

**EFEK EKSTRAK DAUN DEWANDARU (*Eugenia uniflora*) SEBAGAI
PENGHAMBAT PEMBENTUKAN BIOFILM PADA *Staphylococcus aureus*
IN VITRO**

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran Umum**



**Oleh :
Ester Hans Sunanto
NIM. 0910714071**

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2012**



HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

EFEK EKSTRAK DAUN DEWANDARU (*Eugenia uniflora*) SEBAGAI
PENGHAMBAT PEMBENTUKAN BIOFILM PADA *Staphylococcus aureus* IN VITRO

Oleh :

ESTER HANS SUNANTO

NIM : 0910714071

Telah diuji pada

Hari : Rabu

Tanggal : 21 November 2012

dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji I

dr. Danik Agustin P, M.Kes
NIP. 19720822 199802 2 002

Penguji II

Prof. Dr. dr. Sanarto Santoso, DTMH, Sp.MK (K)
NIP. 19481220 198002 1 002

Penguji III

Dr. dr. Retty Ratnawati, M.Sc
NIP. 19550201 198503 2 001

Kepala Jurusan Kedokteran

Prof..Dr.dr. Teguh Wahyu Sardjono DTM& H, MSc, SpPark
NIP.19520410 198002 1 001



KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Tuhan Yesus Kristus yang telah memberi hikmat dan menyertai sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir dengan judul “Efek Ekstrak Daun Dewandaru (*Eugenia uniflora*) Sebagai Penghambat Pembentukan Biofilm Pada *Staphylococcus aureus In Vitro*”. Tugas Akhir ini diajukan untuk memenuhi salah satu syarat dalam menyelesaikan Program Sarjana (S-1) Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

Proses penulisan Tugas Akhir ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu dengan segala kerendahan hati, ucapan terima kasih yang tak terhingga wajib saya berikan kepada:

1. Dr. dr. Karyono Mitaroem, Sp.PA, dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah memberi saya kesempatan menuntut ilmu di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
2. Prof. Dr. dr. Sanarto Santoso, DTM&H, Sp. MK sebagai pembimbing pertama yang telah memberikan bimbingan, saran, dan masukan mulai dari pencetusan ide, pembuatan proposal, pelaksanaan penelitian, hingga penyusunan Tugas Akhir ini selesai.
3. Dr. dr. Retty Ratnawati, M.Sc sebagai pembimbing kedua yang telah memberikan bimbingan, saran, dan masukan, sehingga saya dapat menyelesaikan Tugas Akhir ini.
4. dr. Danik Agustin P, M.Kes yang bersedia menjadi ketua tim penguji Tugas Akhir serta memberikan masukan untuk Tugas Akhir saya.

5. Kedua orang tua saya serta keluarga yang selalu memberikan semangat dan dukungan baik moral maupun material dalam proses penyelesaian Tugas Akhir ini.
6. Teman seperjuangan dalam segala urusan mengenai biofilm ini selama beberapa bulan terakhir, Chatryn Megawati dan Christian Setiawan. Terimakasih untuk setiap masukan dan pertimbangan. Tanpa kalian tidak mungkin saya dapat menyelesaikan secepat ini.
7. Para personil laboratorium Mikrobiologi FKUB, Mas Slamet, Mbak Uci, Mas Hendri, Bu Yatik yang telah membantu dalam proses penelitian dan administrasi.
8. Segenap anggota Tim Pengelola Tugas Akhir FKUB.
9. Semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan Tugas Akhir ini yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa penulisan ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis tetap membuka diri untuk kritik dan saran yang membangun. Akhir kata penulis mengucapkan banyak terima kasih, semoga Tugas Akhir ini bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang, 21 November 2012

Penulis

ABSTRAK

Sunanto, Ester Hans. 2012. *Efek Ekstrak Daun Dewandaru (Eugenia uniflora) sebagai Penghambat Pembentukan Biofilm pada Staphylococcus aureus in vitro*. Tugas Akhir, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing : (1) Prof. Dr. dr. Sanarto Santoso, DTM&H, Sp.MK (2) Dr. dr. Retty Ratnawati, M.Sc

Biofilm bakteri *Staphylococcus aureus* saat ini telah berkembang menjadi masalah kesehatan yang serius. Beberapa strain tertentu bakteri ini mampu membentuk biofilm pada alat-alat medis seperti kateter urine, *central venous catheters* (CVC), sendi prostetik, *prosthetic heart valve*, *pacemaker*, dan *endotracheal tube*. Pembentukan biofilm akan menyebabkan resistensi antibiotika dan resistensi terhadap sistem pertahanan imun, hal ini akan memacu penyebaran infeksi ke bagian tubuh lainnya. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian untuk mencari senyawa yang dapat menghambat pembentukan biofilm. Beberapa penelitian terdahulu menyebutkan bahwa bahan aktif flavonoid, tannin, dan saponin dapat menghambat perlekatan bakteri dengan menginaktivasi adhesin dan merusak substrat. Pemberian ekstrak daun dewandaru yang mengandung tannin, flavonoid dan saponin diharapkan dapat menghambat pembentukan biofilm pada bakteri *Staphylococcus aureus*. Penelitian menggunakan studi *post-test only group design* pada bakteri *Staphylococcus aureus* pembentuk biofilm yang dibagi dalam 2 kelompok. Kelompok kontrol positif tidak diberi ekstrak daun dewandaru, sedangkan kelompok perlakuan diberi ekstrak dengan 3,33 g/dL, 1,67 g/dL, 0,83 g/dL, 0,42 g/dL dan 0,21 g/dL, 0,11 g/dL, 0,06 g/dL, 0,03 g/dL dan kemudian dilakukan pengulangan sampai 4 kali. Biofilm kemudian dilakukan pengukuran *Optical Density* dengan menggunakan *ELISA reader* secara spektrofotometris. Analisis data menggunakan metode *One way Anova* dilanjutkan uji *Post Hoc Tukey HSD* dan uji regresi linier. Hasil uji *Anova* menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun dewandaru berpengaruh terhadap penghambatan pembentukan biofilm secara signifikan ($p < 0,05$). Uji regresi linier juga menunjukkan adanya hubungan yang cukup kuat antara pemberian ekstrak daun dewandaru dengan penghambatan pembentukan biofilm (*standart coefficient beta* -0,603). *Standart coefficient beta* yang negative juga menunjukkan kemampuan ekstrak untuk menghambat pembentukan biofilm. Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun dewandaru (*Eugenia uniflora*) menghambat pembentukan biofilm pada bakteri *Staphylococcus aureus* dengan *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC) sebesar 0,015 g/dL dan konsentrasi maksimum 1,67 g/dL.

Kata kunci: daun dewandaru (*Eugenia uniflora*), biofilm, *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

Sunanto, Ester Hans. 2012. *The Effect of Surinam Cherry (Eugenia uniflora) on the Inhibition of Staphylococcus aureus Biofilm Formation in vitro*. Final thesis, Faculty of Medicine Brawijaya. University . Supervisors : (1) Prof. Dr. dr. Sanarto Santoso, DTM&H, Sp.MK (2) Dr. dr. Retty Ratnawati, M.Sc

Staphylococcus aureus biofilm, nowadays, has grown into a serious health problem. Some specific strains of bacteria are able to form biofilm on medical devices such as urinary catheters, central venous catheters (CVC), prosthetic joints, prosthetic heart valve, pacemaker, and the endotracheal tube. Biofilm formation causes antibiotic and immune system resistance which contributes to the spread of infection to other body parts. Based on this evidence, there is an urgent need to find compounds which are able to inhibit the formation of biofilm. Several previous studies have shown that the active ingredients flavonoids, tannins and saponins may inhibit the attachment of bacteria which in turn will inactivate adhesin and impair the substrate. Extract of Surinam Cherry leaf which contains tannins, flavonoids and saponins are expected to inhibit biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. This study was conducted to prove the effect of Surinam Cherry leaves extract as *S. aureus* biofilm formation inhibitor. The research design was true experimental post-test only group. There were two groups involved in this study. Positive control group was given no extract, while the trial group was given the extract with concentration of 3.33 g / dL, 1.67 g / dL, 0.83 g / dL, 0.42 g / dL and 0.21 g / dL, 0.11 g / dL, 0.06 g / dL, and 0.03 g / dL. The procedures have to be repeated 4 times. The Optical Density of the biofilm formed was then measured with spectrophotometry method using ELISA reader. This study used One Way ANOVA followed by *Post Hoc Tukey HSD* and Linear Regression for statistical analytic tests. Anova test results showed that there is a significant difference on biofilm formation among different concentrations of leaf extracts ($p < 0.05$). Linear regression test also showed a fairly strong relationship between leaf extract and inhibition of biofilm formation (standard beta coefficient -0.603). Negative standard beta coefficient shows the ability of the extracts to inhibit biofilm formation. With all the results in this study, it can be concluded that Surinam Cherry leaf extract (*Eugenia uniflora*) inhibits biofilm formation of *Staphylococcus aureus* with Minimum Biofilm Inhibitory Concentration (MBIC) of 0.015 g / dL and a maximum concentration of 1.67 g / dL.

Keywords: Surinam Cherry (*Eugenia uniflora*), biofilm, *Staphylococcus aureus*.

DAFTAR ISI

Judul	i
Halaman Pengesahan	ii
Kata Pengantar	iii
Abstrak	v
Daftar Isi	vii
Daftar Gambar	x
Daftar Tabel	xi
Daftar Lampiran	xii
BAB 1 Pendahuluan	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	2
1.3.1 Tujuan Umum	3
1.3.2 Tujuan Khusus	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2 Tinjauan Pustaka	5
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	5
2.1.1 Klasifikasi	5
2.1.2 Karakteristik Kuman	6
2.1.2.1 Ciri Khas Organisme	6
2.1.2.2 Biakan	7
2.1.2.3 Sifat-sifat Pertumbuhan	7
2.1.3 Struktur Antigen	7
2.1.4 Enzim dan Toksin	8
2.1.5 Patogenesis	11
2.1.6 Patologi	11
2.1.7 Uji Laboratorium Diagnosis	12
2.1.7.1 Spesimen	12
2.1.7.2 Biakan	13
2.1.7.3 Uji Katalase	13
2.1.7.4 Uji Koagulase	13
2.1.7.5 Uji Latex Agglutinase	14
2.1.8 Epidemiologi dan Pengendalian	14
2.2 Biofilm	15

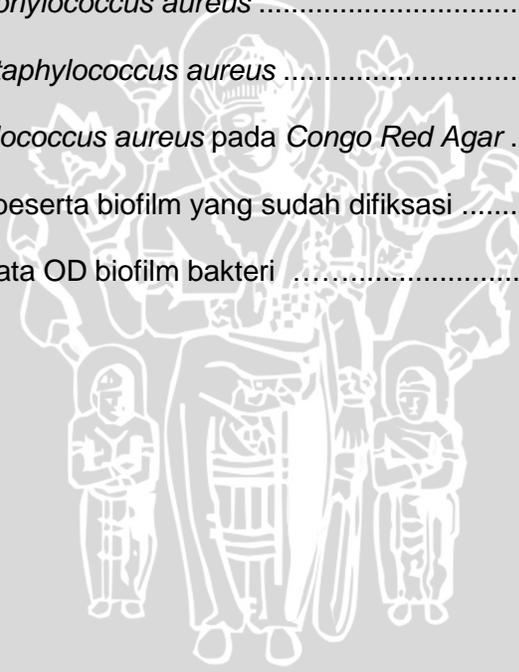
2.2.1 Definisi Biofilm	16
2.2.2 Struktur Biofilm	16
2.2.3 Pembentukan Biofilm	18
2.2.4 Faktor Lingkungan yang Mempengaruhi Pembentukan Biofilm	20
2.2.5 Pembentukan Biofilm pada Alat Medis	21
2.2.6 Tes Pembentukan Biofilm	21
2.2.6.1 Metode Tabung	21
2.2.6.2 Metode Congo Red Agar	22
2.2.6.3 Metode Microtiter Plate-Test	22
2.3 Tanaman Dewandaru	23
2.3.1 Klasifikasi	23
2.3.2 Morfologi dan Ekologi	23
2.3.3 Kandungan Tanaman Dewandaru	24
2.3.3.1 Kandungan Nutrisi	24
2.3.3.2 Kandungan Non-Nutrisi	25
2.3.4 Manfaat dalam Kehidupan Sehari-hari	26
BAB 3 Kerangka Penelitian	28
3.1 Kerangka Konsep Penelitian	28
3.2 Hipotesis Penelitian	30
BAB 4 Metode Penelitian	31
4.1 Rancangan dan Desain Penelitian	31
4.2 Populasi dan Sampel Penelitian	31
4.2.1 Pengulangan	32
4.3 Tempat dan Waktu Penelitian	32
4.4 Variabel Penelitian	32
4.4.1 Variabel Bebas	32
4.4.2 Variabel Tergantung	33
4.5 Definisi Operasional	33
4.6 Instrumen Penelitian	34
4.6.1 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Dewandaru	34
4.6.2 Alat dan Bahan Identifikasi Bakteri Pembenihan Murni	35
4.6.3 Alat dan Bahan Deteksi Biofilm	35
4.7 Prosedur Penelitian	36
4.7.1 Persiapan Daun Dewandaru	36
4.7.1.1 Ekstraksi dan Evaporasi	36
4.7.2 Persiapan Biofilm <i>Staphylococcus aureus</i>	38
4.7.2.1 Identifikasi <i>Staphylococcus aureus</i>	38
4.7.2.2 Pembentukan Perbenihan Cair Bakteri	41

4.7.2.3 Uji Deteksi Pembentukan Biofilm	42
4.7.2.3.1 Congo Red Agar Method	42
4.7.3 Uji Hambatan Pembentukan Biofilm	42
4.8 Analisa Data	43
4.9 Skema Penelitian	44
BAB 5 Hasil Penelitian dan Analisis Data	45
5.1 Hasil Penelitian	45
5.1.1 Hasil Identifikasi Bakteri	45
5.1.2 Hasil Uji Pembentukan Biofilm	46
5.1.3 Hasil Uji Hambat Biofilm	47
5.2 Analisa Data	48
5.2.1 Uji <i>One Way Anova</i>	48
5.2.2 <i>Post Hoc Comparison Test</i>	49
5.2.3 Uji Regresi Linier Sederhana	50
BAB 6 Pembahasan	51
BAB 7 Penutup	57
7.1 Kesimpulan	57
7.2 Saran	57
Daftar Pustaka	59
Lampiran	64
Pernyataan Keaslian Tulisan	71



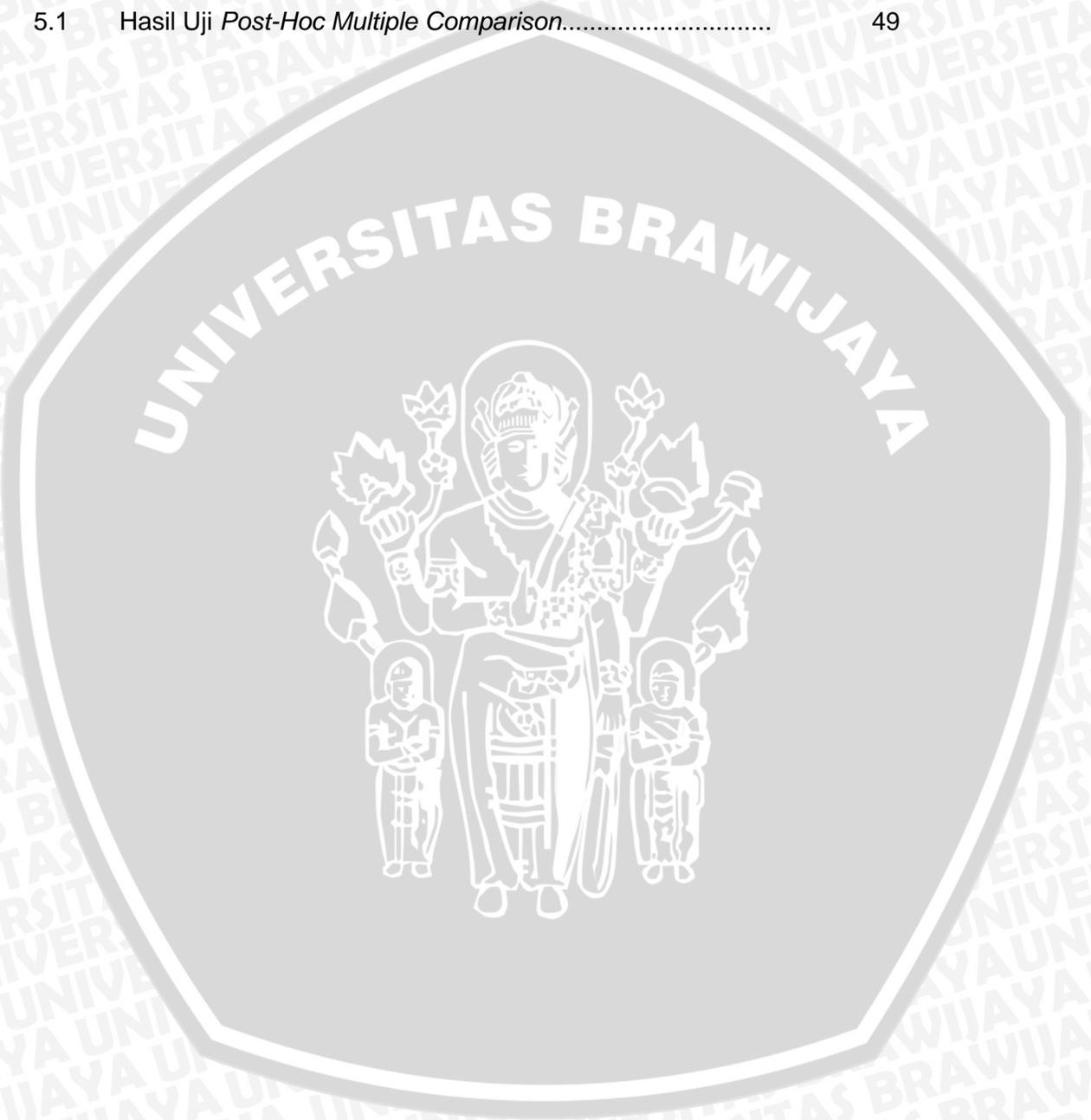
DAFTAR GAMBAR

2.1	<i>Staphylococcus aureus</i> pewarnaan gram	6
2.2	Proses Pembentukan Biofilm Secara Mikroskopis	17
2.3	<i>Biofilm Development Cycle</i>	20
2.4	Tanaman Dewandaru	24
5.1	<i>Staphylococcus aureus</i> pengecatan gram	46
5.2	Uji Katalase <i>Staphylococcus aureus</i>	46
5.3	Uji Koagulase <i>Staphylococcus aureus</i>	46
5.4	Inkubasi <i>Staphylococcus aureus</i> pada <i>Congo Red Agar</i>	47
5.5	<i>Microtitter plate</i> beserta biofilm yang sudah difiksasi	47
5.6	Grafik nilai rata-rata OD biofilm bakteri	48



