

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Tanaman Kumis Kucing (*Orthosiphon stamineus*)

1. Klasifikasi dan Morfologi tanaman

Klasifikasi tanaman kumis kucing (*Orthosiphon Stamineus*) sebagai berikut (Almatar dan Rahmat, 2014)

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Class	: <i>Magnoliopsida</i>
Subclass	: <i>Asteridae</i>
Ordo	: <i>Lamiales</i>
Family	: <i>Lamiaceae</i>
Genus	: <i>Orthosiphon</i>
Species	: <i>Orthosiphon stamineus</i>



Gambar 1. Tanaman Kumis Kucing

merupakan tanaman herba tegak yang dapat tumbuh hingga mencapai tinggi sekitar 1,5 meter. Sistem perakarannya berupa akar tunggang yang kuat. Batang tanaman berwarna cokelat kehijauan, berkayu, berbentuk segi empat dengan permukaan beralur halus, beruas, bercabang, dan dilapisi oleh rambut pendek. Bunganya tersusun dalam bentuk bunga majemuk berwarna ungu pucat atau putih, dengan ciri khas benang sari yang lebih panjang dibandingkan tabung bunganya. Daun *O. stamineus* berbentuk tunggal, berwarna hijau, berbentuk bulat telur hingga lonjong, permukaannya dilapisi rambut halus, tepi bergerigi, dengan ujung dan pangkal yang meruncing. Ukuran daun berkisar antara 2–10 cm panjang dan 1–5 cm lebar. Buah yang dihasilkan berbentuk bulat telur, berwarna hijau saat muda dan berubah menjadi cokelat ketika mencapai matang (Dalimartha, 2006).

2. Manfaat tanaman

Daun kumis kucing (*Orthosiphon stamineus*) diketahui memiliki beragam aktivitas farmakologis, antara lain antioksidan, antibakteri, hepatoprotektif, antiinflamasi, sitotoksik, antihipertensi, dan vasodilator (Sivakumar & Jeganathan, 2018). Berbagai penelitian telah dilakukan untuk mengeksplorasi potensi farmakologi tanaman ini. Salah satu studi yang dilakukan oleh Nair *et al.* (2014) menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat *O. stamineus* efektif menghambat pertumbuhan bakteri patogen seperti *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, dan *Staphylococcus aureus*, serta memperlihatkan aktivitas sitotoksik terhadap sel kanker kolon. Penelitian lain oleh Yam *et al.* (2013) mengungkapkan bahwa ekstrak metanol daun kumis kucing memiliki kandungan antioksidan yang tinggi tanpa menunjukkan efek toksik terhadap sel uji. Selain itu, Maheswari *et al.* (2008) melaporkan bahwa pemberian ekstrak metanol *O. stamineus* (200 mg/kg BB) menunjukkan aktivitas hepatoprotektif pada hewan uji tikus. Temuan serupa juga dilaporkan oleh Prayoga (2008), yang menyatakan bahwa ekstrak etanol daun kumis kucing memberikan efek antiinflamasi sebesar 64,12% pada tikus putih jantan galur Wistar dengan dosis 490 mg/kg berat badan.

3. Bahan aktif dari alam yang berpotensi sebagai antibakteri

Kumis kucing (*Orthosiphon stamineus*) yang termasuk dalam famili Lamiaceae telah lama dimanfaatkan dalam pengobatan tradisional untuk membantu mengatasi berbagai keluhan kesehatan, seperti infeksi saluran kemih, hipertensi, dan diabetes. Kandungan metabolit sekundernya terdiri atas monoterpen, diterpen, triterpen, saponin, flavonoid, dan asam organik, yang diketahui berperan penting dalam aktivitas farmakologi tanaman ini. Kehadiran senyawa-senyawa aktif tersebut mendukung potensi *O. stamineus* sebagai antibakteri, antiinflamasi, dan antioksidan. Aktivitas antibakterinya telah dibuktikan efektif terhadap berbagai spesies bakteri patogen, antara lain *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Salmonella enteritidis*, dan *Salmonella typhimurium* (Ekambaram *et al.*, 2016).

Efektivitas antibakteri *O. stamineus* diduga berkaitan erat dengan kandungan asam rosmarinat yang cukup tinggi (Singh *et al.*, 2015). Asam rosmarinat merupakan senyawa golongan polifenol yang

memiliki aktivitas sebagai antioksidan, antiinflamasi, serta antimikroba. Secara kimia, asam rosmarinat merupakan dimer dari asam kafeat dan 3,4-dihidroksifenil laktat. Mekanisme aktivitas antimikrobanya melibatkan inaktivasi enzim seluler bakteri yang berperan dalam metabolisme serta meningkatkan permeabilitas membran sel, sehingga berdampak pada gangguan fungsi fisiologis bakteri dan berujung pada kematian sel (Ekambaram *et al.*, 2016).

4. Aktivitas Antibakteri Daun Kumis Kucing

Orthosiphon stamineus yang dikenal sebagai daun kumis kucing, dilaporkan memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid, saponin, dan polifenol yang berperan dalam berbagai aktivitas farmakologisnya, termasuk sebagai agen antibakteri. Meskipun aktivitas antibakterinya terhadap *Escherichia coli* telah terkonfirmasi, potensinya dilaporkan bersifat lebih moderat jika dibandingkan dengan tanaman herbal lain seperti *Piper betle* L. Evaluasi potensi inhibisi melalui metode difusi agar menunjukkan pembentukan zona hambat yang lebih kecil. Secara spesifik, penelitian menunjukkan diameter zona hambat sebesar 11.5 mm (ekstrak 50%) (Arafah *et al.*, 2019), 11.2 mm (ekstrak 100%) (Irmala *et al.*, 2022), 9.17 mm (ekstrak 60 mg/mL) (Sulistyoningrum & Laily, 2020), dan 8.23 mm (ekstrak 80%) (Widayanti *et al.*, 2018).

Analisis kuantitatif lebih lanjut untuk mengukur potensi bakteriostatik dan bakterisida dari ekstrak *O. stamineus* juga telah dilakukan. Nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) terhadap *E. coli* dilaporkan secara konsisten pada angka 12.5% oleh dua studi terpisah (Puspitasari *et al.*, 2020; Sulistyoningrum & Laily, 2020), sementara studi lain melaporkannya pada 7.5 mg/mL (Widayanti *et al.*, 2018). Potensi bakterisida ekstrak ini juga terkonfirmasi melalui penentuan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) pada 25% (Puspitasari *et al.*, 2020) dan 15 mg/mL (Widayanti *et al.*, 2018). Secara kolektif, temuan-temuan ini memberikan validasi ilmiah terhadap penggunaan empiris *O. stamineus* dalam tatalaksana infeksi bakteri, khususnya yang disebabkan oleh *E. coli* pada sistem saluran kemih.

