adalah etanol 96% (stok), kemudian diencerkan dengan TSB sehingga diperoleh sederetan konsentrasi etanol yaitu $k_1 = 10$, $k_2 = 6$, $k_3 = 2$, $k_4 = 0.5$, dan $k_5 = 0,1$ %. Dimetil sulfoksida (DMSO) yang diujikan adalah 200, 100, 50, dan 25 μl .

4.3.2.2 Variabel Tergantung

Pertumbuhan bakteri *EIEC* terhadap senyawa andrografolida diketahui secara kuantitatif berdasarkan jumlah bakteri yang hidup berdasarkan perhitungan KHM/KBM pada media *NA* setiap konsentrasi senyawa andrografolida setelah inkubasi 28-48 jam pada suhu 37°C .

4.3.2.3 Variabel Kendali

- Medium yang digunakan untuk menumbuhkan dan memperbanyak bakteri *EIEC*, adalah *NA* (Natrium Agar).
- Sebagai medium uji atau medium yang digunakan untuk uji kepekaan bakteri sekaligus sebagai pengenceran dalam membuat setiap konsentrasi sampel andrografolida dan etanol + DMSO (kontrol) adalah kaldu *TSB*, dan untuk mengetahui jumlah bakteri yang hidup digunakan medium *NA*.
- Jumlah inokulum bakteri uji yang disuspensikan pada larutan garam NaCl 0.9% disesuaikan dengan kekeruhan atau endapan BaSO_4 . Endapan BaSO_4 terbentuk sesuai dengan jumlah bakteri yang telah ditabelkan dan dikenal dengan nama Mc Farland.

Tabel 4.1 *MC Farland Nephelometer Standards*

Tabung	Asam Sulfat 1% (ml)	Barium Klorida 1,175% (ml)	Perkiraan Jumlah Bakteri (x 10 ⁸ /ml)
0,5	9,95	0,05	1,5
1	9,9	0,1	3
2	9,8	0,2	6
3	9,7	0,3	9
4	9,6	0,4	12
5	9,5	0,5	15
6	9,4	0,6	18
7	9,3	0,7	21
8	9,2	0,8	24
9	9,1	0,9	27
10	9,0	1,0	30

Sumber: Baron *et al.*, 1994. *Baily & Scott's Diagnostic Microbiology*. 9th, p. 170.

BaSO₄ diperoleh dari campuran BaCl₂.2H₂O 1,175% dan H₂SO₄ 1% (Baron *et al.*, 1994). Dalam penelitian ini digunakan standar BaSO₄ 0,5 (Mc Farland 0,5); dengan diperkirakan jumlah bakteri sebanyak 1,5 x 10⁸ / ml .

- Temperatur pengeraman yang digunakan adalah 37⁰C pada inkubator dengan lama pengeraman 24 - 48 jam.
- Umur bakteri yang digunakan adalah berumur 24 jam.
- Alat-alat yang digunakan disterilisasi memakai oven maupun autoclave.

4.4 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

- Andrografolida Standar, 98% (Aldrich No. katalog 36-5645)
- Bakteri: *Enteroinvasive Escherichia coli (EIEC) O28ac*.
- Medium: BTB agar, TSB dan NA.
- Pengencer bakteri: NaCl 0.9 %
- Pelarut bahan uji: Etanol 2% dan Dimetil Sulfoksida (DMSO)
- Kertas, tissue.
- *Aquadest*

4.5. Instrumen Penelitian.

Dalam penelitian ini akan menggunakan beberapa macam instrumen, antara lain :

- Autoklaf: Sangat penting dalam penelitian ini karena sebelum dilakukan penelitian, semua bahan dan peralatan tertentu harus steril.
- Oven: Oven penting diperlukan untuk mensterilkan peralatan yang berasal dari gelas sebelum dipakai dalam penelitian.
- Inkubator: Penting digunakan sebab proses pertumbuhan diatur dengan suhu sesuai untuk kebutuhan pertumbuhan bakteri uji.
- Cawan petri ϕ 9 cm: Sebagai tempat media untuk pertumbuhan bakteri uji.
- Tabung reaksi dan rak: Digunakan untuk membuat suspensi bakteri uji dan sebagai pengenceran.

- Pipet dan mikropipet : Digunakan untuk mengukur volume jumlah suspensi bakteri uji dan jumlah konsentrasi senyawa andrografolida.
- Timbangan analitik: Digunakan untuk mengukur berat sampel .
- Erlenmeyer: Digunakan untuk tempat bahan dalam pembuatan medium.
- Jarum ose: Digunakan memindahkan bakteri uji dan digunakan untuk suspensi serta menanam bakteri uji.
- Gelas kimia (pirex): Digunakan dalam membuat medium sebelum disterilisasi.
- Pengaduk (vortex): Digunakan untuk mengaduk dalam proses pembuatan medium

4.6. Lokasi dan Waktu Penelitian

4.6.1 Lokasi Penelitian

Penelitian telah dilaksanakan di laboratorium *Gastroenteritis Tropical Disease Centre (TDC)* Universitas Airlangga Surabaya.

4.6.2 Waktu Penelitian.

Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan September sampai Desember 2003.

4.7 Prosedur Pengumpulan Data

4.7.1 Tahap Persiapan

4.7.1.1 Membuat Biakan Bakteri Uji

- Biakan bakteri uji diperbanyak pada medium Brom timol biru (BTB).
- Dieramkan pada suhu 37⁰C, selama 12 - 24 jam.

4.7.1.2 Membuat Suspensi Bakteri Uji

Dari biakan bakteri uji diambil 4-5 koloni, kemudian disuspensikan dan dimasukkan dalam tabung yang berisi 5 ml larutan natrium klorida (NaCl) 0.9% . Setelah itu kekeruhan NaCl yang berisi bakteri uji tersebut disesuaikan dengan kekeruhan standar BaSO₄ 0,5 (McFarland 0,5). Setelah kekeruhannya sesuai, bakteri uji dalam media cair tersebut dapat ditanam pada media pemeriksaan (*TSB* dan *NA*) yang digunakan untuk penelitian (Baron *et al*, 1982).

4.7.1.3 Membuat Pengenceran Kontrol dan Bahan Uji (Andrografolida)

Membuat pengenceran kontrol dengan konsentrasi menurun dengan menggunakan rumus $%_1 \times V_1 = \%_2 \times V_2$, sebagai berikut : Etanol yang digunakan adalah etanol 96% (%₁), %₂ adalah konsentrasi etanol yang akan dibuat, sedangkan V₂ adalah jumlah volume yang akan dibuat, dan V₁ adalah jumlah volume yang akan diambil dari stok (%₁). Lima tingkatan pengenceran yang dicobakan adalah 10, 6, 2, 0.5 dan 0.1 %. Konsentrasi dimetil sulfoksida (DMSO) yang dicobakan adalah 200, 100, 50, 20, 10 µl. Semua konsentrasi etanol dan DMSO tersebut dilakukan kombinasi kemudian ditanam bersama bakteri uji. Akhirnya diperoleh kombinasi etanol - DMSO yang tidak mematikan bakteri dan juga sebagai kontrol (K) dalam penelitian ini, yaitu 200 µl etanol 96 % (etanol 2 %) dan 50 µl DMSO. Kombinasi konsentrasi inilah yang digunakan dalam melarutkan andrografolida dalam penelitian selanjutnya.

Membuat pengenceran bahan uji (andrografolida) dengan konsentrasi menurun , menurut Soemarno (2000), sebagai berikut:

- 10 mg senyawa andrografolida dilarutkan dalam 0.2 ml (200 μ l) etanol 96% (etanol 2%) dan 0.05 ml (50 μ l) DMSO. Setelah larut, kemudian ditambahkan kaldu hingga konsentrasi andrografolida menjadi 10.000 μ g/ml (A_1 = tabung 1).
- Konsentrasi di atas selanjutnya diambil 500 ml ditambahkan 500 ml kaldu (A_2 = tabung 2), dari tabung 2 diambil 500 ml ditambahkan kaldu 500 ml (A_3 = tabung 3) dan terakhir dari tabung 3 diambil 500 ml ditambahkan 500 ml kaldu (A_4 = tabung 4), sehingga diperoleh konsentrasi untuk penelitian ini yaitu : 5000 (A_2), 2500 (A_3), dan 1250 μ g/ml (A_4). Konsentrasi akhir setelah ditambah bakteri sama banyaknya , menjadi setengahnya.

