

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Manusia beradaptasi dengan lingkungan dalam kehidupan sehari-hari, termasuk mikroorganisme. Secara umum, manusia memiliki sejumlah besar mikroorganisme (flora normal) yang biasanya tidak menyebabkan penyakit. Namun, selama proses ini, beberapa bakteri patogen penting biasanya berasal dari flora normal, yang menyebabkan infeksi (Carroll *et al.*, 2016).

Penyakit infeksi merupakan penyakit yang terus berkembang dari waktu ke waktu dan menjadi masalah di negara berkembang termasuk Indonesia. Istilah penyakit menular digambarkan sebagai pertumbuhan mikroorganisme dan replikasinya di dalam inang. Perubahan fisik dalam tubuh adalah tanda infeksi. Penyakit yang disebabkan oleh infeksi dapat ditularkan dari satu orang ke orang lain atau dari hewan ke manusia, dan dapat disebabkan oleh berbagai mikroorganisme, seperti bakteri, parasit, dan jamur (Solikhah *et al.*, 2018).

Penyakit menular merupakan faktor kematian anak-anak antara 29 hari dan 11 bulan. Seperti tahun lalu, pada tahun 2020, pneumonia dan diare masih menjadi masalah utama yang menyebabkan 73,9% kematian (pneumonia) dan 14,5% kematian (diare). Penyebab kematian lainnya termasuk penyakit jantung bawaan, kelainan bawaan lainnya, meningitis, demam berdarah, dan penyakit saraf. (Kementerian Kesehatan RI, 2020).

Escherichia coli merupakan patogen utama penyebab lebih kurang 90% infeksi saluran kemih, infeksi saluran pencernaan berupa diare, dan infeksi sistemik pada manusia yang mencakup bakteremia, pneumonia nosokomial, kolesistitis, kolangitis, peritonitis, selulitis, osteomyelitis, artritis infeksius, serta meningitis neonatal (Carroll *et al.*, 2016).

Escherichia coli terdapat pada usus besar manusia atau hewan yang akan dimuntahkan melalui tinja. Mikroorganisme patogen yang terkandung pada tinja bisa menularkan beragam penyakit. Bila masuk tubuh manusia, dalam satu gram tinja bisa mengandung satu miliar partikel virus infeksius yang mampu bertahan yang bisa bertahan hidup selama beberapa minggu pada suhu dibawah 100°C. ada empat

mikroorganisme patogen yang terkandung dalam tinja yaitu: virus, protozoa, cacing serta bakteri pada umumnya banyak ditemukan adalah bakteri jenis *Escherichia coli*. Dan juga dapat ditemukan di tanah, sayuran, dan air, serta daging yang kurang matang. Strain patogen menyebabkan penyakit usus pada manusia saat tertelan. (Sligl W *et al.*, 2006)

Kayu manis (*Cinnamon* sp) ialah salah satu agen penguat rasa yang sering digunakan dalam dunia makanan serta industri. Selain itu, kayu manis juga berfungsi menjadi pemanis serta pemberi aroma. Kayu manis pula dipergunakan dalam pembuatan kosmetik serta industri medis karena mempunyai efek antibakteri, antioksidan, dan antikarsinogenik. Dalam dunia pengobatan tradisional Cina, kayu manis dipergunakan menjadi agen neuroprotektif, terapi diabetes, serta penyakit-penyakit lain seperti inflamasi, gangguan saluran cerna, dan infeksi saluran kemih (Wang R *et al.*, 2009).

Kulit serta daun kayu manis mempunyai kandungan minyak atsiri, saponin, serta flavonoid. Kandungan utama minyak atsiri kayu manis ialah sinamaldehyd (60,72%), eugenol (17,62%), dan kumarin (13,39%) yang mempunyai pengaruh antibakterial (Puspita *et al.*, 2014). Hasil penelitian ini sama seperti penelitian di Guangzhou, China, yang dilakukan (Wang R *et al.*, 2009). *Cinnamomum burmannii* mempunyai kandungan primer sinamaldehyd (60-77%), *Cinnamomum zeylanicum* kandungan utamanya artinya eugenol sebanyak 65-89% (Daswir, 2014).

Kayu manis jenis *Cinnamomum burmannii* telah berkembang sejak lama di Indonesia, bahkan menjadi salah satu komoditi utama perdagangan Indonesia sejak zaman Belanda. Pertumbuhan *Cinnamomum burmannii* di Indonesia didukung oleh ketersediaan lahan pegunungan yang terbentang sepanjang pulau Sumatera, Jawa, dan Sulawesi dengan curah hujan yang memadai (Ferry *et al.*, 2013). Pemanfaatan kayu manis spesies *Cinnamomum burmannii* untuk antimikroba cukup potensial dikembangkan di Indonesia. Oleh karena itu, penelitian lebih lanjut dan tertarik melakukan penelitian dengan judul “ Uji Efektivitas Antibiotik Ekstrak Etanol Daun Kayu Manis (*Cinnamomum burmannii*) Terhadap Pertumbuhan *Escherichia coli* Secara In Vitro.”

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian diatas, maka rumusan masalah pada penelitian ini.

1. Apakah ada dampak efek antibiotik ekstrak daun kayu manis (*Cinnamomum burmannii*) terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* secara in vitro?
2. Berapakah konsentrasi ekstrak daun kayu manis (*Cinnamomum burmannii*) yang paling efisien dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Untuk mengetahui efektivitas antibiotik ekstrak daun kayu manis (*Cinnamomum burmannii*) terhadap pertumbuhan *Escherichia coli* secara in vitro.

1.3.2. Tujuan Khusus

Tujuan khusus dalam penelitian ini adalah:

1. Untuk mengetahui efektivitas antibiotik ekstrak daun kayu manis (*Cinnamomum burmannii*) terhadap pertumbuhan *Escherichia coli* pada konsentrasi 15%, 30%, 60%, dan 80% secara in vitro.
2. Untuk membandingkan perbedaan efek antibiotik ekstrak daun kayu manis (*Cinnamomum burmannii*) terhadap pertumbuhan *Escherichia coli* pada konsentrasi 15%, 30%, 60%, dan 80% secara in vitro.
3. Untuk mengetahui konsentrasi ekstrak daun kayu manis (*Cinnamomum burmannii*) yang paling efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.

1.4. Manfaat Penelitian

1. Diharapkan bisa menambahkan pengetahuan serta pemahaman pembaca tentang khasiat daun kayu manis (*Cinnamomum burmannii*) sebagai bahan antibakteri khususnya bakteri *Escherichia coli*.
2. Hasil penelitian ini menambahkan pemahaman serta pengetahuan peneliti dalam penyusunan karya tulis ilmiah serta mengenali tentang pentingnya khasiat dari ekstrak daun kayu manis (*Cinnamomum*

burmannii) yang bisa membatasi perkembangan bakteri *Escherichia coli*.