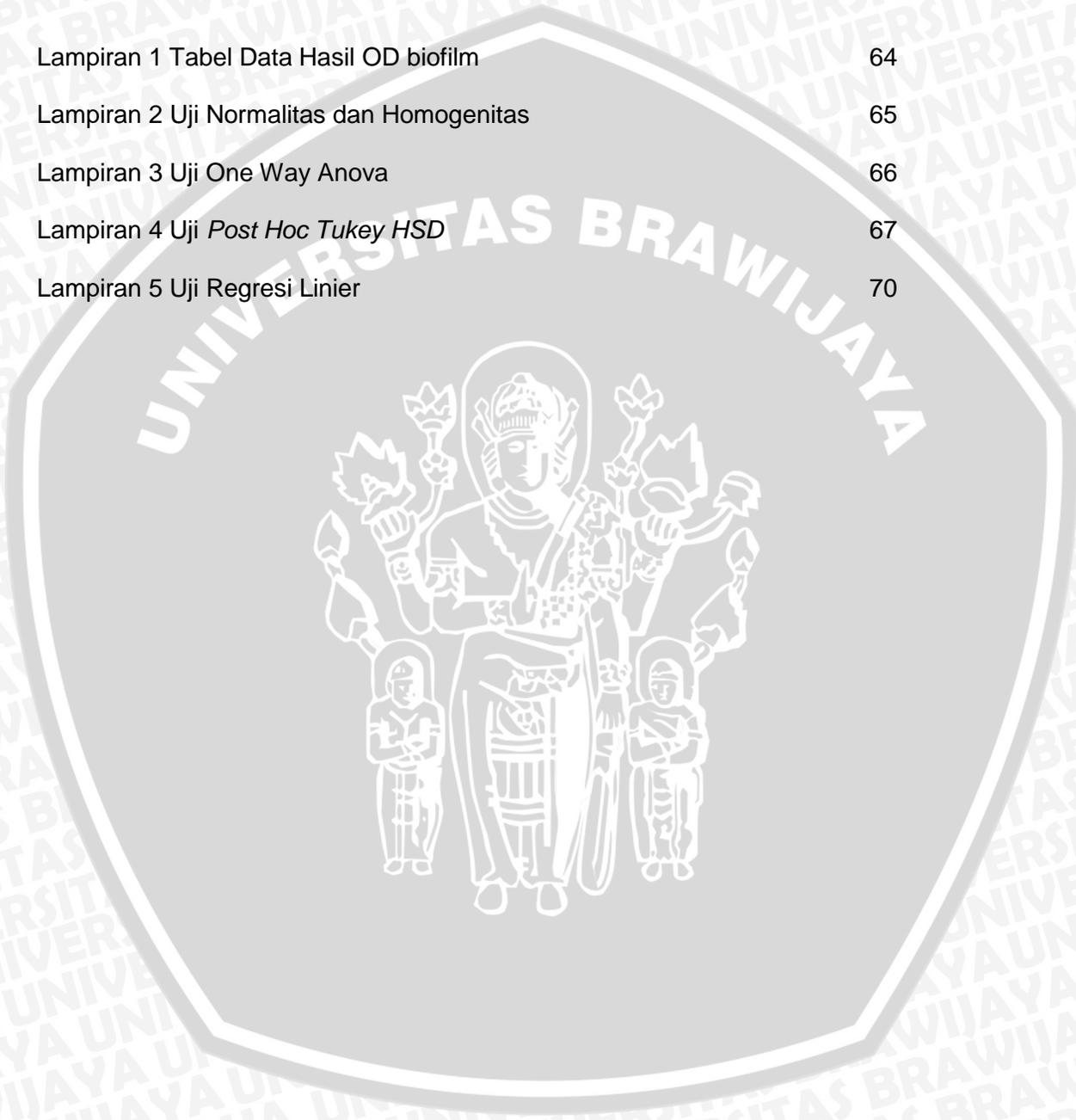
DAFTAR TABEL

5.1 Hasil Uji *Post-Hoc Multiple Comparison*..... 49



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Tabel Data Hasil OD biofilm	64
Lampiran 2 Uji Normalitas dan Homogenitas	65
Lampiran 3 Uji One Way Anova	66
Lampiran 4 Uji <i>Post Hoc Tukey HSD</i>	67
Lampiran 5 Uji Regresi Linier	70



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Infeksi *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) saat ini telah berkembang menjadi masalah kesehatan yang serius pada neonatus, bayi, anak, dan dewasa. Sejak ditemukan epidemi pertamanya di Amerika Serikat pada 1968, *S. aureus* menjadi masalah utama infeksi nosokomial hingga sekarang. Menurut data WHO, *case fatality rate* infeksi *S. aureus* saat ini mencapai 30 %. Dalam beberapa dekade terakhir, insiden infeksi *S. aureus* terus meningkat di berbagai belahan dunia.

Peningkatan infeksi bakteri *S.aureus* saat ini telah berkembang dengan pesat dan menjadi masalah kesehatan yang serius. *S.aureus* merupakan penyebab tersering pada endokarditis dengan komplikasi seperti perikarditis, infeksi saluran pernafasan, *osteomyelitis* dan *septic arthritis*. Infeksi yang invasif juga dapat terjadi di kulit pada orang-orang yang sehat, mulai dari impetigo sampai pembentukan abses, selulitis dan limfadenitis (Todar, 2008; WHO,2010).

Staphylococcus aureus merupakan flora normal yang terdapat paling banyak di lubang hidung, kulit dan saluran cerna. Pada keadaan dimana terdapat lesi pada kulit yang memungkinkan *S. aureus* untuk masuk, bakteri ini dapat menimbulkan infeksi, atau ketika *S.aureus* mengeluarkan enterotoxin di dalam saluran cerna yang juga menyebabkan terjadinya infeksi. Selain dari dalam tubuh, penyebaran infeksi dari *S.aureus* ini dapat ditularkan melalui udara, kontak langsung atau permukaan yang terkontaminasi.

Staphylococcus aureus menjadi penyebab tersering infeksi pada penggunaan alat-alat medis seperti pada *prosthetic heart valves*, *central venous catheters*, *urinary catheters*, lensa kontak, IUD dan implan gigi (Donlan, 2002). Infeksi ini disebabkan karena adanya kemampuan dari *S.aureus* untuk membuat biofilm, dimana bakteri mengeluarkan *extracellular polymer fibrils* yang sangat kuat dan melindungi permukaan bakteri. Dengan adanya bentukan tersebut, maka bakteri menjadi lebih kuat dan tahan terhadap serangan antibiotika dan dari lingkungan.

Mekanisme yang bertanggung jawab terhadap pertahanan bakteri ini dapat mencakup satu atau lebih alasan yaitu keterlambatan penetrasi dari agen antimikroba melalui matrix biofilm, dan perubahan kecepatan pertumbuhan dari organisme biofilm dan perubahan fisiologikal karena pertumbuhan biofilm (Donlan, 2002).

Biofilm dari mikrobial, yang biasanya dibentuk oleh organisme yang resisten terhadap antimikrobia, bertanggung jawab atas 65% kasus infeksi di negara berkembang (Costerton *et al*,1999).

Melihat dari sulitnya penanganan dan perkembangan yang pesat dari bakteri pembentuk biofilm, saat ini banyak penelitian yang memfokuskan pada pencarian bahan-bahan anti pembentukan biofilm. Senyawa polyphenol diyakini mampu menghambat pembentukan biofilm. Bahan ini dapat kita temukan pada ekstrak daun dewandaru (*Eugenia uniflora*). Selain polyphenol, daun dewandaru juga mengandung saponin yang ikut membantu penghambatan pembentukan biofilm.

Tanaman *Eugenia uniflora* tersebar luas di negara-negara Amerika Selatan terutama di Brasil, Argentina, Uruguay, dan Paraguay (Consolini and Sarubbio,

2002). Tanaman ini menyebar di Indonesia hingga di daerah Sumatera dan Jawa (Hutapea, 1994). Daun *Eugenia uniflora* di Paraguay digunakan untuk menurunkan kolesterol dan tekanan darah, selain itu juga dapat menurunkan metabolisme lipid dan dapat digunakan sebagai efek proteksi pada trigliserida dan level lipoprotein yang sangat rendah (Ferro *et al.*, 1988). Daun *Eugenia uniflora* sebagai obat tradisional berkhasiat sebagai obat mencret (Hutapea, 1994). Aksi anti infamasi yang tinggi juga ditemukan pada daun *Eugenia uniflora* (Scapoval *et al.*, 1994). Pada *Brazilian folk medicine*, buah *Eugenia uniflora* digunakan sebagai antidiare, diuretic, antirematik, anti-febrile, dan antidiabetik (Matsumura *et al.*, 2000).

Maka untuk membuktikan fakta di atas, maka diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai manfaat daun dewandaru (*Eugenia uniflora*) sebagai penghambat pembentukan biofilm pada bakteri *Staphylococcus aureus*.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah ekstrak daun dewandaru (*Eugenia uniflora*) dapat menghambat pertumbuhan biofilm pada bakteri *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui efek dari ekstrak daun dewandaru sebagai penghambat pembentukan biofilm pada bakteri *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*.

1.3.2 Tujuan Khusus

1.3.2.1 untuk mengetahui efek dari masing-masing dosis ekstrak daun dewandaru sebagai penghambat pertumbuhan biofilm pada bakteri *Staphylococcus aureus*.

1.3.2.2 untuk mengetahui *Minimal Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC) dari ekstrak daun dewandaru pada *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 dapat dijadikan sebagai dasar teori untuk menambah ilmu pengetahuan dalam bidang kesehatan tentang kegunaan ekstrak daun dewandaru terhadap pembentukan biofilm oleh bakteri *Staphylococcus aureus*.

1.4.2 dapat menambah ilmu yang dapat digunakan lebih lanjut untuk pengembangan penelitian lebih lanjut mengenai anti biofilm pada bakteri *Staphylococcus aureus*.

1.4.3 dapat dijadikan sebagai dasar teori untuk meningkatkan pengetahuan masyarakat dalam pemanfaatan tanaman obat tradisional khususnya daun dewandaru.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Staphylococcus aureus*

2.1.1 Klasifikasi

Staphylococcus merupakan bakteri kokus gram positif, biasanya tersusun dalam kelompok seperti anggur yang tidak teratur (Jawetz *et al.*,2007). Meskipun ada lebih dari dua puluh spesies *Staphylococcus* yang dijelaskan oleh Bergey's Manual (2001), hanya *S.aureus* dan *S.epidermidis* yang memiliki hubungan signifikan interaksinya dengan manusia. *Staphylococcus aureus* biasanya banyak terdapat di jalan masuk hidung, tetapi biasanya juga banyak terdapat pada organ yang lain, termasuk kulit, mulut dan saluran pencernaan (Jawetz *et al.*,2007).

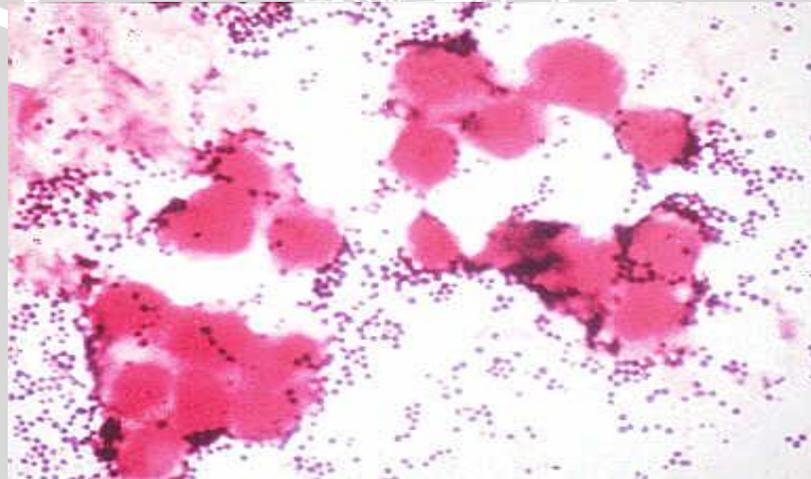
Taksonomi dari *S. aureus* adalah sebagai berikut.

Domain	: <u><i>Bacteria</i></u>
Phylum	: <u><i>Firmicutes</i></u>
Kelas	: <u><i>Bacilli</i></u>
Ordo	: <u><i>Bacillales</i></u>
Family	: <u><i>Staphylococcaceae</i></u>
Genus	: <u><i>Staphylococcus</i></u>
Species	: <i>Staphylococcus aureus</i> (Domrachev <i>et al.</i> , 2008)

2.1.2 Karakteristik Kuman

2.1.2.1 Ciri Khas Organisme

Staphylococcus aureus sferis, bakteri gram positif yang berbentuk kokus dengan diameter sekitar 0,5 – 1 μ m yang pada pemeriksaan mikroskopis tampak seperti berpasangan, rantai pendek dan seperti buah anggur. Kokus yang muda memberikan pewarnaan gram positif yang kuat, akibat penuaan, banyak sel menjadi gram negatif. *Staphylococcus* tidak motil dan tidak membentuk spora. Bila dipengaruhi obat-obat seperti penisilin, *staphylococcus* lisis (Jawetz *et al.*,2007).



Gambar 2.1 *Staphylococcus aureus* pewarnaan Gram (Todar, 2008)

Kuman yang berasal dari perbenihan cair bisa terlihat bentukan kuman yang lepas sendiri-sendiri, berpasangan atau rantai pendek yang pada umumnya terdiri lebih dari empat sel. Dengan pewarnaan, gram bersifat gram positif. Namun dalam keadaan tertentu pula dapat bersifat gram negatif, misalnya :

- Organisme yang berasal dari bagian tengah koloni

- Organisme yang mengalami fagositosis oleh sel
- Organisme yang berasal dari perbenihan yang sudah tua (Dzen *et.al*, 2003)

2.1.2.2 Biakan

Staphylococcus mudah berkembang pada lingkungan aerobik. Organisme ini paling cepat berkembang pada suhu 37°C tetapi suhu terbaik untuk menghasilkan pigmen adalah suhu ruangan (20-25 °C). Pada umumnya untuk membiakkan *S.aureus* perlu medium yang mengandung asam amino dan vitamin-vitamin, misalnya : thereonin, asam nikotinat dan biotin (Dzen *et.al*, 2003). Koloni pada medium padat berbentuk bulat, halus, meninggi, dan berkilau. *S.aureus* biasanya membentuk koloni berwarna abu-abu hingga kuning tua kecoklatan (Brooks *et al*, 2007).

2.1.2.3 Sifat-sifat Pertumbuhan

Staphylococcus memproduksi katalase, yang membedakannya dengan streptococcus. *Staphylococcus* memfermentasikan banyak kabohidrat secara lambat, menghasilkan asam laktat tetapi tidak menghasilkan gas. Aktivitas proteolitik pada masing-masing strain sangat bervariasi. *Staphylococcus* relatif resisten terhadap pengeringan, panas (tahan pada suhu 50°C selama 30 menit) serta terhadap natrium klorida 9% tetapi mudah dihambat oleh bahan kimia tertentu, seperti heksaklorofen 3% (Brooks *et al.*, 2007).

2.1.3 Struktur Antigen

Staphylococcus aureus mengandung polisakarida dan protein yang bersifat antigenik yang merupakan substansi penting di dalam stuktur dinding sel. Peptidoglikan, suatu polimer polisakarida yang mengandung subunit-subunit yang

terangkai, merupakan eksoskeleton yang kaku pada dinding sel. Asam teikoat, yang merupakan polimer gliserol atau ribitol fosfat, berikatan dengan peptidoglikan dan menjadi bersifat antigenik (Jawetz *et al.*, 2007).

Penentu serologis dari polisakarida ini adalah N-acetylglucosamine. Pada dinding sel, asam teikoat berikatan dengan peptidoglikan pada bagian yang tidak larut dan membutuhkan enzim pelisis untuk melepaskannya (Joklik *et al.*, 1992).

Protein A adalah komponen dinding sel pada banyak strain *S.aureus* yang berikatan dengan bagian Fc dari molekul IgG kecuali IgG3. Bagian Fab dari IgG yang terikat dengan protein A bebas berikatan dengan antigen spesifik (Jawetz *et al.*, 2007). Protein A ini mempunyai berat molekul sekitar 13.000 Da berikatan dengan peptidoglikan secara kovalen (Dzen, 2003). Protein A ini dikeluarkan ke dalam medium selama pertumbuhan sel. Protein A ini memicu terjadinya berbagai efek biologis. Protein ini bersifat kemotaksis, antikomplementer, antifagosit, dan memicu reaksi hipersensitifitas (Joklik *et al.*, 1992).