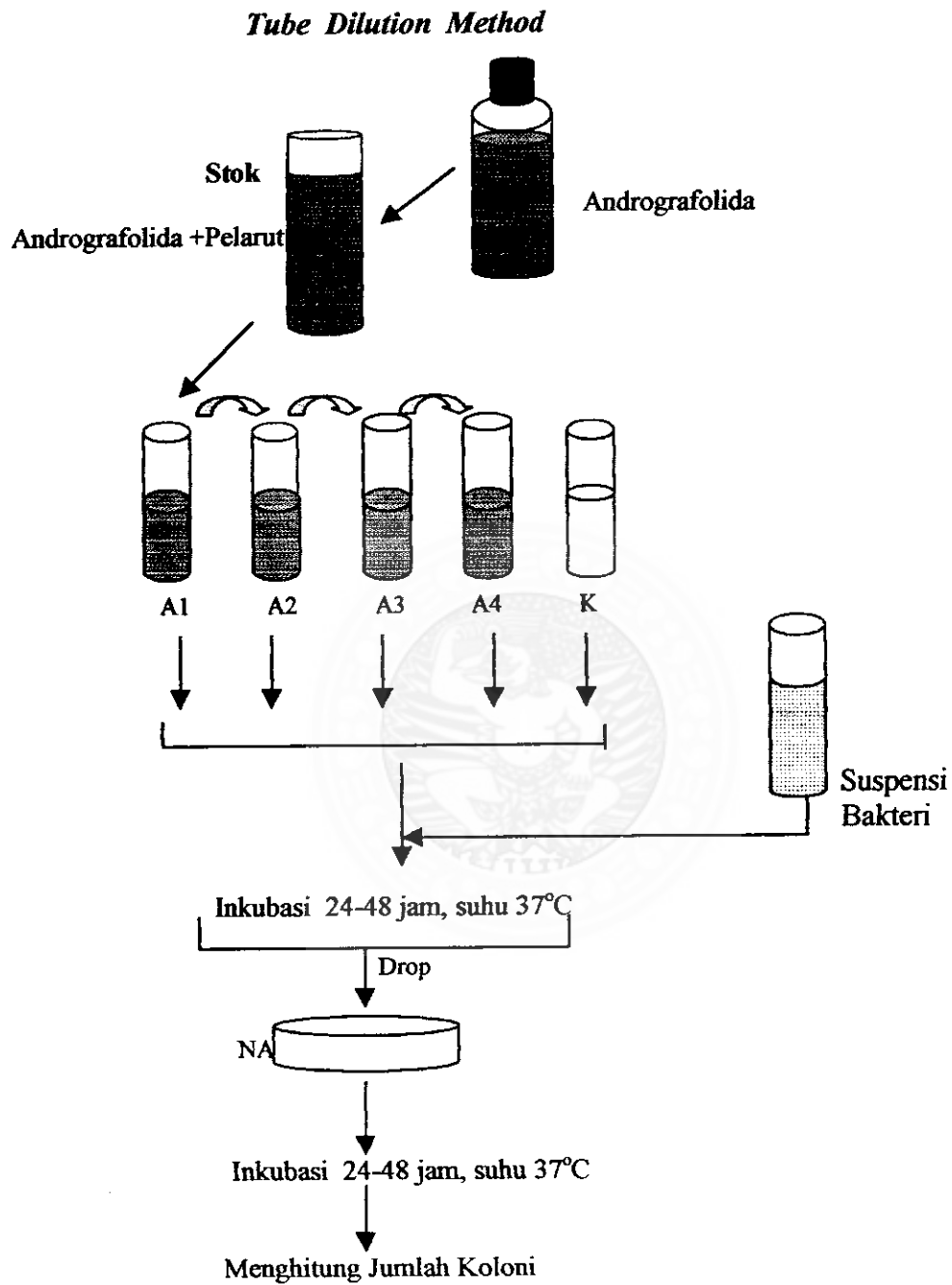
4.7.2 Tahap Pelaksanaan

Untuk mengetahui KBM dari andrografolida terhadap *EIEC*, terlebih dahulu dilakukan metode pengenceran yaitu *tube dilution method*.

Dalam pemeriksaan yang dilakukan, mengacu pada Soemarno (2000), yaitu:

1. 10 mg andrografolida dilarutkan di dalam pelarut 200 μ l etanol 96% dan 50 μ l DMSO.
2. Kemudian diencerkan dengan TSB, sehingga diperoleh sederetan konsentrasi sampel, yaitu 10.000 (A_1), 5000 (A_2), 2500 (A_3), dan 1250 (A_4) μ g/ml.
3. Tiap-tiap konsentrasi ditambah masing-masing 50 μ l suspensi bakteri uji umur 24 jam, sehingga masing-masing konsentrasi mengandung 7.5×10^6 CFU/500 μ l

4. Campur baik-baik dan masuk inkubator 37°C 18 – 48 jam. Secara visual kepadatan bakteri dicatat.
5. Pada waktunya masing-masing konsentrasi diencerkan 10 kali dan 100 kali.
6. Kemudian ditanam pada media agar dengan metode drop
7. Didiamkan hingga kering pada suhu kamar
8. Setelah inkubasi selama 24-48 jam, suhu 37°C , dihitung CFU pada subkultur (jumlah koloni yang muncul) pada konsentrasi terendah yang memperlihatkan aktivitas bakteristatik atau bakterisida (ditetapkan sebagai penurunan 99,9% inokulum), kemudian dibandingkan dengan kontrol. Jumlah koloni bakteri yang boleh dihitung hanya koloni bakteri dengan jumlah antara 30 dan 300. Di atas dari 300 dianggap jumlah koloni terlalu banyak untuk dihitung (TBUD), sedangkan di bawah 30 hanya jumlah koloni yang terendah yang dihitung, hasilnya dilaporkan sebagai kurang dari 30 dikalikan dengan besarnya pengenceran, tetapi jumlah koloni yang sebenarnya harus dicantumkan dalam tanda kurung (Fardiaz, 1989), sedangkan jumlah koloni yang sebenarnya dihitung berdasarkan rumus luas permukaan *petridish* yang digunakan yaitu πr^2 , dimana $\pi = 3,14$ dan $r = 4,5$ ($\frac{1}{2} \times 0,9$).



Gambar 4.2 *Prosedur Tube Dilution Method*

**Senyawa Andrografolida
(isolat murni dari *A. paniculata* Nees.)**



**Pengenceran dalam Tabung
(*Tube Dilution Method*)**



**Uji Aktivitas Antibakteri
Terhadap Bakteri *EIEC***



**Pengamatan dan Perhitungan
Jumlah Bakteri Hidup
(*Viable Count*)**

Gambar 4.3 Bagan Alur Penelitian

BAB 5

ANALISIS HASIL PENELITIAN

5.1 Preparasi Konsentrasi Andrografolida dan Kontrol untuk Uji Aktivitas

5.1.1 Pembuatan Konsentrasi Andrografolida dan Pelarut sebagai Kontrol (K)

Sebelumnya, belum pernah dilakukan penelitian tentang efek andrografolida terhadap bakteri *EIEC*, maka dalam penelitian ini terlebih dahulu dilakukan uji aktivitas dengan sistem uji coba (*trial and error*) mulai dari konsentrasi andrografolida terendah (3,906 µg/ml) sampai didapatkan konsentrasi yang mampu menghambat bakteri. Konsentrasi awal tersebut digunakan mengacu pada penelitian sebelumnya “Uji Aktivitas Antimalaria Senyawa Andrografolida terhadap *Plasmodium falciparum Secara In Vitro*” yang pertumbuhannya terhambat pada konsentrasi 5,020 µg/ml (Widyowati, 2001) dan 5,3067 µg/ml (Wahyuni, 2001). Demikian pula halnya dengan kontrol.