3. Sebagai pengobatan tradisional dengan memanfaatkan dari ekstrak daun kayu manis(*Cinnamomum burmannii*)
4. Sebagai bahan masukan untuk institusi dan bahan bacaan serta referensi untuk mahasiswa buat penelitian berikutnya.

1.5 Hipotesa

Hipotesa yang melandasi penelitian ini adalah :

Ada efek antibiotik ekstrak etanol daun kayu manis (*Cinnamomum burmannii*) terhadap pertumbuhan *Escherichia coli* secara in vitro.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tanaman Kayu Manis (*Cinnamomum burmannii*)

2.1.1 Klasifikasi Tanaman

Tanaman kayu manis (*Cinnamomum burmannii*) pada sistem taksonomi tanaman mempunyai klasifikasi sebagai berikut:

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Divisi	: <i>Gymnospermae</i>
Subdivisi	: <i>Spermatophyta</i>
Kelas	: <i>Dicotyledonae</i>
Subkelas	: <i>Dialypetalae</i>
Ordo	: <i>Policarpicae</i>
Famili	: <i>Lauraceae</i>
Genus	: <i>Cinnamomum</i>
Spesies	: <i>Cinnamomum burmannii</i> (Harmoko, A. D. 2012)



Gambar 2. 1 .Daun kayu manis (*Cinnamomum burmannii*)

Sumber: Dokumentasi Pribadi, 2021

Nama Lain Kayu Manis Di pasaran, kayu manis dikenal menggunakan sebutan casiavera atau cinnamon. Kayu manis mempunyai nama lain *Ceylon cinnamon/ Camphor tree* (Inggris), *Camphrier/ Baume anglais* (Prancis),

Kampferbaum (Jerman), *Al-canfor* (Spanyol), serta *Long nao* (Vietnam Muhammad Adam, H. (2015)

Sedangkan di Indonesia tumbuhan kayu manis dikenal dengan *Cinnamon* atau nama lengkapnya *Cinnamomum burmannii* atau menggunakan kata lain *C zeylanicum* yang banyak memiliki nama daerah seperti Batak (Holim), Melayu (Kayu manis), Minangkabau (Kulik manih), Sunda (Mentek), Jawa Tengah (manis Jangan), Madura (Cingar Kanyengar, Sasak (Onte), Sumba (Kaninggu) serta Flores (Puudinga) (Octavianty Y *et al.*, 2014)

2.1.2 Morfologi Kayu Manis

Cinnamomum burmannii tanaman Kayu manis yang tergolong tanaman kor-mus. tumbuhan kayu manis mempunyai batang yang besar dan bisa mencapai di-
ameter 125 cm, bercabang dan berwarna abu-abu tua. Kayunya berwarna coklat muda serta bertekstur halus. Kulit batang kayu manis bisa dari asal dahan atau ranting, Kayu manis termasuk genus *Cinnamomum* yang termasuk berasal *family Lau-raceae* yang meliputi tanaman yang berkayu menggunakan bentuk daun tunggal, *ordo Polycarpicae* serta termasuk Kelas *Dicotyledoneae* Daun kayu manis mempunyai daun tunggal, berbentuk elips memanjang dan kaku mirip kulit. Letak daun berseling, panjang tangkai daun 0,5- 1,5 cm. Panjang daun 4-14 cm, menggunakan lebar 1,5-6 cm. Ujung runcing, tepi rata, permukaan atas licin warnanya hijau, per-mukaan bawah bertepung dan warna keabu-abuan. Daun muda berwarna merah pucat. Bunga kayu manis yang berkelamin 2 atau bunga tepal. Ukurannya sangat kecil, kelopak bunga berjumlah 6 helai pada 2 rangkaian. Bunganya tidak bertajuk. Benang sari berjumlah 12 helai yang terangkai pada empat kelompok, Buahnya mirip buah buni, berbiji satu dan berdaging. Bentuknya bulat memanjang, rona buah yang masih muda berwarna hijau tua, serta buah yang telah tua berwarna ungu tua. Panjang buah kurang lebih 1,3- 1,6 cm, dan diameter 0,35- 0,75 cm. Panjang biji 0,84-1,32 cm serta diameter 0,59-6,8 cm (Idris *et al.*, 2019)

2.1.3 Manfaat Kayu Manis

Cinnamomum burmanii biasa digunakan sebagai bumbu masakan. Di beberapa penelitian, ekstrak kulit batang tumbuhan tersebut diketahui memiliki aktivitas antibakterial di beberapa bakteri patogen, seperti: *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dan *Salmonella anatum*. Unsur primer yang ditemukan dalam minyak atsiri batang *Cinnamomum burmanii* adalah *trans-cinnamaldehyd*. (Harmoko, 2012)

Trans-cinnamaldehyde diketahui menghambat pertumbuhan beberapa bakteri, yaitu: *P. aeruginosa*, *E. faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Methicillin-Resistant S.Aureus* (MRSA), *Klebsiella pneumoniae*, dan *Vibrio parahaemolyticus*. Selain itu komponen minyak atsiri *Cinnamomum burmanii* tersebut juga terbukti efektif sebagai antifungal terhadap beberapa fungi, termasuk *Alternaria alternata* dan *Malassezia furfur*. Selain itu, *trans-cinnamaldehyde* juga terbukti memiliki efek penghambatan terhadap pertumbuhan *Candida albicans*. (Harmoko, A. D. 2012)

2.1.4 Kandungan Kayu Manis

Cinnamomum burmanii mengandung minyak atsiri, tanin, kalsium oksalat, safrole, *cinneylanin*, *coumarin*, *mucilage*, resin dan gula. Komponen terbesar minyak atsiri *Cinnamomum burmanii* adalah *trans-cinnamaldehyde* (60-75%) dan *eugenol* (4-8%). Selain itu, kayu manis juga mengandung *cinnamic acid* dan *o-methoxycinnamaldehyde* (0,79%). (Harmoko, A. D. 2012).

2.2 *Escherichia Coli*

2.2.1 Taksonomi *Escherichia Coli*

Taksonomi dari bakteri *Escherichia coli* sebagai berikut.