Beberapa strain *S.aureus* memiliki kapsul, yang menghambat fagositosis oleh leukosit polimorfonuklear kecuali terdapat antibiotik spesifik. Sebagian besar strain *S.aureus* mempunyai koagulase pada permukaan dinding sel (Brooks *et al.*, 2007).

2.1.4 Enzim dan Toksin

Staphylococcus dapat menyebabkan penyakit baik melalui kemampuannya untuk berkembang biak dan menyebar luas di jaringan serta dengan cara menghasikan berbagai substansi ekstraseluler. Beberapa substansi tersebut adalah

enzim, lainnya dianggap seperti toxin, tetapi dapat berfungsi seperti enzim (Brooks *et.al*, 2007).

a. Katalase

Katalase mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen. Uji katalase membedakan *staphylococcus*, yang positif, dengan *streptococcus* yang negatif (Brooks *et.al*, 2007).

b. Koagulase

Koagulase adalah suatu protein mirip enzim yang dapat menggumpalkan plasma yang mengandung oksalat atau sitrat. Koagulase berikatan dengan protrombin dan keduanya menjadi aktif secara enzimatik dan menginisiasi polimerasi fibrin. Koagulase dapat menyimpan fibrin pada permukaan *staphylococcus*, mungkin merubah ingestinya oleh sel fagositik atau destruksi *staphylococcus* dalam sel-sel tersebut (Brooks *et al*, 2007).

c. Hialuronidase

Hialuronidase menjadikan bakteri bersifat invasif, tapi sifat ini terjadi pada fase awal dari infeksi dan cepat dinetralkan pada reaksi peradangan (Dzen, 2003).

d. Staphylokinase

Enzim ini bekerja sebagai aktivator enzim protease dalam plasma untuk menghasilkan *lytic agent*. Enzim ini bersifat antigenik dan tidak tahan panas (Dzen, 2003).

e. Protease

Enzim ini bersifat proteolitik dan dapat menyebabkan nekrosis pada jaringan yang diinvasi, termasuk jaringan tulang (Dzen, 2003).

f. Lipase

Enzim ini bersifat antigenik. Pada inokulasi *staphylococcus* koagulase positif galur tertentu pada BAP darah manusia, terlihat pada permukaan koloni terdapat bercak-bercak lemak yang tersusun dari asam oktadekanoat. Ini terjadi karena lipase memutuskan ikatan asam ini dengan lipid (Dzen, 2003).

g. Fosfatase

Fosfatase erat hubungannya dengan patogenitas dan galur koagulase positif biasanya mengandung lebih banyak fosfatase daripada galur negatif, namun hal ini dapat berlaku juga sebaliknya. Oleh karena itu, apabila fosfatase digunakan sebagai indikator patogenitas, nilainya kurang (Dzen, 2003).

h. DNAase

DNAase memecah DNA menjadi fosfomononukleatida dan merupakan suatu protein yang kompak yang terdiri dari rantai polipeptida tunggal dan terdapat pada permukaan sel (Dzen, 2003).

i. Eksotoksin

Alpha toxin (hemolisin) adalah protein heterogen yang dapat melisiskan eritrosit, merusak trombosit, pembuluh darah, dan mungkin identik dengan faktor letal dan faktor dermonekrotik eksotoksin. *Beta toxin* merusak

spingomyelin dan bersifat racun untuk berbagi jenis sel, termasuk sel darah merah manusia. *Delta toxin* bersifat non toxin dan dapat merusak eritrosit manusia dan kuda (Brooks *et al.*, 2007).

j. Enterotoksin

Enterotoksin dihasilkan ketika *S.aureus* tumbuh pada makanan yang mengandung karbohidrat dan protein. Manusia dan kera yang memakan 25 µg enterotoksin akan mengalami muntah dan diare. Efek muntah ini mungkin akibat perangsangan sistem saraf pusat (pusat muntah) setelah toksin bekerja pada reseptor-reseptor dalam usus (Brooks *et al.*, 2007).

2.1.5 Patogenesis

Kemampuan patogenik *S.aureus* tertentu merupakan gabungan efek faktor ekstraselular dan toksin serta sifat invasif strain tersebut. *Staphylococcus aureus* yang patogen dan invasif menghasilkan koagulase dan cenderung menghasilkan pigmen kuning dan bersifat hemolitik. *Staphylococcus aureus* yang patogen juga dilengkapi dengan toksin untuk dapat bertahan pada jaringan host. Lesi dan kelenjar lemak oleh enzim lipase, esterase, koagulase, alpha toxin dan leukosidin yang melawan reaksi host dan fagositosis. Bahkan setelah fagositosis, destruksi intraseluler yang difasilitasi oleh komplemen berlangsung tidak sempurna. Resistensi ini dapat menyebabkan infeksi yang kronis (Brooks *et al.*, 2007).

2.1.6 Patologi

Ciri khas lesi *S.aureus* adalah furunkel atau abses setempat lainnya. Koloni *S. aureus* yang berada dalam folikel rambut dapat menimbulkan nekrosis jaringan

(faktor dermonekrotik). Enzim koagulase dihasilkan dan mengkoagulasi fibrin di sekitar lesi dan di dalam saluran getah bening, mengakibatkan pembentukan dinding yang membatasi proses peradangan. Dinding ini diperkuat oleh penumpukan sel radang dan akhirnya terjadi fibrosis jaringan. Di tengah-tengah lesi, terjadi pencairan jaringan nekrotik (dibantu hipersensitivitas tipe lambat) dan abses mengarah pada daerah yang daya tahannya paling kecil. Setelah cairan di tengah cairan nekrotik keluar, rongga secara pelan-pelan diisi dengan jaringan granulasi dan akhirnya diikuti oleh proses penyembuhan (Gemmel *et al.*, 2006).

Penanahan lokal (abses) adalah sifat khas infeksi *S.aureus*. Dari setiap fokus, organisme menyebar melalui saluran getah bening dan aliran darah ke bagian tubuh lainnya. Penanahan vena yang disertai trombosis, merupakan gambaran umum penyebaran tersebut. *S.aureus* dapat menyebabkan pneumonia, meningitis, empiema, endokarditis atau sepsis dengan abses dengan supurasi di berbagai organ. *Staphylococcus* dengan daya invasif rendah dapat menyebabkan berbagai infeksi kulit, misalnya akne, pioderma atau impetigo. Kokus anaerob berperan dalam menimbulkan infeksi anaerobik campur (Jawetz *et al.*, 2007).

2.1.7 Uji Laboratorium Diagnostik

2.1.7.1 Spesimen

Usapan permukaan, pus, darah, aspirat trakea, cairan spinal untuk biakan, tergantung pada lokalisasi proses (Brooks *et al.*, 2007).

2.1.7.2 Biakan

Pada umumnya, *staphylococcus* dapat tumbuh pada medium-medium yang biasa dipakai di laboratorium bakteriologi seperti *Nutrient Agar Plate* (NAP) dan *Blood Agar Plate* (BAP) (Dzen, 2003). Spesimen yang ditanam di cawan agar darah membentuk koloni yang khas dalam 18 jam pada suhu 37°C, tetapi tidak menghasilkan pigmen dan hemolisis sampai beberapa hari kemudian dan dengan suhu ruangan yang optimal. Spesimen yang terkontaminasi dengan flora campuran dapat dibiakan di medium yang mengandung NaCl 7,5%; garam menghambat pertumbuhan sebagian besar flora normal tetapi tidak menghambat *S.aureus*. Agar garam manitol digunakan untuk memindai *S.aureus* yang berasal dari hidung (Brooks *et al.*, 2007).

2.1.7.3 Uji Katalase

Setetes larutan hidrogen peroksida diletakkan di gelas obyek, dan sedikit pertumbuhan bakteri yang diletakkan di dalam larutan tersebut. Terbentuknya gelembung (pelepasan oksigen) menandakan uji yang positif. Uji ini juga dapat dilakukan dengan menuangkan larutan hidrogen peroksida di atas bakteri yang tumbuh subur di agar miring dan meneliti gelembung yang muncul (Brooks *et al.*, 2007).

2.1.7.4 Uji Koagulase

Plasma kelinci atau manusia yang telah diberi sitrat dan diencerkan 1:5 dicampur dengan biakan bakteri dalam medium yang sama banyaknya dan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C. Sebagai kontrol, dalam satu tabung lainnya dicampurkan plasma dan medium steril, kemudian diinkubasi. Jika terjadi

pembekuan dalam waktu 1-4 jam, menandakan tes itu positif. Kepentingan dari tes ini adalah untuk membedakan antara *staphylococcus* koagulase positif (*Staphylococcus aureus*) dan *staphylococcus* koagulase negatif. Semua *staphylococcus* yang bersifat koagulase positif dianggap patogen bagi manusia (Jawetz *et al.*, 1996).

2.1.7.5 Uji Latex Agglutinase

Uji Latex Agglutinase digunakan untuk mengetahui bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*. Langkah yang dilakukan pertama kali ada ambil sedikit biakan bakteri dengan ose kemudian tempelkan pada *slide* yang disediakan. Kemudian beri satu tetes reagen yang berisi partikel latex kuning yang dibungkus dengan human fibrinogen dan juga spesifik IgG untuk deteksi protein A dan permukaan antigen yang berciri khas kan bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (Remel, 2011).

2.1.8 Epidemiologi dan Pengendalian

Staphylococcus adalah parasit manusia yang dapat ditemukan di mana-mana. Sumber utama infeksi adalah lesi terbuka, barang-barang yang terkontaminasi lesi tersebut, serta saluran nafas dan kulit manusia. Kebersihan, higiene, dan manajemen aseptik pada lesi dapat mengendalikan penyebaran *staphylococcus* dari lesi (Brooks *et al.*, 2007).

Di rumah sakit, tempat yang beresiko tinggi mengalami infeksi *staphylococcus* berat adalah perawatan neonatus, unit perawatan intensif, ruang operasi dan bangsal kemoterapi kanker. Pada orang-orang dengan lesi *S.aureus*

aktif atau *carrier*, pemakaian antiseptik topikal di hidung atau daerah perineal dapat mengurangi penyebaran organisme yang berbahaya ini (Brooks *et al.*, 2007).

2.2 Biofilm

Biofilm adalah suatu istilah yang digunakan untuk menggambarkan suatu lingkungan kehidupan yang khusus dari sekelompok mikroorganisme, yang melekat ke suatu permukaan padat dalam lingkungan perairan. Hal ini menjadi mikrolingkungan yang unik dimana mikroorganisme dalam biofilm berbeda secara struktural maupun fungsional dengan yang hidup bebas (Jamillah, 2003).

Biofilm memberi dampak kepada berbagai kehidupan sehari-hari, oleh sebab itu riset mengenai biofilm menjadi penting dan memperoleh popularitas. Biofilm dapat tumbuh di berbagai permukaan, termasuk batu dan air, gigi, makanan, pipa, alat-alat medis dan jaringan implan. Walaupun biofilm biasanya mengakibatkan kerugian seperti infeksi, adakalanya dia juga menguntungkan. Contohnya biofilm dapat untuk memurnikan air dengan cara menguraikan senyawa-senyawa berbahaya dalam perairan (Jamillah, 2003). Sedangkan efek negative biofilm dapat menyebabkan infeksi yang kronis, kolonisasi pada alat-alat medis, serta menimbulkan plak pada gigi. Baik permukaan abiotik maupun biotik seperti mineral, logam, jaringan hewan dan tumbuhan, paru dan usus, serta alat-alat medis dapat menjadi subjek kolonisasi dari pembentukan biofilm (Jass *et al.*, 2003).

Kolonisasi pada alat-alat medis dan implan dapat menimbulkan operasi ulang, amputasi bahkan kematian. Dampak ini sudah menyita perhatian banyak peneliti dari negara-negara maju seperti Amerika, Australia, Inggris terutama

bidang-bidang terkait dengan mikrobiologi untuk menggali proses terjadinya biofilm, keaneka ragaman spesies, faktor-faktor pemacu, akibat dan pengendalian biofilm (Jamillah, 2003).

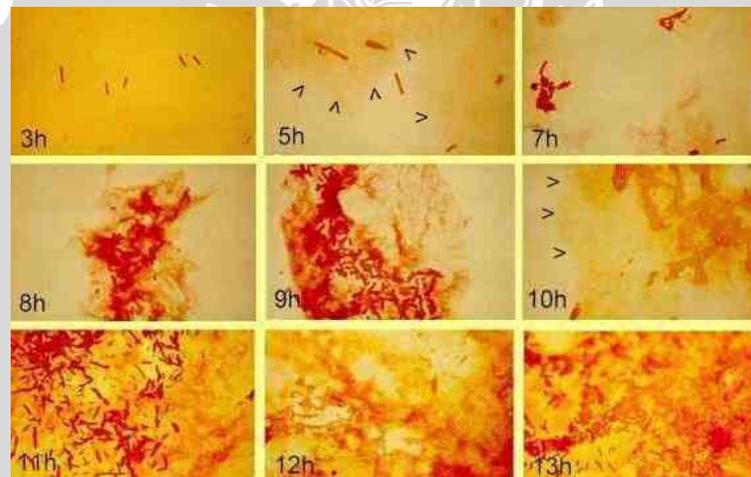
2.2.1 Definisi Biofilm

Biofilm terdiri dari sel-sel mikroorganismen yang melekat erat ke suatu permukaan sehingga berada dalam keadaan diam (*sesile*), tidak mudah lepas atau berpindah tempat (*irreversible*). Pelekatan ini seperti pada bakteri disertai oleh penumpukan bahan-bahan organik yang diselubungi oleh matrik polimer ekstraseluler yang dihasilkan oleh bakteri tersebut. Matrik ini berupa struktur benang-benang bersilang satu sama lain yang dapat berupa perekat bagi biofilm. Biofilm terbentuk khususnya secara cepat dalam sistem yang mengalir dimana suplai nutrisi tersedia secara teratur bagi bakteri. Pertumbuhan bakteri secara ekstensif disertai oleh sejumlah besar polimer ekstraseluler, menyebabkan pembentukan lapisan berlendir (biofilm) yang dapat dilihat dengan mata telanjang (Jamillah, 2003).

2.2.2 Struktur Biofilm

Terdapat keberagaman struktur dan arsitektur biofilm. Hal ini dipengaruhi oleh kondisi fisik (jenis permukaan dan pH), kondisi lingkungan (suhu, kelembapan, dll.), nutrisi, dan status fisiologis mikroorganismen. Struktur biofilm secara umum yang dapat diidentifikasi meliputi : substrat dimana bakteri menempel, film yang terkondisi di atas substrat, matriks biofilm, cairan dan udara. Lapisan film terbentuk dari glikoprotein dan lipid, contohnya protein dari urin pada kateter atau sisa makanan pada gigi. Matriks biofilm merupakan bagian terpenting biofilm, terdiri dari sel

bakteri, *extracellular polymeric substance* (EPS), dan air. Komponen utama matriks biofilm adalah air (95-99%), sel bakteri hanya sekitar 2-5%, sedangkan EPS sebanyak 2% dari total matriks. Substansi lainnya yang terkandung dalam matriks meliputi DNA, RNA, protein dan enzim yang total berjumlah 2%. EPS merupakan struktur yang sangat terhidrasi, biopolimer berbentuk gel yang memerangkap bakteri menjadi struktur tiga dimensi yang menjadi karakteristik biofilm dan agregat bakteri. Komposisi EPS tidak hanya penting untuk perlekatan dan stabilisasi matriks, tetapi juga untuk membentuk heterogenitas dan meningkatkan ketersediaan nutrisi dalam biofilm (Jass *et al.*,2003).



Gambar 2.2 Proses Pembentukan Biofilm (Jamillah, 2003)

Pada urutan di atas, bakteri Gram negatif (*Pseudomonas* strain S61) medium dibiarkan berkembang sebagai biofilm pada slide kaca yang dicelupkan dalam nutrisi yang mengandung 1% glukosa. Perkembangan biofilm diikuti teknik pewarnaan (*Congo red*) dimana sel bakteri bewarna merah gelap dan eksopolisakarida bewarna pink-orange yang melekat dapat dilihat dalam 3 jam. Kemudian mereka membelah dan membentuk mikrokoloni. Setelah 5 jam

perkembangan EPS dapat dilihat dengan jelas (tanda panah) kemudian meningkat seiring dengan peningkatan ukuran mikrokoloni (Jamillah, 2003).

Penelitian menyatakan bahwa pertumbuhan biofilm tidaklah tersusun dari lapisan *homogeneous monolayers* pada permukaan sel mikrobial, tetapi tersusun sebagai *heterogenous monolayer* baik secara waktu maupun tempat. Unit struktural dari biofilm adalah mikrokoloni dan uraian dari proses awal biofilm seperti *quorum sensing*, pertahanan terhadap antimikrobial, dan perlepasan dapat bergantung pada pengertian dari interaksi fisiologikal dari mikrokoloni di dalam pembentukan biofilm (Donlan *et al.*, 2002).