5.1.2 Penetapan Konsentrasi Andrografolida dan Pelarut Sebagai Kontrol.

Dari hasil uji coba (*Trial and Error*) ditetapkan konsentrasi 1250, 2500, 5000 dan 10.000 µg/ml untuk uji aktivitas andrografolida terhadap *EIEC*, sedangkan untuk pelarut andrografolida sekaligus sebagai kontrol, ditetapkan DMSO sebanyak 50 µl dan Etanol 96% sebanyak 200 µl (etanol 2%) dalam Rancangan Penelitian Sesungguhnya (*True Experiment Design*).

5.2 Uji Aktivitas Andrografolida terhadap Bakteri *EIEC* Secara *In Vitro*

Fungsi senyawa andrografolida dalam menghambat pertumbuhan atau membunuh bakteri *Enteroinvasive E. coli (EIEC)* diuji menggunakan metode dilusi, yang dilanjutkan dengan menghitung jumlah bakteri hidup (*Viable Count*) yang tumbuh pada media agar. Namun data pertumbuhan bakteri dengan memperhatikan kekeruhan media perbenihan (*tube dilution method*) tidak dapat digunakan, hal ini disebabkan oleh dua hal, yaitu:

1. Sudah ada endapan/kekeruhan setelah pencampuran medium dengan sampel (andrografolida)
2. Kemungkinan adanya bakteri mati yang dipastikan ikut terbaca dalam pengukuran *OD* bakteri.

Dengan alasan tersebut maka data *OD* bakteri yang merupakan data untuk mencari KHM dalam penelitian ini tidak dapat digunakan.

Data KHM dari aktivitas andrografolida terhadap bakteri *EIEC* dan *E. coli* flora normal sebagai pembanding, serta dua macam kontrol terlihat pada tabel 5.1 berikut.

Tabel 5.1 Hasil Pengamatan Aktivitas Andrografolida terhadap Bakteri Uji dan *E. coli*

Bakteri	Duplo	Konsentrasi Andrografolida ($\mu\text{g/ml}$)					
		1250	2500	5000	10.000	KA	KB
<i>EIEC</i>	1	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+	+
<i>E.coli</i>	1	+	+	+	-	+	+
	2	+	+	+	-	+	+

Keterangan :

KA : Kontrol A [Pelarut (etanol dan DMSO) + Medium + Bakteri] setelah inkubasi

KB : Kontrol B (Medium + Bakteri) setelah inkubasi

+ : Ada pertumbuhan

- : Tidak ada pertumbuhan

Hasil pengamatan pada tabel 5.1 diatas menunjukkan adanya pertumbuhan pada semua *petridish*, kecuali *E. coli* flora normal pada konsentrasi andrografolida 10.000 $\mu\text{g/ml}$ tidak memperlihatkan pertumbuhan sama sekali setelah inkubasi sampai 48 jam. Agar jumlah bakteri hidup pada semua *petridish* dapat dihitung maka selanjutnya dilakukan pengenceran 10 x dan 100 x pada setiap *petridish*, kecuali pembanding dan kontrol, seperti terlihat pada tabel 5.2 berikut.

Tabel 5.2 Hasil Pengamatan Jumlah Bakteri *EIEC* Hidup (CFU/ml)

Repli- Kasi	Konsentrasi Andrografolida ($\mu\text{g/ml}$)							
	1250		2500		5000		10.000	
	Pengenceran		Pengenceran		Pengenceran		Pengenceran	
	10 x	100 x	10 x	100 x	10 x	100 x	10 x	100 x
1	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	$>3,0 \times 10^2$ ($39,5 \times 10^2$)	$>3,0 \times 10^3$ ($29,1 \times 10^3$)	$>3,0 \times 10^2$ ($4,4 \times 10^2$)	$<3,0 \times 10^3$ ($2,4 \times 10^3$)
2	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	$>3,0 \times 10^2$ ($32,7 \times 10^2$)	$>3,0 \times 10^3$ ($28,2 \times 10^3$)	$<3,0 \times 10^2$ ($0,4 \times 10^2$)	$<3,0 \times 10^3$ ($0,8 \times 10^3$)
3	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	$<3,0 \times 10^2$ ($0,8 \times 10^2$)	$<3,0 \times 10^3$ ($1,6 \times 10^3$)
4	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	$<3,0 \times 10^2$ ($0,4 \times 10^2$)	$<3,0 \times 10^3$ ($0,4 \times 10^3$)
5	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	$<3,0 \times 10^2$ ($0,4 \times 10^2$)	$<3,0 \times 10^3$ ($0,4 \times 10^3$)
6	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	$<3,0 \times 10^2$ ($0,8 \times 10^2$)	$<3,0 \times 10^3$ ($0,8 \times 10^3$)
7	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	$<3,0 \times 10^2$ ($0,8 \times 10^2$)	$<3,0 \times 10^3$ ($0,4 \times 10^3$)
8	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	$<3,0 \times 10^2$ ($1,6 \times 10^2$)	$<3,0 \times 10^3$ ($0,4 \times 10^3$)
MEAN	-	-	-	-	-	-	$<3,0 \times 10^2$ ($0,8 \times 10^2$)	$<3,0 \times 10^3$ ($0,6 \times 10^3$)

Keterangan : TBUD = Terlalu Banyak Untuk Dihitung

Dari tabel 5.2 di atas, ternyata antara perlakuan pada konsentrasi 1250, 2500 dan 5000 $\mu\text{g/ml}$ rata-rata memperlihatkan jumlah bakteri terlalu banyak untuk dihitung (TBUD) (jumlah koloni bakteri di atas 300), tetapi pada konsentrasi 10.000

$\mu\text{g/ml}$ menunjukkan jumlah koloni bakteri hidup di bawah 30 sehingga dianggap pada konsentrasi tersebut ($10.000 \mu\text{g/ml}$) pertumbuhan bakteri *EIEC* terhambat .

Dengan memperhatikan model data pada hasil penelitian ini baik pada penelitian pertama maupun ke dua, dimana tidak diperoleh data secara kuantitatif, dapat dikatakan bahwa data tersebut tidak dapat diolah secara statistik. Demikian pula pada perlakuan dengan konsentrasi andrografolida $10.000 \mu\text{g/ml}$ memperlihatkan jumlah koloni bakteri hidup lebih kecil dari 30, dengan demikian uji lanjutpun tidak dapat dilakukan.



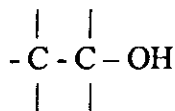
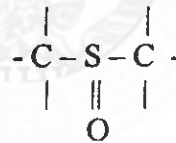
BAB 6 PEMBAHASAN

Pada uji aktivitas andrografolida sebagai antibakteri dalam penelitian ini, digunakan bakteri *EIEC* mengingat *EIEC* merupakan salah satu bakteri yang menyebabkan diare berdarah, dan mewakili bakteri penyebab gastroenteritis yang tergolong gram negatif.

Pada uji aktivitas ini ditentukan baik KHM maupun KBM. Namun data KHM dari pengukuran *OD* menggunakan spektrofotometer yang diperoleh berdasarkan kekeruhan bakteri pada media perbenihan, tidak dapat digunakan karena andrografolida merupakan senyawa tergolong non polar yang ternyata menyebabkan kekeruhan atau menghasilkan endapan pada media perbenihan yang digunakan (kalau senyawa polar tidak menimbulkan kekeruhan dengan senyawa dalam perbenihan). Selain itu kemungkinan besar terdapat bakteri mati yang disebabkan aktivitas senyawa andrografolida ikut pula terbaca dalam *OD* bakteri, sehingga kemurnian data KHM yang merupakan bakteri hidup dalam penelitian ini sangat diragukan.

Dipilihnya medium TSB untuk perbenihan dalam penelitian ini karena merupakan medium cair untuk kultivasi mikroorganisme dalam varietas luas, dan telah direkomendasikan oleh *NCCLS (The National Committee for Clinical Laboratory Standards)* untuk uji kerentanan bakteri dengan metode Kirby-Bauer serta medium pilihan untuk uji sterilitas (Murray *et al.*, 2003). Dasar kandungan medium TSB yang digunakan adalah *Calf Brains, Beef Heart, Proteose peptone, Sodium chloride*, dan *disodium phosphat* (Difco, USA).

