EFEK EKSTRAK KULIT BUAH MANGGIS (*Garcinia mangostana L.*) DALAM MENGHAMBAT PEMBENTUKAN BIOFILM *Staphylococcus aureus* SECARA *IN VITRO*

TUGAS AKHIR

Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran Umum

Oleh:
Christian Setiawan
0910714065

PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2012

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

HALAMAN PERSETUJUAN

TUGAS AKHIR

EFEK EKSTRAK KULIT BUAH MANGGIS (*Garcinia mangostana L.*) DALAM MENGHAMBAT PEMBENTUKAN BIOFILM *Staphylococcus aureus* SECARA *IN VITRO*

Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran Umum

Oleh:

Christian Setiawan
NIM: 0910714065

Menyetujui untuk diuji,

Pembimbing I	**Pembimbing II**
Prof. Dr. dr. Sanarto Santoso DTM&H, SpMK	Dr. dr. Endang Sriwahyuni,MS
NIP. 194812201980021002	NIP. 195210081980032002

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

EFEK EKSTRAK KULIT BUAH MANGGIS (*Garcinia mangostana L.*) DALAM MENGHAMBAT PEMBENTUKAN BIOFILM *Staphylococcus aureus* SECARA *IN VITRO*

Oleh :

CHRISTIAN SETIAWAN

NIM : 0910714065

Telah diuji pada

Hari : Selasa

Tanggal : 27 November 2012

dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji I

Agustina Tri Endharti, S.Si, PhD

NIP. 196908191998022001

Penguji II/ Pembimbing I

Prof. Dr. dr. Sanarto Santoso DTM&H, SpMK

NIP. 194812201980021002

Penguji III/Pembimbing II

Dr. dr. Endang Sriwahyuni,MS

NIP. 195210081980032002

Mengetahui,

Ketua Jurusan Kedokteran

Prof.Dr.dr. Teguh Wahju Sardjono,DTM&H.,M.SC.,Sp.Par.K

NIP. 19520410 198002 1001

KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Tuhan Yang Maha Esa yang telah memberi petunjuk dan berkah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir dengan judul "Efek Ekstrak Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana L.*) dalam Menghambat Pembentukan Biofilm *Staphylococcus aureus* secara *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 Mintaroem SpPA, 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, SpMK 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. Endang Sriwahyuni, MS sebagai pembimbing kedua yang telah memberikan bimbingan, saran, dan masukan, sehingga saya dapat menyelesaikan Tugas Akhir ini.
4. Bu Agustina Tri Endharti, S.Si, PhD yang bersedia menjadi ketua tim penguji Tugas Akhir serta memberikan masukan untuk Tugas Akhir saya.

5. Kedua orang tua saya, Ir. Andi Setiawan dan Melisa serta keluarga besar yang selalu memberikan semangat dan dukungan baik moral maupun material dalam proses penyelesaian Tugas Akhir ini.
6. Tim TA Biofilm yang menjadi teman sejati dalam segala hal yang mana saling membantu, Chatryn Megawati Soetanto, Ester Hans Sunanto, dan Meylita. Tanpa kalian mungkin Tugas Akhir ini baru selesai tahun depan.
7. Para personil laboratorium Mikrobiologi FKUB, Mas Slamet, Mbak Uci, 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, 27 November 2012

Penulis

ABSTRAK

Setiawan, Christian. 2012. *Efek Ekstrak Kulit Buah Manggis (Garcinia mangostana L.) dalam Menghambat Pembentukan Biofilm Staphylococcus aureus secara In Vitro.* Tugas Akhir, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Prof. Dr. dr. Sanarto Santoso DTM&H, SpMK (2) Dr. dr. Endang Sriwahyuni, MS

Infeksi *Staphylococcus aureus* saat ini telah berkembang menjadi masalah kesehatan yang serius *S. aureus* merupakan penyebab utama pada infeksi nosokomial di rumah sakit dan infeksi yang terkait dengan *indwelling medical device*s. Biofilm, yang biasanya dibentuk oleh organisme yang resisten terhadap antimikrobial dan sistem imun tubuh, bertanggung jawab atas 65% kasus infeksi di negara berkembang. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui apakah ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L.)* dapat menghambat pembentukan biofilm. Beberapa penelitian terdahulu menyebutkan bahwa kulit buah manggis mengandung senyawa xanthone, flavonoid, kuinon, epicatechin, monoterpenoid, dan tannin. Senyawa tersebut diperkirakan dapat menghambat biofilm dengan berbagai mekanisme seperti menghambat perlekatan bakteri ke matriks inang dan proliferasi dan akumulasi bakteri. Desain penelitian ini adalah *true experiment post-test only control group design.* Sampel diperoleh dari *stock culture* Laboratorium Mikrobiologi FKUB. Penghambatan biofilm pada 96 *wellplate* diamati dengan metode *Tissue Culture Plate* yang kemudian dibaca hasilnya dengan ELISA reader untuk memperoleh nilai *Optical Density*. Konsentrasi ekstrak kulit buah manggis yang digunakan adalah 0 g/dL (kontrol positif), 6,7 g/dL; 5 g/dL; 4,2 g/dL; 3,3 g/dL; 1,67 g/dL; 0,83 g/dL; 0,42 g/dL dan 0,21 g/dL. Analisa data yang digunakan adalah Uji *One Way ANOVA,* dan Uji Korelasi *Pearson*. Hasil statistik Uji *One Way ANOVA* menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan pada perubahan konsentrasi ekstrak kulit buah manggis terhadap nilai *Optical Density (OD)* bakteri ($p<0,05$). Uji Korelasi *Pearson* ($r = -0,723$: $p<0,05$) menunjukkan adanya hubungan terbalik yang kuat antara konsentrasi ekstrak dengan nilai *OD*. Dari hasil penelitian ini disimpulkan bahwa ekstrak kulit buah manggis dapat menghambat pembentukan biofilm dengan *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration (*MBIC) sebesar 0,21 g/dL.

Kata kunci: kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L.*), biofilm, *Staphylococcus aureus.*

ABSTRACT

Setiawan, Christian. 2012. *Effects of Mangosteen Rind Extract (Garcinia mangostana L.) in Inhibiting Biofilm Formation of Staphylococcus aureus In Vitro.* Final Assignment, Medical Faculty Brawijaya University. Supervisors: (1) Prof. Dr. dr. Sanarto Santoso DTM&H, SpMK (2) Dr. dr. Endang Sriwahyuni, MS

These days, *Staphylococcus aureus* infection has developed into a serious health problem. S. aureus is a major cause of nosocomial infections in hospitals and infections related to indwelling medical devices. Biofilms, which are usually formed by organisms resistant to antimicrobials and immune system, is responsible for 65% of cases of infection in developing countries. Therefore, this research is conducted to determine whether the mangosteen rind extract (*Garcinia mangostana L.*) can inhibit biofilm formation or not. Several studies mention that mangosteen rind contains xanthone, flavonoids, quinones, epicatechin, tannin, and monoterpenoid compounds. These compounds are expected to inhibit biofilm by various mechanisms such as inhibiting the attachment of bacteria to the host matrix and bacterial proliferation and accumulation. The design of this study is a true experiment post-test only control group design. Samples are obtained from the stock culture of Microbiology Laboratory of Medical Faculty Brawijaya University. Biofilm inhibition on 96-wellplate is observed with *Tissue Culture Plate* method and then read with the ELISA reader to obtain the value of Optical Density. Mangosteen rind extract concentration used are 0 g / dL (the positive control), 6.7 g / dL; 5 g / dL; 4.2 g / dL; 3.3 g / dL; 1.67 g / dL; 0.83 g / dL; 0.42 g / dL and 0.21 g / dL. Analysis of the data used is One Way ANOVA test and Pearson correlation test. The results of One Way ANOVA statistical test showed a significant difference in the change in concentration of mangosteen rind extract relative to the value of Optical Density (OD) of bacteria ($p < 0.05$). Pearson correlation test ($r = -0.723$: $p < 0.05$) showed a strong inverse relationship between the concentration of the extract and OD values. From the results of this study conclude that mangosteen rind extract can inhibit biofilm formation by Minimum Inhibitory Concentration Biofilm (MBIC) of 0.21 g / dL.

Key Words: mangosteen rind extract (*Garcinia mangostana L.)*, biofilm, *Staphylococcus aureus.*

DAFTAR ISI

		Halaman
Halaman Judul		
Halaman Persetujuan		i
Halaman Pengesahan		ii
Kata Pengantar		iii
Abstrak		v
Daftar Isi		vii
Daftar Singkatan		xi
Daftar Gambar		xii
Daftar Tabel		xiii
Daftar Lampiran		xiv
BAB 1	**Pendahuluan**	
1.1	Latar Belakang	1
1.2	Rumusan Masalah	3
1.3	Tujuan	4
1.3.1	Tujuan Umum	4
1.3.4	Tujuan Khusus	4
1.4	Manfaat Penelitian	4
1.4.1	Manfaat Teoritis	4
1.4.2	Manfaat Praktis	5
BAB 2	**Tinjauan Pustaka**	
2.1	*Staphylococcus aureus*	6
2.1.1	Klasifikasi	6
2.1.2	Karakteristik Kuman	7
2.1.2.1	Ciri-Ciri Organisme	7
2.1.2.2	Biakan	8
2.1.2.3	Sifat-Sifat Pertumbuhan	9
2.1.3	Struktur Antigen	11
2.1.4	Toksin dan Enzim	11

2.1.4.1	Katalase	11
2.1.4.2	Koagulase	12
2.1.4.3	Staphylokinase	12
2.1.4.4	Protease	12
2.1.4.5	Lipase	12
2.1.4.6	Fosfatase	13
2.1.4.7	DNA ase	13
2.1.4.8	Enzim lain	13
2.1.4.9	Eksotoksin	13
2.1.4.10	Leukosidin	14
2.1.4.11	Toksin Eksfoliatif	14
2.1.4.12	*Toxin Syndrome Shock Toxic*	14
2.1.4.13	Enterotoksin	14
2.1.5	Patogenesis	15
2.1.6	Patologi	15
2.1.7	Diagnosa Laboratorium	16
2.1.7.1	Spesimen	16
2.1.7.2	Biakan	17
2.1.7.3	Tes Katalase	17
2.1.7.4	Tes Koagulase	17
2.1.7.5	Tes Kepekaan Antibiotika	18
2.1.7.6	Uji Latex Aglutinase	18
2.1.8	Epidemiologi dan Pengendalian	19
2.2	Biofilm	19
2.2.1	Pengertian Biofilm	19
2.2.2	Struktur Biofilm	21
2.2.3	Pembentukan Biofilm	22
2.2.4	Faktor Lingkungan yang Mempengaruhi Pembentukan Biofilm	26
2.2.5	Pembentukan Biofilm pada Alat Medis	26
2.2.6	Tes Pembentukan Biofilm	26
2.2.6.1	Metode Tabung	26
2.2.6.2	Metode *Congo Red* Agar	27
2.2.6.3	Metode *Tissue Culture Plate*	28

2.3	Manggis (*Garcinia mangostana* L.)	29
2.3.1	Taksonomi	29
2.3.2	Epidemiologi dan Ekologi	29
2.3.3	*Morfologi*	30
2.3.4	Khasiat Manggis (*Garcinia mangostana* L.)	31
2.3.5	Kandungan Manggis (*Garcinia mangostana* L.)	32
2.3.6	Senyawa Penghambat Biofilm	34
BAB 3	**Kerangka Konsep dan Hipotesis Penelitian**	
3.1	Kerangka Konsep Penelitian	37
3.2	Hipotesis Penelitian	39
BAB 4	**Metode Penelitian**	
4.1	Rancangan dan Desain Penelitian	40
4.2	Populasi dan Sampel Penelitian	40
4.2.1	Pengulangan	41
4.3	Tempat dan Waktu Penelitian	41
4.4	Variabel Penelitian	41
4.4.1	Variabel Bebas	41
4.4.2	Variabel Tergantung	42
4.5	Definisi Operasional	42
4.6	Instrumen Penelitian (Bahan dan Alat)	43
4.6.1	Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* L.)	43
4.6.2	Alat dan Bahan Identifikasi Bakteri Pembenihan Murni	44
4.6.3	Alat dan Bahan Deteksi Biofilm dan Efek Anti Biofilm	44
4.7	Prosedur Penelitian	45
4.7.1	Persiapan Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* L.)	45
4.7.2	Persiapan Bakteri Staphylococcus aureus Pembentuk Biofilm	46
4.7.2.1	Identifikasi *Staphylococcus aureus*	46
4.7.2.2	Pembentukan Perbenihan Cair Bakteri	48
4.7.2.3	Uji Deteksi Pembentukan Biofilm	49
4.7.2.3.1	Congo Red Agar Method	49

4.7.3	Uji Hambatan Pembentukan Biofilm	49
4.8	Analisa Data	50
4.9	Skema Penelitian	51
BAB 5	**Hasil Penelitian dan Analisa Data**	
5.1	Hasil Penelitian	52
5.1.1	Hasil Identifikasi Bakteri	52
5.1.2	Hasi Uji Deteksi Pembentukan Biofilm	54
5.1.3	Hasil Uji Hambat Pembentukan Biofilm	54
5.2	Analisa Data	59
5.2.1	Uji *Kolmogorov-Smirnov*	59
5.2.2	Uji *One Way ANOVA*	60
5.2.3	Uji Korelasi *Pearson*	61
BAB 6.	**Pembahasan**	63
BAB 7	**Penutup**	
7.1	Kesimpulan	70
7.2	Saran	70
Daftar Pustaka		71
Lampiran		75
Pernyataan Keaslian Tulisan		81

DAFTAR SINGKATAN

BAP	: Blood Agar Plate
CFU	: Colony Forming Unit
CRA	: Congo Red Agar
ECM	: Extracellular Matrix
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FKUB	: Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
HIV/AIDS	: Human Immunodeficiency Virus/Acquired Immunodeficiency Syndrome
IUD	: Intrauterine Device
MBIC	: Minimal Biofilm Inhibitory Concentration
MIC	: Minimal Inhibitory Concentration
MLC	: Minimum Lethal Concentration
MRSA	: Methicillin- Resistant *Staphylococcus aureus*
MSCRAMMs	: Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules
NAP	: Nutrient Agar Plate
OD	: Optical Density
PBS	: Phosphat Buffer Saline
PIA	: Polysaccharide Intercellular Adhesion
TSBglu	: Trypticase Soy Broth Glukosa
TSST-1	: Toxin Shock Syndrome Toxic-1
VRSA	: Vancomycin- Resistant *Staphylococcus aureus*
WHO	: World Health Organization

DAFTAR GAMBAR

		Halaman
Gambar 2.1	Pewarnaan Gram *Staphylococcus aureus* dari Eksudat Pus	7
Gambar 2.2	Gambaran Mikrografi Elektron *Staphylococcus aureus*	8
Gambar 2.3	Biakan *Staphylococcus aureus* pada Blood Agar Plate	9
Gambar 2.4	Lokasi Infeksi dan Penyakit karena *Staphylococcus aureus*	16
Gambar 2.5	Ilustrasi Mikroba di Biofilm Berbicara Satu sama Lain Menggunakan Sinyal Kimia untuk Membangun Mikrokoloni	20
Gambar 2.6	Fase dalam Perkembangan Biofilm pada Staphylococci.	25
Gambar 2.7	Morfologi Koloni *S. aureus* pada Congo Red Agar dengan Trypticase Soy Broth (TSB).	28
Gambar 2.8	Pohon Manggis (A) dan Buah Manggis (B)	29
Gambar 5.1	Koloni *Staphylococcus aureus* pada Medium NAP	53
Gambar 5.2	Pengamatan Mikroskopis *Staphylococcus aureus*	53
Gambar 5.3	Tes Katalase	53
Gambar 5.4	Tes Koagulase	54
Gambar 5.5	Hasil Uji Deteksi Pembentukan Biofilm	54
Gambar 5.6	Hasil Uji Hambat Pembentukan Biofilm	57
Gambar 5.7	Grafik Perbandingan Konsentrasi Ekstrak terhadap Nilai Mean *Optical Density* (OD) Bakteri	58

DAFTAR TABEL

		Halaman
Tabel 5.1	Hasil Pembacaan ELISA Reader Penelitian Pendahuluan Eksplorasi Dosis Ekstrak	56
Tabel 5.2	Hasil Pembacaan ELISA Reader Uji Hambat Pembentukan Biofilm	58
Tabel 5.3	Hasil Uji *Post Hoc Multiple Comparison Test* Intensitas Warna Biofilm	60
Tabel 5.4	Hasil Uji Korelasi *Pearson*	61

DAFTAR LAMPIRAN

		Halaman
Lampiran 1	Uji Pre-Analitik	75
Lampiran 2	Uji ANOVA	76
Lampiran 3	Uji Korelasi *Pearson*	80

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Staphylococcus aureus merupakan flora normal yang berkolonisasi paling banyak di lubang hidung. Tetapi, selain itu, *S. aureus* ini juga dapat ditemukan di kulit, rongga mulut dan saluran cerna. Pada individu sehat, biasanya hanya berperan sebagai karier. Infeksi serius akan terjadi ketika resistensi individu melemah karena adanya perubahan hormon, adanya penyakit, luka, atau penggunaan steroid atau obat lain yang bersifat immunosupresan terhadap individu tersebut (Madigan *et. al.*, 2008).

Infeksi yang invasif juga dapat terjadi di kulit pada orang-orang yang sehat, mulai dari impetigo sampai pembentukan abses, selulitis dan limfadenitis. *S.aureus* juga merupakan penyebab tersering pada endokarditis dengan komplikasi seperti perikarditis, infeksi saluran pernafasan, *osteomyelitis* dan *septic arthritis*. Pada estimasi sementara, *S.aureus* bertanggung jawab dari 25%-35% kasus endokarditis (WHO,2010).