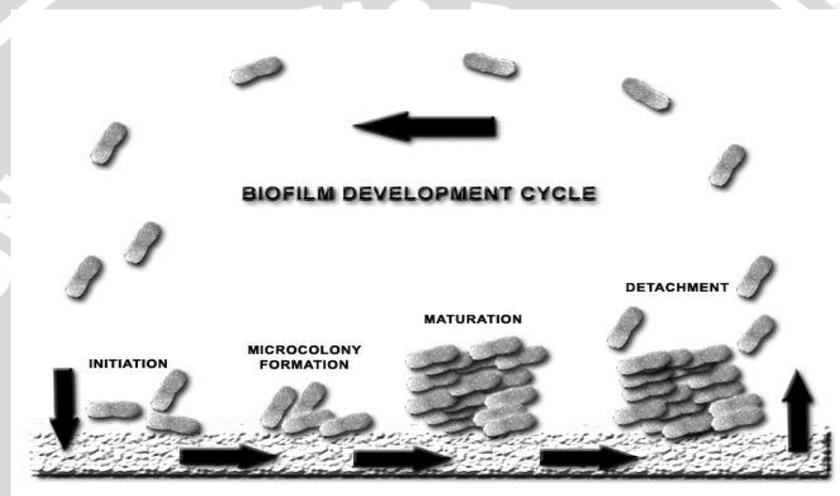
2.2.3 Pembentukan Biofilm

Secara umum, pembentukan biofilm dapat digambarkan dalam lima fase. Fase pertama, permukaan substrat akan terkondisikan dengan *conditioning film* yang terdiri dari protein dan glikoprotein, seperti fibronectin, vitronectin, fibrinogen, albumin, dan immune-globulin, yang mana berperan sebagai ligan penempel pada reseptor di koloni bakteri. Pembentukan biofilm berlanjut dengan perpindahan bakteri ke lingkungan substrat yang diperantarai oleh kombinasi mekanisme transport, termasuk di antaranya adalah Brownian motion, gravitasi, difusi, konveksi, atau pergerakan intrinsik dari mikroorganisme (Bos *et al.*, 1999).

Fase kedua, akan terjadi adhesi mikroba yang reversibel. Faktor-faktor yang terlibat pada perlekatan awal adalah interaksi non spesifik yang berasal dari sel bakteri dan permukaan substrat. Interaksi non spesifik ini diperantarai oleh sesuatu yang bersifat fisik-kimia seperti *surface charge*, hidrofobisitas, dan struktur kimia baik dari sel bakteri maupun permukaan substrat (Bos *et al.*, 1999).

Pada fase ketiga, perlekatan bakteri menjadi ireversibel, dikarenakan oleh interaksi antara protein dan produksi dari EPS. Fase keempat adalah kolonisasi pada permukaan. Bakteri yang telah menempel kemudian tumbuh dan berkembang, membentuk mikrokoloni yang disebut sebagai unit organisasi dasar dari biofilm. *Planktonic bacteria* lain yang terperangkap pada EPS akan membuat biofilm menjadi multilayer dan *mature* (Lindsay dan Von Holy, 2006). Komponen penting dalam pembentukan biofilm adalah pada kemampuan bakteri untuk bisa berkomunikasi satu dengan yang lainnya melalui proses yang disebut dengan *quorum sensing*. Proses ini menginisiasi pembentukan PIA. Enzim-enzim yang terlibat dalam sintesis *polysaccharide intercellular adhesin* (PIA) yang akan membentuk EPS, dikode oleh gen-gen *ica*-operon yaitu *icaA*, *icaD*, *icaB* dan *icaC*. Gen *icaA* memproduksi suatu *transmembrane* protein dengan homolog pada *N-acetyl-glucosaminyltransferases* dengan bantuan dari gen *icaD* untuk optimalisasi (Gerke et al., 1998). *N-acetyl-glucosamine oligomers* yang diproduksi *icaAD* mencapai panjang maksimal 20 residu dan hanya ketika gen *icaD* diekspresikan bersama dengan *icaC* maka rantai yang terbentuk akan menjadi lebih panjang (Gerke et al., 1998). *IcaC* juga diperkirakan terlibat dalam pemindahan dari polisakarida yang sedang berkembang ke permukaan sel. Protein *icaB* yang menempel di permukaan kemudian bertanggungjawab terhadap proses *deacetylation* dari molekul *poly-N-acetylglucosamine* (Vuong et al., 2004). *Poly-acetylglucosamine* yang tidak melalui proses *deacetylation* disebut mengalami mutasi dan tidak dapat menempel pada permukaan sel bakteri atau memediasi terjadinya biofilm (Vuong et al., 2004). *Ica*-operon regulator, *icaR* dan *teiocoplanin-associated locus regulator*, *TcaR* diketahui

memiliki efek kontrol negative terhadap pembentukan biofilm melalui mekanismenya terhadap gen-gen *icaADBC* (Nuryastuti, 2010). Fase terakhir adalah pelepasan bakteri dari biofilm yang membuat bakteri dapat berpencair ke daerah lain untuk membentuk koloni permukaan yang lain (Lindsay dan Van Holy, 2006).



Gambar 2.3 *Biofilm Development Cycle* (Bilecen dan Yildiz, 2009)

2.2.4 Faktor Lingkungan yang Mempengaruhi Pembentukan Biofilm

Pembentukan biofilm juga dipengaruhi oleh beberapa faktor dari lingkungan yang bisa berpotensi menjadi toksik untuk sel bakteri. Bakteri yang terpapar osmolaritas yang tinggi, suhu yang tinggi, detergen, urea, dan adanya MIC (*Minimal Inhibitory Concentration*) dari antibiotik tertentu, glukosa dan *oxidative stress*, menunjukkan peningkatan ekspresi dari *ica* dan pembentukan biofilm (Nuryastuti, 2010).

2.2.5 Pembentukan Biofilm pada Alat Medis

Kriteria pembentukan biofilm sangatlah luas, sehingga lingkungan yang cocok bagi mikroorganisme untuk berkoloni dan membentuk biofilm tidaklah terbatas. Ada sebagian dari daftar peralatan medis yang telah dibuktikan dapat menjadi tempat pertumbuhan biofilm. Biofilm yang terdapat pada peralatan medis sudah diteliti selama kurang lebih 20 tahun. Berbagai peralatan medis yang sudah diteliti dapat menjadi tempat pertumbuhan biofilm adalah *prosthetic heart valves*, *central venous catheters*, *urinary catheters*, lensa kontak dan *intrauterine devices*. Untuk beberapa peralatan medis seperti *urinary catheters* dan lensa kontak, penelitian juga menjelaskan kemungkinan dari ragam variasi material untuk *bacterial adhesion* dan pembentukan biofilm (Donlan, 2002).

2.2.6 Tes Pembentukan Biofilm

2.2.6.1 Metode Tabung

Staphylococcus aureus yang sudah teridentifikasi ditanam dalam Nutrient Broth dan diinkubasi pada suhu 37°C semalam. Bakteri yang sudah tumbuh pada Nutrient Broth ditanam kembali pada NAP kemudian diinkubasi pada suhu 37°C semalam. Mikroba kultur semalam dimasukkan ke tabung TSBglu (10mL) dan diinkubasikan 37°C selama 24 jam. Lalu tabung dicuci dengan *phosphate buffer saline* (PBS) (pH 7,3) dan dikeringkan airnya. Tabung yang sudah dikeringkan diberi kristal violet (0,1%) dan kelebihan warna dibuang dan tabung dicuci dengan *deionized water*. Tabung dikeringkan dan dilihat formasi biofilmnya (Mathur, 2006).

2.2.6.2 Metode Congo Red Agar

Metode ini digunakan untuk mengetahui kemampuan bakteri memproduksi biofilm. Agar *plate* diberi 5% sukrosa dan *stain Congo Red* (0,8 g/L). Setiap *plate* diinkubasi selama 24 sampai 72 jam dalam suhu 37°C. Hasil yang positif akan ditunjukkan dengan adanya koloni berwarna hitam dengan konsistensi *dry cristalline*. Jika terdapat koloni yang menghitam dan terletak di tengah dari *plate*, dengan atau tanpa morfologi *dry cristalline* adalah bentukan non biofilm (Moore, 2009)

2.2.6.3 Metode Microtiter-Plate Test

Untuk melakukan tes terhadap pembentukan biofilm oleh bakteri *S. aureus* dapat digunakan *microtiter-plate test*. Langkah-langkahnya adalah dengan memindahkan sebanyak 200 µl bakteri yang telah dikultur sehari sebelumnya dengan suhu 37 °C pada media TSB ke dalam sterile *96-well flat-bottomed plastic tissue culture plate*. *Well* yang sebagai kontrol negative hanya diisi oleh *fresh broth*. Kemudian semua plates diinkubasi secara aerobik selama 24 jam dalam suhu 37°C. Setelah itu, isi setiap well di aspirasi dan dicuci 3 kali menggunakan 200 µl *sterile physiological saline*. *Well-plates* di kocok secara kuat untuk menghilangkan seluruh bakteri yang tidak menempel. Kemudian setiap *well* dilakukan proses pewarnaan dengan menggunakan 0,2 ml 2% *crystal violet* selama 5 menit. Lalu dilakukan pembilasan dengan menggunakan aquades dan dikeringkan. Untuk menganalisis secara kuantitatif pembentukan biofilm, ditambahkan 200 µl dari 1M HCl isopropanol di setiap well. Kemudian dilakukan pengukuran Optical Density (OD) pada 570 nm menggunakan spektrofotometer (Nuryastuti, 2010). Jika hasil pembacaan OD kurang dari 0,12 maka dapat disimpulkan bahwa biofilm tidak terbentuk. (Gad et al., 2008)

2.3 Tanaman Dewandaru

2.3.1 Klasifikasi

Divisi	: <i>Spermatophyta</i>
Subdivisi	: <i>Angiospermae</i>
Kelas	: <i>Dicotyledonae</i>
Ordo	: <i>Myrtales</i>
Famili	: <i>Myrtaceae</i>
Genus	: <i>Eugenia</i>
Spesies	: <i>Eugenia uniflora</i> (Hutapea, 1994)

Di Indonesia, tanaman dewandaru memiliki berbagai macam nama daerah, diantaranya adalah : Cereme asam (Melayu), Asem selong, belimbing londo, dewandaru (Jawa) (Hutapea, 1994).

2.3.2 Morfologi dan Ekologi

Tanaman *Eugenia uniflora* merupakan pohon atau perdu tegak dengan tinggi \pm 5m. Batang tegak berkayu, bulat dan coklat, sedangkan daunnya tunggal, tersebar, lonjong, ujung runcing, pangkal meruncing, tepi rata, pertulangan menyirip, dengan panjang \pm 5 cm dan lebar \pm 4 cm serta berwarna hijau. Mempunyai daun yang saling berhadapan, berseling, dan tersebar, bagian tepinya rata dengan kelenjar minyak yang dapat dilihat dengan cahaya menerus. Daun penumpu tidak ada, mempunyai bunga yang beraturan kerap kali berkelamin dua berjumlah 4-5, daun pelindung kecil. Kelopak berdaun lekat, tabung kerap sekali diatas buah diperpanjang, bagian tepinya kadang-kadang sebelum mekar rontok seperti tundra, tajuk 3-5, daun mahkota lepas atau melekat menjadi cawan, kadang-kadang rontok sebelum mekar, benang sari umumnya banyak. Daun yang muda memiliki

warna seperti perunggu. Tonjolan dasar bunga bentuk cincin atau cawan, menutupi tabung kelopak. Bakal buah (setengah) tenggelam, beruang satu sampai banyak. Bunga tunggal, berkelamin dua, daun pelindung kecil, hijau, kelopak bertajuk tiga sampai lima, benang sari banyak, putih, putik, silindris, mahkota bentuk kuku, kuning. Buah berbentuk bulat, diameter $\pm 1,5$ cm dan berwarna merah. Biji kecil, keras dan coklat. Akar tunggang dan berwarna coklat. (Steenis, 1997; Hutapea, 1994; Einbond, *et al.*, 2004).

Tanaman *Eugenia uniflora* tersebar luas di negara-negara Amerika Selatan terutama di Brasil, Argentina, Uruguay, dan Paraguay (Consolini and Sarubbio, 2002). Tanaman ini menyebar di Indonesia hingga di daerah Sumatera dan Jawa (Hutapea, 1994)



Gambar 2.4 Tanaman Dewandaru

2.3.3 Kandungan Tanaman Dewandaru

2.3.3.1 Kandungan Nutrisi

Setiap 100 gram buah dewandaru dilaporkan mengandung 43-51g kalori, 1 g protein, 0.8 g lemak, 12.5 g karbohidrat, 0.6 g serat, 0.5 g abu, 9 mg Ca, 2,000 I.U.

vitamin A, 11 mg P, 0.2 mg Fe, 0.03 mg thiamine, 0.04 mg riboflavin, 0.03 mg niacin, dan 30 mg asam askorbat (Morton, 1987)

2.4.3.2 Kandungan Non-Nutrisi

Daun Dewandaru mengandung flavonoid, saponin, dan tannin (Hutapea, 1994). Flavonoid merupakan salah satu metabolit sekunder, kemungkinan keberadaannya dalam daun dipengaruhi oleh adanya proses fotosintesis sehingga daun muda belum terlalu banyak mengandung flavonoid (Markham, 1988).

Tannin adalah senyawa polifenol larut air yang biasanya ditemukan pada tumbuhan. Terlepas dari ciri-cirinya yang larut air, proses ekstraksi untuk mengambil kandungan tannin lebih banyak menggunakan pelarut ethanol karena lebih efektif, terutama jika ditambahkan 80% acetone dan *Sephadex LH-20 column chromatography* (Karamać, 2007). Tannin memiliki sifat bakteriostatik atau bakteriosidal terhadap *S.aureus* dan dapat menghambat pembentukan biofilm dengan menghambat koagulasi plasma. Penghambatan koagulasi plasma ini disebabkan oleh menurunnya konsentrasi ion kalsium, penghambatan produksi enzim, dan terganggunya reaksi enzimatik pada bakteri (Akiyama et al., 2001).

Mekanisme antimikroba tannin berkaitan dengan kemampuan tannin membentuk kompleks dengan protein polipeptida dinding sel bakteri sehingga terjadi gangguan pada dinding bakteri dan bakteri lisis. Selain itu tannin juga memiliki sifat dapat menginaktifkan adhesin sehingga bakteri tidak dapat melekat pada sel inang dan menginaktifkan enzim protease. Kedua mekanisme tersebut akan menghambat kemampuan bakteri menginvasi jaringan inang (Cowan, 1999).

Flavonoid adalah molekul polifenol yang *water soluble* yang mengandung 15 atom karbon (Cushnie dan Lamb, 2005). Meskipun merupakan komponen yang *water soluble*, kandungan flavonoid dapat diekstraksi paling banyak jika menggunakan pelarut ethanol 55%- 75% (Sathishkumar, 2008). Sebuah penelitian menunjukkan bahwa flavonoid memiliki efek anti inflamasi serta mampu menghambat senyawa adhesin (Crespo *et al.*, 2008). Padahal adhesin merupakan salah satu faktor utama yang mempengaruhi pembentukan biofilm disamping EPS. Adhesin berperan pada perlekatan sel bakteri di permukaan substrat (Jass *et al.*, 2003). Efek lain dari flavonoid yang berpengaruh pada penghambatan pembentukan biofilm adalah kemampuannya untuk menghambat fungsi membran sitoplasma bakteri. Mekanisme penghambatan fungsi membran sitoplasma bakteri adalah dengan terjadinya pengurangan fluiditas dari membran dalam dan membran luar sel bakteri, sehingga terjadi kerusakan membran dan membran tidak berfungsi sebagai mestinya, termasuk untuk melakukan perlekatan dengan substrat (Cushnie dan Lamb, 2005).

Saponin merupakan salah satu kandungan dari ekstrak daun dewandaru yang larut air maupun alkohol. Pelarut yang paling sering digunakan untuk proses ekstraksi saponin dari tumbuhan adalah air dan alkohol (methanol atau ethanol) (Glstndag, 2007). Saponin menginisiasi proses terjadinya *detachment* dari biofilm dan bekerja untuk menghambat proses perlekatan reversible dari biofilm sehingga proses maturasi dan agregasi biofilm tidak dapat berjalan (Carvalho, 2004).

2.3.4 Manfaat dalam Kehidupan Sehari-hari

Tanaman dewandaru diketahui memiliki beberapa manfaat, salah satunya merupakan sebagai antioksidan. Buah maupun daun dewandaru terbukti bisa mencegah munculnya kanker atau tumor. Dari hasil penelitian diketahui buah dewandaru mengandung senyawa golongan karotenoid. Begitu juga dengan daun dewandaru ditemukan senyawa yang bermanfaat sebagai antioksidan dan disebut fenolik. *Karotenoid* dan *fenolik* berkhasiat sebagai antioksidan yang bekerja melawan radikal bebas yang masuk ke dalam tubuh manusia. Keberadaan radikal bebas menyebabkan kerusakan sel dan pangsak terjadinya penyimpangan pada pola pembelahan sel atau penyebab dari tumor dan kanker. Seorang ilmuwan menemukan bukti kandungan senyawa fenolik pada ekstrak daun yang dikeringkan dengan panas sinar matahari jauh berkurang dibandingkan dengan yang dikeringkan di udara.