B. Daun Sirih Hijau

1. Klasifikasi dan Morfologi tanaman

Berdasarkan penelitian, daun sirih hijau (*Piper betle* L.) termasuk di dalam klasifikasi sebagai berikut :

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Division	: <i>Magnoliophyta</i>
Class	: <i>Magnoliopsida</i>
Ordo	: <i>Piperales</i>
Family	: <i>Piperaceae</i>
Genus	: <i>Piper</i>
Spesies	: <i>Piper betle</i> linn

Piper betle L. atau dikenal sebagai tanaman sirih, merupakan salah satu spesies dari famili Piperaceae yang bersifat merambat dan dapat tumbuh dengan panjang mencapai 5–15 meter. Pertumbuhan tanaman ini sangat dipengaruhi oleh faktor lingkungan, khususnya kondisi media tumbuh. Morfologi batangnya berbentuk silindris, berwarna coklat kehijauan, berkerut, dan beruas, dengan akar adventif yang muncul pada setiap ruasnya. Daunnya berbentuk bulat telur dengan pangkal berbentuk jantung, ujung meruncing, tepi rata, permukaan halus, bertangkai, serta menghasilkan aroma khas saat diremas. Ukuran daunnya bervariasi, dengan panjang berkisar antara 6–17,5 cm dan lebar 3,5–10 cm. Warna daun sirih umumnya bervariasi mulai dari hijau muda, hijau tua, kuning kehijauan, hingga kemerahan. Tanaman ini tumbuh optimal di wilayah tropis pada ketinggian 300–1.000 meter di atas permukaan laut, dengan preferensi tanah yang kaya bahan organik dan memiliki ketersediaan air yang memadai (James, 2002).

2. Manfaat tanaman

Berbagai literatur Berbagai sumber literatur melaporkan bahwa daun sirih hijau memiliki beragam aktivitas farmakologis, di antaranya bersifat stiptik (menghentikan perdarahan), vulnerari (mempercepat penyembuhan luka pada kulit), serta berkhasiat dalam menjaga kesehatan gigi dan rongga mulut. Ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* L.) telah terbukti memiliki aktivitas antibakteri yang efektif terhadap berbagai jenis bakteri Gram positif maupun Gram negatif, sehingga secara tradisional sering digunakan sebagai agen terapeutik oleh masyarakat. Aktivitas farmakologis daun sirih hijau terutama dikaitkan dengan kandungan minyak atsirinya, khususnya

senyawa fenolik dan kavikol. Kavikol merupakan senyawa dominan yang memberikan aroma khas pada daun sirih serta memiliki potensi sebagai bakterisida yang diketahui lima kali lebih kuat dibandingkan fenol biasa. Mekanisme antibakteri dari senyawa fenol bekerja dengan cara mendenaturasi protein di dalam sel bakteri, sehingga mengganggu aktivitas enzimatis yang berperan dalam proses metabolisme bakteri. Proses denaturasi ini menyebabkan terganggunya integritas dan fungsi protein esensial yang diperlukan untuk kelangsungan hidup sel bakteri (Syukur, 2011).

3. Bahan aktif dari alam yang berpotensi sebagai antibakteri

Daun sirih diketahui mengandung minyak atsiri sebesar 1–4,2% yang terdiri atas berbagai senyawa bioaktif, di antaranya hidroksikavikol, kavikol, kavibetol, estradiol, eugenol, metil eugenol, karvakrol, terpena, seskuiterpena, fenilpropana, tanin, gula, dan pati (James, 2002). Aktivitas antibakteri daun sirih hijau sebagian besar dikaitkan dengan keberadaan senyawa-senyawa aktif dalam minyak atsirinya. Potensi tersebut menjadikan daun sirih sebagai salah satu kandidat sumber antibakteri alami yang berpotensi diaplikasikan untuk mencegah penyakit infeksi seperti diare (Noventi & Carolia, 2016). Daun sirih juga mengandung beragam zat gizi, seperti air, protein, karbohidrat, serat kasar, minyak atsiri, dan alkaloid. Daun sirih hijau juga mengandung berbagai vitamin esensial, seperti vitamin C, vitamin A, asam nikotinat, tiamin, dan riboflavin, serta mineral penting meliputi kalsium, besi, iodine, fosfor, dan kalium. Kombinasi kandungan nutrisi dan senyawa bioaktif tersebut memperkuat potensi daun sirih sebagai sumber bahan fitoterapeutik alami.

4. Aktivitas Antibakteri Daun Sirih Hijau

Daun sirih hijau (*Piper betle* L.) telah lama dikenal dalam pengobatan tradisional dan dibuktikan secara ilmiah memiliki potensi antibakteri yang kuat. Kandungan senyawa aktif utamanya, seperti fenol dan minyak atsiri (eugenol, kavikol), diyakini menjadi agen utama yang bertanggung jawab atas aktivitas tersebut terhadap berbagai patogen, termasuk *Escherichia coli*.

Berbagai penelitian telah mengonfirmasi efektivitas ekstrak daun sirih hijau dalam menghambat pertumbuhan *E. coli*. Pengujian menggunakan metode difusi agar secara konsisten menunjukkan pembentukan zona hambat yang signifikan. Penelitian oleh Ferbiyanti, *et al.* (2020) melaporkan diameter zona hambat terbesar, yaitu 15.66

mm pada konsentrasi ekstrak 75%. Hasil ini sejalan dengan temuan Periadnadi, *et al.* (2013) yang memperoleh zona hambat sebesar 16 mm pada konsentrasi 100% terhadap isolat klinis *E. coli*. Studi lain oleh Fathinah, *et al.* (2015) dan Anam, *et al.* (2010) juga menunjukkan hasil yang kuat dengan diameter hambat masing-masing sebesar 14.5 mm (pada konsentrasi 100%) dan 14.83 mm (pada konsentrasi 30%).