Peningkatan infeksi bakteri *S.aureus* saat ini telah berkembang dengan pesat dan menjadi masalah kesehatan yang serius. *S. aureus* juga merupakan penyebab utama pada infeksi nosokomial di rumah sakit pada luka operasi dan infeksi yang terkait dengan *indwelling medical device*s. *S. aureus* dapat menyebabkan keracunan makanan dengan cara melepaskan enterotoxins ke makanan, dan *toxic shock syndrome* dengan melepaskan superantigen ke dalam aliran darah (Todar, 2011).

Staphylococcus aureus juga menjadi penyebab tersering infeksi pada penggunaan alat-alat medis seperti pada *prosthetic heart valves*, *central venous cathehers*, *urinary catheters*, lensa kontak, IUD dan implan gigi. Hal 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 (Donlan, 2002).

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. Biofilm dari mikrobial, yang biasanya dibentuk oleh organisme yang resisten terhadap antimikrobial, bertanggung jawab atas 65% kasus infeksi di negara berkembang (Donlan, 2002; Costerton *et al*,1999).

Karena perkembangan itu, di berbagai belahan dunia telah dan sedang dilakukan banyak penelitian terhadap pencarian bahan-bahan yang dapat menghambat pembentukan biofilm oleh bakteri. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Vishnu P *et. al.*,2010, ekstrak kulit buah manggis mempunyai aktivitas antibakterial yang efektif melawan bakteri *S. aureus*, dimana pada penelitian ini didapatkan *Minimal Inhibitory Concentration* (MIC) ekstrak sebesar 200 µg/mL. Maka dari itu, penulis akan menggunakan ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L.*) sebagai bahan yang diperkirakan dapat menghambat pembentukan biofilm. Tanaman ini mempunyai kandungan zat aktif seperti *xanthone, kuinon, flavonoid, tannin, epicatechin*, dan *monoterpenoid* yang diduga

mampu menghambat pembentukan biofilm. Kandungan zat aktif yang terdapat dalam ekstrak kulit buah manggis merupakan kombinasi yang sangat menguntungkan untuk menghambat pembentukan biofilm (Pradipta *et. al.*, 2004; Vishnu P *et. al.*,2010).

Berbagai penelitian membuktikan bahwa kulit buah manggis memiliki khasiat yang paling tinggi dibandingkan bagian lain dari tanaman buah manggis. Penelitian *review* yang dilakukan oleh J. Pedraza-Chaverri *et. al.,* 2008, mengungkapkan bahwa banyak studi eksperimental yang telah membuktikan bahwa ekstrak kulit buah manggis mempunyai efek antioksidan, antitumoral, antialergi, anti-inflamasi, antibakteri, dan antivirus. Kulit buah manggis ini sangat baik untuk tubuh sehingga dapat menyembuhkan berbagai jenis penyakit mulai dari yang ringan seperti: sariawan, luka, wasir, dan keputihan, hingga penyakit berat seperti diabetes, jantung koroner, kanker payudara, hingga HIV/ AIDS (Mardiana, 2011).

Maka untuk membuktikan fakta di atas, maka diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai manfaat ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L.*) sebagai penghambat pembentukan biofilm pada bakteri *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L.*) dapat menghambat pembentukan biofilm pada bakteri *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui efek dari ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L.*) dalam menghambat pembentukan biofilm pada bakteri *S.aureus* secara *in vitro*.

1.3.2 Tujuan Khusus

1.3.2.1 Untuk mengetahui efek dari masing-masing konsentrasi ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L.*) dalam menghambat pembentukan biofilm pada bakteri *S.aureus.*

1.3.2.2 Untuk mengetahui apakah masing-masing konsentrasi ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L.*) mempunyai hasil yang siginifikan jika dibandingkan terhadap satu sama lain dalam menghambat pembentukan biofilm pada bakteri *S.aureus* secara *in vitro.*

1.3.2.3 Untuk mengetahui Kadar Hambat Minimal yang dapat menghambat pembentukan biofilm (MBIC = *Minimal Biofilm Inhibitory Concentration*) dari ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L.*) pada *S.aureus* secara *in vitro*.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

- Dapat dijadikan sebagai dasar teori untuk menambah ilmu pengetahuan dalam bidang kesehatan tentang kegunaan ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L.*) terhadap pembentukan biofilm oleh bakteri *S.aureus* secara *in vitro.*

- Dapat menambah ilmu yang dapat digunakan lebih lanjut untuk pengembangan penelitian lebih lanjut mengenai anti biofilm pada bakteri *S.aureus.*

1.4.2 Manfaat Praktis

- Dapat meningkatkan pengetahuan masyarakat dalam pemanfaatan tanaman obat tradisional khususnya kulit buah manggis.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Staphylococcus aureus*

2.1.1 Klasifikasi

Staphylococci adalah bakteri kokus Gram positif, yang biasanya berbentuk seperti anggur yang tidak teratur. Bakteri ini dapat dikultur di medium normal dalam keadaan aerob maupun anaerob. Genus *Staphylococcus* sendiri sekurang-kurangnya memiliki 35 spesies. Tiga spesies utama dengan kepentingan klinis meliputi *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis,* dan *Staphylococcus saprophyticus*. *Staphylococcus aureus* adalah koagulase positif, yang mana membedakan dengan spesies lain. *S aureus* adalah kuman pathogen utama manusia. Hampir 75% infeksi *Staphylococcus* koagulase negatif disebabkan oleh *S. epidermidis*. *S saprophyticus* biasanya merupakan penyebab utama infeksi traktus urinarius pada pasien wanita muda. Spesies lain penting dalam bidang kedokteran hewan (Kayser, 2005; Jawetz *et. al.*,2007).

Taksonomi dari bakteri *Staphylococcus aureus* adalah sebagai berikut:

Domain : Bacteria

Kingdom : Bacteria

Phylum : Firmicutes

Class : Cocci

Order : Bacillales

Family : Staphylococcaceae

Genus : Staphylococcus

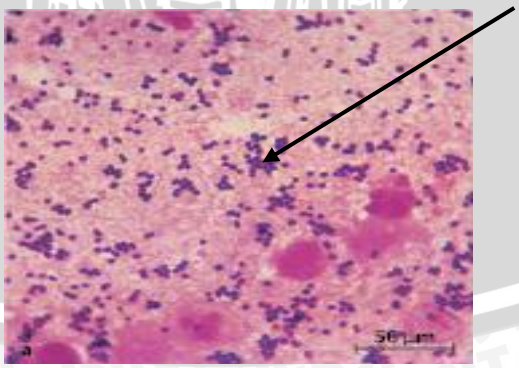
Species : *Staphylococcus aureus* (Domrachev *et. al.,* 2008)

2.1.2 Karakteristik Kuman

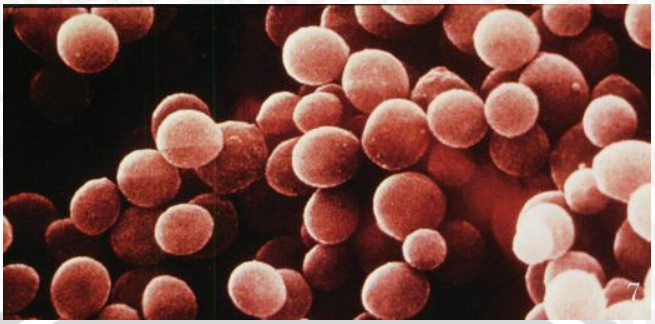
2.1.2.1 Ciri-Ciri Organisme

Staphylococcus aureus bersifat aerob atau anaerob fakultatif, tes katalase positif, dan tahan hidup di lingkungan yang mengandung garam dengan konsentrasi tinggi (halofilik), misalnya NaCl 10% (Dzen *et. al.*, 2010).

Sel *S. aureus* berbentuk kokus dengan garis tengah sekitar 1 µm dan tersusun dalam kelompok-kelompok tak beraturan. Hasil pewarnaan yang berasal dari perbenihan padat menunjukkan susunan bakteri yang bergerombol sepeti anggur, seperti terlihat pada Gambar 2.1 dan 2.2. Pada biakan cair tampak juga kokus tunggal, berpasangan, tetrad, dan berbentuk rantai. Kokus muda bersifat Gram positif kuat, sedangkan pada biakan yang lebih tua banyak sel menjadi Gram negatif. *S. aureus* tidak bergerak dan tidak membentuk spora (Jawetz *et. al.*, 2007).



Gambar 2.1. Pewarnaan Gram *Staphylococcus aureus* dari Eksudat Pus (Kayser, 2005). *S. aureus* adalah bakteri gram (+) yang berwarna ungu, bergerombol seperti anggur, berbentuk bulat (ujung panah)



Gambar 2.2. Gambaran Mikrografi Elektron *Staphylococcus aureus* (Todar, 2011), *S. aureus* berwarna merah keputihan, berbentuk bulat, bergerombol seperti anggur.

Dengan pewarnaan Gram *S. aureus* bersifat Gram positif. Namun, dalam kedaan tertentu dapat pula bersifat Gram negatif, misalnya:

- Organisme yang berasal dari bagian tengah koloni.
- Organisme yang mengalami fagositosis
- Organisme yang berasal dari perbenihan yang sudah tua (Dzen dkk., 2010).

2.1.2.2 Biakan

Pada umumnya *S. aureus* dapat tumbuh pada medium-medium yang biasa dipakai di laboratorium bakteriologi seperti *Nutrient Agar Plate* (NAP) dan *Blood Agar Plate* (BAP). Medium tersebut perlu mengandung asam amino dan vitamin-vitamin, misalnya: threonin, asam nikotinat, dan biotin. Bakteri ini tumbuh secara optimal pada suhu 28-38^{0}C, atau sekitar 35^{0}C. pH optimal untuk pertumbuhan *S. aureus* adalah 7,4. Pembentukan pigmen paling baik apabila dieramkan pada medium NAP pada suhu kamar (20-25^{0}C). *S. aureus* akan menghasilkan pigmen berwarna kuning emas. Pigmen ini tidak terbentuk pada keadaan anaerob dan juga tidak terbentuk pada perbenihan cair (Dzen dkk., 2010).

Gambar 2.3. Biakan *Staphylococcus aureus* pada Blood Agar Plate (BAP). S. aureus menunjukkan koloni berwarna kuning keemasan pada media BAP.

2.1.2.3 Sifat-Sifat Pertumbuhan

Staphylococcus aureus menghasilkan katalase yang membedakannya dengan *streptococcus*. Bakteri ini meragikan banyak karbohidrat dengan lambat, menghasilkan asam laktat, tetapi tidak menghasilkan gas. Aktivitas proteolitik sangat bervariasi untuk setiap strain. *Staphylococcus aureus* relatif resisten terhadap pengeringan dan panas (bakteri ini bisa tahan terhadap suhu 50 ^{o}C selama 30 menit), serta terhadap natrium klorida 9% tetapi mudah dihambat oleh zat-zat kimia tertentu seperti heksaklorofen 3% (Jawetz *et. al.*,2007).

Kepekaan *S. aureus* terhadap antibiotika dapat bervariasi. Mekanisme terjadinya resistensi karena:

(1) sering membentuk enzim *beta lactamase* dibawah kendali plasmid, sehingga resisten terhadap banyak penicillins (penicillin G, ampicillin, ticarcillin, dan piperacillin).. Plasmid dapat dipindahkan melaui mekanisme transduksi dan mungkin pula melalui konjugasi

(2) Resisten terhadap nafcillin (juga terhadap methicillin dan oxacillin). Terjadinya perubahan mecA gen pada kromosom dan gen yang

mengkode *PBP2 (Penicillin Binding Protein 2)* atau *PBP2a* sehingga sulit dicapai oleh antibiotika

(3) *S. aureus* dikatakan *susceptible to vancomycin* jika minimum inhibitory concentration (MIC) 2 g/mL; *intermediate susceptible* jika MIC 4-8 g/mL dan resisten jika MIC 16 g/mL. Di Jepang dan Amerika Serikat, terdapat *Vancomycin-Intermediate S. aureus* ("VISA"). Mereka pada umumnya didapatkan pada infeksi yang kompleks yang mendapatkan terapi vancomycin dalam waktu yang lama. Sering terjadi gagal terapi vancomycin. Mekanisme resistennya karena peningkatan sintesis dinding sel dan perubah dinding sel.

(4) Pada tahun 2002, didapatkan *vancomycin-resistant S. aureus* (VRSA) yang diisolasi dari pasien di Amerika Serikat. Pada VRSA itu terjadi mutasi pada gen vanA sebagai vancomysin resisten dan mecA sebagai nafcillin resisten. *Vancomycin-resistant S. aureus* ini menjadi perhatian penting di berbagai belahan dunia.

(5) Plasmid dapat pula membawa gen resistensi terhadap tetrasiklin, eritromisin, dan aminoglikosida

(6) "Tolerance" berarti bahwa staphylococci hanya dihambat pertumbuhannya oleh medikasi tetapi tidak dibunuh—terdapat perbedaan signifikan antara MIC dan Minimum Lethal Concentration (MLC)(Jawetz *et. al.*, 2007).

2.1.3 Struktur Antigen

S. 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. Peptidoglikan ini dapat dihancurkan oleh asam kuat dan paparan *lysozyme*. Struktur ini penting dalam patogenesis terjadinya infeksi yaitu dengan memproduksi Interleukin-1 dan Antibodi opsonic yang dibentuk monosit, dan dapat juga menjadi chemoattractant sel-sel leukosit polymorphonuclear (PMN) juga dapat mengaktivasi komplemen. Asam teikoat, yang merupakan polimer gliserol atau ribitol fosfat, berikatan dengan peptidoglikan dan menjadi bersifat antigenik (Jawetz *et. al.*, 2007).

Protein A merupakan komponen dinding sel kebanyakan strain *S. aureus* yang terikat pada bagian Fc molekul IgG, kecuali IgG3. Bagian Fab pada IgG yang terikat pada protein A bebas berikatan dengan antigen spesifik. Beberapa strain *S. aureus* mempunyai kapsul yang dapat menghambat fagositosis oleh limfosit polimorfonuklear, kecuali kalau ada antibodi spesifik. Kebanyakan strain *S. aureus* mempunyai koagulase atau faktor penggumpal pada permukaan di dinding sel. Koagulase berikatan secara non-enzimatik dengan fibrinogen sehingga bakteri beragregasi (Jawetz *et. al.*,2007).

2.1.4 Toksin dan Enzim

2.1.4.1 Katalase

S. aureus menghasilkan katalase yang mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen. Katalase membedakan *staphylococci*, yang

menghasilkan positif, dengan *streptococci*, yang menghasilkan negatif (Jawetz *et. al.,* 2007).

2.1.4.2 Koagulase

S. aureus menghasilkan koagulase suatu protein mirip enzim yang dapat menggumpalkan plasma yang telah diberi oksalat atau sitrat dengan bantuan suatu faktor yang banyak terdapat dalam serum. Koagulase dapat menggandakan fibrin di permukaan bakteri, mungkin mengubah pola pemakanan bakteri oleh sel-sel fagosit atau perusakannya dalam sel ini. Bakteri yang membentuk koagulase dianggap mempunyai potensi menjadi patogen invasif (Jawetz *et. al.*, 2007).

2.1.4.3 Staphylokinase

Enzim ini bekerja sebagai aktivator enzim protease dalam plasma untuk menghasilkan *lytic agent*. Enzim ini bersifat antigenik dan tidak tahan panas (Dzen dkk., 2010).

2.1.4.4 Protease

Enzim ini disebut juga fibrinolisin, bersifat proteolitik, dan dapat menyebabkan nekrosis pada jaringan yang mengalami invasi, termasuk jaringan tulang (Dzen dkk., 2010).

2.1.4.5 Lipase

Enzim ini bersifat antigenik. Pada inokulasi, *staphylococcus* koagulase positif strain tertentu pada BAP darah manusia, terlihat pemukaan koloni yang berbercak-bercak lemak yang tersusun dari asam oktadekanoat. Ini tejadi karena lipase memutuskan ikatan asam ini dengan lipid (Dzen dkk., 2010).

2.1.4.6 Fosfatase

Fosfatase erat kaitannya dengan patogenesitas dan galur koagulase positif pada umumnya menghasilkan lebih banyak fosfatase daripada galur koagulase negatif, namun kadang-kadang ada pula galur koagulase negatif yang menghasilkan fosfatase lebih banyak. Oleh karena itu, apabila fosfatase digunakan sebagi indikator patogenesitas, nilainya kurang (Dzen dkk.,2010).

2.1.4.7 DNase

DNase memecah DNA menjadi fosfomononukleotida dan merupakan suatu protein kompak yang terdiri dari rantai polipeptida tunggal dan terdapat pada permukaan sel. Enzim ini tahan pemanasan dan diproduksi oleh 90-96% *staphylococcus* strain koagulase positif, sehingga dapat juga dipakai untuk menentukan spesies *staphylococcus* (Dzen dkk.,2010).

2.1.4.8 Enzim lain

Enzim lain yang dihasilkan *staphylococcus* adalah hialuronidase. Dengan menghasilkan enzim hialuronidase maka bakteri bersifat invasif, tapi sifat ini terjadi pada fase awal dari infeksi dan cepat dinetralkan pada reaksi peradangan (Dzen dkk., 2010).

2.1.4.9 Eksotoksin

Alpha toxin (hemolisin) adalah protein heterogen yang dapat melisiskan berbagai jenis membran sel eukariot. *Beta toxin* merusak spingomyelin dan bersifat racun untuk berbagai jenis sel, termasuk sel darah merah manusia. *Delta toxin* bersifat non toksik dan dapat berperan pada penyakit diare karena *S. aureus*. *Gamma toxin* merujuk pada 3 protein yang berinteraksi dengan 2 protein

Panton-Valentine leukocidin yang membentuk *six potential two-component toxins*. Keenam toksin protein ini dapat melisiskan sel darah putih dengan membentuk pori-pori di membran sel yang meningkatkan permeabilitas kation (Jawetz *et. al.,* 2007).

