

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. *Escherichia coli*

Escherichia coli atau sering disebut dengan *E.coli* merupakan bakteri fakultatif anaerob, kemoorganotropik, dengan metabolisme tipe fermentasi dan respirasi. Bakteri ini akan tumbuh baik pada suhu 37°C pada media yang mengandung 1% pepton sebagai sumber karbon dan nitrogen. Bakteri ini dapat bertahan hingga suhu 60°C selama 15 menit dan bertahan selama 60 menit pada suhu 55°C.

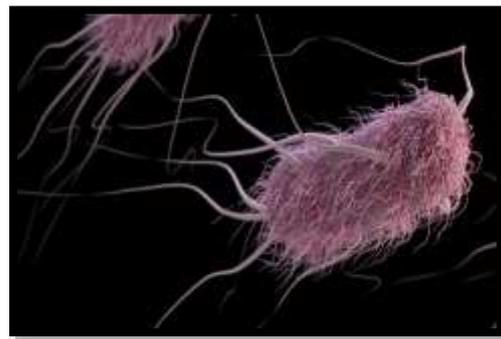
Escherichia coli pertama kali ditemukan oleh Theodor Escherich pada tahun 1885. Umumnya, *Escherichia coli* bersifat non-patogen. Bakteri ini dapat bersifat patogen apabila terdapat di luar habitatnya dan saat daya tahan tubuh inangnya berkurang seperti pada saat kondisi kelelahan atau memiliki penyakit yang bersifat immunosupresan. Secara klinis, tempat yang sering terinfeksi bakteri ini adalah saluran empedu, saluran kemih, dan saluran pencernaan. *Escherichia coli* dapat menyebabkan sepsis jika infeksi sudah menyebar ke dalam pembuluh darah.

Secara morfologi *Escherichia coli* merupakan bakteri gram negatif dengan bentuk batang pendek, gemuk, tidak bersimpai, aktif bergerak, tidak berspora, dan memiliki ukuran 2,4 mikro x 0,4 mikro sampai 0,7 mikro.

Bakteri gram negatif adalah bakteri yang tidak mempertahankan zat warna kristal violet sewaktu proses pewarnaan sehingga bakteri ini akan berwarna merah bila diamati di bawah mikroskop.

Klasifikasi bakteri *Escherichia coli* berdasarkan taksonominya adalah sebagai berikut:

Filum : *Proteobacteria*
 Kelas : *Gamma Proteobacteria*
 Ordo : *Enterobacteriales*
 Familia : *Enterobacteriaceae*
 Genus : *Escherichia*
 Spesies : *Escherichia coli*



Gambar 1. *Escherichia coli* (Sumber: CDC, 2017)

Manifestasi klinis yang ditimbulkan oleh *E. coli* berupa keracunan makanan oleh *Shiga toxin*, diare dan infeksi saluran kemih dimana, berdasarkan *journal Emerging infectious diseases* tahun 2012 menyatakan, *Escherichia coli* merupakan penyebab utama pada lebih dari 85% kasus infeksi saluran kemih. Pada Paru-paru, bakteri ini dapat menyebabkan infeksi pernapasan seperti, pneumonia. *Escherichia coli* juga merupakan penyebab utama meningitis pada bayi (Castro, 2014). Berdasarkan ciri khas sifat-sifat virulensinya, *Escherichia coli* dibagi ke dalam beberapa kelompok dan tiap kelompok menyebabkan penyakit melalui mekanisme yang berbeda . Adapun

kelompok *E.coli* yang patogen menurut *Centers for disease control and prevention*, yaitu:

a. *Enteraggregative E.coli* (EAEC)

EAEC merupakan jenis yang sering ditemui di negara berkembang. Jenis ini bertransmisi melalui *food-borne* dan *water-borne*. Mekanisme diare yang disebabkan oleh jenis ini diperkirakan akibat sitotoksin yang melekat rapat pada bagian mukosa intestinal sehingga menyebabkan diare persisten (<14 hari). Diare jenis ini biasanya cair dan sekretorik tanpa demam dan muntah. Masa inkubasi diperkirakan 20 sampai 48 jam.

b. *Enteropatogenic E.coli* (EPEC)

EPEC merupakan jenis yang menyebabkan diare pada bayi (*Infantile diarrhoea*) dan anak yang menyebabkan diare persisten dengan ciri berair atau berdarah (Ochoa et al., 2008). Penyebab diare berair adalah akibat perlekatan bakteri disertai perubahan integritas usus secara fisik sedangkan, diare berdarah disebabkan oleh proses perusakan jaringan yang akut akibat racun yang mirip dengan *Shigella dysenteriae*, Verotoxin. EPEC ditularkan melalui rute *fekal-oral* dengan masa inkubasi pada orang dewasa selama 9 jam.