Etanol digunakan sebagai pelarut dalam penelitian ini karena merupakan salah satu senyawa non polar dan lebih aman untuk tubuh mikroorganisme (kurang toksik) dibanding senyawa organik lain seperti metanol, kloroform, eter dll. Hasil pengujian awal menunjukkan bahwa konsentrasi 6% etanol ternyata tidak mematikan bakteri sehingga dapat digunakan dalam penelitian ini, namun konsentrasi tersebut tidak dapat melarutkan sampel (senyawa andrografolida). Sebagai alternatif dipadukan dengan senyawa DMSO (dimetil sulfoksid) yang sangat melarutkan senyawa tersebut tetapi dengan konsentrasi yang sangat kecil (50 μ l); dan etanol 96 % yang dibutuhkan hanya 200 μ l. Dengan kombinasi tersebut, ternyata bakteri *EIEC* mampu hidup dan berkembang biak (KA) (tabel 5.2).

Etanol (C₂H₅OH)DMSO/Dimetil sulfoksida (C₂H₆SO)

Gambar 6.1 Struktur molekul dari etanol dan dimetil sulfoksida.
(Sumber : Dyah N.W. dan Sondakh R.,2000. Hubungan Struktur dan Proses Metabolisme Obat, hal. 97).

Dalam penelitian ini telah dilakukan percobaan aktivitas andrografolida terhadap bakteri *EIEC* dengan konsentrasi yang sudah sangat maksimal dinyatakan sebagai obat, yaitu 1250, 2500, 5000, dan 10.000 μ g/ml. Konsentrasi tersebut yang ditetapkan untuk digunakan dalam penelitian ini merupakan hasil akhir dari perkembangan percobaan yang sifatnya uji coba yang dilakukan sebelumnya,

meskipun uji yang digunakan hanya uji aktivitas dengan tujuan untuk mendapatkan konsentrasi yang tepat sebagai antibakteri.

Selain hal tersebut efek samping obat juga ikut dipertimbangkan. Pada banyak obat efek samping dipandang sebagai efek yang tidak diinginkan karena mempengaruhi kesehatan individu. Walaupun senyawa Andrografolida yang telah diketahui mempunyai khasiat yang beragam, namun hanya dengan konsentrasi 20 mg sehari tepung sambiloto selama 6 minggu dapat membuat infertil tikus jantan dan 2 gram sehari per kilogram berat badan (BB) selama 6 minggu (ribuan kali lebih tinggi dari dosis biasa untuk manusia) dapat membuat tikus betina gagal hamil ketika dipertemukan dengan jantan (Anonim³, 2003).

Dari hasil penentuan aktivitas antibakteri didapatkan hasil bahwa senyawa andrografolida ternyata mempunyai aktivitas sebagai antibakteri. Hal ini ditunjukkan dengan KHM senyawa andrografolida terletak pada konsentrasi 10.000 µg/ml. Aktivitas andrografolida sebagai antibakteri, ini berkaitan dengan struktur molekul obat tersebut (halaman 8). Sebagaimana dikemukakan oleh Siswandono dan Soekardjo (2000) bahwa struktur kimia obat ternyata dapat menjelaskan sifat-sifat obat dan terlihat bahwa unit-unit struktur atau gugus-gugus molekul obat berkaitan dengan aktivitas biologis. Dengan melihat struktur molekul dari andrografolida yang mempunyai beberapa macam gugus fungsional (halaman 8), dapat diketahui terdapat interaksi yang sangat kuat dengan molekul reseptor biologis, sebagaimana dikemukakan oleh Purwanto dan Susilowati (2000) bahwa aktivitas biologis

merupakan akibat interaksi molekul obat dengan gugus fungsional molekul reseptor. Interaksi ini dapat berlangsung karena kekuatan ikatan kimia tertentu. Untuk suatu tujuan tertentu, misalnya diinginkan efek berlangsung lama dan irreversibel seperti pada obat antibakteri dan antikanker diperlukan ikatan yang lebih kuat yaitu ikatan kovalen. Ikatan kovalen merupakan ikatan yang paling kuat dengan rata-rata kekuatan ikatan 100 kkal/mol

Sehubungan dengan hal tersebut, dalam struktur molekul andrografolida umumnya terdapat ikatan kovalen, sehingga dengan kekuatan sisi aktif gugus metil ($-CH_3$) pada atom C nomor 20 struktur senyawa andrografolida (gambar 2.1.) dapat berikatan dengan gugus hidroksil ($-OH$) pada permukaan reseptor obat sehingga dapat menghancurkan proses biosintesis dalam tubuh mikroorganisme, sebagaimana dikemukakan oleh Purwanto dan Susilowati (2000) bahwa ikatan CH_3-OH , kekuatannya paling besar dari yang lain yaitu 40 – 140 kkal/mol. Selain itu Siswandono dan Soekardjo (1994) menyatakan bahwa untuk memberikan efek biologis, obat dalam bentuk aktifnya harus berinteraksi dengan reseptor atau tempat aksi atau sel target, dengan konsentrasi yang cukup tinggi, sehingga dengan ikatan kovalen tersebut dapat terjadi mekanisme kerja andrografolida dengan enzim transpeptidase (enzim berperan dalam sintesis dinding sel), meskipun harus dengan konsentrasi yang cukup tinggi ($10.000 \mu g/ml$), yang ditunjukkan oleh serangan gugus hidroksil serin enzim transpeptidase pada gugus aktif karbonil yang bermuatan positif pada cincin diterpenoid lakton senyawa andrografolida, sehingga terjadi

hambatan sintesis peptidoglikan, seperti yang diperlihatkan oleh mekanisme kerja antibiotika β -laktam (Soekardjo dkk, 2000). Akibatnya dinding sel menjadi lemah, dan karena tekanan turgor dari dalam, dinding sel akan pecah atau lisis sehingga bakteri mengalami kematian. Reaksi penghambatan enzim transpeptidase oleh antibiotika β -laktam dapat dilihat pada gambar 6.2, sedangkan berdasarkan alasan ikatan kovalen yang sangat kuat antara gugus aktif metil ($-\text{CH}_3$) dari senyawa andrografolida dengan gugus hidroksil ($-\text{OH}$) dari permukaan reseptor enzim transpeptidase, maka perkiraan mekanisme kerja andrografolida terhadap enzim transpeptidase dapat dilihat pada gambar 6.3.

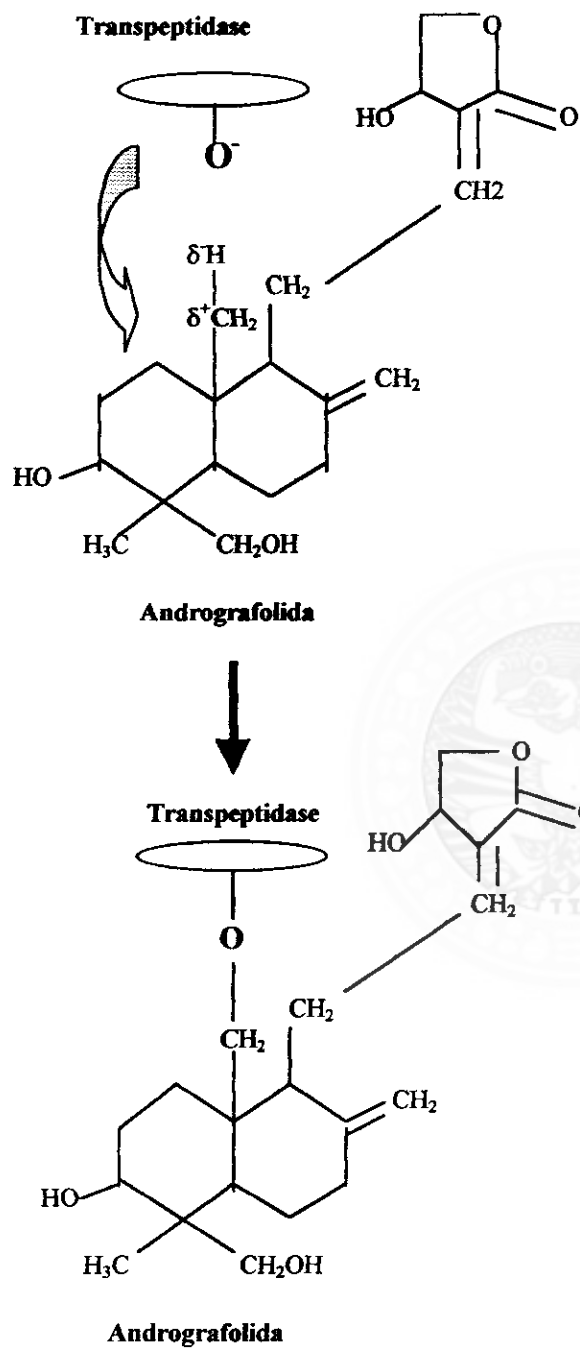
Dengan memperhatikan hasil penelitian terdahulu tentang efek andrografolida, ternyata hanya dengan konsentrasi 12,16 $\mu\text{g/ml}$ uji schizontosida (Wiranti, 2001), 5,020 $\mu\text{g/ml}$ (Widyowati, 2001), dan 5,3067 $\mu\text{g/ml}$ (Wahyuni, 2001), andrografolida mampu menghambat pertumbuhan *Plasmodium falciparum* stadium gametosit *in vitro*, bahkan tidak berbeda secara bermakna (5,235 $\mu\text{g/ml}$) dengan primakuin (Widyowati, 2001). Hal tersebut disebabkan karena andrografolida yang merupakan senyawa diterpen lakton mempunyai ciri-ciri yang menurut Purwanto (2000) termasuk senyawa dengan struktur spesifik. Ciri-cirinya antara lain sebagai berikut :