2.1.4.10 Leukosidin

Toksin ini mempunyai 2 komponen yang bekerja secara sinergis pada membran sel darah putih bersama *gamma toxin*. Toksin ini adalah faktor virulen pada *community associated methicillin resistant S. aureus infections* (Jawetz *et. al.*, 2007).

2.1.4.11 Toksin Eksfoliatif

Toksin *S. aureus* ini meliputi sekurangnya dua protein yang mengakibtkan deskuamasi menyeluruh pada sindroma lepuh kulit *staphylococcus* (Jawetz *et. al.,* 2007).

2.1.4.12 *Toxin Syndrome Shock Toxic*

Kebanyakan strain *S. aureus* yang diisolasi dari penderita sindroma syok toksik memproduksi suatu toksin yang disebut *Toxin Syndrome Shock Toxic*-1 (TSST-1). TSST-1 ini adalah prototipe superantigen karena diperkirakan toksin ini menstimulasi sel T dalam jumLah cukup banyak. Toksin ini dapat menyebabkan sindroma klinik seperti demam, ruam kulit, hipotensi bahkan sampai shock (Jawetz *et. al.*, 2007).

2.1.4.13 Enterotoksin

Enterotoksin dihasilkan ketika *Staphylococcus 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 syaraf pusat (pusat muntah) setelah toksin bekerja pada reseptor-reseptor dalam usus (Brooks *et. al.*, 2007).

2.1.5 Patogenesis

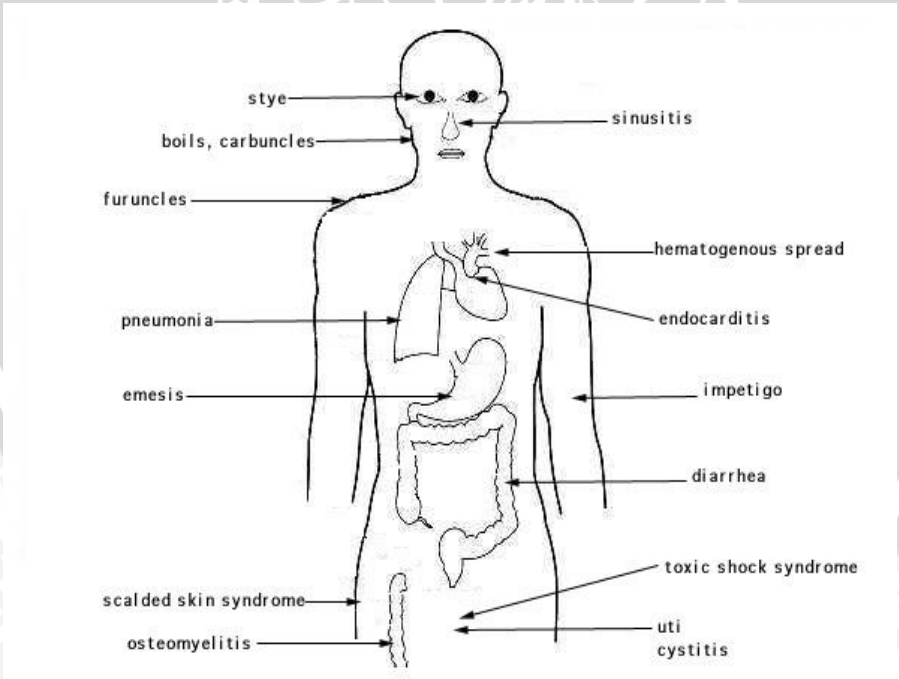
Kemampuan patogenetik strain *S. aureus* tertentu merupakan efek gabungan faktor-faktor ekstraseluler, toksin, serta sifat invasif strain tersebut. *S. aureus* yang patogen dan invasif cenderung menghasilkan koagulase dan pigmen kuning, dan bersifat hemolitik. Lesi yang disebabkan *S. aureus* dikarenakan invasi pada folikel rambut dan kelenjar lemak oleh enzim lipase, esterase, koagulase, *alpha toxin* dan leukosidin yang melawan reaksi host dan fagositosis. Di akhir perjalanan infeksi, akan terjadi keracunan makanan karena adanya kontaminasi pada makanan dengan enterotoxin *S. aureus*. Akhir perjalanan infeksi yang lain adalah berupa terbentuknya dermatitis exfoliativa (sindroma lepuh kulit) karena toksin eksfoliatif sampai pada hipotensi dan shock yang disebabkan oleh TSST-1 (Kayser, 2005).

2.1.6 Patologi

Ciri khas lesi *Staphylococcus aureus* adalah furunkel atau abses setempat lainnya. Koloni *Staphylococcus 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 keradangan. 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).

Pernanahan lokal (abses) adalah sifat khas infeksi *Staphylococcus aureus* . Dari setiap fokus, organisme menyebar melalui saluran getah bening dan aliran darah ke bagian tubuh lainnya. Pernanahan vena yang disertai trombosis sering terjadi pada penyebaran tersebut. Pada osteomielitis, fokus primer pertumbuhan *Staphylococcus aureus* secara khas terjadi di pembuluh darah terminal pada metafisis tulang panjang, mengakibtkan nekrosis tulang dan pernanahan menahun. *Staphylococcus aureus* dapat menyebabkan pneumonia, meningitis, empiema, endokarditis, atau sepsis dengan pernanahan pada bagian tubuh manapun seperti pada Gambar 2.3 (Jawetz *et. al.,* 2007).



Gambar 2.4 Lokasi Infeksi dan Penyakit karena *Staphylococcus aureus* (Todar, 2011)

2.1.7 Diagnosis Laboratorium

2.1.7.1 Spesimen

Spesimen *Staphylococcus aureus* berasal dari usapan permukaan, nanah, darah, aspirat trakea, atau cairan serebrospinal. Pemilihan spesimen untuk biakan tergantung pada lokalisasi proses infeksi (Brooks *et. al*., 2007).

2.1.7.2 Biakan

Bahan yang ditanam pada *Blood Agar Plates* akan menghasilkan koloni yang khas dalam 18 jam pada 37^0C. Hemolisis dan pembentukan pigmen dapat terlihat secara optimal pada suhu kamar, namun mungkin tidak dapat diamati sampai beberapa hari sesudahnya. Bahan yang terkontaminasi flora campuran dapat ditanam dalam perbenihan yang mengandung NaCl 7,5%; garam akan menghambat pertumbuhan kebanyakan flora normal selain *Staphylococcus aureus* (Jawetz *et. al.*, 2007).

2.1.7.3 Tes Katalase

Hidrogen peroksida 3 % sebanyak 0,2 mL dituangkan ke dalam tabung reaksi. Sedikit biakan bakteri diambil dengan menggunakan ose, dan dipaparkan ke atas permukaan H_2O_2 dalam tabung reaksi. Tabung reaksi kemudian digoyangkan dengan pelan dan diamati dalam waktu 10 detik. Pembentukan gelembung udara (pelepasan oksigen) menunjukkan tes positif (*Health Protection Agency,* 2010).

Tes juga dapat dilakukan dengan menuangkan larutan hidrogen peroksida di atas bakteri yang tumbuh subur pada *slant agar* dan meneliti gelembung yang muncul (Brooks *et. al.*, 2007)

2.1.7.4 Tes 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^{0}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 (*S. aureus)* dan *staphylococcus* koagulase negatif. Semua *staphylococcus* yang bersifat koagulase positif dianggap patogen bagi manusia (Jawetz *et. al.,* 2007).

2.1.7.5 Tes Kepekaan Antibiotika

Tes kepekaan antibiotika dengan metode dilusi medium atau difusi *agar plate* sebaiknya dilakukan secara rutin pada isolat *staphylococcus* yang berasal dari klinik. Resistensi terhadap penisilin G dapat diperkirakan dengan tes *β-lactamase* positif. Sekitar 90% *Staphylococcus aureus* akan menghasilkan *β lactamase*. Resistensi terhadap nafsilin terjadi pada 10-20% isolat *S. aureus* . Resistensi nafsilin berkorelasi dengan adanya gen *Mec-A* yang menyandi protein terikat penisilin yang tidak dipengaruhi oleh antibiotika ini. Gen dapat dideteksi dengan menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR), tetapi hal ini tidak berguna karena *staphylococcus* yang tumbuh pada *Muller Hinton Aga*r (mengandung 4% NaCl dan 6000 µg/mL oksasilin), secara khas mengandung gen *Mec-A* dan resisten terhadap oksasilin (Jawetz *et. al.,* 2007).

2.1.7.6 Uji Latex Aglutinase

Uji Latex Aglutinase digunakan untuk mengetahui bakteri *Methicillin Resistant Stahpylococcus 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 Stahpylococcus 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 karier, pemakaian antiseptik topikal di hidung atau daerah perineal dapat mengurangi penyebaran organisme yang berbahaya ini (Brooks *et. al.*, 2007).

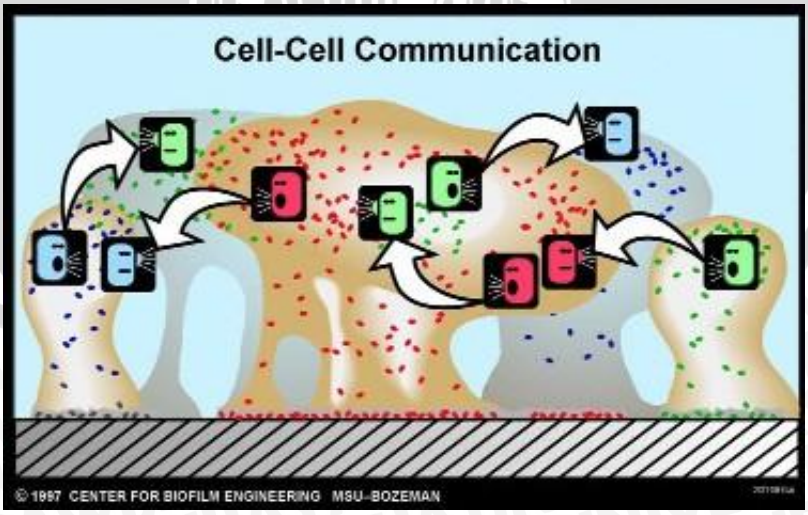
2.2 Biofilm

2.2.1 Pengertian Biofilm

Biofilm merupakan sekumpulan mikroba dalam keadaan diam (sesile) yang ditandai dengan menempelnya sel-sel pada permukaan substrat secara irreversibel, yang mana diliputi oleh matriks substansi polymer ekstraseluler yang mereka produksi, dan menunjukkan perubahan fenotip berkenaan dengan laju pertumbuhan dan transkripsi gen. Biofilm itu ibarat sebuah kota kecil dimana mikroba, yang panjangnya hanya 1-2 mikrometer, membentuk banyak menara yang tingginya dapat beratus-ratus mikrometer. 'Jalan' antar menara berupa kanal yang sangat kaya akan nutrisi, oksigen dan keperluan lain untuk kehidupan

komunitas biofilm. Definisi ini menjadi sangat berguna karena beberapa populasi bakteri yang memenuhi kriteria biofilm sebelumnya, sebenarnya tidak memenuhi karena tidak terdapat perubahan fenotip dari biofilm. (Donlan and Costerton, 2002; Jass *et. al.*, 2003).

Penelitian tentang biofilm bermula pada tahun 1650, ketika Anthony Von Leeuwenhoek pertama kali menyebutkan biofilm pada tulisannya. Lalu pada 1942, Zobell dapat mendefinisikan biofilm sebagai komunitas prokariotik multiseluler yang berasal dari lingkungan. Namun demikian, biofilm baru disadari keberadaannya oleh peneliti pada tahun 1970. Ketika itu, Costerton menunjukkan peran signifikan biofilm pada penyakit infeksi. Selanjutnya pada awal 90-an, terbukti bahwa biofilm berperan penting dalam kejadian infeksi alat-alat medis. Biofilm dikaitkan dengan kejadian resistensi terhadap antibiotika dan ketahanan terhadap sistem imunitas seluler dan humoral *host*. Untuk mengendalikan biofilm, perlu adanya pengetahuan mengenai struktur biofilm, proses pembentukan biofilm, dan proses regulasi di tingkat molekuler (Pace *et. al.*, 2006)



Gambar 2.5. Ilustrasi Mikroba di Biofilm Berbicara Satu Sama Lain Menggunakan Sinyal Kimia untuk Membangun Mikrokoloni (Costerton, 1999)

.

2.2.2 Struktur Biofilm

Terdapat keberagaman struktur dan arsitektur biofilm. Hal ini dipengaruhi oleh kondisi fisik (jenis permukaan dan pH), kondisi lingkungan (suhu dan osmolalitas), nutrisi, dan status fisiologis mikroorganisme. 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, *polysaccharide intercellular adhesion* (PIA), dan air. Komponen utama matriks biofilm adalah air (95-99%), sel bakteri hanya sekitar 2-5%, sedangkan PIA sebanyak 2% dari total matriks. Substansi lainnya yang terkandung dalam matriks meliputi DNA, RNA, protein dan enzim yang total berjumLah 2%. PIA merupakan struktur yang sangat terhidrasi, biopolimer berbentuk gel yang memerangkap bakteri menjadi struktur tiga dimensi yang menjadi karakteristik biofilm dan agregat bakteri. Komposisi PIA tidak hanya penting untuk perlekatan dan stabilisasi matriks, tetapi juga untuk membentuk heterogenitas dan meningkatkan ketersediaan nutrisi dalam biofilm. PIA ini merupakan elemen penting dalam pembentukan biofilm (Jass *et. al.*,2003).

Penelitian menyatakan bahwa pertumbuhan biofilm tidaklah tersusun dari lapisan *homogenoeous monolay*ers 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 empat fase. Fase pertama, akan terjadi adhesi mikroba yang irreversibel. Perlekatan awalnya tergantung pada komponen dinding sel staphylococci seperti *teichnoic acids* (TAs). Akan tetapi sebelum melakukan perlekatan, bakteri harus terlebih dahulu 'merasakan' kedekatan dengan permukaan substrat. Bakteri planktonic ini mengeluarkan proton dan molekul sinyal yang difus saat mereka tidak melekat pada suatu permukaan. Diperkirakan jumLah proton dan molekul sinyal yang sangat banyak di dekat sel bakteri menyebabkan mereka merasakan kedekatan dengan permukaan substrat. Selain itu, dengan pemeriksaan langsung pada sel hidup, bakteri planktonic tertarik ke permukaan dan menjelajahi area permukaan tersebut. Setelah sudah merasakan kedekatan terhadap permukaan dan menjelajahi permukaan substrat, bakteri-bakteri planktonic itu berkomunikasi satu dengan yang lain dengan menggunakan sinyal kimia untuk melakukan proses aktif seperti perlekatan dan pembentukan biofilm. Hal ini sering disebut dengan *quorum sensing* (Costerton, 1999).

Pada alat-alat medis dapat terjadi beberapa perubahan permukaan yang signifikan setelah proses implantasi. Protein-protein host extracellular matrix (ECM) seperti fibrinogen, fibronectin atau vitronectin terdeposit pada permukaan alat medis setelah proses implantasi. Hal ini dikenal sebagai proses *conditioning*. Perlekatan bakteri ke material yang dilapisi protein ECM ini dimediasi oleh struktur spesifik *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules* (MSCRAMMs). Pada *S. aureus* juga ditemukan

kehadiran aktivasi platelet dalam proses perlekatannya ke permukaan substrat. Perlekatan ini terutama dengan koagulasi plasma (Mack, 1999; Rohde *et. al.*, 2010).

Pada fase kedua, akan terjadi proses proliferasi dan akumulasi bakteri. Setelah perlekatan awal, bakteri mulai tumbuh dan berkolonisasi yang dapat membentuk lapisan seluler monolayer yang berdampingan. Pada fase ini bakteri juga memproduksi PIA, eDNA, dan protein. PIA adalah glycan yang terdiri dari sekurang-kurangnya 130 residu dari β-1,6-linked N-Acetylglucosamine, 15-20% deasetilisasi dan sehingga bermuatan positif. PIA ini sendiri diproduksi oleh gen lokus *ica*RADBC, yang mana merupakan gabungan dari 4 gen biosintesis (*ica*ADBC) dan *ica*R, gen yang mengkode berbagai macam protein regulator. Gen *ica*A adalah protein transmembran dengan homolog pada *N-acetyl-glucosaminyltransferases*, yang mensintesis PIA pendek oligomer in vitro menggunakan UDP-N-acetylglucosamine sebagai substrate. Gen *ica*D diperlukan untuk efektifitas biosintesis optimal dari *ica*A. Gen *ica*C terlibat dalam translokasi dan eksternalisasi pertumbuhan polysaccharide di permukaan sel bakteri. Gen *ica*B bertanggungjawab untuk proses deasetilisasi polimer PIA (Speziale *et. al.*, 2008).