Kingdom	: <i>Prokaryotae</i>
Divisi	: <i>Gracilicutes</i>
Kelas	: <i>Scotobacteria</i>
Ordo	: <i>Eubacteriales</i>
Famili	: <i>Enterobacteriaceae</i>

Genus : *Escherichia*
Spesies : *Escherichia coli* (Jawetz *et al.*, 2010)

Secara historis, bakteriologi sangat bergantung pada fenotipe biokimia dan struktural untuk klasifikasi taksonomi bakteri. Namun, kemajuan dalam genomik komparatif telah menyebabkan wawasan yang lebih besar tentang keragaman genetik yang luar biasa di dunia mikroba, dan bahkan dalam spesies yang diterima dengan baik seperti *Escherichia*. Keragaman genetik yang luar biasa di *Escherichia coli* merekapitulasi radiasi evolusi spesies ini dalam mengeksploitasi, termasuk sistem pencernaan dari host vertebrata yang beragam serta lingkungan alam non-host (tanah, perairan alam, air limbah), yang mendorong adaptasi, seleksi alam, dan evolusi spesialisasi spesifik *intra-genotypic* sebagai strategi untuk bertahan hidup. (Mueller M *et al.*, 2021)

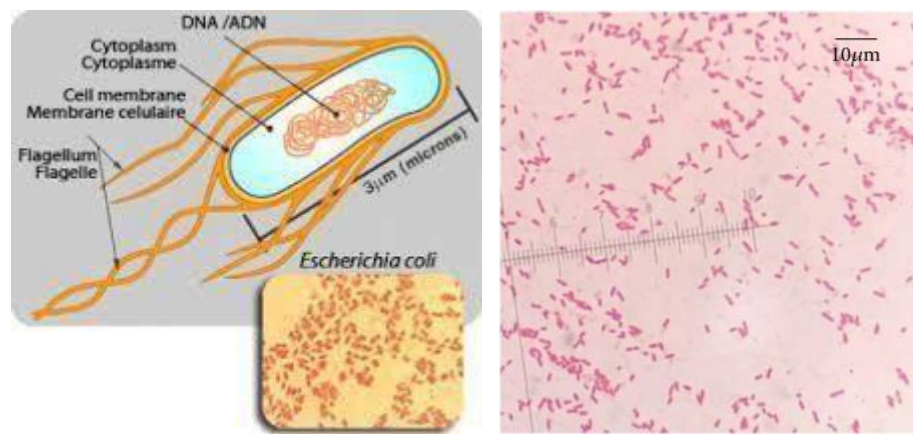
2.2.2 Morfologi *Escherichia Coli*

Escherichia coli termasuk pada *family Enterobacteriaceae*. *E.coli* merupakan bakteri gram negative yang berbentuk batang pendek atau sering disebut kokobasil. Bakteri ini mempunyai flagel, yang mempunyai ukuran 0,4-0,7 μm x 1,4 μm dan memiliki simpai. *Escherichia coli* memiliki panjang sekitar 2 μm , diameter 0,7 μm , lebar 0,4-0,7 μm , dan bersifat anaerob fakultatif. Dan membentuk koloni yang bundar, cembung, dan halus dengan tepi yang nyata (Hidayat, H., 2015).

Escherichia coli (*E. coli*) adalah basil gram negatif yang dikenal sebagai bagian dari flora usus normal tetapi juga dapat menjadi penyebab penyakit usus dan ekstraintestinal pada manusia. Ada ratusan strain *E. coli* yang teridentifikasi, mengakibatkan spektrum penyakit mulai dari gastroenteritis ringan yang sembuh sendiri hingga gagal ginjal dan syok septik. Virulensinya memberikan kemampuan *E. coli* untuk menghindari pertahanan inang dan mengembangkan resistensi terhadap antibiotik umum. Tinjauan ini akan membagi infeksi *E. coli* menjadi yang menyebabkan penyakit usus dan yang menyebabkan penyakit ekstraintestinal. (Mueller M *et al.*, 2021)

Penyakit usus yang disebabkan oleh *E. coli* hasil dari konsumsi bakteri dan kemampuan bawaan *E. coli* untuk mengatasi pertahanan inang. Bakteri gram

negatif dicirikan oleh selubung selnya, yang terdiri dari membran sel sitoplasma bagian dalam, dinding sel peptidoglikan, dan membran luar. Membran luar terbuat dari bilayer lipid, protein terkait, dan lipopolisakarida (LPS), menghasilkan reaksi toksik jika dilisiskan. Strain *E. coli* patogen masing-masing memiliki faktor virulensi khas yang dikodekan pada plasmid, transposon, dan bakteriofag. (Mueller M *et al.*, 2021)



Gambar 2. 2 *Escherichia coli* (Mueller M *et al.*, 2021)

2.2.3 Patogenesis dan Gambaran Klinis *Escherichia coli*

Penyakit usus yang disebabkan oleh *E. coli* hasil dari konsumsi bakteri dan kemampuan bawaan *E. coli* untuk mengatasi pertahanan inang. Bakteri gram negatif dicirikan oleh selubung selnya, yang terdiri dari membran sel sitoplasma bagian dalam, dinding sel peptidoglikan, dan membran luar. Membran luar terbuat dari bilayer lipid, protein terkait, dan lipopolisakarida (LPS), menghasilkan reaksi toksik jika dilisiskan. Strain *E. coli* patogen masing-masing memiliki faktor virulensi khas yang dikodekan pada plasmid, transposon, dan bakteriofag. Ada beberapa jenis patogen antara lain :

1. ETEC (*Enterotoxigenic E. coli*)

ETEC Mengkolonisasi fimbriae yang diekspresikan oleh ETEC memungkinkan bakteri untuk menempel pada dinding usus. Setelah terhubung, ETEC mengekspresikan *heat-labile toxin* (LT) dan/atau *heat-stable toxin* (ST), yang merupakan toksin sekretori yang dikodekan pada

plasmid. LT merangsang adenilat siklase yang menyebabkan peningkatan *Cyclic Adenosine Monophosphate* (cAMP) intraseluler dan selanjutnya sekresi klorida dari sel kriptus usus. Mekanisme ini juga menghambat vili usus dari penyerapan natrium klorida. Proses ini menyebabkan sekresi air bebas ke dalam lumen usus, sehingga menghasilkan diare berair. ST merangsang guanylate cyclase yang menyebabkan peningkatan intraseluler *Cyclic Guanosine Monophosphate* (cGMP) dan sekresi klorida berikutnya dan penghambatan penyerapan natrium klorida, sehingga menghasilkan diare berair (Kotloff, K.L *et al.*, 2013)