1. Efektif pada kadar yang rendah
2. Melibatkan ikatan kimia yang lebih kuat dibanding ikatan pada senyawa yang berstruktur tidak spesifik
3. Sifat fisik dan kimia sama-sama berperan dalam menentukan efek biologis.

Plasmodium falciparum mati dengan konsentrasi rendah dari andrografolida kemungkinan besar karena penyebab malaria tersebut hanya memiliki membran sitoplasma, sehingga obat ini dapat menembus membran dengan mudah melalui proses difusi pasif. Penembusan andrografolida melalui pori membran sitoplasma, tidak dimungkinkan karena mempunyai BM 350, sedang pori membran sitoplasma dengan garis tengah 4 Å hanya dapat dilewati molekul dengan BM lebih kecil dari 150 (Tri Purwanto dan Sondakh, 2000). Dengan demikian, mudahnya penembusan senyawa andrografolida melalui membran sitoplasma *P. falciparum* berkaitan dengan sifat kelarutan senyawa non polar tersebut dalam pelarut organik (non polar) seperti kloroform, aseton, etanol, dan lain-lain, dan juga sifat tidak terionisasinya senyawa tersebut. Menurut Purwanto dan Susilowati, (2000) hal tersebut disebabkan karena untuk dapat menimbulkan aktivitas biologis, pada umumnya obat dalam bentuk tidak terionisasi sehingga makin besar nilai koefisien partisi kloroform dari bentuk tidak terionisasi obat, makin besar persentase obat yang diabsorpsi.

Lain halnya dengan aktivitas andrografolida terhadap pertumbuhan *EIEC* yang terhambat dengan konsentrasi 10.000 µg/ml dalam penelitian ini. Hal ini kemungkinan besar disebabkan oleh adanya struktur tubuh bakteri Gram negatif, yang tidak dimiliki oleh bakteri Gram positif dan *P. falciparum*, yaitu :

1. Lipopolisakarida, yang membentuk lapisan luar dinding sel bakteri merupakan tempat penentu antigen (Ag) utama (O) pada permukaan sel bakteri (Brooks



Gambar 6.3 Kemungkinan serangan gugus hidroksil serin enzim transpeptidase terhadap karbon karbonil pada cincin aktif diterpenoid laktone yang bermuatan positif pada senyawa andrografolida.

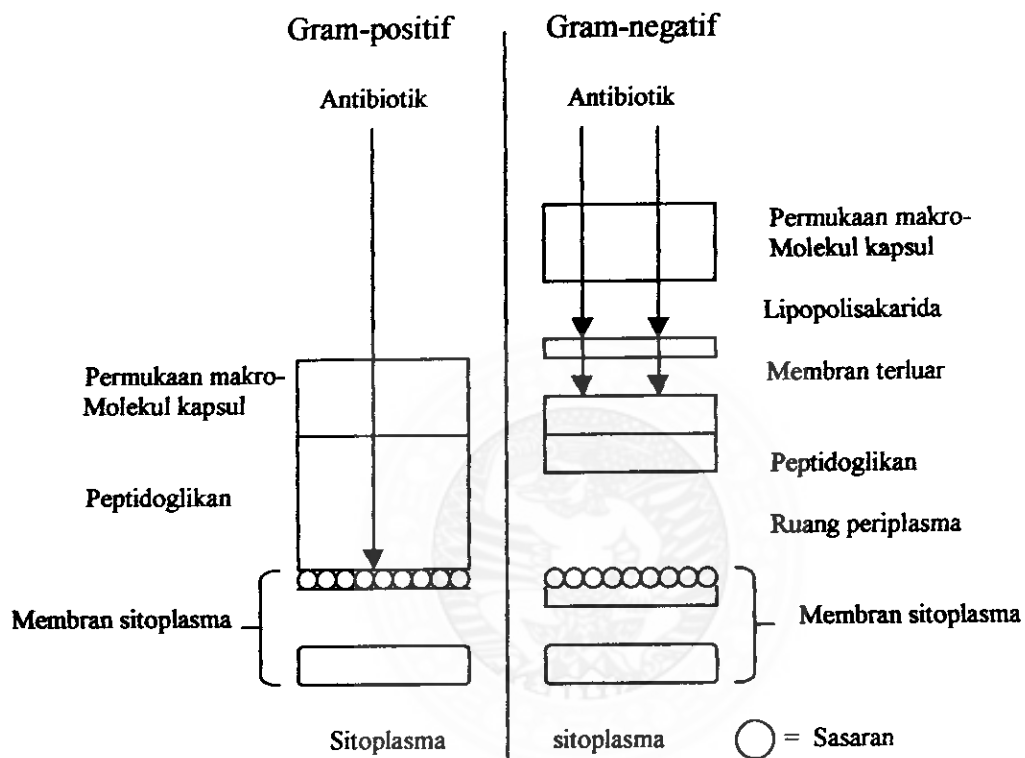
3. Peptidoglikan, disebut juga murein atau mukopeptida yang merupakan komponen dinding sel yang khas dimiliki oleh bakteri umumnya.

Peptidoglikan meskipun komposisinya lebih sedikit (10%) pada dinding sel bakteri Gram negatif dibandingkan bakteri Gram positif (30-70 %) (Schlegel and Karin, 1994), tetapi cukup kuat menahan tekanan dari luar yang tidak menguntungkan. Namun dengan konsentrasi andrografolida 10.000 µg/ml ternyata senyawa andrografolida mampu mengatasi pertahanan komponen dari dinding sel tersebut sehingga dapat menembus masuk ke dalam sel bakteri *EIEC*.

Reaksi penghambatan enzim transpeptidase yang mengkatalisis biosintesis peptidoglikan dari dinding sel bakteri *EIEC* dapat saja terjadi oleh senyawa andrografolida karena kekuatan ikatan yang dimiliki oleh ke dua senyawa tersebut seperti yang telah digambarkan sebelumnya (Gambar 6.2). Soekardjo dkk (2000) menyatakan bahwa dinding sel bakteri Gram positif berbeda dengan bakteri Gram negatif dan hal ini menjelaskan mengapa banyak turunan β-laktam yang tidak sensitif terhadap bakteri Gram negatif. Perbedaan komposisi dinding sel bakteri Gram positif dan Gram negatif dapat dilihat pada gambar 6.4.

Untuk menunjukkan kerja antibiotika pada bakteri Gram negatif (gambar 6.4) seperti *E. coli*, antibiotik pertama-tama harus menembus membran terluar selubung bakteri secara difusi pasif melalui saluran yang terbentuk oleh pori protein. Sesudah menembus membran terluar, antibiotik ini masuk melalui dinding sel, melewati ruang periplasma dan mencapai sasaran, yaitu enzim protease (enzim yang

bertanggung jawab terhadap biosintesis dinding sel) yang terdapat pada membran terdalam (sitoplasma) (Soekardjo dkk., 2000).