Selain pembentukan PIA oleh gen ica, juga terdapat mekanisme lain melalui protein yang diproduksi bakteri. Terdapat *biofilm associated protein* (Bap) yang juga penting pada perlekatan awal dan akumulasi interseluler selama perkembangan biofilm *S. aureus* yang diisolasi dari sapi dengan infeksi mastitis kronik. Di samping itu, terdapat protein pada permukaan *S. aureus* yang bernama SasG (surface associated *Staphylococcus* protein G), yang juga berkontribusi dalam perkembangan biofilm tanpa PIA. Pada data terbaru, e-DNA

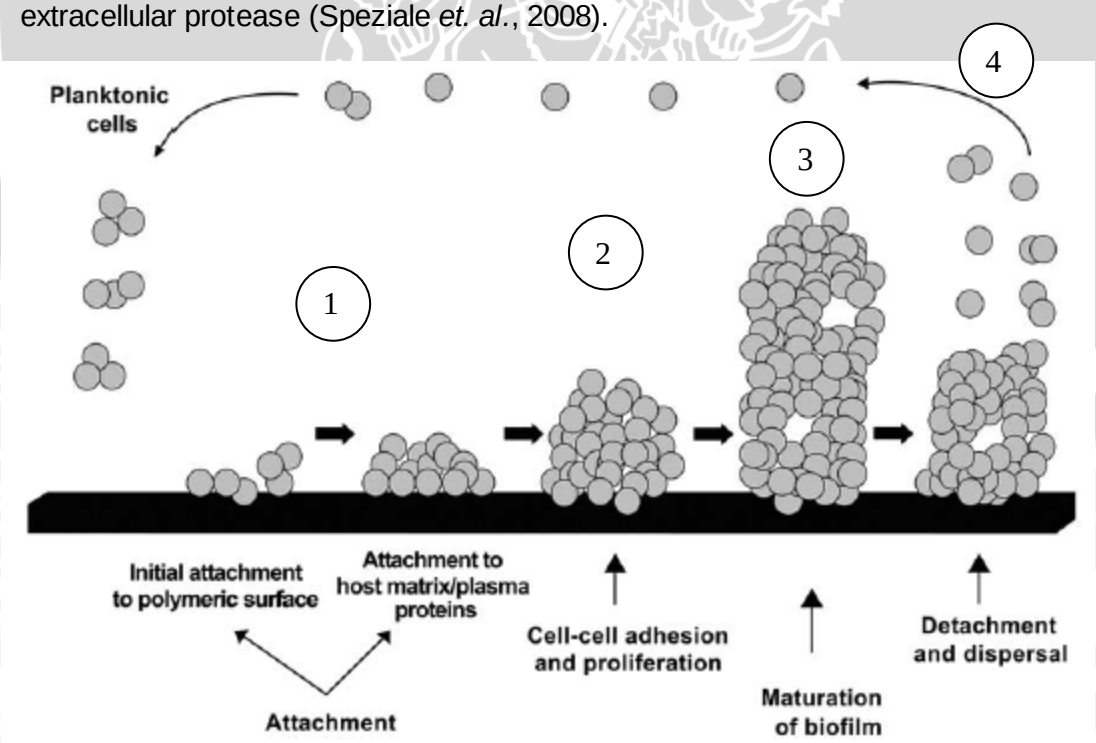
(extracellular DNA) memiliki peran structural yang lebih penting pada matriks biofilm *S. aureus* dibandingkan *S. epidermidis* (Speziale *et. al.*, 2008).

Fase ketiga adalah maturasi biofilm. Biofilm yang telah mengalami proliferasi dan berakumulasi akan berada pada status maturasi. Biofilm yang matur mempunyai gambaran 3 dimensi yang terdiri dari beberapa lapisan bakteri dari struktur tipikal seperti menara atau jamur yang menonjol keluar permukaan. Di antara menara ini ada terowongan dan saluran yang berfungsi untuk mengirim oksigen dan nutrisi ke biofilm pada lapisan yang lebih dalam dan membuang sisa metabolism. Mekanisme ini dapat mengubah struktur biofilm termasuk mengubah biosintesis PIA dan overekspresi sekresi protease dan nuclease yang dapat mengubah komposis ekstraselular matriks dan permukaan bakteri. Selain itu, terbentuk struktur phenol-soluble modulins yang bekerja seperti surfactant. Sehingga biofilm yang telah matur menjadi kurang padat sebelum fase pelepasan (Speziale *et. al.*, 2008).

Fase terakhir pada biofilm ini adalah pelepasan dan penyebaran biofilm. Bakteri tunggal atau kelompok staphylococcus dapat meninggalkan lapisan teratas dari biofilm yang matur dan menyebar untuk berkoloni di tempat yang jauh. Beberapa faktor yang dapat mempengaruhi proses pelepasan adalah: i) tekanan pergeseran dari arah berlawanan seperti aliran darah pada pembuluh darah; ii) surfactants; dan iii) protease yang dapat mengubah kestabilan struktur (Speziale *et. al.*, 2008).

Pada *S. aureus*, ekspresi dikontrol oleh komunikasi *quorum sensing* yang disebut *agr*, untuk *accessory gene regulator.* Lokus agr ini menghasilkan 2 divergen transkrip utama, RNAII dan RNAIII, ditentukan oleh promoter P2 dan P3. Operon P2 mengandung gen agrADBC yang mengkode 4 protein yang

terlibat dalam generasi *agr-sensing mechanism*. AgrB adalah protein transmembran yang memproses produk agrD menjadi *autoinducing peptide* (AIP). *Autoinducing peptide* ini mengaktivasi reseptor sinyal agr yaitu histidine protein kinase agrC. Aktivasi agrC akan mengarahkan fosforilasi sebagai respon regulator agrA yang diikuti dengan regulasi molekul effektor agr, RNAIII, yang menginisiasi perubahan ekspresi gen yang virulen. RNAIII bekerja dengan meningkatkan ekspresi untuk mensekresi faktor virulen (protease, hemolysin dan TSST-1) dan menurunkan ekspresi adhesin permukaan seperti protein A dan fibronectin-binding protein. Aktivasi agr pada *S. aureus* memicu perlepasan dan penyebaran biofilm *staphylococcus*. Perlepasan oleh aktivitas agr dimediasi protease, dimana protease akan diproduksi dalam jumLah lebih banyak sebagai extracellular protease (Speziale *et. al.*, 2008).



Gambar 2.6 Fase dalam Perkembangan Biofilm pada Staphylococci. Fase 1: Perlekatan Bakteri ke Permukaan dan Protein Host; Fase 2: Proliferasi dan Akumulasi Sel dan Produksi Matriks Ekstraselular; Fase 3: Maturasi Biofilm; Fase 4: Perlepasan dan Persebaran Sel Staphylococcus (Speziale *et. al.*, 2008). Planktonic cells adalah bakteri *S. aureus* yang berada dalam keadaan bebas dan tidak menempel pada substrat.

2.2.4 Faktor Lingkungan yang Mempengaruhi Pembentukan Biofilm

Regulasi ekspresi gen *ica* sendiri dan pembentukan biofilm dihambat oleh *ica*-operon regulator, *ica*R, dan teiocoplanin yang berhubungan lokus regulator, TcaR. Sedangkan, paparan seperti tingginya osmolaritas, tingginya temperature, detergent, urea, ethanol, adanya konsentrasi subinhibisi antibiotik, glukosa, stress oksidatif dan pembatasan Fe, semuanya dapat meningkatkan ekspresi *ica* dan pembentukan biofilm (Cramton *et. al.*, 2001; Knobloch *et. al.*, 2002; Rachid *et. al.*, 2000a; Rachid *et. al.*, 2000b).

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 adhesin* dan pembentukan biofilm (Donlan, 2002).

2.2.6 Tes Pembentukan Biofilm

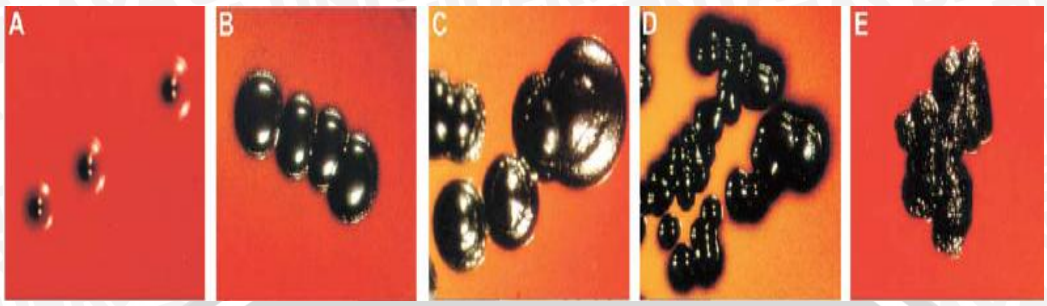
2.2.6.1 Metode Tabung

Staphylococcus aureus yang sudah teridentifikasi ditanam dalam Nutrient Broth dan diinkubasi pada suhu 37^0C semalam. Bakteri yang sudah tumbuh pada Nutrient Broth ditanam kembali pada NAP kemudian diinkubasi

pada suhu 37^{0}C semalam. Mikroba kultur semalam dimasukan ke tabung TSBglu (10mL) dan diinkubasikan 37^{0}C selama 24 jam. Lalu tabung dicuci dengan 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 bentukan biofilm. Bentukan biofilm dianggap positif jika tampak film ungu kebiruan yang terlihat melapisi dinding dan dasar tabung. Pembentukan cincin ungu kebiruan bukan merupakan indikasi pembentukan biofilm (Christensen *et. al.,*2000; Mathur *et. al.*, 2006).

2.2.6.2 Metode *Congo Red* Agar

Metode ini digunakan untuk mengetahui kemampuan bakteri memproduksi biofilm. Mediumnya terdiri dari *brain heart infusion broth* (37g/L), agar *plate* (10 g/L), 5% sukrosa (0,8 g/L), dan *stain Congo Red* (0,8 g/L). *Stain Congo Red* dipersiapkan dengan diautoklaf pada suhu 121^{o}C selama 15 menit secara terpisah dan baru ditambahkan ke dalam media ketika agar telah mencapai suhu 55^{o}C. Setiap *plate* diinkubasi selama 24 sampai 72 jam dalam suhu 37^{0}C. Hasil yang positif akan ditunjukan dengan adanya koloni berwarna hitam dengan konsistensi *dry cristalline*. Hasil negative untuk bakteri non biofilm akan menghasilkan koloni yang berwarna merah muda (Jain and Agarwal, 2009; Moore, 2009).



Gambar 2.7 Morfologi Koloni *S. aureus* pada Congo Red Agar dengan Trypticase Soy Broth (TSB). Strain *S. aureus* Biofilm-Positif Mempunyai Morfologi Tipikal dengan Konsistensi Dry Crystalline (E); Strain Lain Mempunyai Morfologi dengan Konsistensi Biofilm-Negatif (A); Beberapa Strain dengan Morfologi Intermediate dengan Koloni Hitam (B), (C), dan (D) (Knobloch *et. al.*, 2002)

2.2.6.3 Metode *Tissue Culture Plate*

Untuk melakukan tes terhadap pembentukan biofilm oleh bakteri *S. aureus* dapat digunakan metode *Tissue Culture Plate*. Langkah-langkahnya adalah dengan memindahkan sebanyak 200 µl bakteri yang telah dikultur sebelumnya ke dalam sterile *96-well flat-bottomed plastic tissue culture plate*. *Well* yang sebagai kontrol negatif hanya diisi oleh *fresh broth*. Kemudian semua plates diinkubasi secara aerobic selama 24 jam dalam suhu 37ºC. 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 dikosongkan dan dikeringkan. Kemudian setiap *well* dilakukan proses fiksasi dengan sodium acetate 2% dan pewarnaan dengan menggunakan 0,2 mL *crystal violet* selama 5 menit. Lalu dilakukan pembilasan dengan menggunakan air keran dan dikeringkan. Untuk menganalisa secara kuantitatif pembentukan biofilm, ditambahkan 200 µl dari 1M HCl isopropanol di setiap well. Kemudian dilakukan pengukuran Optical Density (OD) pada 570 nm menggunakan ELISA reader. (Nuryastuti, 2010).

2.3 Manggis (*Garcinia mangostana L.*)

2.3.1 Taksonomi

Kingdom / Kerajaan :Plantae

Division / Divisi :Magnoliophyta

Class / Kelas :Magnoliopsida

Order / Ordo :Theales

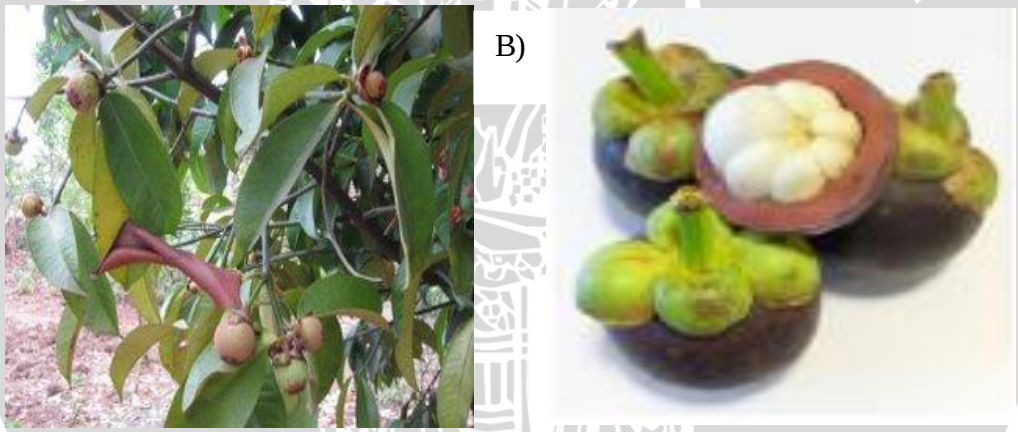
Family / Famili :Guttiferae

Genus :*Garcinia*

Species / Spesies :*Garcinia mangostana L.*

Nama binomial :*Garcinia mangostana L.*

A) B)



Gambar 2.8 Pohon Manggis (A) dan Buah Manggis (B) (Akao *et. al.*, 2008)

2.3.2 Epidemiologi dan Ekologi

Manggis ini merupakan tanaman buah berupa pohon yang banyak tumbuh secara alami pada hutan tropis di kawasan Asia Tenggara, seperti di Indonesia, Malaysia, dan Thailand. Secara biogeografi, manggis ini menyebar ke berbagai pelosok daerah tropis lain, seperti Sri Lanka, Malagasi, Karibia, Hawaii, Australia Utara, hingga ke Amerika Tengah. Di Indonesia, tanaman manggis mudah dijumpai dari Sabang sampai Merauke. Manggis sudah sejak lama

dibudidayakan. Selain di Kalimantan Timur dan Tengah, Jawa Barat, hingga Sumatera Barat, penanamannya juga meluas sampai ke Riau dan Sulawesi Utara. Di sana, tanaman manggis ditanam di daerah dengan ketinggian sampai sekitar 1500 m di atas permukaan air laut (Ramage *et. al.*, 2004; Mardiana, 2011)

Baik di habitat alami maupun yang dibudidayakan, tanaman itu dapat mencapai tinggi 25 m dengan diameter batang mencapai 45 cm. Manggis mampu tumbuh dengan baik pada ketinggian 0-600 m di atas permukaan air laut. Suhu udara rata-rata 20-30^{o}C, pH tanah berkisar 5-7. Pada lahan dengan pH asam seperti di lahan gambut, manggis tetap mampu tumbuh dengan baik. Curah hujan yang sesuai untuk pertumbuhan manggis berkisar 1500-3500 mm/tahun yang merata sepanjang tahun (Ramage *et. al.*, 2004).

Produksi buah manggis cenderung stabil karena buah terbentuk secara apomiksis, yaitu terbentuk tanpa penyerbukan bunga betina oleh jantan. Andai pun terdapat perbedaan antarmanggis dalam satu pohon, biasanya tidak tampak mencolok, seperti kulit buah yang lebih tebal (Ramage *et. al.*, 2004).

2.3.3 Morfologi

Manggis ini memiliki cabang yang teratur, berkulit cokelat dan bergetah. Bentuk buahnya khas. Kulitnya berwarna merah keunguan ketika matang, meski terdapat varian warna lain di kulit, yaitu merah cerah. Buah manggis memiliki beberapa ruang/segmen dengan 1 biji pada setiap segmennya. Namun, yang dapat menjadi biji sempurna hanya 1-3 biji. Setiap biji diselubungi oleh selaput buah berwarna putih bersih, halus, disertai rasa segar (Mardiana, 2011).

Berdasarkan ukuran buah, Balai Penelitian Pohon Buah-buahan (Balitbu) Solok, Sumatera Barat, merekomendasikan tiga klon manggis, yaitu

kelompok besar, sedang, dan kecil. Kelompok besar adalah kelompok dengan panjang daun >20 cm, lebar >10 cm, ketebalan kulit buah >9mm, diameter buah >6,5 cm, dan berat buah >140 g. Kelompok sedang mempunyai panjang daun 17-20 cm, lebar 8,5-10 cm, ketebalan kulit 6-9 mm, diameter buah 5,5-6,5 cm, dan berat buah 70-140g. Kelompok kecil mempunyai panjang daun <17 cm, lebar <8,5 cm, ketebalan kulit buah <6mm, diameter buah <5,5 cm, dan berat buah <70g (Mardiana, 2011).

2.3.4 Khasiat Manggis (*Garcinia mangostana L.*)

Sejak abad ke-13 pada zaman Dinasti Ming di China, manggis sudah dipakai sebagai obat tradisional. Dalam ilmu pengobatan tradisional China, kulit buah manggis dibuat menjadi salep untuk mengobati penyakit eksema. Sementara di Indonesia, air rebusan kulit manggis sering digunakan sebagai ramuan untuk mengobati luka, demam, diare, sariawan, dan sembelit. Tak hanya air rebusnya, bubuk dari kulit manggis yang dikeringkan juga bermanfaat untuk mengobati disentri seperti yang dilakukan penduduk di China dan India (Chin *et. al.* 2008).

Berbagai penelitian membuktikan bahwa kulit manggis memiliki khasiat yang paling tinggi dari manggis dan sangat baik untuk tubuh sehingga dapat menyembuhkan berbagai jenis penyakit. Mulai dari yang ringan seperti sariawan, luka, wasir, dan keputihan, hingga penyakit berat seperti diabetes, jantung koroner, kanker payudara, hingga HIV/ AIDS. Selain itu, kulit manggis dapat meningkatkan sistem kekebalan pada tubuh, menurunkan tingkat depresi dan menstabilkan fungsi jaringan dalam tubuh (Chin *et. al.*, 2008).