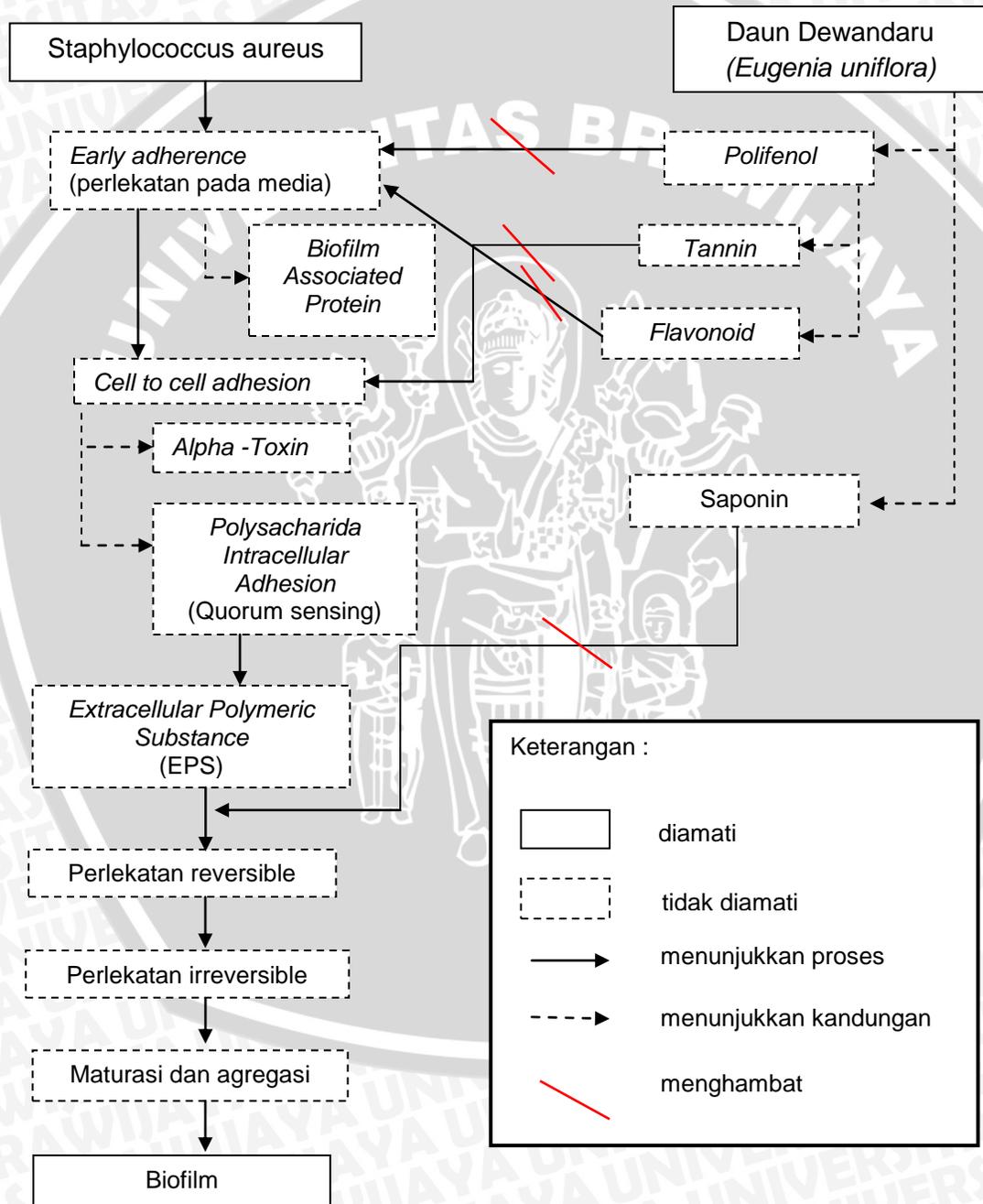
Manfaat lain tanaman ini merupakan sebagai antibakteri. Dewandaru terbukti mampu mengatasi diare. Warga Brazil menggunakan biji dewandaru untuk mengobati diare. Para ilmuwan meneliti sejauh mana biji dewandaru berkhasiat sebagai anti kuman. Ternyata protein biji dewandaru mampu menghambat pertumbuhan berbagai macam kuman, di antaranya adalah kuman penyebab diare.

Penelitian lain menunjukkan bahwa daun dewandaru dapat digunakan untuk obat antirematik. Khasiat yang ditemukan melalui pemakaian secara turun temurun itu juga sudah didukung data ilmiah yang menggembarakan. Daun dewandaru mengandung minyak atsiri, yang bekerja sebagai analgesik alias penghilang rasa sakit (Astutik, 2011).

BAB 3

KERANGKA PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Pembentukan biofilm *S.aureus* dimulai dari perlekatan bakteri pada permukaan media atau substrat (*early adhesion*). Proses ini melibatkan peranan dari beberapa protein, salah satunya adalah BAP (*Biofilm Associated Protein*). Setelah bakteri melekat pada media, selanjutnya akan terjadi *cell to cell adhesion* dimana sel bakteri harus saling melekat satu sama lain untuk menghasilkan biofilm. Zat yang penting dari proses ini diantaranya adalah *Alpha Toxin* dan *Polysaccharide Intercellular Adhesin* (PIA). Pembentukan PIA dipengaruhi oleh suatu proses yang dinamakan dengan *quorum sensing*, suatu sistem dimana bakteri dapat saling berkomunikasi. Komunikasi diperantarai oleh suatu zat yang serupa dengan feromon yang dihasilkan oleh bakteri secara individu dan dapat mempengaruhi perilaku dari bakteri di sekitarnya. Salah satu sistem yang terlibat dalam *quorum sensing*, Sistem LuxS, telah dibuktikan menjadi regulator negative dari pembentukan biofilm dengan mempengaruhi ekspresi gen *ica*, menurunkan produksi PIA dan perkembangan biofilm. PIA ini sendiri merupakan bahan dasar dari *extracellular polymeric substance* (EPS). EPS merupakan salah satu faktor yang vital dalam pembentukan biofilm. EPS kemudian akan menyebabkan perubahan perlekatan bakteri yang semula reversible menjadi irreversible. Setelah itu proses maturasi dan agregasi akan dimulai dan terbentuklah suatu bentuk biofilm dari *S. aureus*.

Pada penelitian ini digunakan ekstrak daun dewandaru (*Eugenia uniflora*) yang diduga dapat menghambat pembentukan biofilm pada bakteri *S.aureus*. Bahan aktif penghambat biofilm pada daun dewandaru adalah dari golongan polifenol (flavonoid dan tannin) dan juga saponin. Polifenol menyebabkan perusakan substrat serta penghambatan enzim sehingga bakteri tidak dapat melekat pada substrat

(*early adherence*). Flavonoid memiliki efek anti inflamasi serta mampu menghambat senyawa adhesin. Adhesin berperan pada perlekatan sel bakteri di permukaan substrat sedangkan tannin memiliki kemampuan menginaktivasi adhesin, enzim, protein, transport dinding sel, dan merusak ikatan polisakarida dinding sel bakteri. Tannin secara khusus bekerja dengan membentuk kompleks dengan protein polipeptida dinding sel bakteri sehingga terjadi gangguan pada dinding bakteri dan bakteri lisis. Dengan demikian tannin memiliki efek pada proses *cell to cell adhesion*, dimana tannin mampu menghambat perlekatan antar sel bakteri yang kemudian menghambat terjadinya biofilm. Saponin mampu menurunkan *surface tension* dari biofilm dan menyebabkan terjadinya proses pelepasan dari biofilm, sehingga cara kerja saponin adalah menghambat terjadinya perlekatan baik irreversible atau reversible.

3.2 Hipotesis Penelitian

Ekstrak daun dewandaru (*Eugenia uniflora*) dapat menghambat pembentukan biofilm pada *S.aureus*.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan dan Desain Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan rancangan eksperimental laboratoris untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun dewandaru (*Eugenia uniflora*) terhadap pembentukan biofilm *S.aureus*. Desain penelitian ini adalah *true experiment post-test only group design*. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode *Congo Red* untuk mendeteksi bakteri pembentuk biofilm dan *Microtitter Plate Test* untuk mengetahui efek ekstrak daun dewandaru (*Eugenia uniflora*) terhadap pembentukan biofilm dari bakteri *S.aureus*. Daun dewandaru dipilih yang berwarna hijau, daun yang masih muda berwarna seperti perunggu dan kandungan flavonoidnya tidak banyak.

Kelompok kontrol adalah kelompok yang tidak mendapat perlakuan berupa pemberian ekstrak. Kelompok perlakuan adalah kelompok yang mendapat perlakuan berupa pemberian ekstrak dengan dosis 0 g/dL, 3,33 g/dL, 1,67 g/dL, 0,83 g/dL, 0,42 g/dL dan 0,21 g/dL, 0,11 g/dL, 0,06 g/dL, 0,03 g/dL.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi dari penelitian ini adalah bakteri *S.aureus*. Sampel penelitian ini diperoleh dari isolat bakteri *S.aureus* pembentuk biofilm koleksi kelompok studi MRSA Indonesia yang disimpan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.2.1 Pengulangan

Pada penelitian ini digunakan sampel *S.aureus* pembentuk biofilm. Rumus untuk menghitung estimasi jumlah pengulangan adalah

$$(n-1)(p-1) \geq 15$$

$$(n-1)(8-1) \geq 15$$

$$7n-7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 4$$

p : perlakuan → dosis ekstrak daun dewandaru (8 perlakuan) yaitu dosis 0 g/dL (kontrol positif), 3,33 g/dL, 1,67 g/dL, 0,83 g/dL, 0,42 g/dL dan 0,21 g/dL, 0,11 g/dL, 0,06 g/dL, 0,03 g/dL.

n : pengulangan → berdasarkan rumus banyaknya pengulangan yang dilakukan minimal 4 kali.

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Pembuatan ekstrak daun dewandaru dilakukan di Balai Materia Medika. Uji penghambat biofilm dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dari bulan April 2012 sampai dengan bulan Oktober 2012.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian adalah konsentrasi ekstrak daun dewandaru. Dalam penelitian ini digunakan konsentrasi dosis 0 g/dL

(kontrol positif), 3,33 g/dL, 1,67 g/dL, 0,83 g/dL, 0,42 g/dL dan 0,21 g/dL, 0,11 g/dL, 0,06 g/dL, 0,03 g/dL.

4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah pembentukan biofilm dari bakteri *S.aureus* yang bisa dihitung menggunakan ELISA Reader.

4.5 Definisi Operasional

1. *Staphylococcus aureus* tergolong dalam bakteri Gram positif yang berbentuk kokus, bergerombol seperti buah anggur, anaerob fakultatif, menunjukkan tes katalase positif dan tes koagulase positif dan membentuk koloni berwarna kuning emas pada *Nutrient Agar Plate* sesuai dengan namanya; *aureus* yang berarti emas dalam bahasa latin. *S.aureus* yang dipakai dalam penelitian ini adalah *S.aureus* strain pembentuk biofilm yang diidentifikasi dengan menggunakan metode *congo red*. Bakteri didapatkan dari *stock culture* Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
2. Biofilm adalah agregat multiseluler yang membentuk lapisan padat pada permukaan suatu substrat/media. Biofilm dibiakkan sendiri di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
3. Ekstrak daun dewandaru adalah hasil ekstraksi berbentuk cairan dengan pelarut ethanol. Ekstrak yang didapat dianggap memiliki kandungan ekstrak sebesar 100%. Ekstraksi dilakukan di Balai Materia Medika.

4. Metode *microtiter plate* menurut Christensen et al. digunakan untuk mendeteksi pembentukan biofilm dan untuk menguji efek ekstrak daun dewandaru terhadap pembentukan biofilm *S.aureus*. Pada penelitian ini menggunakan *96-well plate*.
5. Spektrofotometer adalah alat yang digunakan untuk menghitung biofilm yang terbentuk pada *microtiter plate*. Mekanismenya adalah dengan menghitung *optical density* (OD) dari biofilm yang terbentuk pada *microtiter plate* yang telah diwarnai dengan kristal violet.
6. ELISA *reader* adalah alat yang digunakan untuk menghitung *Optical Density* pada well-microplate yang diukur. ELISA *reader* yang digunakan adalah milik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
7. *Optical Density* adalah satuan yang digunakan untuk mengukur *biomass*, *cell count* dll. Menggunakan prinsip *refraction of light* dari spektrofotometri.
8. *Minimal Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC) adalah konsentrasi terendah dari ekstrak daun dewandaru yang dapat menghambat pembentukan biofilm *S. aureus*.

4.6 Instrumen Penelitian (Bahan dan Alat)

4.6.1 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Daun Dewandaru

1. *Vacuum oven* atau *drying oven*
2. Timbangan analisis (*Analytical balance*)
3. *Beaker glass*

4. *Buchner funnel* (corong Buchner),
5. *Lundum/soxhlet extraction thimble* (tabung berpori untuk memasukkan sampel) dengan ukuran pori 10-15 mm yang sesuai dengan ekstraktor *soxhlet water bath*
6. Labu penampung (*collection flask*) berukuran 250 mL
7. Evaporator dengan vakum
8. *Desiccator*
9. *Water pump* dan *water bath*
10. Ekstraktor *soxhlet*, yang terdiri dari gelas *soxhlet* dengan ukuran 100 mL.

4.6.2 Alat dan Bahan Identifikasi Bakteri Pembenihan Murni

1. Isolat *Staphylococcus aureus*
2. NAP (*Natrium Agar Plate*)
3. Bahan tes Katalase : H₂O₃ 3%
4. Bahan tes Koagulase : plasma darah dengan EDTA
5. Bahan pengecatan Gram : kristal violet, lugol, alkohol 95% dan safranin
6. Minyak emersi, alat ose dan mikroskop
7. Lampu spiritus
8. Tabung reaksi

4.6.3 Alat dan Bahan Deteksi Biofilm

1. Trypticase Soy Broth (TSB) dengan 1% glukosa
2. Biakan *Staphylococcus aureus* pembentuk biofilm
3. Phosphate Buffer Saline (PBS) PH 7,2

4. Kristal violet 0,2 mL 2%
5. HCl Isopropanol
6. *Microtiter plate*
7. *Congo Red Agar Plates*
8. *96-well flat-bottomed plastic tissue culture plate*
9. Spektrofotometer
10. Elisa Reader
11. Ekstrak daun dewandaru dosis 3,33 g/dL, 1,67 g/dL, 0,83 g/dL, 0,42 g/dL dan 0,21 g/dL, 0,11 g/dL, 0,06 g/dL, 0,03 g/dL.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Persiapan Daun Dewandaru (*Eugenia uniflora*)

4.7.1.1 Ekstraksi dan Evaporasi (Handa, 2008)

A. Pengolahan Dewandaru

1. Daun dewandaru dicuci dari kotoran, tiriskan, lalu keringkan dari air.
2. Daun dikeringkan dengan cara diangin-anginkan.
3. Daun dewandaru kering ditumbuk halus menjadi bubuk (250gr).

B. Prosedur Ekstraksi dan Evaporasi

1. Meletakkan 3-4 *boiling chips* pada *collection flask* (labu penampung etanol).
2. Mengeringkan labu penampung ethanol yang berisi 3 *boiling chips* tersebut dengan *drying oven* pada suhu $103^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ selama satu jam.

3. Mengeringkan *Soxhlet extraction thimble* pada suhu 105°C di dalam *drying oven*. Kemudian didinginkan pada suhu kamar pada *desiccator*, dan ditimbang dengan timbangan analitik.
4. Memasukkan daun dewandaru yang sudah dihaluskan dan dikeringkan ke *Soxhlet extraction thimble*. Menimbang *Soxhlet extraction thimble* yang terisi ekstrak. Menutup dengan kapas penutup untuk mencegah kehilangan sampel selama ekstraksi.
5. Memasukkan pelarut 200 mL dari ethanol 70% dalam labu penampung ethanol yang berisi *boiling chips* dan memasangkannya peralatan ekstraktor *soxhlet*.
6. Memasukkan *Soxhlet extraction thimble* pada ekstraktor *soxhlet* dan memanaskan labu penampung ethanol yang sudah terpasang pada ekstraktor *soxhlet* selama 24 jam.
7. Secara periodik mengecek dan menyesuaikan derajat panas untuk mengganti dan mengisi ulang pelarut (ethanol 70%) sampai 4-5 kali
8. Setelah 24 jam, *Soxhlet extraction thimble* diambil dan sampel ekstrak daun dewandaru dipindah ke corong *Buchner (Buchner funnel)*. Sisa pelarut dibuang dengan menggunakan filtrasi vakum. Sampel ekstrak dicuci dengan ethanol 70% dan semua filtrat yang dihasilkan dari ekstraktor *soxhlet* ditampung.
9. Mencampur filtrat dari tahap sebelumnya dengan pelarut dalam labu berukuran 250 mL.

10. Meletakkan labu tersebut pada alat *rotatory evaporator* dan membuang sisa pelarut dengan *vacum*.
11. Menggunakan *waterbath* untuk memanaskan labu tersebut selama proses evaporasi dengan suhu 70-80°C (sesuai dengan titik didih etanol 70%). Tujuan penguapan ini adalah untuk memisahkan bahan-bahan aktif dengan pelarutnya.
12. Setelah semua pelarut dibuang dalam proses evaporasi, labu pengumpul yang berisi rendemen (bahan aktif dan sisa pelarut) diletakkan dalam *vacuum oven* (dengan tekanan 75-100 *torr*) pada suhu 70-80°C selama 24 jam \pm 1 jam. Hasil akhir dari proses evaporasi ini adalah terbentuknya ekstrak daun dewandaru dalam bentuk cair (150ml).

4.7.2 Persiapan Biofilm *Staphylococcus aureus*

4.7.2.1 Identifikasi *Staphylococcus aureus*

A. Pemeriksaan Mikroskopis (Forbes et al, 2007)

1. Pembuatan sediaan slide

Membersihkan gelas obyek dengan kapas, kemudian lewatkan di atas api untuk menghilangkan lemak, biarkan dingin. Buatlah sediaan sedemikian rupa, sehingga tidak terlalu tebal dan tidak terlalu tipis dengan cara :

- Teteskan satu ose aquades steril pada gelas obyek. Ambil sedikit biakan kuman menggunakan ose, selanjutnya suspensikan dengan

aquades pada gelas objek dan ratakan. Untuk sediaan cair tidak perlu disuspensikan dengan aquades.

- Biarkan sediaan kering di udara, kemudian lakukan fiksasi dengan cara melewatkan sediaan di atas api.