Gambar 6.4 Perbedaan penembusan antibiotik pada dinding sel bakteri Gram positif dan Gram negatif.

(Sumber: Soekardjo dkk., 2000. Hubungan struktur-aktivitas obat antibiotika, hal. 113).

Hal tersebut diharapkan berlaku pula pada sifat bakteriostatik dari senyawa andrografiida meskipun harus melalui difusi pasif terfasilitasi yang berakhir dengan:

1. Menghentikan pertumbuhan bakteri, dengan cara menghambat biosintesis peptidoglikan
2. Menurunkan kelangsungan hidup kultur.

3. Membuat sel menjadi lisis

Dengan meningkatnya konsentrasi senyawa andrografolida, maka penembusan terhadap dinding sel dan membran sitoplasma dari sel bakteri *EIEC* menjadi lebih besar sehingga interaksi dengan reseptor biologis makin besar pula. Akibatnya aktivitas antibakteri andrografolida lebih besar pula.

Sehubungan dengan uraian di atas terbukti bahwa senyawa dengan unit struktur kimia sama dapat memberikan aktivitas biologis bermacam-macam oleh karena dengan sedikit perubahan unit struktur tersebut, ternyata dapat berinteraksi dengan reseptor yang berbeda sehingga menimbulkan respon farmakologis yang berbeda pula (Siswandono dan Soekardjo, 2000). Namun pada hasil penelitian ini, senyawa andrografolida dapat sebagai antibakteri meskipun harus dengan konsentrasi tinggi (10.000 $\mu\text{g/ml}$), hal ini disebabkan aktivitas biologis senyawa andrografolida kemungkinan besar terletak pada dinding sel bakteri, sedangkan sebagai antimalaria aktivitas biologis senyawa tersebut pada membran sitoplasma, sehingga dibutuhkan rata-rata hanya 5 $\mu\text{g/ml}$ untuk menghambat pertumbuhan *P. falciparum* stadium gametosit (Wahyuni, 2001; Widyowati, 2001).

Jika dibandingkan dengan *E. coli* flora normal yang mati pada konsentrasi andrografolida 10.000 $\mu\text{g/ml}$ (tabel 5.2), dapat dipastikan bahwa untuk proses pengobatan diare pada manusia, konsentrasi 10.000 $\mu\text{g/ml}$ senyawa andrografolida sulit/tidak dapat digunakan karena dapat memusnahkan *E. coli* flora normal pada saluran cerna manusia.

BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan terdahulu, dapat ditarik beberapa kesimpulan sebagai berikut :

1. Senyawa andrografolida isolat murni dari *Andrographis paniculata* Nees. mempunyai sifat bakteriostatik terhadap bakteri *EIEC* secara *in vitro*.
2. Senyawa andrografolida isolat murni dari *A. paniculata* Nees. tidak bersifat bakterisidal terhadap bakteri *EIEC* secara *in vitro*
3. Sifat bakteriostatik dari senyawa andrografolida, ditunjukkan oleh KHM senyawa tersebut pada konsentrasi 10.000 µg/ml.
4. Sifat bakterisidal dari senyawa andrografolida, tidak ditunjukkan oleh KBM senyawa tersebut.

7.2 Saran

Berdasarkan kesimpulan hasil penelitian di atas, disarankan sebagai berikut:

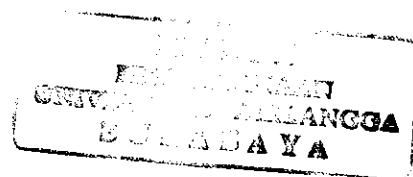
1. Agar berfungsinya senyawa andrografolida sebagai obat atau campuran obat-obatan untuk diare, perlu diteliti kembali konsentrasi di bawah 10.000 µg/ml yang tidak mengganggu kehidupan flora normal usus.
2. Melakukan penelitian aktivitas antibakteri senyawa andrografolida terhadap bakteri-bakteri patogen lain.

3. Melakukan penelitian lanjutan untuk melihat kerusakan pada struktur sel bakteri *EIEC* akibat aktivitas senyawa andrografolida.



DAFTAR PUSTAKA

- Anonim¹, 2002. **Pathogenesis of EIEC: *Escherichia coli* and *Shigella spp.***
<http://www.md.huji.ac.il/md/courses/cmicrobiology/ppt/Ecoli.ppt>
- _____², 2003. **Andrographolide: COA of the Andrographolide 95%.**
<http://www.wemai.com/category/botext/andrograph.htm>
- _____³, 2003. **Infertile Due to Andrographolide: Healing People.**
www.healingpeople.com/hphtm/primapub/pg0008.htm 84k
- Aliadi, A. dan Sudibyo R. B., 1996. **Tanaman Obat Pilihan.** Yayasan Sidwayah Jakarta, hal. 227-231.
- Almatsier M., 2001. **Peran Dokter dalam Pemanfaatan Obat Tradisional pada Pelayanan Kesehatan.** Makalah Disampaikan pada Konggres Nasional Obat Tradisional Indonesia, Diterbitkan Dexa Media (Majalah Kedokteran dan Farmasi) No. 2 Vol. 14, Surabaya, hal. 77.
- Baron E. J, Finegold S. M, 1982. **Baily & Scott's Diagnostic Microbiology** 6th edition, Philadelphia: MosbyyearBook, Inc, p. 533 – 538.
- Baron E. J, Linsey J. R, Finegold S. M, 1994. **Baily & Scott's Diagnostic Microbiology.** 9th edition, Philadelphia: Mosbyyear Book, Inc, p.168-175
- Berghe, D A, Vlietinck, AJ., 1991. **Screening Methods for Antibacterial dan Antiviral Agent From Higher Plant.** Methods in Plant Biochemistry, Vol.6, London Harchourt Brace Javanovich Publisher, p. 47-58.
- Brooks G. F., Butel J. S and Ornston L. N., 1996. **Mikrobiologi Kedokteran.** Edisi 20, Alih Bahasa Edi Nugroho dan R. F. Maulany, Penerbit Buku Kedokteran, Jakarta, hal. 19, 53-54.
- Brooks G. F, Butel J. S., Morse., 2001. **Medical Microbiology**, Twenty Second Ed. Penerjemah: Bagian Mikrobiologi FK Unair, Penerbit Salemba Medika, Jakarta, hal. 356, 359, 362-364
- Chang HM and Bur PPH., 1965. **Pharmacology and Application of Chines Materia Medica**, Vol. 2, World Scientific Publishing Co. Ptd. Ltd Hongkong, p. 918-924



- Difco, Dickinson B. and Company Sparks., **Composition of Trypticase Soy Broth**. Maryland, USA.
- Dwiputro A.Y., 2000. **Uji Sitotoksitas Andrografolida dan Ekstrak Etanol Herba Sambiloto pada Kultur sel Rhabdomyosarkoma dengan Metoda Pewarnaan MTT**. Skripsi, FF Unair, Surabaya.
- Dyah N.W. dan Sondakh R., 2000. Hubungan Struktur dan Proses Metabolisme Obat, dalam; **Kimia Medisinal**. Jilid 1. Editor Siswandono dan Bambang S. Penerbit Airlangga University Press, Surabaya, hal. 97.
- Dzulkarnain B., Sundari D., Chozin A., 1996. **Tanaman Obat Bersifat Antibakteri di Indonesia**. Tinjauan Kepustakaan, Puslitbang Farmasi, BPPK Depkes RI, Jakarta, hal. 35-37.
- Fardias S., 1989. **Analisis Mikrobiologi Pangan**. Petunjuk Laboratorium, Dep. P. dan K. PAU Pangan dan Gizi, IPB, Bogor. Hal. 36-37.
- Hariati Y., 1991. **Uji Aktivitas Imunomodulator daun Sambiloto Terhadap Sistem Fagositosis Mencit**. Skripsi, FF Unair, Surabaya.
- Heyne K., 1987. **Tumbuhan berguna Indonesia**. Cetakan 1, Jilid III. Alih bahasa: Balitbanghut, Yayasan Sarana Wana Jaya, Jakarta, hal 1757, 926-924.
- Hold J. G., Krieg N. R., Sneath P.H.A., Staley J. T., and Williams S.T., 1994. **Determinative Bacteriology**. Ninth Edition, Copyright Williams & Wilkins, Baltimore USA, p. 179.
- Kamaruddin Z., 2001. **Diare Persisten: Telaah Terhadap Terapi Nutrisi**. Majalah Penyakit Inspeksi Indonesia, No. 1, Jakarta, hal. 18.
- Lay B. W. dan Hastowo S, 1993. **Mikrobiologi**. PAU Bioteknologi IPB, Bogor, hal. 102, 105.
- Lay B.W., 1994. **Analisis Mikrobiologi Di Laboratorium**. Penerbit P.T. Raja Grafindo Persada, Jakarta, hal. 52-54.
- Matsuda T., Kuroyanagi M, Sugiyama S, Umehara K, Ueno A, Nishi K., 1994. **Cell Differentiation Inducing Diterpenes From *A. Paniculata* Nees**. In: Chemical and Pharmaceutical, Bulletin, Vol. 42 No.6, Pharmaceutical Society of Tokyo, p. 1216-1225.