c. *Enterotoksigenik E.coli* (ETEC)

Diare yang disebabkan oleh ETEC mirip dengan diare yang disebabkan oleh *Vibrio cholerae*. Jenis ini menyebabkan diare pada bayi di negara yang kurang berkembang, anak-anak pada negara berkembang, dan wisatawan

yang berasal dari negara maju. Nama umum dari diare jenis ini adalah Gastroenteritis atau *travelers' diarrhoea*. Mekanisme penyebab diarenya adalah dengan pelekatan bakteri pada sel epitel usus kecil dengan masa inkubasi pendek (14 sampai 50 jam). Ciri yang dihasilkan adalah diare berair, biasanya tanpa darah atau lendir, dan tidak menyebabkan demam.

d. *Enteroinvasif E.coli* (EIEC)

EIEC memiliki mekanisme infeksi dengan menginvasi sel epitel mukosa usus. Jenis ini sering terjadi pada anak-anak pada negara berkembang dan wisatawan yang mengunjungi negara tersebut. Jenis ini berhubungan dengan *Shigella spp*, sehingga menyebabkan diare yang mirip dengan disentri (*bacillary dysentery*). Tanda dari diare akibat EIEC adalah munculnya darah dan lendir dalam tinja, kram, perut, muntah, demam, menggigil, dan malaise dan terjadi dalam kurun waktu 12 sampai 72 jam.

e. *Enterohemoragik E.coli* (EHEC)

Tipe ini berhubungan dengan *E.coli* O157:H7, yang pertama kali menyebabkan wabah *food-borne disease* pada tahun 1982-1983. EHEC berhubungan dengan pengkonsumsian daging, buah, dan sayuran yang tercemar. Bakteri ini mengeluarkan toksin yang dikenal sebagai *Shigatoxin-producing E.coli* (STEC) dan *Verotoxin-producing E.coli* (VTEC). Penyakit ini ditandai dengan kejang akut dan diare cair yang cepat menjadi darah.

f. *Diffuse-Adherence E.coli* (DAEC)

Manifestasi klinis dari DAEC adalah diare berair atau berdarah, sakit perut, dehidrasi, dan demam. Bakteri jenis ini memiliki mekanisme perlekatan pada sel HEL-a dan HEP-2 dalam kultur jaringan. DAEC memiliki transmisi utama melalui makanan atau air yang terkontaminasi kotoran manusia maupun hewan. Diare tipe ini sering menyerang anak-anak dan balita.

B. Avokad

1. Klasifikasi dan Morfologi

Avokad (*Persea americana* Mill) merupakan tanaman yang berasal dari Amerika tengah yaitu Meksiko, Peru, dan Venezuela. Tanaman ini umumnya memiliki bentuk buah berjuntai, bulat, bujur telur atau memiliki bentuk seperti buah pir, dengan panjang sekitar 20 cm dan lebar sekitar 15 cm. Tanaman ini sekarang dapat ditanaman di daerah tropis dan sub tropis seperti Indonesia.

Tanaman avokad memiliki tinggi pohon sekitar 3-10 meter, berakar tunggang, batang berkayu berbentuk bulat, memiliki banyak cabang, dan berwarna coklat. Daunnya merupakan daun tunggal, bentuknya memanjang dengan bagian runcing dipangkal dan ujungnya. Bagian tepi daun rata, namun sebagian ada yang menggulung ke atas dengan bentuk tulang

menyirip. Daun muda biasanya berwarna kemerahan dengan rambut rapat, sedangkan daun tua berwarna kehijauan dan tidak berbulu.

Bentuk bunga majemuk dengan kelamin ganda, berwarna putih kuning atau kuning kehijauan. Buahnya berbentuk bundar atau bulat telur dan daging buahnya lunak dengan warna hijau kekuningan (Agromedia, 2008; Kurniawan R. F., 2014).