2. EPEC (*Enteropathogenic E. coli*)

EPEC: *Bundle-Forming Pilus* (BFP) encoded by the plasmid (pEAF), memungkinkan EPEC untuk membentuk lampiran lokal untuk enterosit di usus kecil. Setelah terikat, faktor kolonisasi protein membran luar, intimin, memfasilitasi peningkatan kepatuhan. Intimin adalah faktor kolonisasi protein membran luar yang dikodekan pada gen *eae* di dalam *locus of enterocyte effacement* (LEE) chromosomal island. Pulau kromosom LEE menguraikan sekitar 20 toksin sekretori yang disuntikkan ke dalam enterosit dengan injeksi tipe III. (Pinaud L *et al.*, 2018) Racun ini menghasilkan serangkaian peristiwa, yang pada akhirnya mengarah pada penipisan karakteristik mikrovili, peningkatan permeabilitas persimpangan ketat, dan perubahan dalam sekresi dan penyerapan air dan elektrolit. EspF adalah protein yang disekresikan LEE yang tidak terlibat dalam pelekatan dan pengikisan. Tampaknya mengganggu fungsi penghalang usus dengan meningkatkan permeabilitas monolayer melalui perubahan hambatan listrik. EspF memiliki beberapa domain interaksi protein-protein yang dapat berfungsi dengan berinteraksi dengan regulasi endositik. Dua protein lain yang disekresikan, EspG dan EspG2, menghambat penyerapan klorida membran luminal dengan menurunkan ekspresi permukaan penukar Cl⁻/OH⁻ melalui gangguan mikrotubulus. (Morin N *et al.*, 2013)

3. EAEC: (*Enterobacter Adherent E. coli*)

Patogenitas EAEC terjadi karena kuman melekat rapat-rapat pada bagian mukosa intestinal sehingga menimbulkan gangguan. Mekanisme terjadinya diare yang disebabkan oleh EAEC belum jelas diketahui, tetapi diperkirakan menghasilkan sitotoksin yang menyebabkan terjadinya diare. Beberapa strain EAEC memiliki serotipe seperti EPEC. EAEC menyebabkan diare berair pada anak-anak dan dapat berlanjut menjadi diare persisten.

EAEC menunjukkan terjadi karena kuman pola bata bertumpuk yang melekat pada sel epitel. Plasmid virulensi mengkodekan aktivator transkripsi AggR yang mengaktifkan beberapa faktor virulensi, meskipun pemahaman ilmiah tentang proses ini tidak lengkap. AggR kemungkinan menginduksi fimbriae kepatuhan *agregat aggregative adherence fimbriae* (AAF/I-III), adhesin, dispersi protein permukaan, dan enterotoksin Pet, EAST-1, ShET1, dan ShET2. Dispersin kemungkinan mempromosikan kolonisasi yang dimediasi AAF.

Diperkirakan menghasilkan sitotoksin yang menyebabkan terjadinya diare. EAEC menyebabkan diare berair pada anak-anak dan dapat berlanjut menjadi diare persisten. (Kotloff, K.L., *et al.*, 2013)

4. EHEC/STEC: (*Enterohaemorrhagic E. coli*)

EHEC/STEC menghasilkan diare berdarah karena kemampuannya untuk mengekspresikan Shiga toxin 1 (Stx1) dan atau Shiga toxin 2 (Stx2). Stx1 dan Stx2 terkait erat dengan toksin Shiga (Stx) yang diproduksi oleh *Shigella dysenteriae*. EHEC/STEC, yang mengekspresikan Stx2, menyebabkan diare berdarah dan mungkin juga mengekspresikan Stx1, sedangkan bakteri yang tidak mengekspresikan Stx2 tidak menyebabkan diare berdarah. Stxs adalah sekelompok toksin protein AB bakteri yang terdiri dari satu subunit A dan lima subunit B identik yang mampu menghambat sintesis protein melalui kemampuannya untuk menargetkan ribosom eukariotik. Subunit A bertanggung jawab untuk menghambat sintesis protein sedangkan pentamer B mengikat

glikosfingolipid Gb3, reseptor seluler pada sel endotel. Penghambatan sintesis protein menyebabkan kematian sel enterosit dan kolitis inflamasi berikutnya. Genom EHEC/STEC juga mengkodekan intimin, yang merupakan adhesin utamanya, dan EHEC/STEC memiliki plasmid (pO157) yang mengekspresikan toksin pembentuk pori yang disebut EHEC-hemolysin. Setelah EHEC/STEC menempel dan menghasilkan kerusakan usus lokal, toksin Stx memasuki inang dan berjalan ke sel epitel organ target. Sel epitel glomerulus mengalami kerusakan yang sama seperti enterosit, dan sebagai akibat dari kematian sel, terlepas dari membran glomerulus. Keadaan inflamasi ini menghasilkan trombosis dan aktivasi kaskade koagulasi yang menghasilkan trombositopenia berikutnya, anemia, dan kerusakan ginjal, trias HUS. EHEC/STEC juga dikenal karena kemampuannya untuk menginduksi *hemolytic uremic syndrome* (HUS). HUS ditandai dengan trias *microangiopathic hemolytic anemia* (MAHA), trombositopenia, dan insufisiensi ginjal. . (Bielaszewska M *et al.*, 2014)

5. EIEC (*Enteroinvasive E. coli*)

EIEC: Seperti EHEC, enterotoksin menginduksi diare sekretori. Kolonisasi dan invasi selanjutnya pada mukosa kolon, replikasi, penyebaran sel ke sel menyebabkan kolitis inflamasi. (Bielaszewska M *et al.*, 2014)

E. coli adalah salah satu mikroorganisme yang paling serbaguna secara genetik dan mampu berkoloni dan bertahan di beberapa relung, baik di lingkungan maupun di inang. Strain *E. coli* komensal menjajah saluran pencernaan manusia beberapa jam setelah lahir, menghasilkan hubungan simbiosis antara mikrobiota dan inangnya (Ducarmon *et al.*, 2019). Namun, mekanisme bagaimana *E. coli* memastikan simbiosis yang efisien ini tidak diketahui dengan baik. Hal ini dapat dikaitkan dengan kemampuannya yang tinggi untuk menggunakan nutrisi di usus besar (Fabich *et al.*, 2008 ; Ducarmon *et al.*, 2019). Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa persaingan nutrisi antara mikrobiota dan

patogen membatasi kolonisasi patogen, yang menyebabkan persaingan sengit di antara mikroorganisme ini (Lustri *et al.*, 2017).

Terkadang *E. coli* patogen tidak dapat dibedakan dari *E. coli* komensal, hanya berdasarkan faktor virulensi tertentu, seperti yang dijelaskan sebelumnya dalam galur ExPEC (Köhler *et al.*, 2011). Namun, seiring dengan perkembangan zaman ini berubah karena kecanggihan dan ketersediaan metodologi pengetikan molekuler. Pendekatan komputasi baru membawa informasi penting yang tak terhitung jumlahnya tentang hubungan host-patogen, reservoir, diagnosis klinis, dan jalur transmisi ExPEC baru (Johnson *et al.*, 2018).