Parameter Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) juga telah dilaporkan dengan hasil yang bervariasi. Anam, *et al.* (2010) melaporkan nilai KHM dan KBM yang sangat rendah, yaitu 1.87% dan 3.75%. Sementara itu, Zulfa & Bachtiar (2015) menetapkan KHM pada 15% dan KBM pada 30%, dan Periadnadi, *et al.* (2013) menemukan KHM pada konsentrasi 12.5%. Variasi nilai ini kemungkinan disebabkan oleh perbedaan metode ekstraksi, pelarut yang digunakan, serta strain bakteri uji.

C. Infeksi Saluran Kemih

Infeksi saluran kemih (ISK) merupakan kondisi infeksi yang menyerang saluran kemih bagian atas maupun bawah, termasuk uretra, kandung kemih, dan ginjal. Prevalensi ISK lebih tinggi pada wanita, dengan angka kejadian berkisar 50–60%, dibandingkan pria (Heisler & Gebhart, 2008). ISK bagian bawah melibatkan infeksi pada uretra dan kandung kemih, sedangkan ISK bagian atas menyerang ginjal. Infeksi saluran kemih berpotensi menimbulkan komplikasi serius, salah satunya sepsis, apabila bakteri patogen bermigrasi dari ginjal ke sistem peredaran darah. Kondisi sepsis akibat infeksi bakteri sistemik dapat menyebabkan penurunan tekanan darah secara signifikan, yang berujung pada peningkatan risiko kematian (Muhlisin, 2017).

Secara fisiologis saluran kemih bersifat steril, namun infeksi dapat terjadi apabila mikroorganisme, khususnya bakteri berkembang biak di dalamnya. *Escherichia coli* merupakan bakteri yang paling sering ditemukan sebagai penyebab ISK, dengan prevalensi sekitar 80% kasus (Adib, 2012). Beberapa bakteri patogen lain yang turut berperan dalam infeksi ini meliputi *Klebsiella sp.*, *Enterobacter sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus saprophyticus*, dan *Staphylococcus aureus* (Adib, 2012).

Diagnosis ISK umumnya ditegakkan berdasarkan hasil pemeriksaan laboratorium, dengan kriteria adanya pertumbuhan patogen sebanyak $\geq 10^5$ koloni/mL pada sampel urin porsi tengah.

Manifestasi klinis ISK dapat bervariasi sesuai dengan lokasi infeksi. Infeksi pada saluran kemih bagian atas (ginjal) ditandai oleh gejala seperti nyeri pinggang, menggigil, mual, dan muntah, sedangkan infeksi pada bagian bawah (kandung kemih dan uretra) umumnya memunculkan keluhan berupa frekuensi buang air kecil meningkat serta rasa nyeri atau panas pada kandung kemih (Adib, 2012).

D. *Escherichia coli*

Infeksi saluran kemih (ISK) merupakan gangguan patologis yang ditandai oleh adanya inflamasi pada saluran kemih, meliputi saluran kemih bagian atas (ginjal) maupun bagian bawah (kandung kemih dan uretra). Kejadian ISK lebih sering dialami oleh perempuan, dengan prevalensi sekitar 50–60% lebih tinggi dibandingkan laki-laki (Heisler & Gebhart, 2008). Infeksi yang tidak tertangani dengan baik dapat berkembang menjadi komplikasi serius, seperti sepsis, yang berpotensi mengancam jiwa akibat penurunan tekanan darah sistemik secara drastis (Muhlisin, 2017).

Kemampuan *Escherichia coli* dalam memicu terjadinya infeksi saluran kemih (ISK) erat kaitannya dengan keberadaan faktor virulensi yang diklasifikasikan menjadi dua jenis, yaitu faktor virulensi permukaan dan faktor virulensi yang disekresikan. Faktor virulensi permukaan meliputi struktur fimbriae, kapsul, flagela, serta lipopolisakarida (LPS). *Fimbriae* berperan penting dalam membantu *E. coli* menempel pada sel epitel saluran kemih, sedangkan kapsul berfungsi melindungi bakteri dari serangan sistem imun inang. Flagela meningkatkan kemampuan gerak (motilitas) bakteri, dan sekitar 70–90% kasus ISK dikaitkan dengan *E. coli* yang memiliki flagela. LPS berperan dalam menstimulasi respons inflamasi, mendorong sekresi sitokin, dan meningkatkan produksi nitric oxide. Selain itu, adhesin sebagai molekul adhesif berfungsi memfasilitasi interaksi antara bakteri dengan sel inang, memperkuat proses invasi jaringan, dan mendukung keberhasilan kolonisasi patogen (Bien *et al.*, 2012).

E. coli juga menghasilkan senyawa toksin dan lipoprotein yang berkontribusi terhadap patogenesis ISK. Salah satu toksin utama yang dihasilkan adalah α -hemolisin (HlyA), yang termasuk dalam kelompok *repeat in toxin* (RTX). Toksin ini mampu membentuk pori pada membran sel target. Konsentrasi tinggi HlyA dapat menyebabkan lisis sel inang, sedangkan konsentrasinya rendah memicu apoptosis pada

neutrofil, limfosit T, dan sel ginjal. Produksi toksin ini menjadi salah satu strategi bakteri dalam menghindari respons imun inang (Bien *et al.*, 2012).

Tahapan perlekatan bakteri pada mukosa saluran kemih merupakan fase fundamental dalam proses patogenesis infeksi saluran kemih (ISK). *Fimbriae* tipe I berfungsi memediasi adhesi bakteri terhadap residu oligosakarida manosa yang terdapat pada permukaan glikoprotein sel epitel, sekaligus berperan dalam proses hemaglutinasi eritrosit. *Adhesin FimH* yang berada pada *fimbriae* tipe I memiliki afinitas spesifik terhadap uroplakin di permukaan sel uroepitel, sehingga berperan sebagai komponen utama dalam kolonisasi bakteri pada kandung kemih (Manu *et al.*, 2011). *Fimbriae* tipe P berkontribusi dalam perlekatan pada reseptor oligosakarida, memicu aktivasi sel epitel, serta menginduksi produksi sitokin proinflamasi seperti interleukin-6 (IL-6) dan interleukin-8 (IL-8). *Fimbriae* tipe S dan F1C juga memiliki peranan penting dalam mendukung adhesi bakteri pada permukaan epitel dan endotel ginjal (Manu *et al.*, 2011).