Klasifikasi tanaman avokad (*Persea americana* Mill) berdasarkan taksonomi adalah sebagai berikut:

Divisi	: Spermatophyta
Sub Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Bangsa	: Ranales
Keluarga	: Lauraceae
Marga	: Persea
Varietas	: <i>Persea americana</i> Mill



Gambar 2. Daun Avokad
(Sumber: Agromedia, 2008)

2. Kandungan Kimia

Kandungan kimia yang terdapat pada daun avokad memiliki kandungan kimia diantaranya adalah alkaloid, fenol, flavonoid, saponin, steroid, dan tanin (Paramawati & Dumilah, 2016). Selain itu daun avokad juga diketahui memiliki kandungan glikosida sianogenik (Irawati, 2015).

Kandungan alkaloid yang pernah di isolasi adalah senyawa alkaloid aromatik memiliki karakteristik: N-H (3311,55 cm⁻¹), C-H alifatik (2921,96 cm⁻¹), C-N (1130,21 cm⁻¹), C=O (1735,81 cm⁻¹), C-H aromatik, gugus N-C=O (580,53 cm⁻¹). Data tersebut didapat dari hasil interpretasi spektrofotometri IR dan didukung oleh data spektrofotometer UV-Visibel dengan serapan panjang gelombang 238,5 nm serta hasil dari transisi elektron $n \pi^*$ dan $n \sigma^*$ yang mengindikasikan adanya gugus C=O dan gugus N-H (Tengo, Bialangi, & Suleman, 2013).

Tabel 1. Senyawa kimia daun avokad (*Pesea americana mill*) per 100 gram.

Senyawa Kimia	Kadar per 100 gram
Saponin	1,29±0.08
Tanin	0,68±0.06
Flavonoid	8,11±0.14
Glikosida Sianogernik	0.06±0.02
Alkaloid	0,51±0.21
Fenol	3,41±0.64
Steroid	1,21±0.14

Sumber : (Arukwe, et al., 2012).

3. Manfaat Daun Avokad

Daun avokad memiliki manfaat sebagai kardioprotektor (Ojewole *et al.*, 2009), mengobati kencing batu, hipertensi, sakit kepala, nyeri syaraf, nyeri lambung, pembengkakan saluran napas, haid tidak teratur, sebagai antibakteri, anti inflamasi, analgesik, dan menurunkan kolesterol (Budiana & Astawan, 2013).

4. Mekanisme Antibakteri

Menurut Wijayakesuma pada tahun 1996 dalam (Katja, Suryanto, & Wehantouw, 2009) menyatakan, bahwa daun avokad memiliki aktivitas antibakteri yang mampu menghambat beberapa bakteri seperti *Staphylococcus aureus strain A dan B*, *Staphylococcus albus*, *Pseudomonas sp*, *Escherichia sp*, dan *Bacillus subtilis*. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Aditya (2010) menyebutkan bahwa ekstrak daun avokad mengandung beberapa senyawa kimia seperti saponin, alkaloid dan flavonoid yang mempunyai efek antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

Aktivitas senyawa alkaloid yang merupakan senyawa nitrogen heterosiklik dan mengandung basa nitrogen berhubungan dengan kemampuannya berinteraksi atau melekatkan diri pada DNA. Adanya zat yang berada diantara DNA akan menyebabkan gangguan pada proses replikasi sehingga akan terjadi kematian sel.

C. Ekstraksi

Ekstraksi merupakan suatu kegiatan penyarian senyawa kimia yang terkandung dalam bahan baik tumbuhan maupun hewan berdasar prinsip kelarutan (Depkes, 1979). Metode ekstraksi dibagi menjadi dua jenis, yaitu metode panas dan metode dingin. Metode cara panas misalnya refluk, sokletasi, digesti, infus, dan dekok. Sedangkan metode cara dingin misalnya maserasi dan perkolasi (Ditjen POM, 2000).

Maserasi merupakan metode yang paling sering digunakan karena dianggap paling mudah dan sederhana walaupun, memerlukan waktu yang cukup lama. Ekstraksi ini bertujuan agar senyawa tidak rusak akibat pemanasan yang dilakukan. Proses ekstraksi pada maserasi menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada suhu ruang. Serbuk simplisia dimasukkan ke dalam wadah tertutup, ditambahkan pelarut, dan kemudian diletakkan pada suhu kamar selama periode tertentu. Umumnya maserasi dilakukan selama 5 hari kemudian dilanjutkan dengan remaserasi selama 2 hari. Kelemahan dari metode ini adalah waktu yang digunakan cukup lama dan pelarut yang digunakan juga banyak.

D. Fraksinasi

Ekstraksi akan menghasilkan ekstrak yang biasanya masih mengandung zat pengotor seperti karbohidrat, resin, lilin, dan sejenisnya. Zat pengotor ini dapat mempengaruhi kestabilan dan mengurangi kadar senyawa aktif di dalam ekstrak (Srijanto dkk, 2012).