2.2.4 Kehidupan *Escherichia coli* In Vitro

Interaksi *E. coli* pada in vitro dengan sel kultur jaringan mewakili sistem model yang sederhana namun sangat kuat untuk mempelajari patogen. *E. coli* menunjukkan spesifisitas yang ketat untuk usus kecil pediatrik selama infeksi alami. Menariknya, di bawah kondisi kultur jaringan, selektivitas ini hilang dan *E. coli* berinteraksi dengan sel-sel yang berasal dari berbagai macam jaringan dan spesies. Meskipun ini menghalangi penggunaan garis sel untuk mempelajari spesifisitas spesies dan tropisme jaringan *E. coli*, ini membuka peluang untuk menggunakan garis sel khusus, termasuk yang mengandung mutasi spesifik, untuk mengatasi peran gen dan protein inang spesifik dalam proses tertentu. Banyak fitur dari garis sel yang umum digunakan telah dicirikan, menjadikannya alat yang efektif untuk mempelajari peran protein sel inang yang diberikan dalam menanggapi infeksi bakteri. Selain interaksi dengan enterosit, *E. coli* juga berinteraksi dengan sel M fagositik dan sel dendritik yang memperpanjang tonjolan ke dalam lumen usus di mana *E. coli* mungkin menghadapi infiltrasi sel imun bawaan. (Vossenkämper A *et al.*, 2010)

2.3 Antibiotik

Antibiotik tidak direkomendasikan sebagai pengobatan lini pertama untuk penyakit diare yang disebabkan oleh *E. coli* untuk sebagian besar pasien karena

efek samping yang berbahaya dan hubungannya dengan resistensi antibiotik. Untuk pasien dengan penyakit parah (misalnya, lebih dari enam tinja per hari, demam, dehidrasi yang memerlukan rawat inap, diare yang berlangsung lebih dari tujuh hari, atau diare berdarah), antibiotik yang digunakan. Rifaximin, azitromisin, dan ciprofloxacin saat ini direkomendasikan oleh *Infectious Diseases Society of America* (IDSA) dan *International Society of Travel Medicine* (ISTM) untuk mengobati penyakit diare *E. coli*. Dosis yang digunakan Ciprofloxacin: 750 mg sekali; atau 500 mg selama tiga hari. (Shane AL *et al.*, 2017)

2.3.1 Definisi Antibiotik

Antibiotik berasal dari kata “anti dan bios” yang berarti hidup atau kehidupan. Antibiotika merupakan suatu zat yang dapat membunuh atau melemahkan suatu mikroorganisme, seperti bakteri, parasit, atau jamur (Utami, 2012).

Antibiotik merupakan obat yang berasal dari seluruh atau bagian tertentu mikroorganisme yang digunakan untuk mengobati infeksi bakteri. Antibiotika tidak efektif untuk melawan virus. Antibiotik selain mematikan mikroorganisme atau menghentikan reproduksi bakteri dan membantu sistem pertahanan alami tubuh untuk mengeliminasi bakteri tersebut (Fernandezt, 2013).

2.3.2 Penggolongan Antibiotik Berdasarkan Sifat

Berdasarkan luas aktivitasnya, antibiotika dibagi menjadi dua golongan yaitu:

1. Antibiotika yang *narrow spectrum* (aktivitas sempit).

Obat-obat ini terutama aktif terhadap beberapa jenis kuman saja, misalnya penisilin-G dan penisilin-V, eritromisin, klindamisin, kanamisin, dan asam fusidat hanya bekerja terhadap kuman Gram positif. Sedangkan streptomisin, gentamisin, polimiksin-B, dan asam nalidiksat khusus aktif terhadap kuman gram negatif.

Pada bakteri gram negatif Ampisilin umumnya digunakan secara intravena yang efektif untuk infeksi. Selain aminopenicillin,

Carboxypenicillin (Karbenisilin dan Tikarsilin) dan Ureidopenicillin (Piperasilin) juga merupakan penisilin terhadap bakteri gram negatif, sedangkan pada bakteri gram positif Obat-obat antibiotik beta-laktam umumnya bersifat bakterisid dan sebagian besar efektif terhadap organisme Gram positif.

Secara umum mekanisme kerja antibiotik pada sel bakteri dapat terjadi melalui beberapa cara yaitu :

- a. Menghambat sintesis dinding sel bakteri.
- b. Menghambat fungsi membran plasma.
- c. Menghambat sintesis asam nukleat.
- d. Menghambat sintesis protein melalui penghambatan pada tahap translasi dan transkripsi material genetik.
- e. Menghambat metabolisme folat. (Tjay *et al.*, 2007)

2. Antibiotika *broad spectrum* (aktivitas luas)

Bekerja terhadap lebih banyak, baik jenis kuman Gram positif maupun Gram negatif. Golongan ini diharapkan dapat menghambat pertumbuhan dan mematikan sebagian besar bakteri. Antara lain sulfonamida, ampicilin, sefalosporin, kloramfenikol, tetrasiklin, dan rifampisin (Tjay *et al.*, 2007).

2.3.3. Penggolongan Antibiotik Berdasarkan Cara Kerja

Agen antimikroba secara klasik berdasarkan cara kerja dikelompokkan menjadi 2 kategori utama berdasarkan efek *in vitro* mereka pada bakteri: bakterisida dan bakteriostatik. Ajaran umum sering menjelaskan bahwa antibiotik bakterisida "membunuh" bakteri dan antibiotik bakteriostatik "mencegah pertumbuhan" bakteri. Definisi sebenarnya tidak sesederhana itu. Untuk secara akurat menentukan setiap kategori, Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bakterisida Minimum (KBM) harus dipahami. Konsentrasi terendah yang menghambat pertumbuhan bakteri terlihat pada 24 jam adalah KHM. Konsentrasi Bakterisida Minimum (KBM) adalah konsentrasi antibiotik yang mengurangi kepadatan bakteri hingga 1000 kali lipat dalam 24 jam. (Pankey GA *et al.*, 2004)

Kelas Obat dan Antibiotik Spesifik:

1. Bakteriostatik

- a. Glycylcyclines : Tigecycline
- b. Tetrasiklin : Doksisisiklin, minosiklin
- c. Lincosamides : Clindamycin
- d. Makrolida : Azitromisin, klaritromisin, eritromisin
- e. Oksazolidinon : Linezolid
- f. Sulfonamida : Sulfametoksazol