- Murray P.R., Baron E.J., Tenenbaum J.C., Tenenbaum J.C., and Tenenbaum J.C., 2003. **Manual of Clinical Microbiology**. 8th Edition, Vol.1. American Society for Microbiology (ASM) Press, Washington, p. 379, 656, 659.
- Paxton D.J., 1991. **Assay for Antifungal Activity**. In *Method in Plant Biochemistry* Vol.6 London, Harcourt Brace Jovanovich Publisher, p. 33-46.
- Pelczar M.A., dan ECS. Chan, 1988. **Dasar-Dasar Mikrobiologi**. Alih Bahasa Ratna Dkk, Penerbit Universitas Indonesia Press, Jakarta. p.718-720,810-811.
- Puri A., Saxena R., Saxena R.P., Saxena K.C., Srivastava V., Tandon J.S., 1993. **Immuno Stimulant Agent from *A. paniculata***. *Journal Natural Product*, Volume 13 No. 4. p. 193-198
- Purwanto, 2000. Hubungan Struktur, Kelarutan dan Aktivitas Biologis Obat dalam; **Kimia Medisinal**. Jilid 1. Editor Siswandono dan Bambang S. Penerbit Airlangga University Press, Surabaya. Hal. 122, 132.
- Purwanto dan Susilowati R., 2000. Hubungan Struktur, Ikatan Kimia dan Aktivitas Biologis obat, dalam; **Kimia Medisinal**. Jilid 1. Editor Siswandono dan Bambang S. Penerbit Airlangga University Press, Surabaya, hal. 181-182.
- Purwanto E. H., 2001. **Tinjauan Sekilas Kebijakan Program Pemberantasan Diare (P2 Diare)**. *Majalah Penyakit Infeksi Indonesia*, No. 1, Jakarta, hal. 30.
- Radjaram A., Mulja Hadi S., Hasan A. F., 2000. **Dispersi Solida Andrografolida Untuk Rancangan Dasar Formulasi Ekstrak Kering Terstandar dari Herba *A. paniculata***. Lemlit Unair, Surabaya, hal. 2, 18, 19.
- Rahmawati, T., 2001. **Uji Efek Teratogenik Isolat Andrografolida dari Herba Sambiloto (*A. paniculata*) terhadap Mencit Betina Hamil**. Skripsi, FF Unair, Surabaya.
- Rusli S., 2001. **Tatalaksana Diare Berdarah Pasien Dewasa**. Tinjauan Kepustakaan, *Majalah Penyakit Infeksi Indonesia*, No.1, Jakarta, hal. 8-9.
- Santa, I. G. P., 1996. **Studi Taksonomi Sambiloto (*A. paniculata*) warna Tumbuhan Obat Indonesia**. Vol. 3 No. 1 hal. 14

- Saxena S., 1998. Chemistry and Pharmacology of *Andrographis* Spesies. Published in *Indian Drugs* 35 (8). **Andrographolide: Andrographis Home: Phitochemistry of *A. paniculata*.**
<http://www.geocities.com/andrographis/phytochemistry.htm>.
- Schlegel H.G. dan Karin S., 1994. **Mikrobiologi Umum**. Edisi keenam, Penerjemah Prof. R.M. Tedjo Baskoro, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta, hal. 49, 51, 53, 56-58.
- Siswandono dan Sukardjo B., 1998. **Prinsip-Prinsip Rancangan Obat**. Airlangga University Press, Surabaya, hal. 86, 93.
- Siswandono dan Sukardjo B., 2000. **Kimia Medisinal**. Airlangga University Press, Surabaya, hal. 2-3.
- Soekardjo B. Hardjono S., dan Sondakh R., 2000. Hubungan Struktur Aktivitas Obat Antibiotika, dalam: **Kimia Medisinal**. Jilid 2. Editor Siswandono dan Bambang S. Penerbit Airlangga University Press, Surabaya, hal. 112, 113
- Soemarno, 2000. **Isolasi dan Identifikasi Bakteri Klinik**. Penerbit Akademi Analisis Kesehatan Yogyakarta Departemen Kesehatan Republik Indonesia, hal. 121-122
- Soetanto T., Sondang M. S., Sukiman R., 2001. **Pola Kepekaan Mikroba Terhadap Antibiotik Yang Lazim Digunakan Pada Kasus Diare Akut**. Artikel orisinil, *Majalah Penyakit Infeksi Indonesia*, Jakarta, hal. 4.
- Staf Pengajar FKUI, 1994. **Mikrobiologi Kedokteran**. Edisi Revisi, penerbit Binarupa Aksara, Jakarta, hal. 163-167.
- Steel, R.G.D., and Torrie, J. H., 1980. **Principles and Procedures of Statistics**. McGraw-Hill International, Alih bahasa; Ir. Bambang Sumantri, Penerbit Gramedia, Jakarta, hal. 145.
- Stricland GT., 1991. Enteric Bacterial Infections in: **Hunter's Tropical Medicine**. Seventh ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia, p.340-344, 377-380.
- Sulastri, S., 2001. **Tatalaksana Diare Berdarah (Bloody diarrhoea) pada Pasien Di Pelayanan Rawat Jalan**. Tinjauan Pustaka, *Majalah Penyakit Infeksi Indonesia*, No.1, Jakarta, hal. 13.

- Tri Purwanto B. dan Susilowati R., 2000. Hubungan Struktur, Sifat Kimia Fisika Dan Aktivitas Biologis, dalam; **Kimia Medisinal**. Jilid 1. Editor Siswandono dan Bambang S. Penerbit Airlangga University Press, Surabaya. Hal. 161
- Tri Purwanto B. dan Sondakh R., 2000. Hubungan Struktur, Sifat Kimia Fisika Dengan Proses Absorpsi, Distribusi dan Ekskresi Obat, dalam; **Kimia Medisinal**. Jilid 1. Editor Siswandono dan Bambang S. Penerbit Airlangga University Press, Surabaya, hal. 39-41
- Wahyuni, 2001. **Uji Aktivitas Anti Malaria Ekstrak Metanol Terstandar Sambiloto Terhadap *Plasmodium falciparum* Stadium gametosit *in vitro***. Skripsi, FF. Unair, Surabaya.
- Wiranti W., 2001. **Uji Daya Schizontosida Andrografolida Isolat dari Herba Sambiloto pada *Plasmodium falciparum in vitro***. Skripsi, FF. Unair, Surabaya.
- Widyawaruyanti A., 1998. **Uji Immunostimulan Andrografolida terhadap Sekresi IFN- γ dan TNF- α oleh subset limfosit THI Mencit (TH-1) dalam Percobaan Kultur Sel**. Laporan Penelitian DIP OPF UNAIR, Surabaya.
- Widyawaruyanti A., 1999. **Aktivitas Immunomodulator Senyawa - Senyawa Diterpenoid dari *A. paniculata* Nees. terhadap Fungsi Sitotoksisitas Limfosit T-Sitotoksik (CD8+) Mencit**. Thesis FF Unair, Suarabaya.
- Widyowati R., 2001. **Uji Aktivitas Antimalaria Senyawa Diterpen Lakton dari Herba *A. paniculata* Nees. Terhadap *P. falciparum* pada Stadium Gametosit *in vitro***. Skripsi FF, Surabaya.
- Wijayakusuma H., Agustinus W., Thomas Y., Setiawan D., Bambang W., 1996. **Tanaman berkhasiat Obat Indonesia**. Jilid II, Pustaka Kartini, Jakarta, hal 117-119

Lampiran 1

Nomor : 5982 /J03.4/PP/2003

7 Agustus 2003

Lamp :

Hal : Izin melaksanakan penelitian/fasilitas Laboratorium

Yth. Ketua TDC Univ.Airlangga Kampus C
Surabaya

Guna penulisan penelitian untuk Tesis peserta Program Magister Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar angkatan tahun 2001/2002 Program Pascasarjana Universitas Airlangga,

N a m a : Nikmah M.