Fraksinasi ekstrak diharapkan mampu menghilangkan zat-zat pengotor, selain itu juga dapat meningkatkan khasiat ekstrak serta memperkecil jumlah dosis pemberian kepada pengguna (Srijanto dkk, 2012). Salah satu teknik fraksinasi ekstrak adalah teknik ekstraksi cair-cair.

Prinsip dari metode ini adalah perbedaan distribusi komponen dari dua fase cair (Febriyanti dkk, 2014). Proses pemisahan zat terlarut tersebut

dilakukan di dalam dua macam pelarut yang tidak saling campur. Hal tersebut memungkinkan karena adanya sifat senyawa yang dapat terlarut dalam air maupun senyawa yang dapat larut dalam pelarut organik. Komponen kimia yang akan terpisah ke dalam kedua fase tersebut sesuai dengan tingkat kepolarannya masing-masing (Harborne, 1987).

E. Uji Aktivitas Antibakteri

Mikroorganisme dapat menyebabkan infeksi, menimbulkan penyakit dan merusak bahan pangan. Senyawa antimikroba adalah zat yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme dan dapat digunakan untuk penelitian pengobatan infeksi pada manusia maupun hewan. Antimikroba meliputi antifungi, antibakteri, antiprotozoa dan antivirus (Inayati, 2007).

Antibakteri diartikan sebagai bahan yang dapat mengganggu pertumbuhan dan metabolisme bakteri sehingga dapat memiliki sifat menghambat perkembangbiakan bakteri (bakteriostatik) atau sifat mematikan bakteri (bakterisidal) dalam menghentikan aktivitas sel bakteri.

Aktivitas antimikroba dapat ditentukan dengan dua cara yaitu metode difusi dan dilusi. Pada metode difusi termasuk di dalamnya metode *disk diffusion* (tes Kirby & Bauer), *ditch-plate technique*, *cup-plate technique*. Sedangkan pada metode dilusi termasuk di dalamnya metode dilusi cair dan dilusi padat (Aziz, 2010).

1. Metode difusi

a. Metode *Kirby and Bauer* (Kertas cakram)

Metode difusi cakram merupakan cara yang paling sering digunakan untuk menentukan kepekaan antibakteri terhadap suatu antibiotik. Pada cara ini digunakan suatu cakram kertas saring (*paper disk*) yang berfungsi sebagai tempat menampung zat antimikroba. Kertas saring tersebut kemudian diletakkan pada lempeng agar yang telah diinokulasi mikroba uji, kemudian diinkubasi pada waktu tertentu dan suhu tertentu, sesuai dengan kondisi optimum dari mikroba uji. Pada umumnya, hasil yang di dapat bisa diamati setelah inkubasi selama 18-24 jam dengan suhu 37°C. Hasil pengamatan yang diperoleh berupa ada atau tidaknya daerah bening yang terbentuk di sekeliling kertas cakram yang menunjukkan zona hambat pada pertumbuhan bakteri (Pelczar & Chan, 1988).

b. Cara Parit (*Ditch-plate technique*).

Pada metode ini lempeng agar yang telah diinokulasikan dengan bakteri uji dibuat sebidang parit. Parit tersebut berisi zat antimikroba, kemudian diinkubasi pada waktu dan suhu optimum yang sesuai untuk mikroba uji. Hasil pengamatan yang diperoleh berupa ada tidaknya zona hambat yang akan terbentuk di sekitar parit (Bonang, 1992).

c. Cara Sumuran (*Hole/Cup-plate technique*).

Metode ini lempeng agar yang telah diinokulasikan dengan bakteri uji dibuat suatu lubang yang selanjutnya diisi dengan zat antimikroba uji. Setelah diinkubasi pada suhu dan waktu yang sesuai dengan mikroba uji, dilakukan pengamatan dengan melihat ada atau tidaknya zona hambatan di sekeliling lubang (Bonang, 1992).

d. Metode *E-test* (epsilometer)

Metode gabungan antara metode dilusi dan metode difusi antibakteri ke dalam media. Metode ini dilakukan dengan menggunakan strip plastik yang sudah mengandung agen antibakteri dengan konsentrasi terendah sampai tertinggi yang diletakkan pada media agar yang telah ditanami mikroorganisme. Hambatan pertumbuhan mikroorganisme bisa diamati dengan adanya area jernih di sekitar strip tersebut (Pratiwi, 2008).