2. Bakterisida

- a. Aminoglikosida: Tobramycin, gentamicin, amikasin
- b. Beta-laktam (penisilin, sefalosporin, karbapenem): Amoksisilin, cefazolin, meropenem
- c. Fluoroquinolones: Ciprofloxacin, levofloxacin, moksifloksasin
- d. Glikopeptida: Vankomisin
- e. Lipopeptida siklik: Daptomisin
- f. Nitroimidazol: Metronidazol (Nemeth J, 2015)

2.3.4. Pemilihan Antibiotik

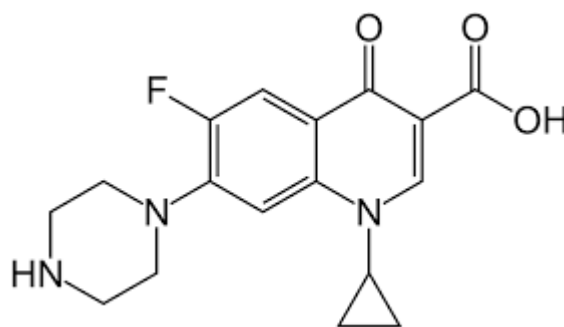
Pada penelitian ini menggunakan penggunaan antibiotik dengan cara kerja bakterisida dan menggunakan golongan Fluoroquinolones yaitu ciprofloxacin dengan spektrum luas terhadap bakteri gram positif maupun bakteri gram negatif yang mekanisme kerjanya mempengaruhi sintesis atau metabolisme asam nukleat, sehingga penulis tertarik untuk menguji golongan obat ciprofloxacin sebagai kontrol positif pada ekstrak daun kayu manis terhadap pertumbuhan *E.coli* (bakteri gram negatif) secara in vitro.

1. Ciprofloxacin

Ciprofloxacin adalah agen antibiotik di kelas *fluoroquinolone* yang digunakan untuk mengobati infeksi bakteri seperti infeksi saluran kemih dan pneumonia. Ciprofloxacin memiliki persetujuan FDA untuk mengobati infeksi saluran kemih, infeksi menular seksual (gonore dan chancroid), kulit, tulang, infeksi sendi, prostatitis, demam tifoid, infeksi gastrointestinal, dan

infeksi saluran pernapasan bawah, antraks, wabah, dan salmonellosis. Selain itu, ciprofloxacin merupakan pilihan pengobatan yang tepat pada pasien dengan infeksi campuran atau pasien dengan faktor predisposisi infeksi Gram-negatif. Kegiatan ini mencakup ciprofloxacin, antibiotik kuinolon spektrum luas yang perlu ditinjau oleh anggota tim interprofesional, cakupan, kontraindikasi, dan profil efek samping untuk mengelola penyakit menular pasien secara optimal.

Ciprofloxacin aktif terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif. Ciprofloxacin terutama aktif terhadap kuman Gram negatif termasuk *Salmonella*, *Shigella*, *Campilobakter*, *Neisseria*, dan *Pseudomonas*. Penggunaan ciprofloxacin termasuk untuk infeksi saluran napas, saluran kemih, sistem pencernaan, dan gonore serta septikemia oleh organisme yang sensitif (BPOM., 2018).



Gambar 2.3 Ciprofloxacin (Trung Dung *et al.*, 2017)

Ciprofloxacin adalah agen antibiotik di kelas fluoroquinolone yang digunakan untuk mengobati infeksi bakteri seperti infeksi saluran kemih dan pneumonia. Ciprofloxacin disetujui FDA untuk pengobatan infeksi saluran kemih, infeksi menular seksual (gonore dan chancroid), kulit, tulang, infeksi sendi, prostatitis, demam tifoid, infeksi gastrointestinal, infeksi saluran pernapasan bawah, antraks, wabah, dan salmonellosis. Ciprofloxacin tidak boleh menjadi terapi empiris lini pertama untuk infeksi saluran pernapasan jika *Streptococcus pneumoniae* rentan penisilin merupakan patogen utama. Ciprofloxacin adalah pilihan pengobatan yang tepat pada pasien

dengan infeksi campuran atau pasien dengan faktor predisposisi infeksi Gram-negatif. Ciprofloxacin dipatenkan pada tahun 1983 oleh Bayer AG dan disetujui pada tahun 1987 oleh Badan Pengawas Obat dan Makanan Amerika Serikat. (Sharma et al., 2010)

2. Mekanisme Kerja Ciprofloxacin

Ciprofloxacin adalah antibiotik bakterisida dari kelas obat fluoroquinolone. Ini menghambat replikasi DNA dengan menghambat topoisomerase DNA bakteri dan DNA-girase. Dari kelas fluoroquinolone, ciprofloxacin adalah yang paling ampuh melawan bakteri basil gram negatif (terutama, *Enterobacteriaceae* seperti *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., dan *Neisseria*). Ciprofloxacin juga memiliki efektivitas terhadap beberapa bakteri gram positif. Ciprofloxacin adalah yang paling aktif melawan *Pseudomonas aeruginosa*, di antara kuinolon. Semakin menurun kerentanan di antara *P. aeruginosa* telah dilaporkan di Eropa, Amerika Utara dan Selatan, terutama di rumah sakit atau panti jompo dengan faktor risiko yang dapat diidentifikasi. Ciprofloxacin mudah diserap tetapi biasanya tidak mencapai penyerapan lengkap. Bioavailabilitas ciprofloxacin oral adalah 70 hingga 80%. Ciprofloxacin adalah salah satu dari sedikit antibiotik oral yang mampu mengobati infeksi *P. aeruginosa*. (Sharma et al., 2010)

2.4. Pengukuran Efektifitas Antibiotik

Kegunaan uji efektivitas ini adalah untuk mengetahui suatu hasil untuk menghambat pertumbuhan bakteri terhadap agen antibakteri. Metode uji efektivitas antibiotik daun kayu manis (*Cinnamomum burmannii*) terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. sebagai berikut:

2.4.1. Metode Difusi

- A. Metode *disc diffusion (test Kirby & Bauer)* akan menentukan aktivitas antimikroba. Piringan yang berisi agen antimikroba diletakkan di media agar yang sudah ditanami mikroorganisme yang akan berdifusi di media agar tersebut. Area jernih mengindikasikan adanya kendala pertumbuhan mikroorganisme oleh agen antimikroba pada permukaan media agar. Metode ini ialah metode yang paling sering dipergunakan. Metode ini ditentukan oleh beberapa faktor fisika serta kimia, selain faktor antara obat serta organisme (contohnya sifat medium dan kemampuan difusi, ukuran molekular dan stabilitas obat). Meskipun demikian, standarisasi faktor-faktor tadi memungkinkan melakukan uji kepekaan dengan baik. pada difusi supaya ada 3 metode, yaitu metode silinder, metode perforasi, dan metode cakram kertas. (Atikah, 2013).
- B. *E-tes* Metode. *E-tes* adalah metode yang bermanfaat buat mengestimasi *MIC (Minimum Inhibitory Concentration)* atau KHM (kadar hambat minimum), yaitu konsentrasi minimal suatu agen antimikroba buat bisa menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Metode ini memakai stip plastik yang mengandung agen antimikroba dari kadar terendah sampai tertinggi kemudian di letakkan pada permukaan media agar yang telah ditanami mikroorganisme. Pengamatan dilakukan pada area jernih yang ditimbulkannya yang memberikan kadar agen antimikroba yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme pada media.
- C. *Ditch-plate technique* artinya metode sampel uji beberapa agen mikroba yang diletakkan di parit yang didesain dengan cara memotong media agar pada cawan petri di bagian tengah secara membujur serta mikroba uji (maksimal 6 macam) digoreskan ke arah cawan petri yang berisi agen antimikroba.