Kandungan berupa beragam senyawa bermanfaat membuat hampir semua bagian tanaman manggis dimanfaatkan sebagai herbal. Hal tersebut

sudah dilakukan sejak lama. Selain kulit buahnya, akar, daun, kulit batang dan buahnya dapat bermanfaat. Akar pohon manggis dapat digunakan untuk mengatasi haid tidak teratur. Kulit batangnya berkhasiat untuk mengatasi nyeri perut. Daging buah manggis juga dipercaya untuk mengobati diare, radang amandel, keputihan, wasir, peluruh dahak, dan sakit gigi. Di Jepang, daun dan kulit batang manggis kerap digunakan untuk mengobati eksema, psoriasis, dan hiperkeratosis lantaran bersifat antiinflamasi. Di Amerika Serikat, buah manggis diolah menjadi jus untuk suplemen kesehatan. Sementara itu, ekstrak cangkang buah manggis bermanfaat sebagai bahan baku kosmetik dan vitamin (Mardiana, 2011).

2.3.5 Kandungan Manggis (*Garcinia mangostana L.*)

Buah manggis mengandung gula sakrosa, dekstrosa, dan levulosa. Sementara itu, komposisi bagian buah yang dimakan per 100 g meliputi 79,2 g air; 19,8 g karbohidrat; 17 mg fosfor; 0,5 g protein; 0,3 g serat; 11 mg kalsium; 0,9 mg besi; 14 IU vitamin A; 66 mg vitamin C; 0,09 mg vitamin B (tiamin); 0,06 mg vitamin B2 (riboflavin); dan 0,1 mg vitamin B5 (niasin). Kulit manggis mengandung sejumLah pigmen yang berasal dari 2 metabolit, yaitu *α-mangostin* dan *β-mangostin*. Kulit manggis juga mengandung flavan-3,4-diols, yang tergolong senyawa tannin dan dapat digunakan sebagai pewarna alami pada kain (Chin *et. al.*, 2008).

Kulit manggis sangat bermanfaat bagi kesehatan karena terdapat senyawa *xanthone* yang banyak. Kandungan senyawa xanthone ini pada kulit buah 27 kali lebih banyak daripada yang terkandung di daging buah. Xanthone ini adalah senyawa fitokimia yang terbesar dalam kulit manggis. Xanthone ialah suatu bahan kimia aktif dengan struktur cincin 6 karbon dan kerangka karbon

rangkap. Oleh karena itu, xanthone sangat stabil dan serbaguna ketika berada dalam tubuh. Setidaknya ada sekitar 40 jenis xanthone yang terdapat di kulit buah manggis. Sebut saja *mangostin, mangostenol, mangostinon A, mangostenon B, trapezifolixanthone, tovophyllin B, alpha mangostin, beta mangostin, gamma mangostin, garcinonB, mangostanol, flavonoid, epicatechin, garciniafuran, mangoxanthone, dan gartanin*. Nilai kandungan *xanthone*-nya pun mencapai 17.000-20.000 ORAC per 100 ons (sekitar 2835 g kulit). ORAC yang merupakan kependekan dari *Oxygen Radical Absorbance Capacity* adalah kemampuan antioksidan menetralkan radikal bebas (Mardiana, 2011).

Xanthone memiliki gugus hidroksi (OH) yang efektif untuk mengikat radikal bebas di dalam tubuh. Antioksidan ini dapat membantu mengobati kerusakan sel akibat oksidasi radikal bebas, menghambat proses penuaan, dan mencegah penyakit degeneratif. Kadar xanthone pada buah umur 2 bulan sebesar 16,21 mg/g; umur tiga bulan (15,74 mg/g); dan umur 4 bulan sebesar 15,68 mg/g. Kadar xanthone ini justru meningkat jika buah disimpan hingga empat minggu setelah dipetik, mencapai 34,36 mg/g. Diduga, hal itu disebabkan oleh perubahan kimiawi di kulit buah saat proses respirasi (Mardiana, 2011).

Xanthone juga memiliki fungsi meningkatkan sistem kekebalan tubuh dan sebagai terapi untuk penyakit kardiovaskular seperti penyakit jantung iskemik, hipertensi dan atherosklerosis. Selain efek antioksidan, xanthone juga memiliki efek antikanker, antijamur, antimikroba, dan antiradang. Komponen terbanyak dari xanthone adalah alpha mangostin, yang mana dalam penelitian-penelitian terbaru selain memiliki efek antikanker,juga dapat berperan sebagai antimikroba yang ampuh (Akao *et. al.*, 2008).

Berdasarkan beberapa penelitian mengenai isolasi dan identifikasi senyawa golongan xanthone pada kulit manggis, didapatkan senyawa-senyawa seperti condensed tannin, flavonoid, monoterpenoid, dan kuinon. Senyawa-senyawa tersebut merupakan senyawa bioaktif fenolik yang mana diduga berperan dalam menentukan jumLah antioksidan di manggis (Pradipta dkk., 2004).

2.3.6 Senyawa Penghambat Biofilm

Pada ekstrak kulit manggis terdapat 6 senyawa yang berperan sebagai penghambat biofilm yaitu xanthone, flavonoid, kuinon, epicatechin, monoterpenoid, dan tannin. Xanthone adalah senyawa antioksidan dengan struktur cincin 6 karbon dan kerangka karbon rangkap. Oleh karena itu, xanthone sangat stabil dan serbaguna ketika berada dalam tubuh. Setidaknya ada 13 jenis senyawa xanthone yang dominan yang telah diuji dalam kegunaannya sebagai antimikroba yaitu sebagai berikut: (1) alpha-mangostin; (2) beta-mangostin; (3) gamma-mangostin; (4) garcinone E; (5) 1,5-Dihydroxy-2-isoprenyl-3-methoxyxanthone; (6) 1,7-Dihydroxy-2-isoprenyl-3-methoxy-xanthone; (7) gartanin; (8) subelliptenone F; (9) 12-b-dihydroxy-des-D-garcigerin; (10) caloxanthone A; (11) macluraxanthone; (12)1,7-dihydroxyxanthone; (13) rubraxanthone. Dari ke 13 senyawa itu diperoleh bahwa senyawa (1) dan (13) merupakan senyawa aktif yang paling poten dalam melawan MRSA. Bahkan senyawa (1) dalam aktivitasnya melawan MRSA hampir sama dengan potensi antibiotik vancomycin. Dalam penelitian tersebut juga dikatakan bahwa dengan adanya vancomycin aktivitas anti MRSA yang dimiliki senyawa alpha-mangostin akan meningkat. Sedangkan senyawa rubraxanthone tidak meningkat aktivitas antibakterinya terhadap MRSA dengan adanya vancomycin. Hal ini menunjukkan

bahwa *mode of action* kedua senyawa ini berbeda dalam melawan strain staphylococcus (linuma *et. al.*, 1996).

Flavonoid adalah molekul polifenol yang *water soluble* yang mengandung 15 atom karbon. Flavonoid adalah senyawa yang memberikan warna pada sayur-sayuran, buah-buahan, biji-bijian, daun-daunan, dan bunga-bungaan. Molekul ini bisa digambarkan sebagai dua cincin benzene yang bergabung dengan 3 rantai karbon pendek. Flavonoid memiliki beberapa efek antibakteri, yaitu salah satunya menghambat sintesa RNA pada *Staphylococcus aureus*. Efek yang lain adalah berikatan dengan molekul adhesin yang dapat menghambat proses perlekatan *S. aureus* dalam prosesnya dalam membentuk biofilm, penghambatan fungsi membran sitoplasma oleh sophoraflavone G dan penghambatan metabolisme energi oleh licochalcone A dan C (Cushnie dan Lamb, 2005).

Kuinon merupakan cincin aromatik dengan 2 keton. Kuinon ini terdapat di berbagai tempat di alam bebas, dan berkarakteristik sangat reaktif. Kuinon ini dapat menyebabkan inaktivasi protein. Karena itulah efek kuinon sebagai antimikroba sangat beragam. Target kerja kuinon adalah di surface-exposed adhesions, polipeptida dinding sel, dan enzim yang terikat di membrane. Pada kulit manggis terdapat juga epicatechin dan monoterpenoid yang dapat menghambat pembentukan biofilm dengan mengganggu membran sel *S. aureus*. Epicatechin merupakan senyawa fenolik sederhana sedangkan monoterpenoid adalah senyawa derivate dari minyak esensial yang disintesis dari asetat dan mempunyai kemiripan dengan asam lemak yang mana bedanya adalah senyawa terpenoid ini merupakan senyawa siklik yang mengandung banyak cabang (Cowan,1999).

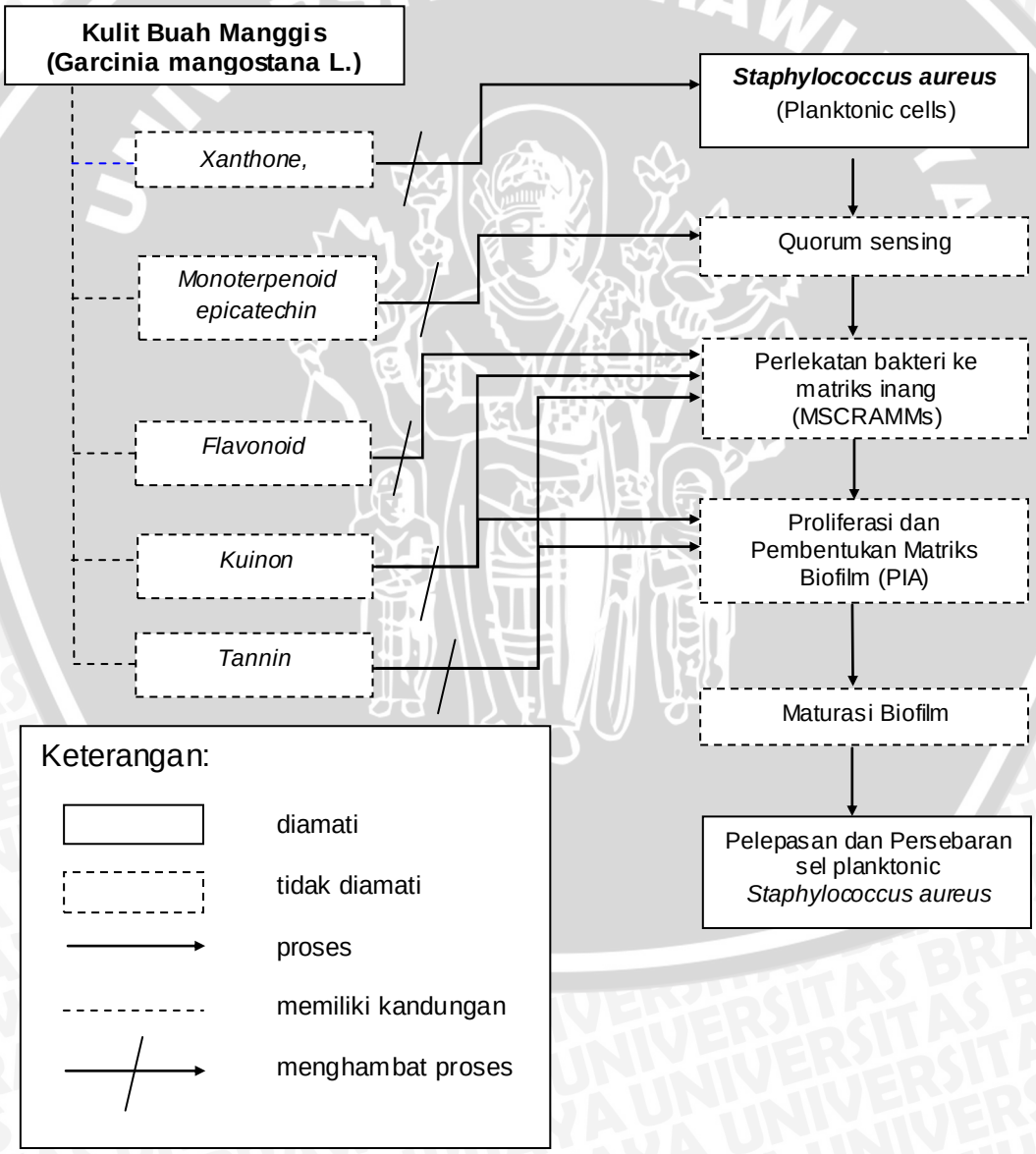
Kulit buah manggis dalam kegunaannya sebagai pewarna alami juga mengandung flavan-3,4-diols, yang merupakan derivate dari senyawa condensed tannin. Tannin jenis ini banyak ditemukan pada tumbuhan berkayu. Telah dilaporkan bahwa tannin bersifat bakteriostatik atau bakteriosidal pada *S.aureus*. Tannin dapat menghambat pembentukan biofilm dengan menghambat koagulasi plasma yang mana koagulasi plasma ini dibutuhkan oleh bakteri untuk membentuk biofilm. Penghambatan koagulasi plasma ini disebabkan oleh menurunnya konsentrasi ion kalsium, penghambatan produksi enzim, dan terganggunya reaksi enzimatis pada bakteri. Penghambatan koagulasi plasma ini bermakna karena akan mengganggu proses polimerisasi fibrin dengan menghambat produksi enzim dan mempersulit reaksi enzimatis, juga mengurangi konsentrasi ion Ca^{2+} dengan begitu pembentukan fibrin akan dapat dihambat. Dikatakan bermakna karena dengan fakta yang ada yaitu bahwa adanya pembentukan fibrin yang melimpah dari biofilm merupakan faktor yang membuat infeksi *S. aureus* menjadi semakin kronis karena pembentukan serat-serat fibrin akan menjadikannya lebih resisten terhadap efek fisik dibandingkan biofilm bakteri yang lain (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. Kedua mekanisme tersebut akan menghambat kemampuan bakteri menginvasi jaringan inang. Perampasan substrat untuk pembentukan biofilm yang terkait dengan PIA juga menjadi salah satu mekanisme tannin (Cowan, 1999).

BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Proses pembentukan biofilm diawali dari bakteri *Staphylococcus aureus* yang akan menempel di substrat / media. Sebelum melakukan perlekatan sel planktonic akan terlebih dahulu merasakan kedekatan dengan permukaan substrat dan menjelajahi seluruh area permukaan substrat. Setelah itu mereka akan sepakat untuk melakukan proses aktif berupa perlekatan dan pembentukan biofilm. Interaksi antar sel ini sering disebut dengan *quorum sensing*. Kemudian terjadi perlekatan sel planktonic bakteri terhadap *host extracellular matrix* (ECM) menggunakan *microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules* (MSCRAMMs). Selain itu juga terjadi polimerisasi fibrin oleh *S. aureus* yang mana dengan melimpahnya fibrin nantinya akan menyebabkan resistensi bakteri menjadi lebih tinggi. Selanjutnya *S. aureus* tersebut akan melanjutkan proses pembentukan biofilm yaitu fase proliferasi dan akumulasi. Di fase ini bakteri akan tumbuh dan berkolonisasi dan menghasilkan PIA yang dikode gen ica atau dapat menggunakan beberapa protein. Pengontrolan produksi PIA lebih berperan dalam proses pembentukan biofilm bakteri dibandingkan dengan pembentukan biofilm menggunakan protein. Berikutnya terjadi maturasi biofilm sehingga terbentuklah biofilm. Pada tahap akhir pembentukan biofilm sebelum terlepas dan tersebar menjadi bakteri dalam jumLah kecil yang tidak lagi melekat pada substrat/media.

Xanthone terutama senyawa alpha-mangostin dan rubraxanthone dapat bersifat bakterisidal terhadap bakteri itu sendiri, sehingga dapat mencegah bakteri untuk membentuk biofilm. Selain itu terdapat 2 senyawa lain yaitu monoterpenoid dan epicatechin yang dapat mengganggu membran sel *S. aureus*. Dengan mengganggu membran sel *S. aureus*, interaksi quorum sensing akan terganggu. Interaksi antar sel untuk berkomitmen melakukan perlekatan

dan pembentukan biofilm, yang diperlukan pada tahap awal pembentukan biofilm, akan menjadi kacau.

Setelah itu tannin dan flavonoid terlebih dahulu akan mengikat molekul adhesin, sehingga dapat menghambat perlekatan bakteri dengan substrat / media. Kuinon juga dapat menghambat proses perlekatan bakteri yaitu dengan cara menginaktivasi protein MSCRAMMs.

Kuinon akan menghambat pembentukan biofilm yang menggunakan protein yang independen terhadap kontrol gen ica. Sedangkan tannin akan menghambat pertumbuhan mikrokoloni dan merampas substrat *N-acetyl-glucosaminyltransferases* yang nantinya akan dikode untuk jadi PIA.

Quorum sensing, perlekatan bakteri ke matriks inang, proliferasi dan akumulasi bakteri, dan maturasi biofilm dalam proses ini tidak diamati. Hanya pembentukan biofilm dan pelepasan bakteri dapat diamati dengan cara melihat tingkat kekeruhan *wellplate* pada pengecatan *crystal violet* (secara kualititatif) dan nilai *Optical Density* bakteri (secara kuantitatif). Semakin keruh *wellplate* semakin kuat ikatan bakteri dan semakin banyak pembentukan biofilm. Demikian pula nilai *Optical Density*, semakin tinggi nilainya, semakin kuat ikatan bakteri dan banyak pembentukan biofilm.

3.2 Hipotesis Penelitian

Ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L.*) dapat menghambat pembentukan biofilm pada *Staphylococcus aureus*.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan dan Desain Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan rancangan eksperimental laboratoris untuk mengetahui pengaruh ekstrak kulit buah manggis (Garcinia mangostana L.) terhadap pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus*. Desain penelitian ini adalah *post-test only control group design*. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode *Tissue Culture Plate* untuk mengetahui efek ekstrak kulit buah manggis terhadap penghambatan pembentukan biofilm dari bakteri *S. aureus*.