Kolonisasi *E. coli* uropatogenik (UPEC) dimulai dari periuretra, kemudian berlanjut ke uretra hingga kandung kemih. Kemampuan kolonisasi UPEC ini dikodekan oleh *pathogenicity islands* (PAI) yang memungkinkan infeksi pada individu dengan sistem imun kompeten (Kaper *et al.*, 2004). Adhesi bakteri terhadap uroplakin pada sel umbrella di membran apikal kandung kemih menjadi salah satu mekanisme bakteri untuk menghindari deteksi sistem imun, baik melalui invasi intraseluler maupun modifikasi fisiologis bakteri agar lebih resisten terhadap fagositosis oleh neutrofil (Flores-Mireles *et al.*, 2015). Selanjutnya, bakteri mampu berkembang biak, membentuk biofilm, dan bermigrasi ke ginjal, menyebabkan kerusakan jaringan inang akibat produksi toksin yang bersifat merusak.

E. Pengobatan *E. coli* dalam Infeksi Saluran Kemih

Penatalaksanaan ISK umumnya melibatkan pemberian antibiotik sebagai terapi utama. Beberapa jenis antibiotik yang sering diresepkan meliputi trimetoprim-sulfametoksazol, siprofloksasin, dan ampicilin. *Escherichia coli*, sebagai patogen utama penyebab ISK, telah menunjukkan resistensi terhadap antibiotik golongan sefalosporin generasi ketiga. Selain itu, resistensi terhadap kelompok antibiotik cephalosporin generasi ketiga juga semakin meningkat.

Trimetoprim-sulfametoksazol merupakan salah satu antibiotik pilihan pertama dalam terapi ISK karena efektivitasnya terhadap *E. coli*. Kombinasi kedua zat aktif tersebut bekerja secara sinergis pada dua tahap jalur metabolisme folat bakteri, sehingga mampu menghambat sintesis DNA secara optimal. Antibiotik golongan fluoroquinolon, seperti siprofloksasin dan levofloksasin, bekerja dengan cara menghambat aktivitas enzim topoisomerase II (DNA gyrase) dan topoisomerase IV yang berperan penting dalam replikasi DNA bakteri. Selain itu, fosfomisin digunakan sebagai alternatif terapi dengan mekanisme kerja menghambat aktivitas enzim pyruvyl transferase yang berperan pada tahap awal biosintesis dinding sel bakteri. Meskipun efektif sebagai terapi infeksi bakteri, penggunaan antibiotik tetap memerlukan pengawasan ketat karena dapat menimbulkan efek samping seperti diare, mual, muntah, dan sakit kepala (Jancel & Dudas, 2002). Mekanisme aksi antibiotik meliputi penghambatan proses replikasi DNA, sintesis dinding sel, dan biosintesis protein bakteri.

Quinolon merupakan turunan asam nalidiksat yang menargetkan enzim DNA gyrase (topoisomerase II) dan topoisomerase IV, sehingga mengganggu konfigurasi topologi DNA bakteri. Pada bakteri Gram positif, topoisomerase IV merupakan target utama, sedangkan pada bakteri Gram negatif seperti *Escherichia coli*, DNA gyrase berfungsi sebagai target primer. Kompleks yang terbentuk antara antibiotik, enzim topoisomerase, dan potongan DNA akan menyebabkan hambatan proses replikasi DNA, yang pada akhirnya memicu kematian sel bakteri. Selain itu, proses ini dapat menginduksi respons stres DNA (SOS response), yang melibatkan aktivasi RecA, proteolisis represor LexA, serta ekspresi berbagai gen perbaikan DNA untuk mempertahankan integritas genom (Kohanski *et al.*, 2010).

Antibiotik β -laktam, seperti penisilin, karbapenem, dan sefalosporin, serta golongan glikopeptida, bekerja dengan menghambat biosintesis dinding sel bakteri. Mekanisme ini akan menyebabkan perubahan bentuk sel, meningkatkan stres seluler, dan berujung pada lisis sel bakteri. Antibiotik β -laktam bekerja dengan menghambat pembentukan ikatan silang antar peptidoglikan yang dikatalisis oleh transpeptidase (penicillin-binding proteins/PBP), sehingga mengganggu integritas dinding sel. Antibiotik β -laktam efektif terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif, sementara glikopeptida hanya efektif

melawan bakteri Gram positif. Penghambatan proses sintesis protein bakteri juga dapat dilakukan melalui antibiotik yang menargetkan subunit ribosom 50S dan 30S.

F. Kombinasi Antibakteri

1. Pengertian Efek Kombinasi Antibakteri

Kombinasi obat adalah ketika dua obat digunakan secara bersamaan dengan cara yang memungkinkan efek masing-masing obat saling mempengaruhi. Kombinasi antibakteri dapat digunakan untuk mengobati infeksi bakteri. Diharapkan kombinasi tersebut dapat mencapai hasil yang sinergis, oleh karena itu perlu dicari terapi alternatif yang lebih aman dengan menggabungkan agen antibakteri dan diyakini memiliki efek sinergis (Aiyegoro dan Okoh, 2009).

2. Jenis Efek Kombinasi Antibakteri

2.1. Aditif. Merupakan efek kombinasi dari dua senyawa yang digabungkan memiliki efek penghambat yang bersama dengan efek penghambatan masing-masing senyawa (Choirunnisa dan Sutjiatmo, 2017). Efek aditif terjadi jika kombinasi ekstrak hanya memiliki pengaruh peningkatan efek dari salah satu ekstrak tunggalnya (Saputri *et al.*, 2022).

2.2. Sinergis. Merupakan interaksi positif di mana dua senyawa bekerja sama memberikan efek penghambatan yang lebih besar daripada jumlah efek masing-masing (Blesson *et al.*, 2015). Efek sinergis ekstrak adalah ketika efek biologis dari kombinasi lebih besar daripada efek biologis ekstrak tunggal (Saputri *et al.*, 2022).

2.3. Antagonis. Merupakan keadaan mengganggu atau menghambat kerja satu sama lain, atau zat kimia mengganggu zat kimia lain jika ditambahkan atau digabungkan (Putri *et al.*, 2017). Efek antagonis adalah Ketika campuran senyawa memiliki efek yang lebih rendah daripada senyawa individu atau tunggalnya (Rahayu *et al.*, 2019).