2. Pewarnaan Gram

- Satu ose aquades steril ditetaskan pada gelas objek, kemudian diambil sedikit bakteri untuk disuspensikan dengan aquades yang telah diletakkan diatas gelas objek. Kemudian dibiarkan kering di udara.
- Suspensi bakteri yang telah kering difiksasi dengan cara melewatkannya di atas api beberapa kali dan sediaan siap untuk diwarnai.
- Sediaan kemudian ditetesi dengan kristal violet dan ditunggu selama satu menit. Kemudian kristal violet dibuang dan dibilas dengan air perlahan-lahan.
- Sediaan ditetesi dengan lugol dan ditunggu selama satu menit, lalu lugol dibuang dan dibilas dengan air.
- Sediaan ditetesi dengan alkohol 96% dan ditunggu 5-10 detik, kemudian alkohol segera dibuang dan dibilas dengan air.
- Sediaan ditetesi dengan safranin dan ditunggu selama 30 detik, kemudian safranin dibuang dan dibilas dengan air.
- Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap dan siap untuk dilihat di bawah mikroskop dengan lensa obyektif pembesaran 1000x

B. Tes Katalase (*Health Protection Agency, 2010*)

- Tuangkan 0,2 mL H₂O₃ 3% ke dalam tabung reaksi.
- Ambil sedikit biakan bakteri dengan ose.
- Usapkan ose pada dinding tabung di atas permukaan cairan.
- Tutup tabung reaksi, lalu goyangkan agar cairan H₂O₃ 3% dapat mengenai usapan biakan bakteri.
- Hasil positif bila ada gelembung.
- Hasil negatif bila tidak ada gelembung.

Hasil positif menunjukkan *Staphylococcus* sp.

Hasil negatif menunjukkan *Streptococcus* sp.

C. Tes Koagulase (*Forbes et al, 2007*)*Slide Test*

- Teteskan satu ose plasma darah dengan EDTA pada gelas objek yang kering & bersih (gelas objek A)
- Teteskan air distilasi / air salin sebagai kontrol pada gelas objek B
- Ambil sedikit biakan kuman dengan ose. Buat suspensi dengan masing-masing gelas objek dan diratakan perlahan selama 5-10 detik
- Hasil positif bila terjadi penggumpalan dalam waktu 10 detik atau kurang pada gelas objek A dan tidak ada penggumpalan pada gelas objek B
- Hasil negatif bila tidak ada penggumpalan pada kedua gelas objek

Hasil keseluruhan:

Hasil positif menunjukkan *Staphylococcus aureus*

Hasil negatif menunjukkan *Staphylococcus* koagulase negatif

4.7.2.2 Pembentukan Perbenihan Cair Bakteri

Staphylococcus aureus yang sudah ditanam dalam medium *Nutrient Agar Plate* (NAP) dikultur dalam medium *Nutrient Broth* (NB) selama 24 jam dalam inkubator 37°C. Suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* pada medium NB dilakukan pengukuran spektrofotometri dengan panjang gelombang (λ) 625nm sehingga diketahui kepadatan bakterinya (OD = *Optical density*) yang setara dengan kepadatan bakteri 10^8 bakteri/mL. Kemudian dengan rumus pengenceran $N1 \times V1 = N2 \times V2$, kepadatan bakteri tersebut diencerkan satu kali dengan NaCl dan satu kali dengan TSBglu menjadi 10^7 bakteri/mL. Dasar penghitungannya sebagai berikut:

Apabila diperoleh OD bakteri hasil spektrofotometri = 2,610 (N1)

OD bakteri dengan kepadatan 10^8 bakteri/mL = 0,1 (N2)

Volume keseluruhan dalam satu tabung = 10 mL (V2)

Rumus : $N1 \times V1 = N2 \times V2$

$$2,610 \times V1 = 0,1 \times 10$$

$$V1 = 1 / 2,61 = 0,68 \text{ mL}$$

- Suspensi bakteri sebanyak 0,68 mL diambil dan ditambah dengan 9,32 mL NaCl menjadi suspensi bakteri dengan kepadatan 10^8 bakteri/ml.
- Suspensi bakteri sebanyak 1 mL diambil dari kepadatan 10^8 bakteri/ml ditambah dengan 9 mL TSBglu menjadi suspensi dengan kepadatan 10^7 bakteri/mL.

- Prosedur diulang hingga mendapatkan konsentrasi bakteri yang diinginkan yaitu 10^6 bakteri/mL.

4.7.2.3 Uji Deteksi Pembentukan Biofilm

4.7.2.3.1 Congo Red Agar Method (Fremaan *et al.* 1989)

1. *Congo Red Agar (CRA)* yang telah disiapkan di autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.
2. Kultur *S.aureus* diinokulasikan pada *CRA* setelah medium bersuhu sekitar 55°C .
3. *CRA* ini lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C .
4. Hasil positif ditunjukkan dengan koloni yang berwarna hitam.
5. Hasil negatif ditunjukkan dengan koloni yang berwarna pink.

4.7.3 Uji Hambatan Pembentukan Biofilm (Nuryastuti, 2010)

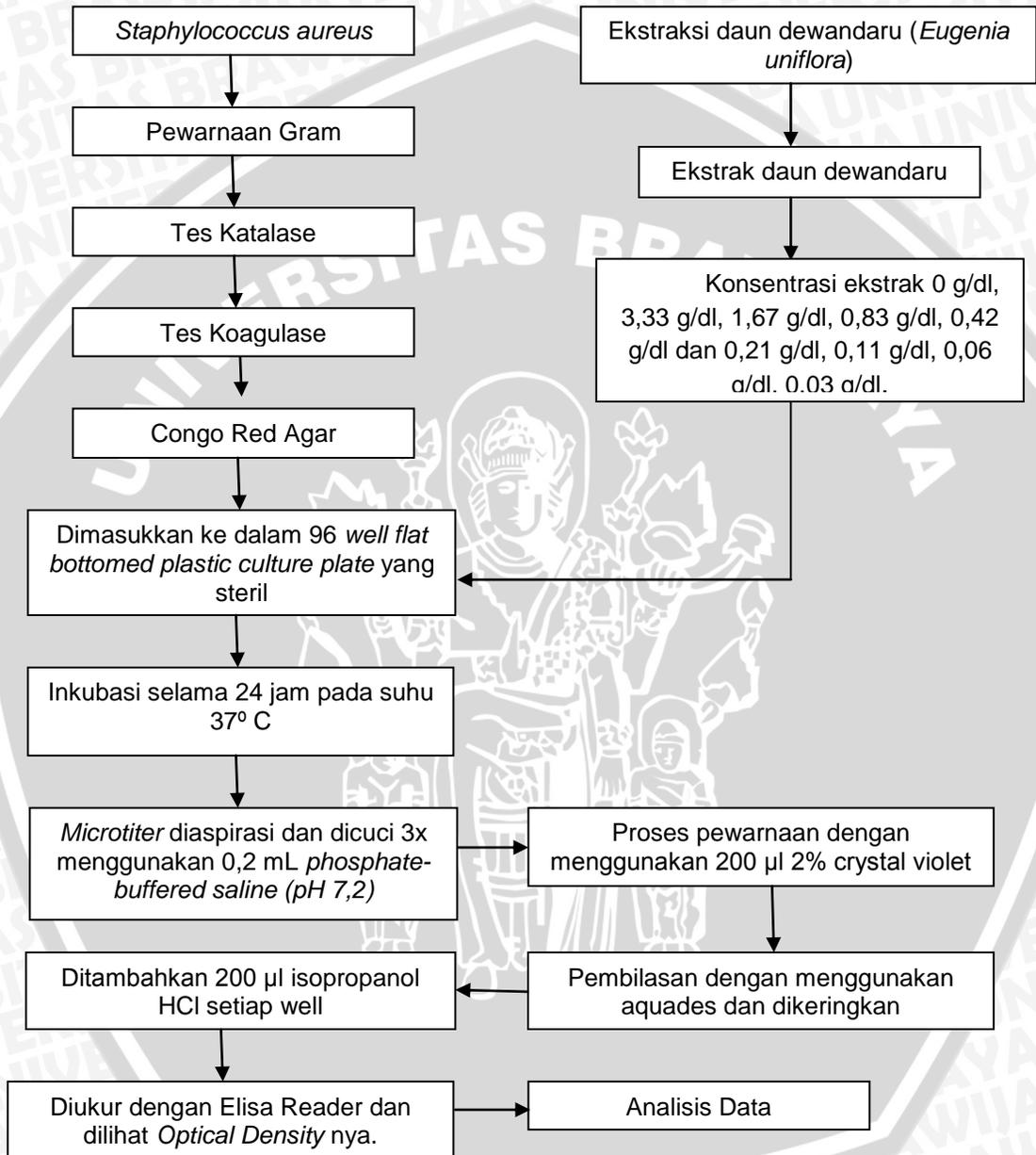
- 1 Bakteri *S.aureus* dikultur semalaman di media TSB di dilusi sampai 1:100 pada TSBglu.
- 2 Kemudian 200 μl *S.aureus* konsentrasi 10^6 bakteri/ml diisikan pada baris pertama 96-well flat-bottomed plastic tissue culture plate.
Kemudian di tiap kolomnya ditambahkan ekstrak daun dewandaru dengan konsentrasi yang berbeda-beda, yaitu 3,33 g/dL, 1,67 g/dL, 0,83 g/dL, 0,42 g/dL dan 0,21 g/dL, 0,11 g/dL, 0,06 g/dL, 0,03 g/dL dan 0gr/dL sebagai kontrol positif.

- 3 Mikrotiter diinkubasi 24 jam dengan suhu 37° C.
- 4 Setelah itu, isi setiap mikrotiter di aspirasi dan dicuci 3 kali menggunakan 200 µl *phosphate-buffered saline* (pH 7,2). *Well-plates* di kocok secara hati-hati untuk menghilangkan seluruh bakteri yang tidak menempel.
- 5 Kemudian dilakukan pengecatan dengan *crystal violet*.
- 6 Lalu dilakukan pembilasan dengan menggunakan aquades dan dikeringkan.
- 7 Untuk menganalisis secara kuantitatif pembentukan biofilm, ditambahkan 200 µl dari HCl isopropanol di setiap well.
- 8 Kemudian dilakukan pengukuran *Optical Density* (OD) pada 570 nm menggunakan *ELISA reader* dengan metode sama dengan spektrofotometri. Prosedur ini diulang sebanyak empat kali.

4.8 Analisa Data

Analisis data yang digunakan adalah Uji One Way ANOVA dan uji korelasi. Uji One Way ANOVA dengan derajat kepercayaan 95% digunakan untuk mengetahui adanya perbedaan pengaruh antara berbagai konsentrasi ekstrak daun dewandaru terhadap intensitas warna biofilm yang dicat dengan kristal violet (*Optical Density*) pada *microtiter plate*. Analisis data menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) for Windows versi 20.0.

4.9 Skema Penelitian



BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

Penelitian ini menggunakan bakteri *S. aureus* isolat urin yang didapat dari *stock culture* laboratorium Mikrobiologi FKUB. Tiap isolat dikultur ulang dalam medium *Nutrient Agar Plate* (NAP) kemudian dilakukan reidentifikasi bakteri dan uji deteksi pembentukan biofilm. Selanjutnya dilakukan uji efektifitas efek daun dewandaru terhadap pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus* pada isolat bakteri dengan menggunakan *microtiter plate method* dan dilakukan pengulangan sebanyak 4 kali.

5.1 Hasil Penelitian pada *Staphylococcus aureus* Isolat Urin

5.1.1 Hasil Identifikasi Bakteri

Pada pewarnaan Gram dan pengamatan di bawah mikroskop dengan pembesaran 1000 kali, didapatkan gambaran bakteri berbentuk bulat/*coccus* bergerombol seperti buah anggur, dan berwarna ungu yang menandakan bakteri kokus gram positif (Gambar 5.1). Tes katalase pada gelas objek menunjukkan adanya gelembung-gelembung udara bakteri *Staphylococcus sp.* (Gambar 5.2). Tes Koagulase pada gelas objek menunjukkan adanya penggumpalan dalam waktu kurang dari 10 detik yang menandakan *Staphylococcus aureus* (Gambar 5.3). Dari hasil-hasil tes tersebut dapat disimpulkan bahwa isolat yang diuji adalah bakteri *Staphylococcus aureus*.



Gambar 5.1 Pewarnaan Gram
(bentukan bulat berwarna ungu dan bergerombol seperti buah anggur menunjukkan karakteristik bakteri *S. aureus*)



Gambar 5.2 Tes Katalase Positif
(Tampak gelembung pada *slide object* yang menunjukkan hasil tes katalase positif. Pada bakteri *Streptococcus* hasil tes negative.)



Gambar 5.3 Tes Koagulase Positif
(Gumpalan yang terbentuk pada gambar atas menunjukkan bahwa bakteri adalah *S.aureus* yang bersifat koagulase positif dan membedakannya dengan *strain* lain.)

5.1.2 Hasil Uji Deteksi Pembentukan Biofilm

Untuk mendeteksi pembentukan biofilm digunakan medium *Congo Red Agar*. Setelah dilakukan inkubasi pada medium *Congo Red Agar*

didapatkan koloni bakteri yang berwarna hitam, bulat, dan berkilau (Gambar 5.4).



Gambar 5.4 Inkubasi pada Congo Red Agar
(Hasil koloni berwarna hitam menandakan pembentukan biofilm)

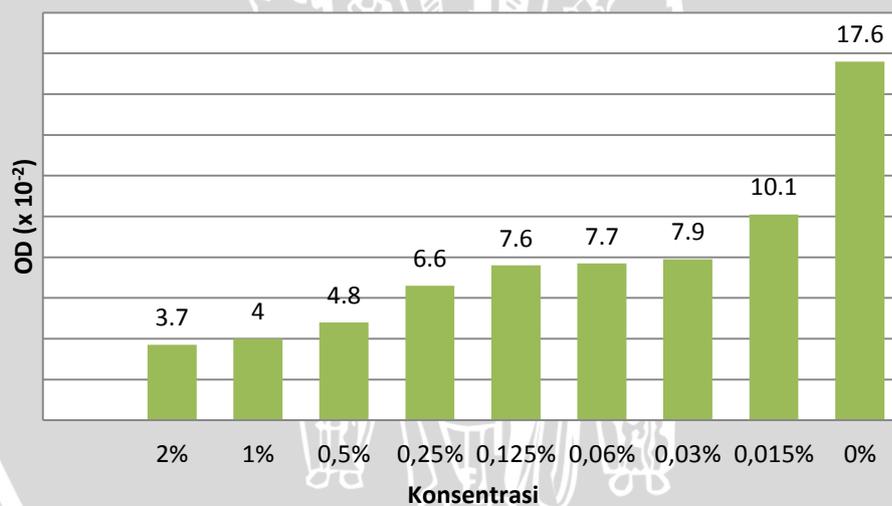
5.1.3 Hasil Uji Hambat Biofilm

Pada penelitian ini digunakan 8 macam konsentrasi ekstrak daun dewandaru (*Eugenia uniflora*) yaitu 0,015 %, 0,03%, 0,06%, 0,125%, 0,25%, 0,5%, 1%, dan 2% serta konsentrasi 0% sebagai kontrol positif.

Pengukuran pembentukan biofilm dilakukan dengan pembacaan mikrotiter 96-well plate pada ELISA reader dengan panjang gelombang 570nm setelah dilarutkan dalam HCL.isopropanol. Hasil pembacaan lengkap dapat dilihat pada lampiran 1.



Gambar 5.5 Fiksasi dengan HCL Isopropanol Sebelum Dibaca pada Elisa Reader



Gambar 5.6 Grafik nilai rata-rata OD biofilm bakteri

5.2 Analisis Data Uji Efektifitas Ekstrak Daun Dewandaru terhadap Pembentukan Biofilm *Staphylococcus aureus* Isolat Urin

Hasil penelitian ini dianalisis menggunakan analisis statistik SPSS untuk Windows. Data hasil pengukuran biofilm menggunakan ELISA

reader dianalisis dengan menggunakan Uji *One Way ANOVA* yang dilanjutkan dengan analisis *Post-Hoc multiple comparison test* dan Uji Regresi Linier. Uji *One Way ANOVA* digunakan untuk melihat adanya perbedaan yang bermakna antara kelompok data. Analisis *Post-Hoc multiple comparison* metode Tukey HSD digunakan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara bermakna. Uji regresi linier digunakan untuk mengetahui kekuatan pengaruh ekstrak terhadap pembentukan biofilm.

5.2.1 Uji *One Way ANOVA*

Sebelum menguji data dengan Uji *One Way ANOVA*, sebaran data harus normal dan homogen terlebih dahulu. Untuk mengetahuinya digunakan Uji Normalitas dan Uji Homogenitas. Hasil Uji Normalitas dan Uji Homogenitas dapat dilihat pada lampiran 2 dimana data yang didapat $p > 0,05$ sehingga dalam batas normal dan homogen serta memenuhi syarat Uji *ANOVA*.

Setelah semua syarat telah terpenuhi, maka dilanjutkan dengan Uji *One Way ANOVA* yang dapat dilihat pada lampiran 3 nilai $p = 0,000$ ($p < 0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat sedikitnya dua kelompok data yang mempunyai nilai *Optical Density* yang berbeda secara bermakna.