N i m : 090114225 / M

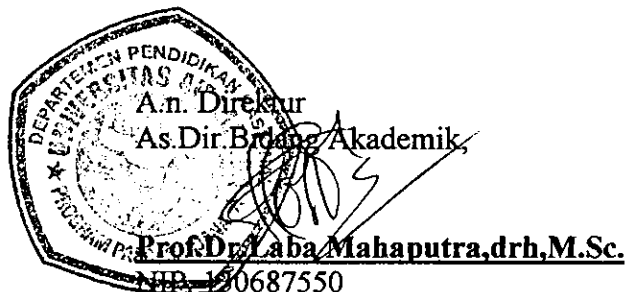
J u d u l : " AKTIVITAS ANDROGRAFOLIDA ISOLAT DARI A.PANICULATE NEES. TERHADAP BAKTERI ENTEROINVASIVE E. COLI SECARA IN VITRO"

Pembimbing : Dr. H.Eddy Bagus Wasitodr,M.S,SpMK

Pembimbing I : Marijam Purwanta,Dra,Apt,M.Sc

Maka dengan ini kami mohon perkenan Saudara untuk memberikan izin kepada yang bersangkutan untuk melaksanakan penelitian di Instansi Saudara.

Demikian dan atas bantuan Saudara kami sampaikan terima kasih.





DEPARTMENT OF EDUCATION AND CULTURE
TROPICAL DISEASE CENTRE (T D C)
AIRLANGGA UNIVERSITY

KAMPUS C, UNAIR JL. MULYOUREJO SURABAYA
 PHONE : 62 - 31 - 5992445, 5992446 FAX : 62 - 31 - 5992445 ZONE : 60115
 E-mail : tdcusa@rad.net.id

15 September 2003

No. : 296 /TDC-UNAIR/2003
 Hal. : ijin menggunakan fasilitas alat di TDC

Kepada Yth.
 Direktur Bidang Akademik
 Program Pascasarjana Unair
 Surabaya

Menjawab surat no. 5982/J03.4/PP/2003 tertanggal 7 Agustus 2003 perihal permohonan ijin menggunakan fasilitas penelitian di TDC-Unair bagi mahasiswa Program Magister Program Studi Ilmu Kedokteran Dasar angkatan tahun 2001/2002 a.n Nikmah M, maka dapat kami beritahukan bahwa pada prinsipnya kami dapat memberikan ijin menggunakan fasilitas tersebut dengan ketentuan sebagai berikut :

1. Ada tenaga analis TDC yang menjadi pendampingnya.
2. Pemakaian fasilitas dilakukan pada jam kerja (08.00 s/d 16.00 WIB), diluar jam kerja harus melapor ke Dr.dr.Eddy Bagus Wasito,MS selaku penanggung jawab laboratorium.
3. Biaya pemakaian fasilitas dan tenaga analis diperhitungkan sesudah kegiatan selesai.
4. Mengganti bahan habis apabila memang menggunakan bahan habis milik TDC.

Demikian untuk diketahui.
 Atas perhatian dan kerjasamanya diucapkan terima kasih.

Prof. Dr. dr. Yoes Prijatna Dachlan, MSc
 NIP. 130 359 278

Tembusan: Kepada Yth
 Sdr. Nikmah M

Lampiran 3

**Data KBM Mentah Hasil Penelitian Jumlah Bakteri *EIEC*
Hidup (Viable Count)**

Repli- Kasi	Konsentrasi Andrografolida ($\mu\text{g/ml}$)							
	1250		2500		5000		10.000	
	Pengenceran		Pengenceran		Pengenceran		Pengenceran	
	10 x	100 x	10 x	100 x	10 x	100 x	10 x	100 x
1	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	99	73	11	6
2	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	82	98	1	2
3	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	2	4
4	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	1	1
5	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	1	2
6	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	2	2
7	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	2	1
8	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	TBUD	4	1
MEAN	-	-	-	-	26,6	21,4	3	2,375

Keterangan : TBUD = Terlalu Banyak Untuk Dihitung

Lampiran 4

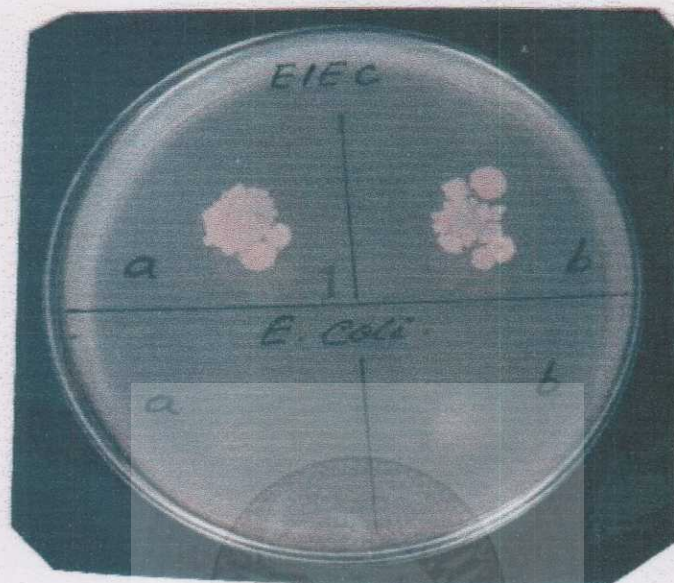
**Gambar Pertumbuhan Bakteri *EIEC* pada
Kontrol A (KA) dan Kontrol B (KB)
Inkubasi 48 Jam**

Keterangan :

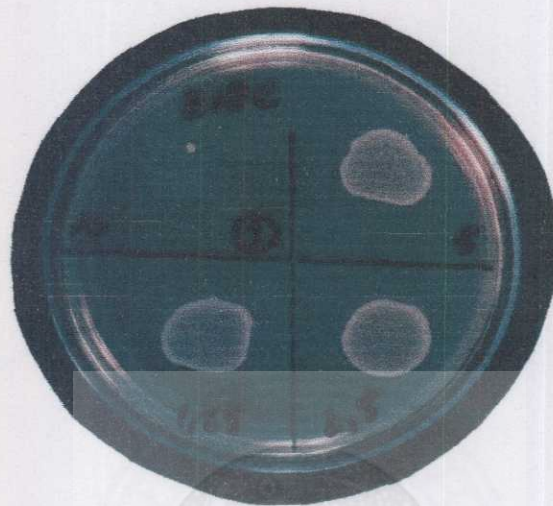
Komposisi KA = Pelarut *Andrografolida* + Medium TSB + Bakteri *EIEC*

Komposisi KB = Medium TSB + Bakteri *EIEC*

Lampiran 5



Gambar Pertumbuhan Bakteri *EIEC* dan *E. coli*
Konsentrasi Senyawa Andrografolida 10.000 $\mu\text{g/ml}$
Inkubasi 48 Jam

Lampiran 6

**Gambar Pertumbuhan Bakteri *EIEC* pada
Konsentrasi Senyawa Andrografolida
10, 5, 2.5 dan 1.25 mg/ml, Pengenceran 10 x
Inkubasi 48 Jam**

Lampiran 7

**Gambar Pertumbuhan Bakteri *EIEC* pada
Konsentrasi Senyawa Andrografolida
10, 5, 2.5 dan 1.25 mg/ml, Pengenceran 100 x
Inkubasi 48 Jam**