Kelompok kontrol adalah kelompok yang tidak mendapat perlakuan berupa pemberian ekstrak. Kelompok perlakuan adalah kelompok yang mendapat perlakuan berupa pemberian ekstrak dengan dosis 6700 µg/mL; 5000 µg/mL; 4200 µg/mL; 3300 µg/mL; 1670 µg/mL; 830 µg/mL; 420 µg/mL dan 210 µg/mL.

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi dari penelitian ini adalah bakteri *S.aureus* . Sampel penelitian ini adalah bakteri *S.aureus* pembentuk biofilm isolat urin 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 (Notobroto, 2005):

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

$$(n-1)(9-1) \geq 15$$

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

$$8n-8 \geq 15$$

$$8n \geq 23$$

$$n \geq 3$$

p : perlakuan → dosis ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L.*) yaitu dosis 0 µg/mL (kontrol positif); 6700 µg/mL; 5000 µg/mL; 4200 µg/mL; 3300 µg/mL; 1670 µg/mL; 830 µg/mL; 420 µg/mL dan 210 µg/mL.

n : pengulangan → berdasarkan rumus banyaknya pengulangan yang dilkakukan minimal 3 kali.

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Pembuatan ekstrak kulit buah manggis dilakukan di Balai Materia Medika Batu. Uji hambat biofilm dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dari bulan Juli 2012 sampai dengan bulan September 2012.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian adalah konsentrasi ekstrak kulit buah manggis. Dalam penelitian ini digunakan konsentrasi 6700 µg/mL; 5000 µg/mL; 4200 µg/mL; 3300 µg/mL; 1670 µg/mL; 830 µg/mL; 420 µg/mL dan 210 µg/mL.

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* adalah 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*. *S. aureus* yang dipakai dalam penelitian ini adalah *S. aureus* dari isolat urin koleksi studi MRSA Indonesia yang disimpan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
2. Biofilm adalah suatu produk dari bakteri yang membentuk lapisan padat pada permukaan suatu substrat/media. Pada penelitian ini, penghambatan pembentukan biofilm akan diuji dengan menggunakan metode *Tissue Culture Plate*.
3. Ekstrak kulit buah manggis adalah hasil ekstraksi kulit buah manggis dengan pelarut ethanol 70%. Ekstrak yang didapat dianggap memiliki kandungan ekstrak sebesar 100%. Buah manggis berasal dari kota Malang. Buah dipilih yang tua, segar, telah disimpan hingga 4 minggu.

4. Metode *Tissue Culture Plate* menurut Christensen *et. al.*, 2000, digunakan untuk mendeteksi pembentukan biofilm dan menguji efek ekstrak kulit buah manggis terhadap pembentukan biofilm *S. aureus.* Pada penelitian ini menggunakan 96-*well plate*.
5. ELISA reader adalah alat yang digunakan untuk menghitung *Optical Density* pada well-microplate yang diukur. Dalam penelitian ini, digunakan panjang gelombang 570 nm. Dari *Optical Density* (*OD*), dapat ditentukan jumLah biofilm yang terbentuk di setiap *well-microplates*. ELISA reader yang digunakan adalah milik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
6. *Optical Density* adalah satuan yang digunakan untuk mengukur *biomass*, *cell count* dll. Menggunakan prinsip *refraction of light* dari spektofotometri. Jika nilai mean OD<0,120 itu berarti bahwa perlekatan bakteri tidak terjadi dan pembentukan biofilm tidak ada atau minimal. Nilai mean OD diantara 0,120-0,240 berarti terjadi perlekatan bakteri dan pembentukan biofilm dalam jumLah sedang. Nilai mean OD>0,240 berarti terjadi ikatan kuat bakteri terhadap substrat dan terbentuk biofilm dalam jumLah tinggi.
7. *Minimal Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC) adalah konsentrasi terendah dari ekstrak kulit buah manggis yang dapat menghambat pembentukan biofilm *S. aureus*. Di penelitian ini pembentukan biofilm terutama diobservasi berdasarkan nilai mean OD.

4.6 Instrumen Penelitian (Bahan dan Alat)

4.6.1 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Kulit Buah Manggis (Garcinia mangostana L.)

1. Mesin penggiling
2. *Maserator*
3. Pelarut etanol 70%
4. Pemotong kulit manggis atau pisau
5. *Oven* atau *microwave*
6. Penampung filtrat

4.6.2 Alat dan Bahan Identifikasi Bakteri Pembenihan Murni

1. isolat *Staphylococcus aureus*
2. NAP (*Natrium Agar Plate*)
3. bahan tes Katalase : H_2O_3 3%
4. bahan tes Koagulase
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 dan Efek Anti Biofilm

1. Trypticase Soy Broth (TSB) dengan 1% glukosa
2. Biakan *Staphylococcus aureus* pembentuk biofilm
3. Phospate Buffer Saline (PBS) PH 7,2
4. Sodium acetate 2%
5. Kristal violet 0,2 mL
6. HCl Isopropanol 200 µl
7. *Congo Red Agar Plates*

8. *96-well flat-bottomed plastic tissue culture plate*
9. ELISA reader
10. Ekstrak kulit buah manggis dengan konsentrasi 6700 µg/mL; 5000 µg/mL; 4200 µg/mL; 3300 µg/mL; 1670 µg/mL; 830 µg/mL; 420 µg/mL dan 210 µg/mL.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Persiapan Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana L.*)

Kulit buah manggis yang telah terkumpul dibersihkan dari kotoran-kotoran, kemudian dipotong-potong hingga berukuran sekitar 4 cm. Kemudian jemur di bawah sinar matahari di udara terbuka selama 2-3 hari hingga kering. Kulit yang telah mengering dihancurkan menggunakan mesin penggiling hingga menjadi serbuk simplisia.

Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode maserasi menggunakan pelarut etanol 70%. Maserasi adalah metode pelarutan sederhana. Maserasi dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia ke dalam cairan pelarut etanol 70%. Filtrat yang ada ditampung kemudian ditambahkan lagi pelarut etanol 70% sampai bahan tersebut terendam. Filtrat kemudian ditampung kembali. Hal ini dilakukan terus menerus secara berulang sampai filtrat tidak berwarna. Dalam proses maserasi tersebut dapat dilakukan pengadukan sesekali untuk mempercepat keseimbangan konsentrasi bahan dalam cairan. Waktu maserasi ini kurang lebih berkisar 5 hari dan selama waktu itu keseimbangan antara bahan yang diekstraksi pada bagian dalam sel dengan yang masuk dalam cairan telah tercapai, sehingga penarikan zat yang disari oleh cairan pelarut telah optimal. Dari proses ekstraksi ini didapatkan hasil ekstraksi berupa ekstrak bersifat suspensi.

4.7.2 Persiapan Bakteri *Staphylococcus aureus* Pembentuk Biofilm

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 aquadest steril diteteskan pada gelas objek, kemudian diambil sedikit bakteri untuk disuspensikan dengan aquadest 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 100x

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

Tes katalase digunakan untuk membedakan bakteri *Streptococcus* dan *Staphylococcus*

- Tuangkan 0,2 mL H_2O_3 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 H_2O_3 3% dapat mengenai usapan biakan bakteri.
- Amati pembentukan gelembung dalam waktu 10 detik.
- Hasil positif bila ada gelembung.
- Hasil negatif bila tidak ada gelembung.

Hasil positif menunjukan *Staphylococcus* sp.

Hasil negatif menunjukkan *Streptococcus* sp.

C. Tes Koagulase

Kepentingan dari tes ini adalah untuk membedakan antara *staphylococcus* koagulase positif (*Staphylococcus aureus)* dan *staphylococcus* koagulase negatif.

- Plasma kelinci atau manusia yang telah diberi sitrat dan diencerkan 1:5 dicampur dengan biakan bakteri dalam medium yang sama banyaknya
- Inkubasikan pada suhu 37^0C
- Sebagai kontrol, satu tabung lainnya dicampurkan plasma dan medium steril, dan kemudian diinkubasi.
- Jika terjadi pembekuan dalam waktu 1-4 jam, menandakan tes itu positif.
- Semua *staphylococcus* yang bersifat koagulase positif dianggap patogen bagi manusia (Jawetz *et. al.,* 1996).

4.7.2.2 Pembentukan Perbenihan Cair Bakteri

1. Setelah dipastikan bakteri adalah bakteri *S. aureus* bakteri dipindahkan dalam tabung yang berisi MH *broth* dan diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C.
2. Dilakukan pengenceran pada perbenihan cair bakteri sehingga didapatkan konsentrasi bakteri 10^8 CFU/mL.
3. Dari konsentrasi bakteri 10^8 CFU/mL ini, kemudian dilakukan pengenceran dengan menambahkan 1mL perbenihan (10^8 CFU/mL) ke dalam 9mL MH *broth* untuk mendapatkan konsentrasi sebesar 10^7 CFU/mL.
4. Setelah itu, dilakukan pengenceran lagi dengan mengambil 1mL perbenihan cair (10^7 CFU/mL) ubtuk ditambahkan pada 9mL MH

broth sehingga akhirnya didapatkan konsentrasi bakteri yang diinginkan yaitu sebesar 10^6 CFU/mL.

4.7.2.3 Uji Deteksi Pembentukan Biofilm

4.7.2.3.1 Congo Red Agar Method (Moore, 2009)

1. *Congo Red Agar* yang telah disiapkan di autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.
2. *S. aureus* diinokulasi pada CRA.
3. CRA ini lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
4. Hasil positif ditunjukkan dengan koloni yang berwana 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 kolom pertama *96-well flat-bottomed plastic tissue culture plate*. Kemudian di tiap barisnya ditambahkan ekstrak kulit buah manggis dengan konsentrasi yang berbeda-beda, yaitu 6700 µg/mL; 5000 µg/mL; 4200 µg/mL; 3300 µg/mL; 1670 µg/mL; 830 µg/mL; 420 µg/mL dan 210 µg/mL.dan 0 µg/mL sebagai kontrol positif.

3 Mikrotiter diinkubasi 24 jam dengan suhu 37º 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 fiksasi dengan sodium acetate 2% dan pengecatan dengan 0,2 mL *crystal violet*.

6 Lalu dilakukan pembilasan dengan menggunakan aquades dan dikeringkan.

7 Untuk menganalisa secara kuantitatif pembentukan biofilm, ditambahkan 200 µl dari HCl isopropanol di setiap well.

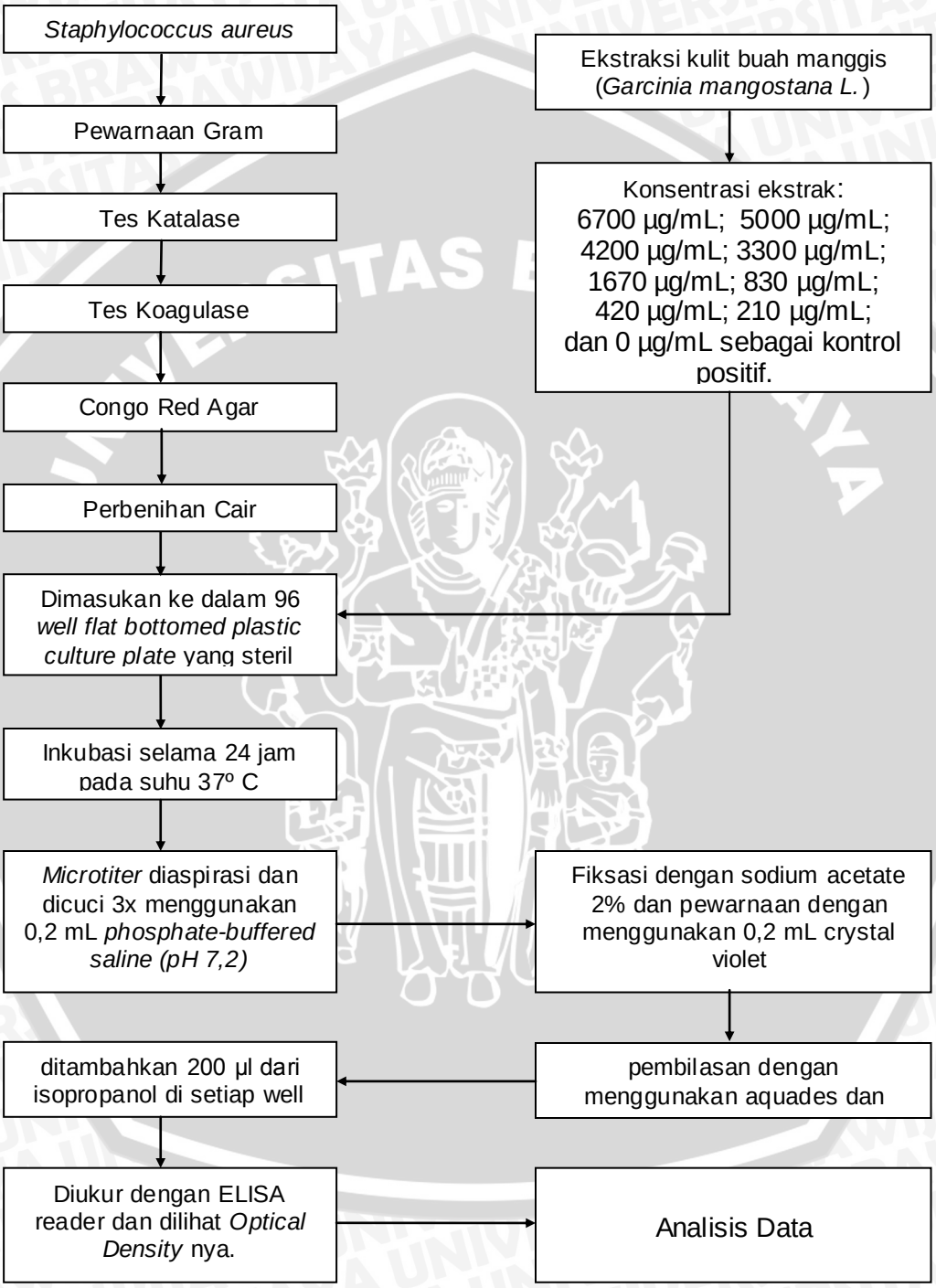
8 Kemudian dilakukan pengukuran *Optical Density* (OD) pada panjang gelombang 570 nm menggunakan ELISA reader. Prosedur ini diulang sebanyak empat kali.

4.8 Analisa Data

Data yang diperoleh adalah data kuantitatif dari pembacaan di ELISA reader yang berupa *Optical Density* setiap *well-plates* yang diberi perlakuan berbeda, yaitu pemberian ekstrak kulit buah manggis dengan konsentrasi 6700 µg/mL; 5000 µg/mL; 4200 µg/mL; 3300 µg/mL; 1670 µg/mL; 830 µg/mL; 420 µg/mL dan 210 µg/mL.dan 0 µg/mL sebagai kontrol positif.

Analisa yang digunakan adalah Uji *Kolmogorov- Smirnov*, Uji *One-Way ANOVA dan* Uji Korelasi *Pearson*. Semua perangkat analisa menggunakan fasilitas *SPSS 20* untuk *Windows*.

4.9 Skema Penelitian



BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA

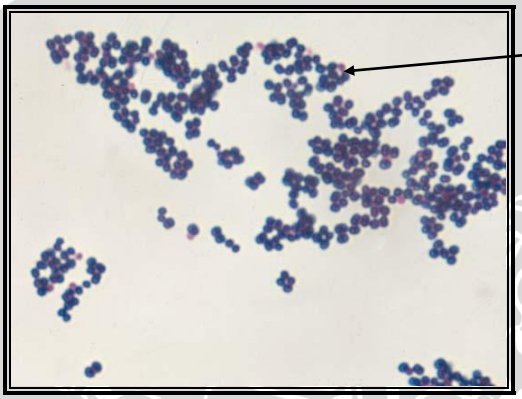
5.1 Hasil Penelitian

Penelitian ini menggunakan isolat bakteri *Staphylococcus aureus* yang didapat dari *stock culture* laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Tiap isolat dikultur ulang dalam medium *Nutrient Agar Plate* (NAP) kemudian dilakukan identifikasi bakteri dan uji deteksi pembentukan biofilm. Selanjutnya dipilih isolat bakteri *Staphylococcus aureus* strain pembentuk biofilm yang kemudian diberi perlakuan sebanyak 4 kali pengulangan.

5.1.1 Hasil Identifikasi Bakteri

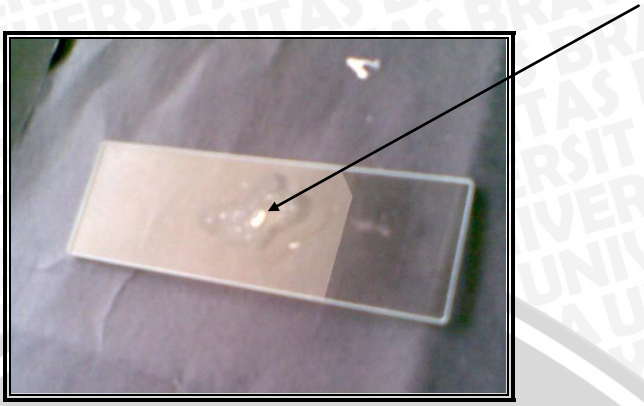
Pada medium NAP, semua isolat bakteri menghasilkan koloni yang berbentuk bulat, halus, menonjol, berkilau dan berwarna kuning keemasan. Pada pewarnaan Gram dan pengamatan di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000 kali, didapatkan bakteri berbentuk bulat / *coccus*, bergerombol seperti buah anggur, dan berwarna biru keunguan Tes katalase pada tabung menunjukkan adanya gelembung-gelembung udara. Tes koagulase pada gelas objek menunjukkan adanya penggumpalan dalam waktu kurang dari 10 detik. Dari hasil-hasil tes tersebut dapat disimpulkan bahwa isolat yang diuji adalah bakteri *Staphylococcus aureus*.