2. Metode dilusi

Metode dilusi digunakan untuk menentukan Diameter zona hambat Minimum (DZI) atau konsentrasi terendah dari agen antimikroba yang dibutuhkan untuk menghambat pertumbuhan mikroba (Mahon & Manuselis Jr, 1995).

a. Metode dilusi cair/*broth dilution test (serial dilution test)*.

Pengujian dilakukan dengan menggunakan sederetan tabung reaksi yang diisi dengan inokulum kuman dan larutan antibakteri dalam berbagai konsentrasi. Zat yang akan diuji aktivitas bakterinya diencerkan sesuai serial dalam media cair, kemudian diinokulasikan dengan kuman dan diinkubasi pada waktu dan suhu yang sesuai dengan mikroba uji. Aktivitas zat ditentukan sebagai Kadar hambat minimum (KHM) (Pratiwi, 2008).

b. Penipisan Lempeng Agar

Zat antibakteri diencerkan dalam media agar dan kemudian dituangkan kedalam cawan petri. Setelah agar membeku, diinokulasikan bakteri kemudian diinkubasi pada waktu dan suhu tertentu. Konsentrasi terendah dari larutan zat antibakteri yang masih memberikan hambatan terhadap pertumbuhan bakteri ditetapkan sebagai diameter zona hambat minimal (Pratiwi, 2008). Uji dilusi membutuhkan sejumlah kontrol, yaitu kontrol sterilitas, kontrol pertumbuhan dan uji secara simultan strain bakteri dengan KHM 21 yang sudah diketahui untuk menunjukkan bahwa seri pengenceran benar. Titik akhir uji dilusi biasanya tajam dan mudah didefinisikan (Smith, 2004).

F. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi merupakan teknik pemisahan yang paling umum dan sering digunakan. Keunggulan dari teknik kromatografi yaitu dapat melakukan analisis, baik kualitatif, kuantitatif dan preparatif. Teknik pemisahan pada kromatografi menggunakan fase diam (*stationary phase*) dan fase gerak (*mobile phase*) (Gandjar & Rohman, 2007).

Kromatografi lapis tipis biasanya digunakan untuk menentukan jumlah komponen suatu senyawa. Dasar dari teknik pemisahan ini adalah perbedaan kecepatan perambatan komponen dalam medium tertentu. Fase diam pada KLT akan menahan komponen campuran, sedangkan fase gerak akan melarutkan zat komponen campuran. Fase gerak pada KLT disebut eluen. Eluen dipilih berdasarkan pada polaritas senyawa, sehingga jarak yang ditempuh oleh eluen akan menghasilkan sebuah perbandingan yang disebut R_f . Untuk menentukan R_f dapat digunakan rumus sebagai berikut :

$$R_f = \frac{\text{Jarak tempuh Komponen (cm)}}{\text{Jarak tempuh eluen (cm)}}$$

1. Fase Diam

Fase diam yang digunakan pada KLT merupakan penjerap berukuran kecil dengan diameter partikel antara 10 μm sampai 30 μm . Efisiensi dan resolusi KLT akan semakin baik pada fase diam yang memiliki ukuran rata-rata partikel semakin kecil dan kisaran ukuran yang semakin sempit.

Fase diam yang sering digunakan adalah silika gel dengan mekanisme sorpsinya yaitu adsorpsi. Ukuran diameter partikel silika gel berkisar antara antara 10 μm sampai 40 μm , Luas permukaan berkisar 300 m^2/g sampai 1000 m^2/g , bersifat higroskopis dengan kadar kelembapan relatif 45% sampai 75%, dan dapat mengikat air 7% sampai 20% (Gandjar & Rohman, 2007).

2. Fase gerak

Fase gerak yang biasa digunakan adalah pelarut organik. Sistem yang paling sederhana ialah campuran 2 pelarut organik karena daya elusi campuran kedua pelarut mudah diatur sehingga pemisahan dapat terjadi secara optimal. Pemilihan fase gerak yang tepat merupakan langkah penting dalam menentukan keberhasilan analisa sebab sifat pelarut pengembang merupakan faktor dominan dalam penentuan mobilitas komponen campuran (Atun, 2014).

Pelarut organik yang dicampur dengan air akan menghasilkan mekanisme sorpsi fase gerak secara partisi. Pemilihan pelarut biasanya menggunakan pendekatan polaritas dimana, senyawa polar akan lebih mudah terelusi pada fase gerak polar dan senyawa non polar lebih mudah terelusi pada fase gerak non polar.