2.4.1. Metode Difusi

- A. Metode *disc diffusion (test Kirby & Bauer)* akan menentukan aktivitas antimikroba. Piringan yang berisi agen antimikroba diletakkan di media agar yang sudah ditanami mikroorganisme yang akan berdifusi di media agar tersebut. Area jernih mengindikasikan adanya kendala pertumbuhan mikroorganisme oleh agen antimikroba pada permukaan media agar. Metode ini ialah metode yang paling sering dipergunakan. Metode ini ditentukan oleh beberapa faktor fisika serta kimia, selain faktor antara obat serta organisme (contohnya sifat medium dan kemampuan difusi, ukuran molekular dan stabilitas obat). Meskipun demikian, standarisasi faktor-faktor tadi memungkinkan melakukan uji kepekaan dengan baik. pada difusi supaya ada 3 metode, yaitu metode silinder, metode perforasi, dan metode cakram kertas. (Atikah, 2013).
- B. *E-tes* Metode. *E-tes* adalah metode yang bermanfaat buat mengestimasi *MIC (Minimum Inhibitory Concentration)* atau KHM (kadar hambat minimum), yaitu konsentrasi minimal suatu agen antimikroba buat bisa menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Metode ini memakai stip plastik yang mengandung agen antimikroba dari kadar terendah sampai tertinggi kemudian di letakkan pada permukaan media agar yang telah ditanami mikroorganisme. Pengamatan dilakukan pada area jernih yang ditimbulkannya yang memberikan kadar agen antimikroba yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme pada media.
- C. *Ditch-plate technique* artinya metode sampel uji beberapa agen mikroba yang diletakkan di parit yang didesain dengan cara memotong media agar pada cawan petri di bagian tengah secara membujur serta mikroba uji (maksimal 6 macam) digoreskan ke arah cawan petri yang berisi agen antimikroba.

2.4.1. Metode Difusi

- A. Metode *disc diffusion (test Kirby & Bauer)* akan menentukan aktivitas antimikroba. Piringan yang berisi agen antimikroba diletakkan di media agar yang sudah ditanami mikroorganisme yang akan berdifusi di media agar tersebut. Area jernih mengindikasikan adanya kendala pertumbuhan mikroorganisme oleh agen antimikroba pada permukaan media agar. Metode ini ialah metode yang paling sering dipergunakan. Metode ini ditentukan oleh beberapa faktor fisika serta kimia, selain faktor antara obat serta organisme (contohnya sifat medium dan kemampuan difusi, ukuran molekular dan stabilitas obat). Meskipun demikian, standarisasi faktor-faktor tadi memungkinkan melakukan uji kepekaan dengan baik. pada difusi supaya ada 3 metode, yaitu metode silinder, metode perforasi, dan metode cakram kertas. (Atikah, 2013).
- B. *E-tes* Metode. *E-tes* adalah metode yang bermanfaat buat mengestimasi *MIC (Minimum Inhibitory Concentration)* atau KHM (kadar hambat minimum), yaitu konsentrasi minimal suatu agen antimikroba buat bisa menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Metode ini memakai strip plastik yang mengandung agen antimikroba dari kadar terendah sampai tertinggi kemudian di letakkan pada permukaan media agar yang telah ditanami mikroorganisme. Pengamatan dilakukan pada area jernih yang ditimbulkannya yang memberikan kadar agen antimikroba yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme pada media.
- C. *Ditch-plate technique* artinya metode sampel uji beberapa agen mikroba yang diletakkan di parit yang didesain dengan cara memotong media agar pada cawan petri di bagian tengah secara membujur serta mikroba uji (maksimal 6 macam) digoreskan ke arah cawan petri yang berisi agen antimikroba.
- D. *Cupp-plate technique* adalah metode yang serupa dengan metode *disc diffusion* menggunakan cara membentuk sumur pada media supaya yang sudah ditanami menggunakan mikroorganisme serta diberi agen antimikroba yang telah diuji di sumur tersebut.

- E. *Gradient-plate technique* merupakan metode yang konsentrasi agen antimikroba pada media supaya secara teoritis bervariasi dari 0 hingga maksimal . Media agar dicairkan serta larutan uji masukkan menggunakan campuran kemudian dituang ke dalam cawan petri serta diletakkan dalam posisi miring. Nutrisi kedua lalu dituang di atasnya. Plate diinkubasi selama 24 jam buat memungkinkan agen antimikroba berdifusi dan permukaan media mengering. Mikroba uji (maksimal 6 macam) digoreskan di arah mulai dari konsentrasi tinggi ke rendah. (Atikah, 2013)

2.4.2. Metode Dilusi

Metode ini menggunakan antimikroba dengan kadar yang menurun secara bertahap, baik menggunakan media cair atau padat. Selanjutnya media diinokulasi bakteri uji serta dieramkan. Pada tahap akhir metode ini, dilarutkan antimikroba menggunakan kadar yang menghambat atau mematikan. Metode ini dibedakan menjadi 2 yaitu dilusi cair (*broth dilution*) serta dilusi padat (*solid dilution*).