Gambar 5.1 Koloni *Staphylococcus aureus* pada Medium NAP. Koloni berwarna kuning keemasan.



Gambar 5.2 Pengamatan Mikroskopis *Staphylococcus aureus.* S. aureus berbentuk bulat, bergerombol seperti anggur dan berwarna ungu.

Gambar 5.3 Tes Katalase. Tes menunjukkan positif dengan adanya gelembung udara (ujung anak panah).

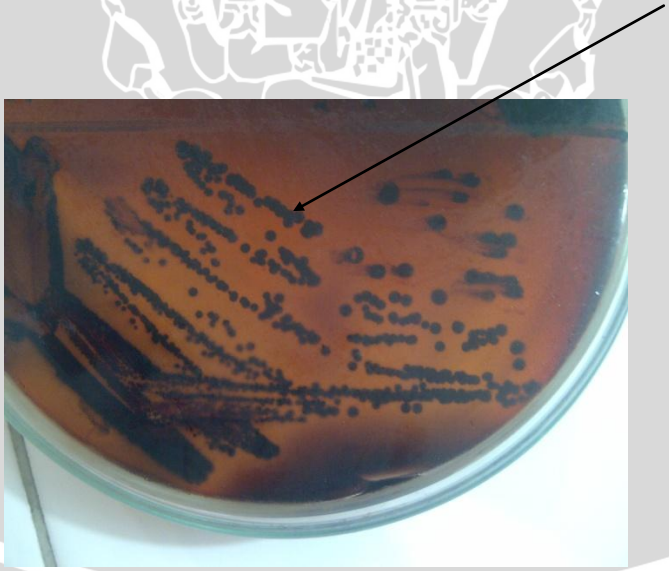


Gambar 5.4 Tes Koagulase. Tes menunjukkan positif dengan terbentuknya gumpalan (ujung anak panah)

5.1.2 Hasil Uji Deteksi Pembentukan Biofilm

Untuk mengetahui apakah bakteri ini membentuk biofilm, maka dilakukan uji pembentukan biofilm dengan menginokulasi bakteri pada *Congo Red Agar.* Hasilnya menunjukkan bakteri yang memunculkan warna hitam yang menghasilkan biofilm.

\



Gambar 5.5 Hasil Uji Deteksi Pembentukan Biofilm. *S. aureus* (ujung anak panah) merupakan bakteri pembentuk biofilm. Hal ini ditandai dengan pembentukan koloni berwarna hitam(ujung anak panah) pada media *Congo Red Agar.*

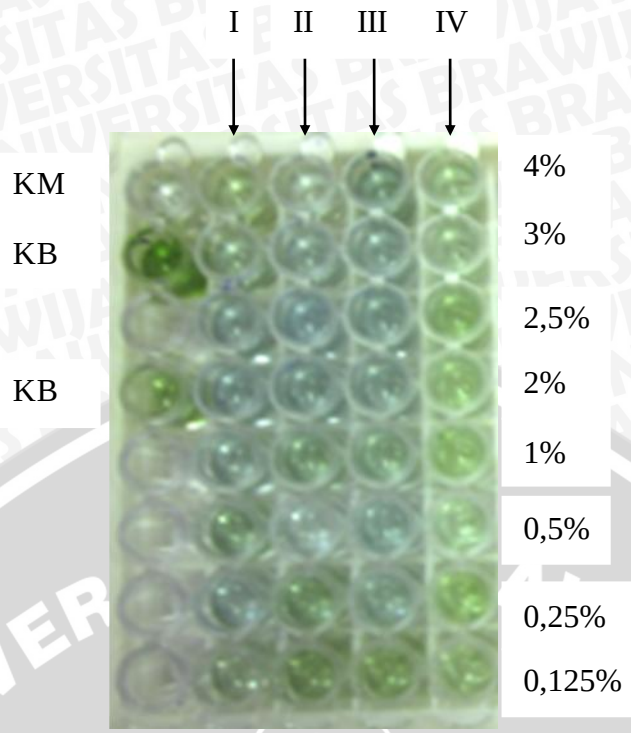
5.1.3 Hasil Uji Hambat Pembentukan Biofilm

Pada penelitian pendahuluan untuk eskplorasi dosis, peneliti telah membuat beberapa kali percobaan dosis. Dari penelitian pendahuluan tersebut diperoleh kesimpulan bahwa konsentrasi ekstrak di atas 4% (konsentrasi ekstrak murni dianggap sebagai konsentrasi 100%) mengganggu pembacaan ELISA reader. Hal ini terjadi karena pada ekstrak peneliti didapatkan presipitat/endapan yang dapat mempengaruhi kekeruhan *microtiter wellplate*-96. Sehingga dengan demikian, pada penelitian ini peneliti menggunakan batas atas konsentrasi ekstrak sebesar 4%. Berdasarkan penelitian Gad *et. al*., 2009, yaitu jika nilai mean OD<0,120 itu berarti bahwa perlekatan bakteri tidak terjadi dan pembentukan biofilm tidak ada atau minimal. Nilai mean OD diantara 0,120-0,240 berarti terjadi perlekatan bakteri dan pembentukan biofilm dalam jumLah sedang. Nilai mean OD>0,240 berarti terjadi ikatan kuat bakteri terhadap substrat dan terbentuk biofilm dalam jumLah tinggi. Kesimpulan yang dapat diperoleh dari penelitian pendahuluan adalah bahwa nilai *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* adalah sebesar 0.125%. Data selengkapnya dapat dilihat dari tabel 5.1.

Tabel 5.1 Hasil Pembacaan ELISA Reader Penelitian Pendahuluan Eksplorasi Dosis Ekstrak

Ekstrak kulit buah manggis-*Staphylococcus aureus*					
Penelitian Pendahuluan I		**Penelitian Pendahuluan II**		**Penelitian Pendahuluan III**	
Ekstrak (%)	**OD**	**Ekstrak (%)**	**OD**	**Ekstrak (%)**	**OD**
Kontrol bakteri (0%)	0,128	Kontrol bakteri (0%)	0,151	Kontrol bakteri (0%)	0,156
6	0,293	4	0,044	2	0,065
5	0,156	2	0,054	1	0,077
4	0,048	1	0,067	0,5	0,086
2	0,067	0,5	0,079	0,25	0,091
1	0,074	0,25	0,090	0,125	0,108
0,5	0,089	0,125	0,101	0,0625	0,123
0,25	0,092	0,0625	0,128	0,03125	0,130
0,125	0,098	0,03125	0,144	0,015625	0,146

Pada penelitian ini digunakan 8 macam konsentrasi ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L.*) yaitu 4%, 3%, 2,5%, 2%, 1%, 0,5%, 0,25%, dan 0,125% serta konsentrasi 0% sebagai kontrol positif. Pengamatan langsung hasil akhir pembentukan biofilm dapat dilihat selengkapnya pada Gambar 5.6.

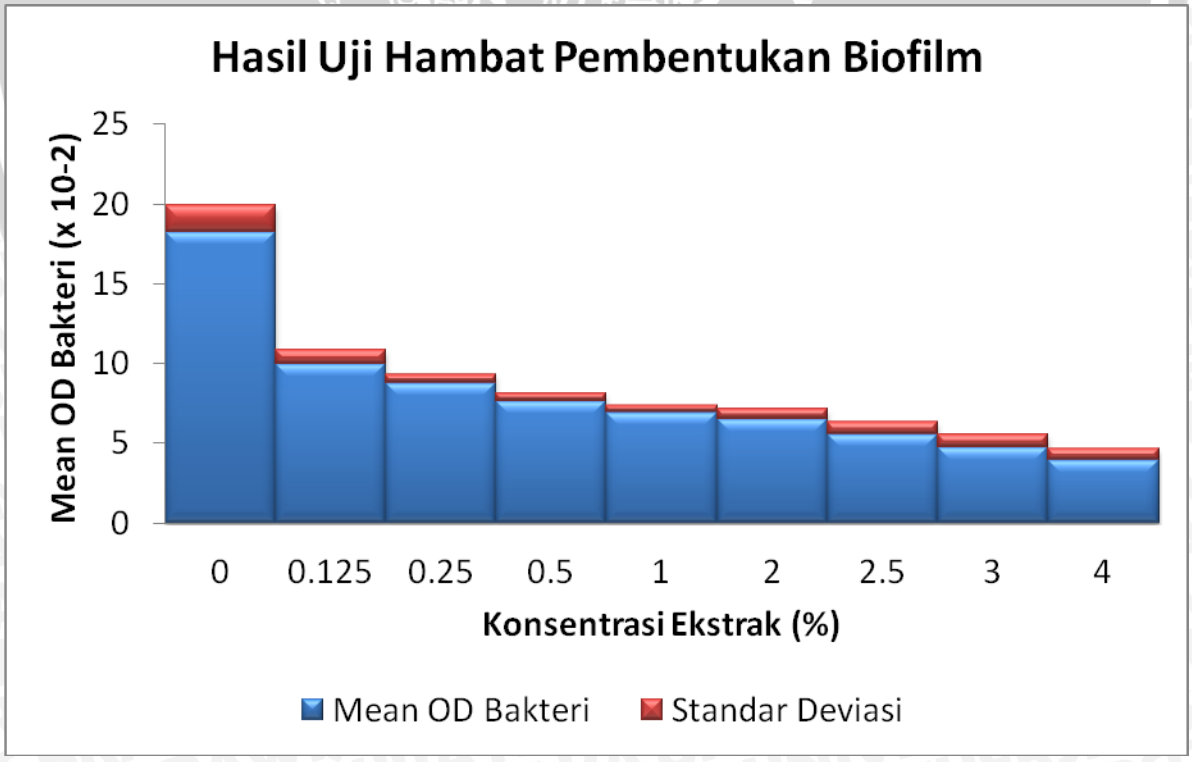


Gambar 5.6 Hasil Uji Hambat Pembentukan Biofilm. Uji hambat pembentukan biofilm dilakukan pada microtiter wellplate dengan 8 konsentrasi yaitu 4%, 3%, 2,5%, 2%, 1%, 0,5%, 0,25%, dan 0,125%. Uji hambat dilakukan pengulangan 4x yaitu I,II, III, dan IV. Dalam pembacaan ELISA reader, microtiter paling atas kiri digunakan sebagai Kontrol Media (KM), dan terdapat Kontrol Bakteri (KB) atau Kontrol positif (0%)

Penilaian pengamatan terhadap pembentukan biofilm menggunakan hasil spektrofotometri berupa Optical Density. Pembacaan dilakukan menggunakan ELISA reader dengan panjang gelombang 570nm. Hasil uji hambat pembentukan biofilm masing-masing konsentrasi dan pengulangan dapat dilihat selengkapnya pada Tabel 5.2 dan Gambar 5.7. Hasil ini mengindikasikan bahwa semakin tinggi konsentrasi dosis ekstrak, semakin rendah nilai mean OD (semakin sedikit pembentukan biofilm atau tidak terbentuk biofilm sama sekali). Jika biofilm tidak dibentuk, maka secara otomatis, bakteri lebih mudah dibunuh (lebih sensitif), karena seringkali didapatkan resistensi infeksi *Staphylococcus aureus* kronis yang mana setelah diteliti lebih lanjut, dapat terjadi karena terbentuknya biofilm.

Tabel 5.2 Hasil Pembacaan ELISA Reader Uji Hambat Pembentukan Biofilm

Konsentrasi Ekstrak (%)	Optical Density Bakteri				Mean OD	Standard Deviation
	I	II	III	IV		
0 (Kontrol bakteri)	*17,0* x 10^{-2}	*20,5* x 10^{-2}	*18,6* x 10^{-2}	*16,9* x 10^{-2}	18,250 x 10^{-2}	1,6902 x 10^{-2}
4	3,6 x 10^{-2}	4,5 x 10^{-2}	4,6 x 10^{-2}	3,1 x 10^{-2}	3,950 x 10^{-2}	0,7234 x 10^{-2}
3	4,6 x 10^{-2}	5,8 x 10^{-2}	4,7 x 10^{-2}	3,8 x 10^{-2}	4,725 x 10^{-2}	0,8221 x 10^{-2}
2,5	5,2 x 10^{-2}	6,4 x 10^{-2}	6,0 x 10^{-2}	4,7 x 10^{-2}	5,575 x 10^{-2}	0,7676 x 10^{-2}
2	5,7 x 10^{-2}	7,3 x 10^{-2}	6,6 x 10^{-2}	6,3 x 10^{-2}	6,475 x 10^{-2}	0,6652 x 10^{-2}
1	6,5 x 10^{-2}	7,4 x 10^{-2}	7,2 x 10^{-2}	6,7 x 10^{-2}	6,950 x 10^{-2}	0,4203 x 10^{-2}
0,5	7,3 x 10^{-2}	7,7 x 10^{-2}	8,3 x 10^{-2}	7,1 x 10^{-2}	7,600 x 10^{-2}	0,5292 x 10^{-2}
0,25	8,8 x 10^{-2}	9,3 x 10^{-2}	9,0 x 10^{-2}	8,1 x 10^{-2}	8,800 x 10^{-2}	0,5099 x 10^{-2}
0,125	9,9 x 10^{-2}	11,2 x 10^{-2}	9,6 x 10^{-2}	9,0 x 10^{-2}	9,925 x 10^{-2}	0,9287 x 10^{-2}



Gambar 5.7 Grafik Perbandingan Konsentrasi Ekstrak terhadap Nilai Mean *Optical Density* (OD) Bakteri

5.2. Analisa Data

Hasil penelitian ini dianalisa menggunakan program analisa data statistik SPSS versi 20.0 untuk *Windows*. Data hasil pembacaan ELISA reader pada Tabel 5.2 dilakukan Uji *Kolmogorov-Smirnov* setelah itu dianalisa Uji *One Way ANOVA* yang dilanjutkan dengan Uji Korelasi *Pearson*. Uji *Kolmogorov-smirnov* dilakukan untuk mengetahui apakah sampel data yang akan dianalisa distribusinya normal atau tidak. Uji *One Way ANOVA* digunakan untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna antar kelompok data. Pada Uji *One Way ANOVA* terdapat analisa *Post-Hoc multiple comparison test* untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara bermakna. Uji Korelasi *Pearson* dilakukan untuk membuktikan korelasi antara peningkatan konsentrasi ekstrak kulit buah manggis terhadap nilai OD bakteri.

5.2.1 Uji *Kolmogorov-Smirnov*

Sebelum menganalisa data OD bakteri dengan *One Way ANOVA* dilakukan pengujian syarat *ANOVA* untuk > 2 kelompok data tidak berpasangan, yaitu pengujian terhadap distribusi/sebaran data (harus normal) dan varians data (harus sama). Uji *Kolmogorov-Smirnov* pada penelitian kali ini mempunyai data sebaran normal, yaitu $p = 0.092$ untuk variabel konsentrasi ekstrak dan $p = 0.160$ untuk variable nilai OD bakteri. Pada uji ini dikatakan bahwa distribusi normal apabila $p > \frac{1}{2}\alpha$ atau $p > 0.025$. Dengan demikian, syarat Uji *ANOVA* terpenuhi. Syarat *ANOVA* lainnya adalah varian data harus sama, maka dilakukan uji homogenitas varian untuk menguji apakah varian data sama/homogen atau tidak. Dari hasil uji homogenitas varian didapatkan $p = 0.112$ ($p > 0.05$) yang

berarti bahwa varian antar perlakuan sudah homogen sehingga syarat Uji ANOVA terpenuhi.

5.2.2 Uji *One Way ANOVA*

Setelah semua syarat terpenuhi maka dilanjutkan dengan Uji *One Way ANOVA*. Dari hasil Uji *ANOVA* diperoleh nilai p = 0,000 (p < 0,05) sehingga dapat disimpulkan bahwa "terdapat sedikitnya dua kelompok data yang mempunyai perbedaan nilai mean OD bakteri secara bermakna". Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 2 dan 3.

Analisa mengenai perbedaan rata-rata dari kedelapan kelompok dapat diketahui dalam Uji *Post Hoc Multiple Comparison*. Metode *Post Hoc* yang digunakan adalah Uji *Tukey*. Indikator yang digunakan untuk melihat apakah perbedaan mean OD bakteri antar kelompok dianggap bermakna adalah nilai signifikansi pada tabel. Perbedaan dianggap signifikan jika nilai p < 0,05. Berdasarkan uji tersebut didapatkan hasil sebagai berikut :

Tabel 5.3 Hasil Uji *Post Hoc Multiple Comparison Test* Intensitas Warna Biofilm

Nilai p	0%	0,125%	0,25%	0,5%	1%	2%	2,5%	3%	4%
0%	-	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000	.000
0.125%	.000	-	.652	.017	.001	.000	.000	.000	.000
0,25%	.000	.652	-	.574	.100	.017	.000	.000	.000
0,5%	.000	.017	.574	-	.974	.652	.054	.002	.000
1%	.000	.001	.100	.974	-	.997	.399	.026	.001
2%	.000	.000	.017	.652	.997	-	.855	.140	.008
2,5%	.000	.000	.000	.054	.399	.855	-	.889	.205
3%	.000	.000	.000	.002	.026	.140	.889	-	.931
4%	.000	.000	.000	.000	.001	.008	.205	.931	-

Keterangan

= nilai p<0,05 = terdapat perbedaan bermakna antara dua kelompok (signifikan)
= nilai p>0,05 = tidak terdapat perbedaan bermakna antara dua kelompok (tidak signifikan)

Dari tabel diatas terlihat bahwa terdapat perbedaan mean OD bakteri yang bermakna (p<0,05) pada setiap kelompok konsentrasi ekstrak (4%, 3%, 2,5%, 2%, 1%, 0,5%, 0,25%, dan 0,125%) bila dibandingkan dengan kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa semua konsentrasi ekstrak efektif untuk menghambat terjadinya pembentukan biofilm. Akan tetapi jika diamati lebih lanjut dari tabel di atas, dapat diperoleh kesimpulan lain yaitu pada 2 konsentrasi yang berdekatan, pada umumnya, selalu didapatkan perbedaan yang tidak signifikan. Sehingga dengan demikian disimpulkan bahwa untuk menghambat pembentukan biofilm, sebaiknya digunakan ekstrak kulit buah manggis dengan konsentrasi ekstrak yang tidak berdekatan.