Tabel 2. Pelarut organik yang sering digunakan sebagai fase gerak.

Non Polar	Parafin Cair
	Petroleum eter
	Sikloheksana
	Karbon tetraklorida
	Benzena
	Toluena
	Kloroform
	Dietileter
	Etilasetat
	Aseton
	<i>n</i> -propanol
	etanol
	asetonitril
	metanol
polar	air

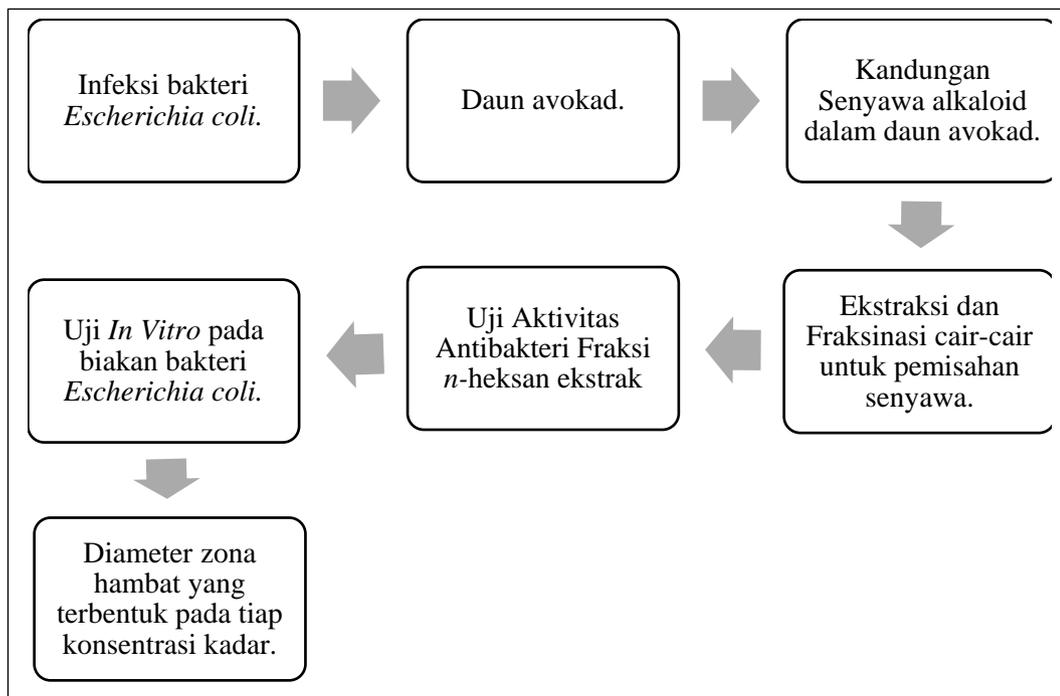
G. Kerangka Konsep

Escherichia coli merupakan salah satu bakteri non patogen yang dapat berubah menjadi patogen jika jumlahnya melebihi batas normal dan berada di luar habitatnya. Bakteri ini dapat menimbulkan beberapa penyakit seperti infeksi saluran kemih, meningitis pada bayi, keracunan makanan dan diare. Salah satu pengobatan yang dilakukan adalah dengan penggunaan antibiotika. Dampak penggunaan antibiotika yang berlebih akan menyebabkan peningkatan jumlah bakteri patogen yang resisten terhadap antibiotika, salah satunya adalah *Escherichia coli*. Untuk itulah, digunakan terapi bahan alam

seperti daun avokad sebagai terapi lain guna mengurangi resiko resistensi antibiotik.

Uji aktivitas antibakteri fraksi *n*-heksan ekstrak etanolik daun avocad terhadap bakteri *E.coli* diharapkan mendapatkan hasil sesuai yang diharapkan. Metode yang digunakan untuk penelitian ini adalah cakram kertas atau Kirby-Bauer.

Daun avokad di ekstrak dengan etanol 70% dan hasil ekstrak etanol daun avokad tersebut di fraksinasi menggunakan pelarut heksana. Berikut adalah skema kerangka konsep pada penelitian ini.



Gambar 3. Skema kerangka konsep.

H. Hipotesis

1. Fraksi *n*-heksan ekstrak etanolik daun avokad mengandung senyawa alkaloid.
2. Fraksi *n*-heksan ekstrak etanolik daun avokad terbukti dapat menjadi agen antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* karena didalamnya mengandung senyawa golongan alkaloid.