3. Metode Pengujian Kombinasi Antibakteri

3.1. Metode Papan Catur (*Checkerboard*). Metode *checkerboard* adalah metode dilusi cair yang digunakan pada *microplate* 96 wells untuk melihat bagaimana suatu senyawa antimikroba bekerja sama dengan senyawa antimikroba lainnya untuk menghentikan pertumbuhan mikroorganisme (Martin., 2010). Kombinasi melibatkan satu antibiotik dan satu ekstrak uji (Choirunnisa dan Sutjiatmo., 2017).

3.2. Metode Pita Kertas. Pola interaksi dapat diamati secara visual

ketika ekstrak uji dan antibiotik dicampur pada pita kertas, kemudian diletakkan di atas media agar yang telah dicampur dengan suspensi bakteri pada cawan petri (Choirunnisa dan Sutjiatmo., 2017).

G. Simplisia

1. Definisi

Simplisia adalah bahan alami yang digunakan untuk pengobatan dan umumnya berbentuk kering tanpa perubahan bentuk struktural. Berdasarkan sumbernya, simplisia dikelompokkan menjadi tiga kategori, yaitu :

1.1. Simplisia nabati. Simplisia berupa seluruh tanaman, bagian tertentu dari tanaman, atau eksudat tanaman. Eksudat adalah isi sel yang keluar secara spontan atau sengaja diekstrak, serta zat nabati lain yang dipisahkan dari tanamannya (Zainab *et al.*, 2021).

1.2. Simplisia hewani. Simplisia hewani merupakan bahan alami yang berasal dari hewan, baik dalam bentuk tubuh utuh, bagian tubuh, maupun zat bermanfaat yang dihasilkan oleh hewan, yang masih dalam bentuk asli dan belum mengalami proses pemurnian menjadi senyawa kimia tunggal. (Zainab *et al.*, 2021).

1.3. Simplisia mineral. Simplisia mineral atau pelikan adalah bahan alam yang berasal dari mineral atau batuan, baik yang belum diolah maupun yang telah mengalami pengolahan sederhana, tetapi belum berbentuk senyawa kimia murni (Zainab *et al.*, 2021).

2. Pembuatan simplisia

2.1. Sortasi basah. Tahap awal ini bertujuan memisahkan kotoran dan bahan asing (seperti kerikil, rumput, tanah, atau bagian batang yang rusak) dari tanaman segar setelah panen. Proses ini penting untuk mengurangi jumlah mikroba awal yang mungkin terkandung dalam tanah (Maulidi, 2020).

2.2. Pencucian. Simplisia dicuci dengan air bersih untuk menghilangkan kotoran dan mikroba yang menempel. Proses pencucian dilakukan singkat untuk mencegah hilangnya bahan aktif yang mudah larut dalam air (Maulidi, 2020).

2.3. Perajangan. Simplisia dipotong menjadi bagian yang lebih tipis atau kecil. Tujuan utama perajangan adalah mempercepat proses pengeringan. Pemotongan dapat dilakukan menggunakan pisau, alat potong khusus, atau mesin perajangan (Maulidi, 2020).

2.4. Pengeringan. Proses pengeringan bertujuan untuk

menghentikan aktivitas enzimatis dalam bahan serta menurunkan kadar air hingga mencapai sekitar 10%. Beberapa faktor penting yang memengaruhi efektivitas proses ini antara lain kelembapan udara, suhu lingkungan, luas permukaan bahan, dan durasi pengeringan. Suhu maksimum yang direkomendasikan untuk proses pengeringan adalah 60°C, namun untuk bahan yang bersifat termosensitif, suhu optimal berkisar antara 30°C hingga 45°C. Pengeringan dapat dilakukan dengan metode alami, seperti di bawah paparan sinar matahari secara tidak langsung, atau dengan cara buatan menggunakan oven atau alat pengering lainnya. Pemilihan metode pengeringan disesuaikan dengan karakteristik bahan agar kandungan senyawa aktif tetap terjaga (Maulidi, 2020).

2.5. Sortasi kering. Sortasi kering merupakan proses pemisahan bahan simplisia dari bagian tanaman yang rusak, hangus, atau tidak layak, serta pengotor lain yang masih tersisa setelah proses pengeringan. Tahap ini menjadi langkah akhir dalam pembuatan simplisia, yang bertujuan untuk memastikan kemurnian bahan dengan mengeliminasi kontaminan fisik yang dapat menurunkan mutu simplisia (Maulidi, 2020).

2.6. Penyimpanan. Simplisia kering harus disimpan dalam wadah inert (tidak bereaksi dengan bahan lain), terlindung dari cahaya dan kelembapan, serta bebas racun dan cemaran mikroba untuk menjaga kualitasnya (Maulidi, 2020).

H. Ekstraksi

1. Definisi

Ekstrak merupakan sediaan hasil proses penyarian bahan alam yang dapat berupa bentuk cair, kental, maupun kering. Proses ekstraksi dilakukan dengan menggunakan simplisia nabati atau hewani melalui metode yang tepat serta terlindungi dari paparan langsung sinar matahari untuk menjaga stabilitas senyawa aktif. Ekstrak berfungsi sebagai bentuk sediaan hasil olahan bahan alam yang bertujuan untuk memperoleh kandungan senyawa aktif yang terdapat di dalam bahan tersebut (BPOM, 2014)

2. Metode ekstraksi

Ekstraksi merupakan suatu proses pemisahan senyawa kimia aktif yang larut dari bahan alam, dengan tujuan memisahkan komponen yang larut dari bagian yang tidak larut. Proses ini memanfaatkan

pelarut yang dipilih berdasarkan kesesuaian dengan karakteristik bahan yang akan diekstraksi. Prinsip kerja ekstraksi melibatkan perendaman simplisia dalam pelarut sehingga memungkinkan pelarut berdifusi masuk ke dalam sel, melarutkan senyawa metabolit sekunder, dan membawa senyawa tersebut keluar hingga tercapai keseimbangan konsentrasi antara bagian dalam dan luar sel (Putri, 2014)

Tujuan utama dari proses ekstraksi ialah memperoleh ekstrak berkualitas tinggi yang mengandung senyawa aktif sesuai dengan kebutuhan. Pemilihan metode ekstraksi sangat ditentukan oleh sifat fisikokimia bahan baku dan karakteristik senyawa target yang akan diisolasi. Penguasaan teknik ekstraksi yang tepat menjadi aspek krusial dalam menghasilkan produk ekstrak yang optimal, khususnya untuk aplikasi di bidang farmasi, kesehatan, serta industri berbasis bahan alam lainnya.