5.2.2 Uji *Post-Hoc Multiple Comparison Test (Tukey HSD)*

Analisis mengenai perbedaan rata-rata dari kelompok-kelompok data dapat dilihat dalam Uji *Post-Hoc Multiple Comparison*. Metode *Post-Hoc*

yang digunakan adalah Uji *Tukey HSD*. Indikator yang digunakan untuk melihat perbedaan nilai *OD* bermakna atau tidak adalah nilai signifikansi pada tabel. Perbedaan dianggap signifikan jika nilai $p < 0,05$. Berdasarkan uji tersebut didapatkan hasil sebagai berikut:

Tabel 5.1 Hasil Uji *Post-Hoc Multiple Comparison* Nilai *OD*

Nilai p	2%	1%	0,5%	0,25%	0,125%	0,06%	0,03%	0,015%	0%
2%	-	.961	.002	.000	.000	.000	.000	.000	.000
1%	.961	-	.033	.000	.000	.000	.000	.000	.000
0,5%	.002	.033	-	.000	.000	.000	.000	.000	.000
0,25%	.000	.000	.000	-	.003	.002	.000	.000	.000
0,125%	.000	.000	.000	.003	-	1.000	.937	.000	.000
0,06%	.000	.000	.000	.002	1.000	-	.978	.000	.000
0,03%	.000	.000	.000	.000	.937	.978	-	.000	.000
0,015%	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	-	.000
0%	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	-

Keterangan:

= nilai $p < 0,05$ = terdapat perbedaan bermakna (signifikan)

= nilai $p > 0,05$ = tidak terdapat perbedaan bermakna (tidak signifikan)

Hasil selengkapnya dapat dilihat pada lampiran 4. Dari tabel di atas terlihat adanya perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) antara kelompok kontrol positif (0%) dengan tiap kelompok konsentrasi (2%; 1%; 0,5%; 0,25%; 0,125%; 0,06%; 0,03%; 0,015%). Dan terdapat perbedaan yang bermakna antara tiap-tiap konsentrasi, kecuali antara konsentrasi 2% dan 1%, juga antara 0,03%, 0,06%, dan 0,125%.

5.2.3 Uji Regresi Linier Sederhana

Untuk mengetahui pengaruh hubungan antara konsentrasi ekstrak daun dewandaru terhadap hambatan pembentukan biofilm maka dilakukan Uji Regresi Linier Sederhana. Hasil uji regresi Linier dapat dilihat pada lampiran 5.

Dari hasil uji regresi linier didapatkan persamaan sebagai berikut:

$$Y = 0,95 - 0,38X$$

Koefisien determinasi mencerminkan seberapa besar kemampuan variabel bebas dalam menjelaskan varians variabel terikatnya dalam hal ini pembentukan biofilm. Koefisien ini mempunyai nilai antara 0 - (-1) di mana nilai yang semakin mendekati -1 mempunyai arti semakin tinggi pengaruh variabel bebas terhadap variabel terikatnya. Data di atas menunjukkan koefisien -0.603 yang berarti bahwa ekstrak daun dewandaru mempunyai pengaruh yang cukup kuat terhadap hambatan pembentukan biofilm. Nilai yang negatif menandakan pemberian ekstrak daun dewandaru menghambat pembentukan biofilm yang dihasilkan oleh bakteri *S. aureus* isolat urin. Selain itu nilai signifikansi menunjukkan angka $< 0,05$.

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini digunakan untuk mengetahui efek ekstrak daun dewandaru (*Eugenia uniflora*) dalam menghambat pembentukan biofilm pada bakteri *S.aureus* secara *in vitro*. Untuk menilai kemampuan ekstrak daun dewandaru ini, digunakan metode *microtiter plate test* yang merupakan uji kuantitatif (Jain, 2008). Kemudian setelah melakukan prosedur yang telah ditentukan, maka kita akan mendapatkan suatu nilai yaitu OD (*Optical Density*) biofilm yang diukur dengan menggunakan spektrofotometer. Nilai ini kemudian dianalisis untuk menjawab pertanyaan dari tujuan penelitian ini.

Bakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah bakteri *S.aureus* isolat urin milik Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Sebelum digunakan untuk penelitian, bakteri ini terlebih dahulu diinokulasikan pada medium *NAP* selama 24 jam. Kemudian dilakukan tes identifikasi bakteri yaitu pengecatan gram, uji katalase dan koagulase. Hasil dari pengecatan gram dapat dilihat dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran obyektif 1000x dengan terlebih dahulu diberi minyak emersi, dan didapatkan hasil bakteri yang berbentuk bulat berwarna biru keunguan yang merupakan pertanda bahwa ini adalah bakteri gram positif. Untuk membedakan antara genus *Staphylococcus sp* dan *Streptococcus sp*, dilakukan tes katalase. Hasil positif berupa gelembung udara mengindikasikan bahwa biakan bakteri yang dites adalah genus *Staphylococcus sp*. Selanjutnya dilakukan tes koagulase untuk membedakan antara *Staphylococcus*

aureus dengan *Staphylococcus* koagulase negatif. Hasil positif mengindikasikan bahwa biakan bakteri yang dites adalah *Staphylococcus aureus*. Dengan seluruh pemeriksaan identifikasi bakteri tersebut maka dapat dibuktikan bahwa isolat bakteri yang dipakai dalam penelitian ini adalah *Staphylococcus aureus* (Dzen dkk, 2003; Todar, 2008).

Setelah proses identifikasi bakteri selesai, dilakukan uji pembentukan biofilm dengan menggunakan metode *Congo Red Agar*. *Congo Red Agar* merupakan metode kualitatif yang dapat digunakan dalam pendeteksian bakteri pembentuk biofilm (Jain, 2008). Komposisi yang ada pada *congo red* antara lain adalah *congo red dye* (0.8 gram), sukrosa (36 gram), *Brain Heart Infusion Agar* (52 gram), dan air (1000 mL) (Freeman et al., 1989). Kemudian bakteri diinokulasikan pada medium *Congo Red Agar* selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil yang didapat adalah adanya koloni berwarna hitam yang menunjukkan bahwa bakteri ini menghasilkan biofilm. *Congo red agar* dapat berinteraksi secara langsung dengan *polysaccharide intercellular adhesin* dan membentuk suatu kompleks warna. Koloni berwarna hitam sepertinya didapatkan dari perubahan metabolik dari pewarna (Jain, 2008). Selain itu, penelitian lain menyatakan bahwa bakteri penghasil biofilm memiliki gen *icaA* dan *icaD*, yang jika terekspresi secara bersamaan akan menghasilkan biofilm. Dari kedua gen inilah yang mungkin menyebabkan munculnya koloni bias berwarna hitam (Aricola et al., 2002).

Sebelum dilakukan perlakuan terhadap bakteri *S.aureus* penghasil biofilm ini, dilakukan eksplorasi konsentrasi ekstrak terlebih dahulu untuk menentukan konsentrasi yang akan dipakai. Ekstrak daun dewandaru didapatkan dari

pengekstraksian daun yang diambil langsung dari pohonnya kemudian dengan menggunakan pelarut ethanol di ekstraksikan dan dibentuk dalam bentukan cair. Ekstrak didapatkan dengan cara ekstraksi metode *Soxhlet*. Ekstraksi metode *Soxhlet* digunakan karena dengan metode ini, pelarut yang digunakan akan berkurang secara signifikan dan konsentrasi bahan aktif akan meningkat sehingga didapatkan hasil ekstrak yang murni.

Dari hasil eksplorasi, ditemukan konsentrasi yang akan digunakan untuk penelitian ini, yaitu konsentrasi 0 gr/dL (kontrol kuman), 3,33 g/dL, 1,67 g/dL, 0,83 g/dL, 0,42 g/dL dan 0,21 g/dL, 0,11 g/dL, 0,06 g/dL, 0,03 g/dL. Setelah melakukan eksplorasi ditemukan juga bahwa kadar hambat minimum pembentukan biofilm (MBIC) terdapat pada konsentrasi 0,015 g/dL. Pada konsentrasi lebih rendah daripada 0,015gr/dL, terjadi pembentukan biofilm yang dibuktikan dengan pembacaan OD sebesar lebih dari 0,12 menggunakan gelombang 570nm (Gad et al., 2008).

Setelah menemukan konsentrasi yang akan digunakan, maka kita melakukan pengukuran terhadap OD Biofilm dengan menggunakan spektrofotometer. Pada proses ini, ditemukan beberapa kesulitan diantaranya adalah kepekatan ekstrak yang cukup tinggi, mengakibatkan adanya gangguan dalam pembacaan OD. Prosedur pemberian ekstrak terhadap bakteri pembentuk biofilm dan mengukur nilai OD Biofilm dengan menggunakan spektrofotometer ini diulang sebanyak empat kali. Dari pengulangan sebanyak empat kali ini, hasil yang didapatkan selalu menunjukkan bahwa semua konsentrasi dapat menghambat pembentukan biofilm yang dihasilkan *S. aureus*, karena OD biofilm bakteri yang diberi perlakuan di bawah

0,12. Dimana angka tersebut diyakini sebagai batas minimal terjadinya pembentukan biofilm.

Langkah selanjutnya yang akan dilakukan adalah memastikan adanya hubungan antara pemberian ekstrak dengan OD biofilm bakteri menggunakan SPSS. Analisis yang digunakan pertama adalah metode *One-way Anova*, didapatkan hasil berupa setidaknya dua kelompok data yang memiliki perbedaan OD biofilm bakteri secara bermakna. Untuk mengetahui kelompok data yang memiliki perbedaan tersebut, maka dilakukan *Post-Hoc Multiple Comparison Test*. Pada percobaan ini dapat dilihat bahwa terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) antara kelompok kontrol positif (0%) dengan tiap kelompok konsentrasi (2%; 1%; 0,5%; 0,25%; 0,125%; 0,06%; 0,03%; 0,015%). Dan terdapat perbedaan yang bermakna antara tiap-tiap konsentrasi, kecuali antara konsentrasi 2% dan 1%, juga antara masing-masing konsentrasi 0,03%, 0,06%, dan 0,125%. Dengan hasil tersebut, dapat disimpulkan bahwa untuk penelitian ini, dosis maksimal ekstrak daun dewandaru yang dapat menghambat pembentukan biofilm *S.aureus* sebesar 1%. Untuk dosis 0,03%, 0,06%, dan 0,125% yang tidak memberikan signifikansi satu sama lain, mungkin disebabkan oleh *range* konsentrasi yang terlalu kecil.

Kemudian untuk mengetahui seberapa besar pengaruh pemberian ekstrak daun dewandaru terhadap penghambatan pembentukan biofilm dapat digunakan dengan melakukan Uji Regresi Linier. Hasil yang didapatkan menunjukkan *standart coefficient beta* -.603, hal ini berarti pemberian ekstrak daun dewandaru memiliki pengaruh cukup kuat terhadap penghambatan pembentukan biofilm. Hasil dari

standart coefficient beta yang negatif juga menunjukkan kemampuan ekstrak daun dewandaru dalam menghambat pembentukan biofilm.

Kandungan pada daun dewandaru yang berperan dalam menghambat pembentukan biofilm adalah dari golongan polifenol (flavonoid dan tannin) dan juga saponin. Polifenol menyebabkan kerusakan substrat serta penghambatan enzim sehingga bakteri tidak dapat melekat pada substrat (*early adherence*). Flavonoid memiliki efek anti inflamasi serta mampu menghambat senyawa adhesin. Adhesin berperan pada perlekatan sel bakteri di permukaan substrat sedangkan tannin memiliki kemampuan menginaktivasi adhesin, enzim, protein, transport dinding sel, dan merusak ikatan polisakarida dinding sel bakteri. Tannin secara khusus bekerja dengan membentuk kompleks dengan protein polipeptida dinding sel bakteri sehingga terjadi gangguan pada dinding bakteri dan bakteri lisis. Dengan demikian tannin memiliki efek pada proses *cell to cell adhesion*, dimana tannin mampu menghambat perlekatan antar sel bakteri yang kemudian menghambat terjadinya biofilm. Saponin mampu menurunkan *surface tension* dari biofilm dan menyebabkan terjadinya proses pelepasan dari biofilm, sehingga cara kerja saponin adalah menghambat terjadinya perlekatan baik irreversible atau reversible yang berakibat proses maturasi dan agregasi biofilm tidak dapat berjalan (Carvalho, 2004).

Belum banyak penelitian terkait efek daun dewandaru terhadap biofilm. Sejumlah penelitian telah dilakukan untuk melihat efek daun dewandaru terhadap sel kanker dan menunjukkan kemajuan yang positif. Hal ini dapat menjadi salah satu alasan yang menyebabkan sedikitnya penelitian efek ekstrak daun dewandaru terhadap pembentukan biofilm.

Dalam penelitian ini terdapat hambatan berupa karakter ekstrak daun dewandaru yang sukar larut dan keruh sehingga pembacaan OD mungkin lebih tinggi daripada seharusnya. Untuk kepentingan penelitian yang selanjutnya, hal ini dapat diatasi dengan menggunakan metode MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a yellow tetrazole) atau metode XTT (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide).

Metode MTT merupakan suatu metode dimana sistem respirasi bakteri berupa mitokondria dan sistem transport elektronnya mereduksi MTT dan membentuk suatu kristal keunguan yang tidak larut air di dalam sel (Freimoser *et al.*, 1999). *Purple MTT formazam* ini tidak larut dalam air, sehingga dalam pembacaan pada spektrofotometer memerlukan isopropanol asam (Wallert and Provost Lab, 2007). Jumlah kristal ini dapat ditentukan secara spektrofotometris dan menunjukkan jumlah mitokondria yang mewakili jumlah bakteri dalam sampel tersebut. Penghitungan ini dilakukan dengan menggunakan panjang gelombang 500-600nm (Freimoser *et al.*, 1999).

Metode XTT memiliki prinsip yang sama dengan metode MTT. Yang membedakan MTT dengan XTT hanyalah pewarna yang digunakan. Metode XTT dipercaya memiliki sensitivitas yang lebih tinggi daripada metode MTT. Pada metode XTT digunakan derivat dari tetrazolium, yang nantinya akan tereduksi menjadi produk berwarna *orange* yang sangat larut dalam air, sehingga bisa melewati langkah pelarutan yang diperlukan pada metode MTT (Freimoser *et al.*, 1999). Diharapkan dengan menggunakan metode MTT atau XTT, penelitian selanjutnya bisa menghasilkan data yang lebih baik.

BAB 7 PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak daun dewandaru (*Eugenia uniflora*) dapat menghambat pembentukan biofilm yang dihasilkan oleh bakteri *S.aureus*.

Kesimpulan khusus yang bisa didapat dari penelitian ini adalah :

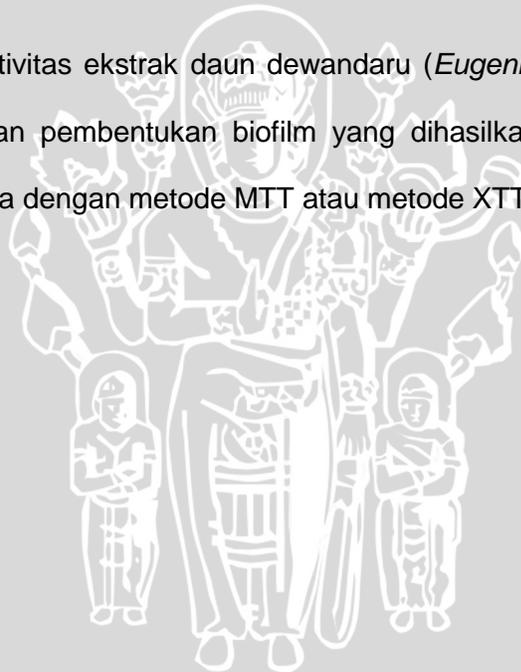
1. Kadar Hambat Minimal yang dapat menghambat pembentukan biofilm (MBIC = *Minimal Biofilm Inhibitory Concentration*) adalah pada konsentrasi 0,015 g/dL.
2. Kadar Hambat Maksimum yang dapat menghambat pembentukan biofilm adalah pada konsentrasi 1,67 g/dL.
3. Konsentrasi ekstrak 3,33 g/dL tidak memiliki perbedaan yang signifikan hanya dengan konsentrasi 1,67 g/dL. Konsentrasi 0,21 g/dL, 0,11 g/dL, dan 0,06 g/dL juga tidak memiliki hasil yang signifikan antara satu dengan yang lain. Selain yang disebut di atas terdapat perbedaan yang signifikan antara konsentrasi ekstrak daun dewandaru satu dengan yang lain.

7.2 Saran

Setelah diketahui bahwa pemberian ekstrak daun dewandaru (*Eugenia uniflora*) memberikan pengaruh pada penghambatan pembentukan biofilm yang

dihasilkan bakteri *S.aureus* dan hasil yang didapat tidak menunjukkan perbedaan pada saat penambahan konsentrasi ekstrak, maka perlu dilakukan penelitian yang lebih lanjut berupa :

1. Meneliti efektivitas ekstrak daun dewandaru (*Eugenia uniflora*) terhadap penghambatan pembentukan biofilm yang dihasilkan bakteri *S.aureus* dengan menggunakan metode MTT atau metode XTT yang mana prosedurnya tidak dipengaruhi oleh karakter ekstrak yang keruh dan sukar larut.
2. Meneliti efektivitas ekstrak daun dewandaru (*Eugenia uniflora*) terhadap penghambatan pembentukan biofilm yang dihasilkan bakteri penghasil biofilm lainnya dengan metode MTT atau metode XTT.