- A. Metode dilusi cair/ *broth dilution* merupakan metode yang mengukur MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) atau Kadar Hambat Minimum (KHM) dan MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*) atau kadar bunuh minimum (KBM). Metode ini dilakukan dengan cara membentuk seri pengenceran agen antimikroba di medium cair yang dibubuhi dengan mikroba uji. Larutan uji agen antimikroba di kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan mikroba uji ditetapkan menjadi KHM. Larutan tadi selanjutnya dikultur ulang pada media cair tanpa penambahan mikroba uji ataupun agen antimikroba serta diinkubasi 18 – 24 jam. Media cair yang jernih sesudah diinkubasi maka ditetapkan menjadi KBM.
- B. Metode dilusi/solid dilution artinya metode yang serupa menggunakan metode dilusi cair namun metode ini memakai media padat (solid). Keuntungan metode ini ialah suatu konsentrasi agen antimikroba yang diuji bisa dipergunakan untuk menguji beberapa mikroba uji. (Cappuccino JG *et al.*, 2013)

2.5. Metode Ekstraksi

Ekstraksi merupakan peristiwa pemindahan massa zat aktif dalam pelarut tersebut. Umumnya zat berkhasiat tersebut dapat ditarik, namun khasiatnya tidak berubah. Tujuan utama ekstraksi adalah mendapatkan atau memisahkan sebanyak mungkin zat-zat yang memiliki khasiat pengobatan.

A. Maserasi

Merupakan metode maserasi yang dimodifikasi menggunakan memakai bantuan ultrasound (sinyal dengan frekuensi tinggi). Wadah yang berisi bubuk sampel ditempatkan pada wadah ultrasonic serta ultrasound. Hal ini dilakukan buat menyampaikan tekanan mekanik di sel sampai menghasilkan rongga di sampel. Kerusakan sel bisa mengakibatkan peningkatan kelarutan senyawa pada pelarut dan mempertinggi hasil ekstraksi.

Maserasi berasal dari kata "*macerace*" artinya melunakkan. Maserat adalah hasil penarikan simplisia dengan cara maserasi. Maserasi merupakan proses paling cepat dimana obat yang sudah halus memungkinkan untuk direndam dalam pelarut sampai meresap dan melunakkan susunan sel, sehingga zat-zat mudah larut. Penekanan utama pada maserasi adalah tersedianya waktu kontak yang cukup antara pelarut dan jaringan yang diekstraksi. Maserasi merupakan cara yang sederhana, maserasi dilakukan dengan cara merendam haksel simplisia dalam pelarut. Pelarut akan menembus dinding sel dan masuk kedalam rongga sel yang mengandung zat-zat aktif sehingga zat aktif akan larut, karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif didalam sel, maka larutan yang pekat akan didesak keluar. Pelarut yang digunakan dapat berupa metanol, atau pelarut lain. Keuntungan ekstraksi ini adalah cara pengerjaan atau peralatan yang digunakan sederhana dan mudah diusahakan. Pelarut merupakan salah satu faktor yang menentukan dalam proses ekstraksi, sehingga pada pemilihan pelarut untuk ekstraksi mempertimbangkan banyak faktor. Terdapat dua pertimbangan utama dalam memilih jenis pelarut, yaitu pelarut harus mempunyai daya larut yang

tinggi dan pelarut tidak berbahaya atau tidak beracun. Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi harus dapat melarutkan ekstrak yang diinginkan saja, mempunyai kelarutan yang besar, tidak menyebabkan perubahan secara kimia pada komponen ekstrak, dan titik didih kedua bahan tidak boleh terlalu dekat.

B. Ultrasound-Assisted Solvent Extraction

Merupakan metode maserasi yang dimodifikasi dengan menggunakan bantuan *ultrasound* (sinyal dengan frekuensi tinggi). Wadah yang berisi serbuk sampel ditempatkan dalam wadah *ultrasonic* dan *ultrasound*. Hal ini dilakukan untuk memberikan tekanan mekanik pada sel hingga menghasilkan rongga pada sampel. Kerusakan sel dapat menyebabkan peningkatan kelarutan senyawa dalam pelarut dan meningkatkan hasil ekstraksi.

C. Perlokasi

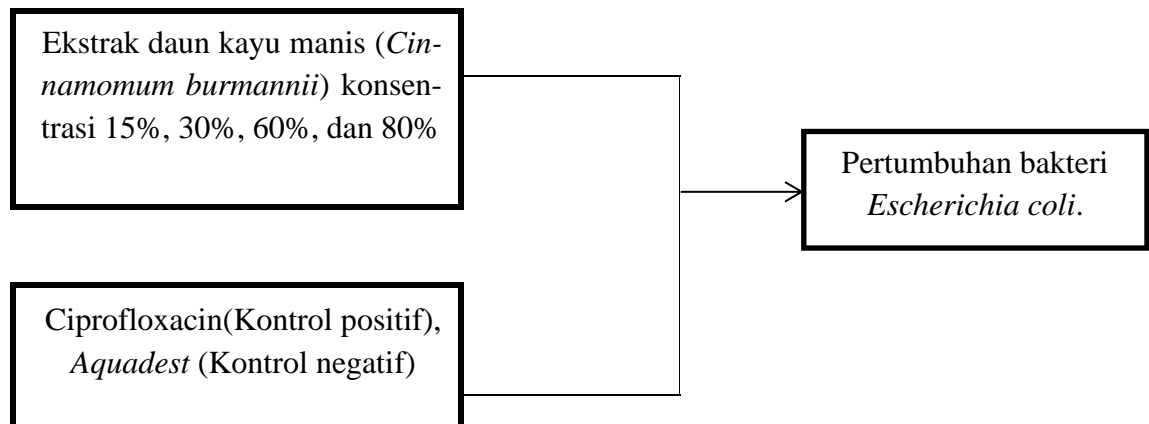
Pada metode ini, bubuk sampel dibasahi secara perlahan pada sebuah perkolator (wadah silinder yang dilengkapi dengan kran di bagian bawahnya). Pelarut dibubuhi pada bagian atas serbuk sampel serta dibiarkan menetes perlahan di bagian bawah. Kelebihan metode ini merupakan sampel senantiasa dialiri oleh pelarut baru. Sedangkan kerugiannya terdapat bila sampel dalam perlokator tidak rata maka pelarut akan sulit menjangkau seluruh area. Selain itu, metode ini akan membutuhkan banyak pelarut dan memakan banyak waktu.

D. Sokletasi

Metode ini dilakukan dengan menempatkan bubuk sampel pada sarung selulosa (bisa digunakan kertas saring) pada kelongsong yang ditempatkan di atas labu serta di bawah kondensor. Pelarut yang sesuai dimasukkan ke dalam labu dan suhu pemanas diatur di bawah suhu refluks. Keuntungan metode ini adalah proses ekstraksi yang kontinu dan sampel terekstraksi oleh pelarut murni hasil kondensasi sehingga tidak membutuhkan banyak pelarut dan tidak memakan waktu banyak. Kerugiannya merupakan senyawa yang bersifat termolabil bisa terdegradasi

karena ekstrak yang diperoleh terus menerus berada di titik didih.
(Mukhriani *et al.*, 2014) (Munawaroh S *et al.*, 2010)

2.6. Kerangka Konsep Penelitian



2.7. Kerangka Teori