2.1. Maserasi. Proses maserasi yaitu dengan melakukan penyaringan simplisia dengan menggunakan pelarut dan perendaman serta sesekali dikocok dan diaduk pada suhu ruangan. Keseimbangan senyawa yang terekstraksi cukup banyak yang akan terjadi dengan senyawa yang memiliki ketertabatasan larut dalam pelarut ekstraksi di suhu kamar (Soemiati, 2013). Maserasi merupakan salah satu teknik ekstraksi dengan memerlukan suhu yang relatif rendah atau dingin. Metode maserasi merupakan proses berhasilnya senyawa dalam pelarut dan sel tanaman mempunyai keseimbangan pada konsentrasinya. Tujuan maserasi dalam suhu ruang merupakan salah satu tujuan agar tidak rusak pada senyawa tersebut yang memiliki sifat termolabil (Tetti, 2014).

Serbuk simplisia yang akan digunakan diayak terlebih dahulu dan dilanjutkan merendam dengan pelarut selama 24 jam dan sesekali dilakukan pengadukan atau pengocokan guna mendapatkan keseimbangan konsentrasi serbuk simplisia sehingga bagian dalam sel bercampur dengan cairan. Proses perendaman atau dalam keadaan diam selama maserasi guna mendapatkan zat aktif yang lebih banyak pada simplisia. Setelah didiamkan setelah itu dilakukan penyaringan yang bertujuan untuk mendapatkan filtrat dan mapas akan diremaserasi hingga larutan hampir tidak berwarna. Berdasarkan literatur tahap maserasi akan jauh terjadinya ekstraksi absolut karena sudah diperhitungkan perbandingan simplisia dengan cairan ekstraksi (Soemiati, 2013).

Pemilihan metode maserasi merupakan salah satu metode paling banyak digunakan karena proses yang sederhana dan peralatan yang mudah didapatkan (Wullur *et al.*, 2012). Sedangkan pengerjaan yang lama dan penyaringan kurang sempurna salah satu kekurangan dalam tahap ini (Soemiati, 2013).

2.2. Perkolasi. Perkolasi merupakan proses ekstraksi bahan baku menggunakan pelarut yang tepat dan selalu baru yang dilakukan pada suhu ruangan. Proses perkolasi merupakan salah satu metode ekstraksi yang menggunakan alat berupa bejana silinder sebagai wadah untuk menampung serbuk simplisia. Bagian dasar bejana dipasang sekat berpori yang berfungsi sebagai penyangga bahan dan jalur keluarnya pelarut. Tahapan dalam metode ini diawali dengan proses pengembangan bahan untuk memastikan seluruh permukaan simplisia terbasahi pelarut. Tahap inti adalah proses perkolasi, yaitu penetesan ekstrak secara kontinu hingga diperoleh perkolat sebanyak 1-5 kali volume pelarut dari jumlah bahan yang digunakan (Depkes RI, 2000).

2.3. Refluks. Refluks merupakan proses ekstraksi bahan baku menggunakan pelarut di temperatur titik didihnya. Jumlah pelarut yang terbatas dan rata-rata mudah konstan karena adanya pendingin balik. Tahap ekstraksi sempurna pada umumnya dapat dicapai dengan pengulangan proses residu pertama hingga 3-5 kali (Depkes RI, 2000).

2.4. Soxhlet. Soxhletasi adalah metode ekstraksi berulang yang memanfaatkan alat soxhlet khusus, di mana simplisia diekstraksi secara kontinu menggunakan pelarut baru yang bersirkulasi dengan adanya pendingin balik. Pendingin balik menjaga kestabilan pelarut, sehingga ekstraksi berlangsung secara efisien dan optimal (Depkes RI, 2000).

2.5. Digesti. Digesti merupakan metode maserasi kinetik yang dilakukan dengan pengadukan terus-menerus sambil mempertahankan suhu proses pada kisaran 40–50°C. Temperatur ekstraksi dipertahankan lebih tinggi dari suhu ruangan untuk mempercepat proses pelarutan senyawa aktif (Depkes RI, 2000).

2.6. Infus. Infusa adalah metode ekstraksi simplisia menggunakan pelarut air yang dipanaskan dalam penangas air pada suhu 96–98°C. Proses pemanasan berlangsung selama 15–20 menit dengan bejana infus sepenuhnya tercelup dalam penangas air mendidih (Depkes RI, 2000).

2.7. Dekok. Dekokta merupakan metode ekstraksi menggunakan pelarut air dengan proses perebusan yang lebih lama

dibandingkan infusa. Lama waktu ekstraksi berlangsung selama ± 30 menit dengan suhu mencapai titik didih air untuk memastikan senyawa aktif terekstraksi secara maksimal (Depkes RI, 2000)

I. Antibakteri

Antibakteri merupakan senyawa yang memiliki kemampuan untuk menghambat atau membunuh pertumbuhan bakteri patogen. Mekanisme kerja antibakteri didasarkan pada kemampuan senyawa tersebut dalam menimbulkan efek toksisitas selektif terhadap bakteri dengan menggunakan konsentrasi tertentu (Jawetz *et al.*, 2001). Aktivitas antibakteri berfokus pada target tertentu pada struktur sel bakteri, sehingga kerusakan pada salah satu komponen esensial dapat menyebabkan kematian sel bakteri. Perubahan tersebut melibatkan beberapa mekanisme berikut:

1. Kerusakan pada dinding sel

Dinding sel berfungsi sebagai pelindung utama bagi bakteri untuk mempertahankan bentuk sel serta menjaga tekanan osmotik internal. Komponen utama dinding sel, yaitu peptidoglikan, terdapat baik pada bakteri Gram-positif maupun Gram-negatif, berperan dalam melindungi bakteri dari tekanan lingkungan yang bersifat hipotonik (Neu & Gootz, 1996). Kerusakan dinding sel dapat terjadi melalui proses penghambatan biosintesis peptidoglikan maupun melalui degradasi struktur yang telah terbentuk (Jawetz *et al.*, 2001).

2. Perubahan permeabilitas sel

Membran sitoplasma berfungsi sebagai pengatur lalu lintas zat yang masuk dan keluar sel melalui proses transport aktif. Kerusakan membran menyebabkan gangguan integritas sel, sehingga ion serta makromolekul penting keluar dari sel dan menyebabkan gangguan metabolisme. Struktur membran bakteri lebih rentan terhadap senyawa sintesis dibandingkan dengan membran sel eukariotik (Brooks *et al.*, 1998).