DAFTAR PUSTAKA

- Astutik, Sri. 2011. *Dewandaru (Cerma Belanda), Si Kecil yang Berkhasiat*
<http://ksupointer.com/dewandaru-cermai-belanda-si-kecil-yang-berkhasiat>
(diakses tanggal 9 Desember 2011).
- Akiyama, Hisanori, Kazuyasu Fujii, Osama Yamasakai, Takashi Oono, and Keiji Iwatsuki. 2001. Antibacterial Action of Several Tannins Against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48 : 487-491.
- Aricola *et al.* 2002. Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for ica locus. *Elsevier*, 2002, 23 : 4233-4239.
- Bos, R., H.C. van der Mei, and H. J. Busscher. 1999. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions – its mechanism and methods for study. *FEMS Microbiol Rev* 23:179-230.
- Brooks Geo F., Butel James S., Morse Stephen A. 1996. *Medical Microbiology*, Elferia R.N (Ed), 2007. *Mikrobiologi Kedokteran*, Hartanto Huriawati (penterjemah), ECG, Jakarta, Indonesia.
- Carvalho, Carla C. C. R. 2006. "Biofilms: Recent Developments on an Old Battle" *Recent Patents on Biotechnology* 2007, 1, 49-57.
- Christensen, Gordon D., Simpson W., Anglen, Jeffrey O., Gainor, Barry J., 2000. *Handbook of Bacterial Adhesion*. New Jersey: Humana Press Inc.
- Consolini, A.E., and Sarubbio, M.G., 2002, Pharmacological effects of *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) aqueous crude extract on rats heart, *Journal of Ethno pharmacology*, 81, 57-63.
- Costerton J.W. Introduction to Biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 1999; 11: 217-221.
- Costerton J.W., Stewart Philip S., Greenberg E.P. Bacterial Biofilm : A Common Cause of Persistent Infections in Microbes, Immunity and Disease. *Science Mag*, 1999, 284: 1318-1322.
- Cowan, M. M. 1999. *Clinical Microbiology Reviews - Plants Products as Antimicrobial Agents*. (Online). (<http://cmr.asm.org/cgi/reprint/12/4/564>, diakses tanggal 31 Oktober 2011).
- Crespo, I., Mari´a V. Garc´ıa-Mediavilla, Bele´n Gutie´rrrez, Sonia Sa´nchez-Campos, Mari´a J. Tun´o´n, and Javier Gonza´lez-Gallego, 2008, "A comparison of the

effects of kaempferol and quercetin on cytokine-induced pro-inflammatory status of cultured human endothelial cells”, *British Journal of Nutrition* (2008), 100, 968–976.

Cushnie. T.P. Tim, Lamb. Andrew J. Antimicrobial activity of flavonoids. *Journal of Antimicrobial Agents*, 2005; 26 (5) :343-356.

Domrachev M., Federhen S., Hotton C., Leipe D., Soussov V., Sharma S. *et al.* 2008 *Taxonomy Browser – S. aureus* (Online). (www.ncbi.nlm.nih.gov , diakses pada 31 Desember 2011).

Donlan Rodney M., Costerton J.William. Biofilm: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbial Reviews*, 2002 15(2) : 167-193.

Dzen, S.J.; Roekistiningsih; Santoso, S.; Winarsih, S. 2003. Bakteriologi Medik. 1st Ed. Malang: Bayumedia Publishing. Hal 132-140.

Einbond, L.S., K.A. Reynertson, X.D. Luo, M.J. Basile and E.J. Kennelly, 2004. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. *Food Chem.*, 84: 23-28.

Ferro, E., A. Schinini, M. Maldonado, J. Rosner and G.S. Hirschman, 1988, Eugenia uniflora leaf extract and lipid metabolism in Cebus apella monkeys. *Journal of Ethnopharmacology* 24:321-325.

Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. 2007. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology 12th Edition*. USA : Mosby.

Flemming H-C, Wingender J, Griegbe, Mayer C. Physico-chemical properties of biofilms. In: Evans LV, editor. *Biofilms: recent advances in their study and control*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers; 2000. p. 19-34.

Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase-negative staphylococci. *J Clin Pathol* 1989;42:872–4.

Freimoser, Florian M., Jakob Claude A., Aebi Markus, Tuor Urs. 1999. The MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] Assay Is a Fast and Reliable Method for Colorimetric Determination of Fungal Cell Densities. *Appl Environ Microbiol.*1999. 65(8): 3727–3729

Gad, G.F.M., El-Feky, M.A., El-Rehewy, M.S., Hassan, M.A., Abolella, H., El-Baky, R.M.A. 2008. “ Detection of *icaA*, *icaD* genes and biofilm production by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from urinary tract catheterized patients”. *J Infect Dev Ctries* 2009; 3(5):342-351.

Gemmell, C.G., Edwards, D.I., Fraise, A.P. 2006. *Guidelines for the prophylaxis and treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) infections in*

the UK (Online). (<http://www.pubmedcentral.nih.gov>, diakses pada 30 Oktober 2010).

Gerke C, Kraft A, Sussmuth R, Schweitzer O & Gotz F (1998) Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *J Biol Chem* 273: 18586–18593.

GI-stndag Z., Giuseppe M., 2007. *Saponins: Properties, Applications and Processing*. (Online). (<http://www.redorbit.com>, diakses pada 22 November 2012).

Handa, S.S.; Khanuja, S.P.S.; Longo, G.; Rakesh, D.D. (Eds.). 2008. *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*. Trieste. International Center for Science and High Technology.

Health Protection Agency. 2010. *Catalase Test*. National Standard Method BSOP TP 8 Issue 2. (http://www.hpa-standardmethods.org.uk/pdf_sops.asp, diakses pada 30 Maret 2012).

Hutapea, J.R., 1994, Inventaris Tanaman Obat Indonesia, Jilid III, Departemen Kesehatan RI dan Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, 29-30.

Jain Amita, Agarwal Astha. Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci. *Journals of Microbiological Methods*, 2008, 76 : 88–92.

Jamilah, It. 2002. *Biofilm Sebagai Mikrolingkungan Bakteri yang Unik : Seberapa Jauh Kita Mengenalnya?*, (Online), (www.rudycr.com/PPS702-ipb/05123/it_jamilah.htm, diakses tanggal 31 Oktober 2011).

Jass J., Surman S, Walker J. 2003. *Medical Biofilm : Detection, Prevention and Control*. England : John Wiley and Sons, Ltd.

Jawetz E, Levinson EW. 1996. *Medical Microbiology and Immunology*. New York: Lange Medical Book.

Joklik, et al. *Staphylococcus*, in *Zenser Microbiology, 20th edition*. 1992. Canada : Prentice-Hall International Inc., p : 403-413.

Karamać M., Kosińska A. , Rybarczyk A., Amarowicz R., 2007. "Extraction and Chromatographic Separation of Tannin Fractions From Tannin-Rich Plant Material". *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 2007, Vol. 57, No. 4, pp. 471–474

Lee, M., Chiou, J., Yen, K., and Yang, L., 2000, EBV DNA polymerase Inhibition of tannins from *Eugenia uniflora*, *Cancer Letters*, 154, 131-136.

Lindsay, D., dan A. Von Holy. 2006. Bacterial Biofilm within the clinica setting: what healthcare professional should know. *J Hosp Infect* 64:313-325

Markham, K.R., 1988, *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*, 1-103. terjemahan Kosasih Padmawinata, Bandung, Penerbit ITB.

Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay DJ, Fatma T, Rattan A.. 2006. *Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods* (Online). (<http://www.ijmm.org>, diakses pada 17 Mei 2012).

Matsumura, T., Kasai, M., Hayashi, T., Arisawa, M., Momose, Y., Arai, I., 2000, A Glucosidase inhibitors fromParaguay an Natural medicine, Nangapiry, the leaves of *Eugenia uniflora*, *Pharmaceutical Biology*, 38, 302-307.

Moore, G.Elizabeth. 2009. *Biofilm Production by Streptococcus uberis Associated with Intramammary Infections*. www.trace.tennessee.edu/utk_chanhonoproj/1299.

Morton, J. 1987. *Fruits of warm climates*. Miami, FL. Julia F. Morton.

Naim R. 2004. Senyawa Antimikroba dari Tanaman (Online). (<http://kompas.com/kompas-cetak/0409/15/sorotan/1265264.htm>, diakses tanggal 20 April 2012).

Notobroto BH. 2005. Penelitian Eksperimental dalam Materi Praktikum Teknik Sampling dan Penghitungan Besar Sampel Angka 3. Surabaya : Lembaga Penelitian Universitas Airlangga.

Nuryastuti, Titik. 2010. *Environmental Signals affecting ica-expression in Staphylococcus Epidermidis Biofilm*. Yogyakarta : Niaga Sejati.

Pace JL, Rupp ME, Finch RG.2006. Biofilm, Infection, and Antimicrobial Therapy. USA : CRC Press Taylor and Francis Group.

Remel. 2011. Staphaurex, (Online), (<http://www.remel.com/Clinical/DiagnosticTests/Staphaurex.aspx>, diakses tanggal 18 September 2012).

Schmeda-Hirschmann, G., C. Theoduloz, L. Franco, E. Ferro and A. Rojas De Arias, 1987, Preliminary pharmacological studies on *Eugenia uniflora* leaves: xanthine oxi-dase inhibitory activity, *Journal of Ethnopharmacology* 21:183-186.

Sathishkumar T., Baskar R., Shanmugam S., Rajasekaran P., Sadasivam S., and Manikandan V., 2008, "Optimization of flavonoids extraction from the leaves of *Tabernaemontana*

heyneana Wall. using L16 Orthogonal design”, *Nature and Science*. 2008;6(3): p. 10-21

Stepanovic S. *et al.*,1999. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiology*, 40: 175-179.

Todar K.2008. Staphylococcus. http://www.textbookofbacteriology.net/staph_3.html.

Van Steenis,C.G.G.J. 1997. Flora. Pradnya Paramita: Jakarta.

Vuong C, Kocianova S, Voyich JM, Yao Y, Fischer ER, DeLeo FR & Otto M (2004) A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *J Biol Chem* 279: 54881–54886.

Wallert and Provost Lab. 2007. Proliferation Assay MTT Protocol. (Online). (http://www.mnstate.edu/provost/MTT_Proliferation_Protocol.pdf, diakses tanggal 23 Februari 2012)

WHO. *Bacterial Infections*, (Online), (http://www.who.int/vaccine_research/diseases/soa_bacterial/en/index2.html, diakses tanggal 1 Oktober 2011).



Lampiran

Lampiran 1

Optical Density biofilm bakteri *S. aureus* isolat urin yang diukur dengan spektrofotometri (ELISA reader)

Konsentrasi	Pengulangan				Mean ± SD
	I	II	III	IV	
2%	$4,1 \times 10^{-2}$	$3,7 \times 10^{-2}$	$3,5 \times 10^{-2}$	$3,6 \times 10^{-2}$	$3,7 \times 10^{-2} \pm 2,6 \times 10^{-3}$
1%	$3,7 \times 10^{-2}$	$4,2 \times 10^{-2}$	$4,1 \times 10^{-2}$	4×10^{-2}	$4 \times 10^{-2} \pm 2,2 \times 10^{-3}$
0,5%	$5,1 \times 10^{-2}$	$4,8 \times 10^{-2}$	$4,3 \times 10^{-2}$	$5,2 \times 10^{-2}$	$4,8 \times 10^{-2} \pm 4 \times 10^{-3}$
0,25%	$6,2 \times 10^{-2}$	$6,4 \times 10^{-2}$	$6,9 \times 10^{-2}$	$6,7 \times 10^{-2}$	$6,6 \times 10^{-2} \pm 3,1 \times 10^{-3}$
0,125%	$7,5 \times 10^{-2}$	$7,6 \times 10^{-2}$	$7,6 \times 10^{-2}$	$7,8 \times 10^{-2}$	$7,6 \times 10^{-2} \pm 1,3 \times 10^{-3}$
0,06%	$7,6 \times 10^{-2}$	$7,7 \times 10^{-2}$	$7,7 \times 10^{-2}$	$7,7 \times 10^{-2}$	$7,7 \times 10^{-2} \pm 5 \times 10^{-4}$
0,03%	$7,7 \times 10^{-2}$	$8,1 \times 10^{-2}$	$7,9 \times 10^{-2}$	8×10^{-2}	$7,9 \times 10^{-2} \pm 1,7 \times 10^{-3}$
0,015%	$10,1 \times 10^{-2}$	$9,2 \times 10^{-2}$	$10,6 \times 10^{-2}$	$10,4 \times 10^{-2}$	$10,1 \times 10^{-2} \pm 6,2 \times 10^{-3}$
0%	17×10^{-2}	18×10^{-2}	$17,5 \times 10^{-2}$	18×10^{-2}	$17,6 \times 10^{-2} \pm 4,8 \times 10^{-3}$

Lampiran 2 Uji Normalitas dan Homogenitas

1. Uji Normalitas Sebaran Data

Untuk menguji apakah sampel penelitian mempunyai sebaran data yang normal, maka dalam penelitian ini digunakan Uji Kolmogorov-Smirnov terhadap tiap-tiap variabel.

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
		OD
N		36
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	.077611
	Std. Deviation	.0398614
	Absolute	.224
Most Extreme Differences	Positive	.224
	Negative	-.149
Kolmogorov-Smirnov Z		1.341
Asymp. Sig. (2-tailed)		.055

Nilai 0,055 yang berarti bahwa distribusi data normal

a. Test distribution is Normal.
b. Calculated from data.

signifikansi = ($p > 0,05$)

2. Uji Homogenitas Variansi Data

Test of Homogeneity of Variances			
OD			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.114	8	27	.070

Nilai signifikansi ($p > 0,05$) yang berarti data mempunyai ragam (varians) yang relatif homogen.

= 0,070

Lampiran 3
Uji One Way Anova
ANOVA

OD

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.055	8	.007	582.249	.000
Within Groups	.000	27	.000		
Total	.056	35			

Nilai signifikansi = 0,000 ($p < 0,05$) yang berarti bahwa ada perbedaan signifikan pada perubahan konsentrasi terhadap jumlah koloni.



Lampiran 4
Post Hoc Test

Multiple Comparisons

Dependent Variable: OD

Tukey HSD

(I) konsentrasi	(J) konsentrasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
0%	0,015625%	.0755000*	.0023979	.000
	0,03125%	.0970000*	.0023979	.000
	0,0625%	.0995000*	.0023979	.000
	0,125%	.1000000*	.0023979	.000
	0,25%	.1107500*	.0023979	.000
	0,5%	.1277500*	.0023979	.000
	1%	.1362500*	.0023979	.000
	2%	.1390000*	.0023979	.000
	0%	-.0755000*	.0023979	.000
0,015625%	0,03125%	.0215000*	.0023979	.000
	0,0625%	.0240000*	.0023979	.000
	0,125%	.0245000*	.0023979	.000
	0,25%	.0352500*	.0023979	.000
	0,5%	.0522500*	.0023979	.000
	1%	.0607500*	.0023979	.000
	2%	.0635000*	.0023979	.000
	0%	-.0970000*	.0023979	.000
	0,015625%	-.0215000*	.0023979	.000
0,03125%	0,0625%	.0025000	.0023979	.978
	0,125%	.0030000	.0023979	.937
	0,25%	.0137500*	.0023979	.000
	0,5%	.0307500*	.0023979	.000
	1%	.0392500*	.0023979	.000
	2%	.0420000*	.0023979	.000
	0%	-.0995000*	.0023979	.000
	0,015625%	-.0240000*	.0023979	.000
	0,03125%	-.0025000	.0023979	.978
0,0625%	0,125%	.0005000	.0023979	1.000

0,125%	0,25%	.0112500*	.0023979	.002
	0,5%	.0282500*	.0023979	.000
	1%	.0367500*	.0023979	.000
	2%	.0395000*	.0023979	.000
	0%	-.1000000*	.0023979	.000
	0,015625%	-.0245000*	.0023979	.000
	0,03125%	-.0030000	.0023979	.937
	0,0625%	-.0005000	.0023979	1.000
	0,25%	.0107500*	.0023979	.003
	0,5%	.0277500*	.0023979	.000
	1%	.0362500*	.0023979	.000
	2%	.0390000*	.0023979	.000
	0%	-.1107500*	.0023979	.000
0,25%	0,015625%	-.0352500*	.0023979	.000
	0,03125%	-.0137500*	.0023979	.000
	0,0625%	-.0112500*	.0023979	.002
	0,125%	-.0107500*	.0023979	.003
	0,5%	.0170000*	.0023979	.000
	1%	.0255000*	.0023979	.000
	2%	.0282500*	.0023979	.000
	0%	-.1277500*	.0023979	.000
	0,015625%	-.0522500*	.0023979	.000
	0,03125%	-.0307500*	.0023979	.000
	0,0625%	-.0282500*	.0023979	.000
	0,125%	-.0277500*	.0023979	.000
	0,25%	-.0170000*	.0023979	.000
0,5%	1%	.0085000*	.0023979	.033
	2%	.0112500*	.0023979	.002
	0%	-.1362500*	.0023979	.000
	0,015625%	-.0607500*	.0023979	.000
	0,03125%	-.0392500*	.0023979	.000
	0,0625%	-.0367500*	.0023979	.000
	0,125%	-.0362500*	.0023979	.000
	0,25%	-.0255000*	.0023979	.000
	0,5%	-.0085000*	.0023979	.033
	2%	.0027500	.0023979	.961



	0%	- .1390000*	.0023979	.000
	0,015625%	-.0635000*	.0023979	.000
	0,03125%	-.0420000*	.0023979	.000
2%	0,0625%	-.0395000*	.0023979	.000
	0,125%	-.0390000*	.0023979	.000
	0,25%	-.0282500*	.0023979	.000
	0,5%	-.0112500*	.0023979	.002
	1%	-.0027500	.0023979	.961

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.



Lampiran 5
Hasil Uji Regresi Linier Sederhana

ANOVA^a

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	.021	1	.021	19.415	.000 ^b
	Residual	.037	34	.001		
	Total	.058	35			

a. Dependent Variable: OD

b. Predictors: (Constant), konsentrasi

Coefficients^a

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	.095	.007		14.174	.000
	konsentrasi	-.038	.009	-.603	-4.406	.000

a. Dependent Variable: OD

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ester Hans Sunanto
NIM : 0910714971
Program Studi : Program Studi Kedokteran Umum

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

menyatakan dengan sebenarnya bahwa tugas akhir yang saya tulis ini benar-benar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya sendiri. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan tugas akhir ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 21 November 2012

Yang membuat pernyataan,

Ester Hans Sunanto
NIM. 0910714071