3. Perubahan molekul protein dan asam nukleat

Kelangsungan hidup sel bergantung pada kestabilan molekul protein dan asam nukleat yang berperan dalam sintesis komponen esensial. Senyawa antibakteri dapat bekerja dengan cara mendenaturasi protein atau merusak struktur asam nukleat, sehingga menyebabkan kerusakan sel permanen yang tidak dapat diperbaiki (Jawetz *et al.*, 2001).

4. Penghambatan kerja enzim

Penghambatan aktivitas enzim merupakan salah satu mekanisme utama antibakteri. Contohnya, senyawa sulfonamida berkompetisi dengan asam para-aminobenzoat (PABA) untuk menghambat sintesis asam folat. Asam folat diperlukan dalam biosintesis purin dan pirimidin, yang berperan dalam sintesis DNA dan RNA bakteri. Akibatnya, aktivitas seluler bakteri terhenti karena terganggunya proses metabolisme esensial (Jawetz *et al.*, 2001).

5. Penghambatan sintesis asam nukleat dan protein

Asam deoksiribonukleat (DNA), asam ribonukleat (RNA), dan protein merupakan komponen esensial dalam mendukung fungsi dan kelangsungan hidup sel. Ketiga molekul tersebut berperan dalam pengaturan proses replikasi, transkripsi, translasi, serta berbagai aktivitas metabolisme seluler. Gangguan terhadap sintesis atau fungsi salah satu dari molekul tersebut dapat menyebabkan kerusakan permanen pada struktur dan fungsi sel, yang pada akhirnya berujung pada kematian sel (Jawetz *et al.*, 2001).

J. Uji Aktivitas Antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri merupakan metode evaluasi untuk menentukan efektivitas suatu senyawa dalam menghambat atau mematikan pertumbuhan bakteri. Secara umum, teknik yang digunakan dalam pengujian aktivitas antibakteri terdiri atas dua pendekatan, yaitu metode difusi dan metode dilusi (Bonang & Koeswardono, 1982). Metode difusi dilakukan dengan cara menginokulasikan bakteri pada medium agar yang telah diperlakukan dengan senyawa antibakteri, kemudian mengamati terbentuknya zona hambat di sekitar perlakuan sebagai indikator efektivitas senyawa dalam menghambat pertumbuhan mikroorganisme uji (Jawetz *et al.*, 1986).

Beberapa faktor dapat memengaruhi hasil uji aktivitas antibakteri dengan metode difusi, antara lain waktu pradifusi, ketebalan media agar, konsentrasi inokulum, komposisi media, suhu dan durasi inkubasi, serta pH media. Ketebalan media agar yang berlebih dapat menghambat difusi senyawa antibakteri sehingga diameter zona hambat yang terbentuk menjadi lebih kecil (Bonang & Koeswardono, 1982).

Metode difusi lebih mudah diaplikasikan dibandingkan metode dilusi karena pengamatan hasil uji hanya memerlukan pengukuran diameter zona hambat secara langsung. Dalam metode difusi dikenal dua jenis zona, yaitu zona radikal dan zona iradikal. Zona radikal

merupakan area Jernih di sekitar sumuran atau cakram yang sepenuhnya bebas dari pertumbuhan bakteri, sedangkan zona iradikal merupakan area di sekitar sumuran yang masih menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri yang terhambat oleh senyawa antibakteri. Meskipun metode difusi mudah diaplikasikan, terdapat keterbatasan, yaitu hasil uji sangat dipengaruhi oleh ketebalan medium agar dan kemampuan senyawa untuk berdifusi, serta distribusi inokulum bakteri yang kurang merata dibandingkan dengan metode dilusi (Jawetz *et al*, 1986).

1. Metode cakram (*disc diffusion*)

Pengujian difusi metode cakram menginokulasikan preparat dengan inokulum bakteri uji. Uji metode ini berisi senyawa uji yang diletakkan pada permukaan sehingga proses berdifusinya senyawa antibakteri ke dalam agar dapat menghambat pertumbuhan bakteri (Balouri *et al.*, 2016).

2. Metode sumuran (*Cup-plate*)

Metode *cup-plate* dilakukan dengan sumuran pada area media dengan menanam bakteri. metode yang menggunakan cara aseptis berupa penggerak gabus steril berdiameter 6 – 8 mm. Larutan senyawa antibakteri dengan konsentrasi yang sudah ditetapkan dapat dimasukkan ke dalam sumuran sebanyak 20 – 100 ml (Balouri *et al.*, 2016).

K. Landasan Teori

Senyawa antibakteri merupakan senyawa yang berperan dalam menghambat atau membunuh pertumbuhan bakteri dengan cara mengganggu jalannya metabolisme mikroorganisme patogen. Efektivitas suatu senyawa antibakteri dikategorikan berdasarkan ukuran diameter zona hambat yang dihasilkan, yaitu ≤ 5 mm (kategori lemah), 6–10 mm (kategori sedang), dan 11–20 mm (kategori kuat).

Daun sirih hijau (*Piper betle* L.) maupun daun kumis kucing (*Orthosiphon stamineus*) telah dimanfaatkan untuk mengatasi berbagai keluhan kesehatan, termasuk yang berkaitan dengan saluran kemih (Perry & Metzger, 1980). Pemanfaatan keduanya secara terpisah memiliki keterbatasan dalam efektivitasnya terhadap spektrum bakteri penyebab ISK yang luas. Potensi peningkatan aktivitas antibakteri melalui kombinasi ekstrak daun sirih hijau dan daun kumis kucing, sebagai alternatif terapi ISK yang lebih efektif dan berbasis sumber daya alam.

Daun sirih hijau (*Piper betle* L.) telah lama dikenal dalam pengobatan tradisional dan dibuktikan secara ilmiah memiliki potensi antibakteri yang kuat. Kandungan senyawa aktif utamanya, seperti fenol dan minyak atsiri (eugenol, kavikol). Berbagai penelitian telah mengonfirmasi efektivitas ekstrak daun sirih hijau dalam menghambat pertumbuhan *E. coli*. Pengujian menggunakan metode difusi agar menunjukkan pembentukan zona hambat yang signifikan. Penelitian oleh Ferbiyanti, *et al.* (2020) melaporkan diameter zona hambat terbesar, yaitu 15.66 mm pada konsentrasi ekstrak 75%. Hasil ini sejalan dengan temuan Periadnadi, *et al.* (2013) yang memperoleh zona hambat sebesar 16 mm pada konsentrasi 100% terhadap isolat *E. coli*. Studi lain oleh Fathinah, *et al.* (2015) dan Anam, *et al.* (2010) juga menunjukkan hasil yang kuat dengan diameter hambat masing-masing sebesar 14.5 mm (pada konsentrasi 100%) dan 14.83 mm (pada konsentrasi 30%).

Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) juga telah dilaporkan dengan hasil yang bervariasi. Anam, *et al.* (2010) melaporkan nilai KHM dan KBM yang sangat rendah, yaitu 1.87% dan 3.75%. Zulfa & Bachtiar (2015) menetapkan KHM pada 15% dan KBM pada 30%, dan Periadnadi, *et al.* (2013) menemukan KHM pada konsentrasi 12.5%. Variasi nilai ini kemungkinan disebabkan oleh perbedaan metode ekstraksi, pelarut yang digunakan, serta strain bakteri uji. Secara kolektif, data-data ini menegaskan potensi superior dari ekstrak daun sirih hijau sebagai agen antibakteri terhadap *E. coli*.

Daun kumis kucing (*Orthosiphon stamineus*) dikenal memiliki kandungan senyawa metabolit sekunder seperti flavonoid (sinensetin), saponin, dan polifenol yang berkontribusi pada efek farmakologisnya, termasuk sebagai antibakteri. Studi mengenai daya hambat ekstrak daun kumis kucing menunjukkan hasil yang positif namun dengan diameter zona Jernih yang lebih kecil. Penelitian oleh Sulistyoningrum & Laily (2020) menunjukkan zona hambat sebesar 11.5 mm pada konsentrasi ekstrak 50%, sementara Irmala, *et al.* (2022) melaporkan diameter 11.2 mm pada konsentrasi 100%. Hasil yang sedikit lebih rendah ditunjukkan oleh Widayanti, *et al.* (2018) dengan zona hambat 9.17 mm (pada 60 mg/mL) dan Arafah, *et al.* (2019) dengan 8.23 mm (pada 80%).

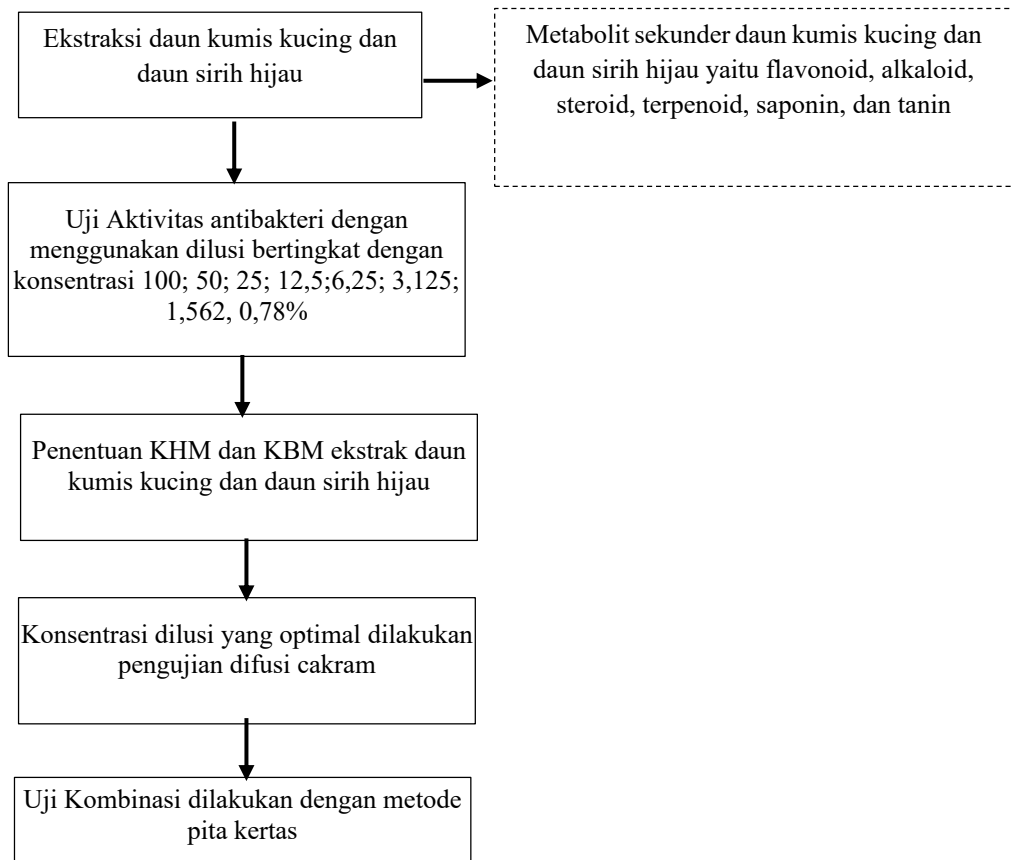
Penentuan nilai KHM dan KBM memberikan gambaran yang lebih kuantitatif mengenai potensi ekstrak ini. Puspitasari, *et al.* (2020) dan Sulistyoningrum & Laily (2020) melaporkan nilai KHM yang identik, yaitu pada konsentrasi 12.5%. Widayanti, *et al.* (2018) melaporkan KHM pada 7.5 mg/mL dan KBM pada 15 mg/mL. Puspitasari, *et al.* (2020) juga berhasil menentukan nilai KBM ekstrak pada konsentrasi 25%.

L. Hipotesis

Berdasarkan permasalahan yang ada, maka dapat disusun hipotesis dalam penelitian ini yaitu:

1. Nilai KHM dan KBM dari ekstrak daun kumis kucing adalah 25% sedangkan daun sirih hijau 6,125% dengan menggunakan dilusi
2. Perbandingan kombinasi ekstrak daun kumis kucing dan daun sirih yang paling efektif sebagai antibakteri *Escherichia coli* adalah 1:2 dengan memiliki daya hambat yang paling besar secara difusi.
3. Kombinasi 1: 2 antara kumis kucing dan daun sirih memiliki efek sinergis terhadap antibakteri.

M. Kerangka Pikir Penelitian



Gambar 2. Skema kerangka pikir penelitian