5.2.3 Uji Korelasi *Pearson*

Selanjutnya, untuk mengetahui kekuatan hubungan antara peningkatan dosis pemberian ekstrak kulit buah manggis dan mean OD bakteri, dilakukan Uji Korelasi *Pearson*. Dari hasil analisa didapatkan hasil sebagai berikut:

Tabel 5.4 Hasil Uji Korelasi *Pearson*

Correlations

		Ekstrak	OD
Ekstrak	Pearson Correlation	1	-.723**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	36	36
OD	Pearson Correlation	-.723**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	36	36

**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Agar penafsiran dapat dilakukan sesuai dengan ketentuan, kita perlu mempunyai kriteria yang menunjukkan kuat atau lemahnya korelasi. Kriterianya sebagai berikut:

Nilai Korelasi 0	=	tidak ada korelasi antara dua variabel
Nilai Korelasi > 0 – 0,25	=	sangat lemah
Nilai Korelasi > 0,25 – 0,5	=	cukup
Nilai Korelasi > 0,5 – 0,75	=	kuat
Nilai Korelasi > 0,75 – 0,99	=	sangat kuat
Nilai Korelasi 1	=	sempurna

Korelasi dapat positif dan negatif. Korelasi positif menunjukkan arah yang sama hubungan antar variabel. Sebaliknya korelasi negatif menunjukkan arah yang berlawanan.

Signifikansi hubungan dua variabel dapat dianalisa dengan ketentuan, jika probabilitas atau signifikansi < 0,05, hubungan kedua variabel signifikan. Jika probabilitas atau signifikansi > 0,05, hubungan kedua variabel tidak signifikan.

Dari hasil perhitungan, didapatkan hasil sebagai berikut:

1. Kekuatan korelasi (*r*) =- 0.723, yang berarti terdapat korelasi yang kuat antara dosis ekstrak kulit buah manggis dengan mean OD bakteri.
2. Arah korelasi adalah negatif; artinya semakin besar dosis ekstrak kulit buah manggis, semakin kecil nilai mean OD bakteri
3. Nilai p = 0,000, yang berarti terdapat korelasi yang signifikan (p < 0,05) antara dosis ekstrak kulit buah manggis dengan mean OD bakteri.

BAB 6
PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek dari ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L.*) yang signifikan dalam menghambat pembentukan biofilm pada bakteri *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*. Bakteri *Staphylococcus aureus* ini akan dilakukan uji hambat pembentukan biofilm di *96-well flat-bottomed plastic tissue culture plate* dengan menggunakan metode *Tissue Culture Plate*, yang mana merupakan uji kuantitatif. Selanjutnya dengan prosedur yang telah ditentukan, akan didapat suatu nilai yaitu *Optical Density* (OD) biofilm diukur hasil dari pembacaan ELISA reader. Secara khusus dalam penelitian ini juga dicari Minimum Biofilm Inhibitory Concentration (MBIC). MBIC ini dapat diamati secara kuantitatif menggunakan pedoman dari penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Gad *et. al.*, 2009, dan Mathur *et. al.*, 2006, yaitu menggunakan nilai *Mean Optical Density*.

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat bakteri *Staphylococcus aureus* strain pembentuk biofilm yang berasal dari *stock culture* bakteri yang disimpan di laboratorium Mikrobiologi FKUB. Bakteri yang berasal dari *stock culture* disubkultur dalam medium *Nutrient Agar Plate* (NAP) lalu diinkubasi selama 18-24 jam. Selanjutnya dilakukan identifikasi bakteri, yaitu pengamatan secara makroskopis dengan melihat bentuk dan warna koloni bakteri yang dibentuk dalam medium NAP, pada bakteri *Staphylococcus aureus*

didapatkan koloni bakteri yang berbentuk bulat, halus, menonjol, berkilau, dan berwarna kuning keemasan(Gambar 5.1). Pemeriksaan selanjutnya adalah pewarnaan Gram. Pada pewarnaan Gram dan pengamatan di bawah mikroskop perbesaran 1000x didapatkan gambaran bakteri kokus berwarna ungu yang menunjukkan sifat Gram positif, serta bergerombol berbentuk seperti anggur (Gambar 5.2). Untuk membedakan antara genus *Staphylococcus sp* dan *Streptococcus sp*, dilakukan tes katalase. Hasil positif berupa adanya gelembung pada tabung reaksi mengindikasikan bahwa biakan bakteri yang dites adalah genus *Staphylococcus sp.* (Gambar 5.3). Selanjutnya dilakukan tes koagulase untuk membedakan antara *Staphylococcus* koagulase positif (hanya *Staphylococcus aureus*) dengan *Staphylococcus* koagulase negatif. Hasil positif mengindikasikan bahwa biakan bakteri yang dites adalah *Staphylococcus aureus* (Gambar 5.4). Dengan seluruh pemeriksaan identifikasi bakteri tersebut maka dapat dibuktikan bahwa isolat bakteri yang dipakai dalam penelitian ini adalah *Staphylococcus aureus* (Dzen dkk, 2003; Todar, 2011).

Untuk mendapatkan strain bakteri pembentuk biofilm, dilakukan uji deteksi pembentukan biofilm dengan cara menginokulasikan bakteri pada medium *Congo Red Agar* (CRA). Koloni berwarna hitam menunjukkan hasil positif, sehingga didapatkan bakteri yang membentuk biofilm (Gambar 5.5). Biofilm ini dapat menempel pada substrat/media yang sering mengakibatkan infeksi terkait *indwelling devices* seperti pemasangan kateter. Pembentukan matriks biofilm berupa *polysaccharide intercellular adhesion* (PIA) dan adanya molekul adhesin MSCRAMMs merupakan langkah krusial pembentukan biofilm yang mana menjadi faktor virulensi bakteri. Kemampuan bakteri membentuk biofilm dapat membantu bakteri menghindar dari sistem imun penderita dan

seringkali menyebabkan infeksi kronis (Gad *et. al.*,2009; Rohde *et. al.*, 2010; Jass *et. al.*,2003).

Ekstrak yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L.*) Ekstrak didapatkan dengan cara ekstraksi maserasi, yaitu metode pelarutan sederhana. Ekstraksi dilakukan di Balai Materia Medika Batu. Pada proses ekstraksi ini digunakan pelarut etanol 70% dan didapat hasil berupa ekstrak bersifat suspensi. Ekstrak kulit buah manggis ini dipilih karena terdapat banyak kandungan zat-zat aktif yang sangat baik, terutama antioksidan dan senyawa-senyawa aromatic seperti xanthone, tannin, flavonoid, dan kuinon. Bahan-bahan aktif ini diperkirakan dapat menghambat proses pembentukan biofilm. Mekanisme yang berbeda-beda tiap zat aktif membuat pembentukan biofilm dapat dihambat secara lebih efektif.

Sebelum dimulai penelitian, dilakukan eksplorasi dahulu untuk mendapatkan konsentrasi perlakuan. Dari penelitian eksplorasi (Tabel 5.1) dapat diketahui rentang konsentrasi dimana batas atas yang dipergunakan adalah konsentrasi ekstrak sebesar 4% yang dikarenakan pada konsentrasi di atas 4% ekstrak dapat mengganggu hasil pembacaan dan batas bawah dimana sudah tidak didapatkan lagi pembentukan biofilm (MBIC) sebesar 0,125%. Dari angka ini dapat ditentukan konsentrasi yang tepat pada penelitian. Konsentrasi ekstrak yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 4% (6700 µg/mL), 3% (5000 µg/mL), 2,5% (4200 µg/mL), 2% (3300 µg/mL), 1% (1670 µg/mL), 0,5% (830 µg/mL), 0,25% (420 µg/mL), dan 0,125% (210 µg/mL) serta konsentrasi 0% sebagai kontrol positif.

Metode yang digunakan dalam uji hambat pembentukan biofilm adalah metode *Tissue Culture Plate*. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh

Mathur (2006) metode *Tissue Culture Plate* mempunyai angka sensitivitas sebesar 97,1%, spesifisitas sebesar 97,5%, dan akurasinya sebesar 97,2%. Pada 96 *well flat bottomed plastic culture plate* yang steril dipindahkan bakteri dalam media TSBglu dan diinkubasikan selama 18-24 jam pada suhu 37ºC. Selanjutnya ekstrak kulit buah manggis sesuai dengan konsentrasinya masing-masing ditambahkan ke *plate*. Setelah diinkubasikan 24 jam plate dibersihkan dengan *Phosphat Buffer Saline* (PBS) 3-4 kali. Sebelum dilakukan pembacaan, plate diberi crystal violet, ditunggu sekitar 15 menit, kemudian dibilas dan difiksasi menggunakan isopropanol sebagai media untuk pembacaan ELISA reader.

Pengamatan biofilm dilakukan dengan cara pembacaan hasil ELISA reader secara kuantitatif berupa nilai *Optical Density* bakteri. Prosedur pemberian ekstrak terhadap bakteri pembentuk biofilm dan mengukur nilai OD Biofilm dengan menggunakan ELISA reader ini diulang sebanyak empat kali. Dari pengulangan sebanyak empat kali ini (Tabel 5.2), hasil yang didapatkan selalu menunjukkan bahwa semua konsentrasi dapat menghambat pembentukan biofilm yang dihasilkan *S. aureus*, karena OD biofilm bakteri yang diberi perlakuan berupa ekstrak selalu menunjukkan angka di bawah 0,120. Berdasarkan dari penelitian yang telah dilakukan sebelumnya (Gad *et. al.,* 2009, dan Mathur *et. al.*, 2006), nilai mean OD<0,120 itu berarti bahwa perlekatan bakteri tidak terjadi dan pembentukan biofilm tidak ada atau minimal. Nilai mean OD diantara 0,120-0,240 berarti terjadi perlekatan bakteri dan pembentukan biofilm dalam jumLah sedang. Nilai mean OD>0,240 berarti terjadi ikatan kuat bakteri terhadap substrat dan terbentuk biofilm dalam jumLah tinggi.

Hasil pengukuran mean OD bakteri kemudian dianalisa dengan program SPSS versi 20 untuk *Windows*. Uji statistik yang digunakan adalah uji *Kolmogorov-Smirnov*, uji *One Way ANOVA* (termasuk di dalamnya uji homogenitas dan uji *Post Hoc*) dan uji korelasi *Pearson.* Dari uji *Kolmogorov-Smirnov* (Lampiran 1) didapatkan nilai *p* = 0.092 untuk variabel konsentrasi ekstrak dan *p* = 0.160 untuk variable nilai OD bakteri yang keduanya berarti distribusi datanya normal ($p > \frac{1}{2}\alpha$ atau $p > 0.025$). Uji ini digunakan sebagai syarat uji statistik parametric *ANOVA*. Dari hasil uji homogenitas (Lampiran 1) varian didapatkan *p* = 0.112 (*p* > 0.05) yang berarti bahwa varian antar perlakuan sudah homogen sehingga syarat uji *ANOVA* terpenuhi. Dari hasil uji *ANOVA* (Lampiran 2) diperoleh nilai *p* = 0,000 (*p* < 0,05) sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat sedikitnya dua kelompok konsentrasi ekstrak yang mempunyai perbedaan nilai mean OD bakteri secara bermakna. Hasil uji *Pearson* (Lampiran 3) menunjukkan kekuatan korelasi (*r*) =- 0.723, yang berarti terdapat korelasi yang kuat (mendekati -1) antara dosis ekstrak kulit buah manggis dengan mean OD bakteri. Tanda korelasi negatif menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L.*) maka semakin kecil nilai mean OD bakteri. Dari hasil analisa yang didapat, bisa diambil kesimpulan bahwa ekstrak kulit buah manggis dapat menghambat pembentukan biofilm dari bakteri *S.aureus* mulai dari konsentrasi terkecil yaitu 210 µg/mL.

Hasil penelitian ini cukup baik apabila dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan oleh Quave *et. al*., 2012. Pada penelitian tersebut, asam ellagic dan derivatnya yang diperoleh dari *Rubus ulmifolius* digunakan untuk menghambat pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus* dan meningkatkan respon terhadap antibiotik. Derivat asam ellagic yang digunakan adalah partisi

butanol (220D-F2). Derivat inilah yang digunakan untuk menghambat pembentukan biofilm dari 15 strain ganas *S. aureus*. Dari penelitian diperoleh dosis aktif dari derivat asam ellagic yang diperlukan untuk penghambatan biofilm berkisar dari 50-200 µg/mL (tergantung strain *S. aureus*). Selain itu terdapat penelitian oleh Vishnu P *et. al*., 2010, yang meneliti tentang efek ekstrak kulit buah manggis terhadap *S. aureus*. Ekstrak kulit buah manggis dapat menghambat pertumbuhan *S. aureus* dengan konsentrasi MIC 200 µg/mL. Dengan demikian perbedaan konsentrasi MBIC peneliti dengan MIC penelitian tersebut tidak berbeda signifikan karena menilik penelitian yang dilakukan oleh Kwiecińskia *et. al.,* 2009, bahwa MBIC ekstrak sebesar dua kali lipat lebih tinggi daripada Kadar Bunuh Minimum (KBM).

Penghambatan pembentukan biofilm diduga dikarenakan oleh kandungan-kandungan yang terdapat pada kulit buah manggis seperti *xanthone, flavonoid, tannin*, *kuinon, epicatechin* dan *monoterpenoid*. Senyawa xanthone terutama alpha-mangostin dan rubraxanthone dapat bersifat bakterisidal terhadap bakteri itu sendiri. Berdasarkan *review* penelitian yang dilakukan J. Pedraza-Chaverri *et al*., 2008, α- mangostin (salah satu jenis senyawa xanthone) terbukti menunjukkan efikasi yang tinggi dalam menghambat pertumbuhan methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), yaitu dengan nilai MIC sekitar 1,57-12,5 µg/mL. Pada tahap selanjutnya untuk mencegah proses perlekatan bakteri, flavonoid dan tannin dapat mengikat molekul adhesin, sehingga dapat menghambat perlekatan bakteri dengan substrat/media (Cushnie dan Lamb, 2005; Cowan, 1999). Kuinon juga dapat menghambat proses perlekatan bakteri yaitu dengan cara menginaktivasi protein MSCRAMMs. Selain itu terdapat 2 senyawa lain yaitu monoterpenoid dan epicatechin yang mana dapat

mengganggu membran sel *S. aureus* (Cowan, 1999). Dengan mengganggu membran sel *S. aureus*, interaksi quorum sensing akan terganggu. Interaksi antar sel untuk berkomitmen melakukan perlekatan dan pembentukan biofilm, yang diperlukan pada tahap awal pembentukan biofilm, akan menjadi kacau. Kuinon akan menghambat pembentukan biofilm yang menggunakan protein yang independen terhadap kontrol gen ica. Sedangkan tannin akan menghambat pertumbuhan mikrokoloni dan merampas substrat yang nantinya akan dikode untuk jadi PIA (Akiyama *et al*., 2001).

Kandungan-kandungan zat aktif yang terdapat dalam ekstrak kulit buah manggis itu dapat saling bersinergis untuk menghambat pembentukan biofilm dari berbagai proses. Akan tetapi, pada penelitian ini tidak dibahas lebih lanjut mengenai mekanisme yang lebih detail pada proses penghambatan pembentukan biofilm dan zat aktif dari ekstrak kulit buah manggis yang paling efektif dalam proses tersebut. Dengan demikian diharapkan dilakukan penelitian tentang mekanisme proses penghambatan biofilm dan ekstrak kulit buah manggis secara lebih mendalam dan lebih luas demi kepentingan medis. Dengan mekanisme yang telah diperagakan di bab sebelumnya, ekstrak kulit buah manggis, selanjutnya dapat diteliti lebih lanjut, dapat dikonsumsi sebagai pendamping antibiotika, agar dapat meningkatkan potensi obat antibiotika, dan desinfektan alat-alat kedokteran yang dapat menyebabkan infeksi terkait *indwelling medical device*s.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian efek ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L.*) dalam menghambat pembentukan biofilm bakteri *Staphylococcus aureus* secara *in vitro,* maka dapat ditarik beberapa kesimpulan.

1. Ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L.*) dapat menghambat pembentukan biofilm bakteri *Staphylococcus aureus* secara *in vitro.*
2. *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC) ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana L.*) dalam penelitian ini adalah 0,125% yang mana sebesar 210 µg/mL.

7.2 Saran

1. Diperlukan penelitian lebih lanjut tentang pemanfaatan ekstrak kulit buah manggis (Garcinia mangostana L.) sebagai desinfektan alat kedokteran dan pendamping antibiotika pada kasus infeksi kronis.
2. Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai zat-zat aktif mana yang paling poten dalam proses penghambatan pembentukan biofilm
3. Diperlukan penelitian lebih lanjut tentang cara fiksasi pewarnaan dan reaktan pewarnaan well-plate yang lebih tepat dan sempurna untuk mendapatkan hasil yang lebih maksimal.

DAFTAR PUSTAKA

Akao Y., Nakagawa Y., Iinuma M. and Nozawa Y. 2008. Anti-Cancer Effects of Xanthones from Pericarps of Mangosteen. *International Journal of Molecular Sciences*. 2008, 9, 355-370

Akiyama H., Fujii K., Yamasakai O., Oono T., and Iwatsuki K. 2001. Antibacterial Action of Several Tannins Against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotheraphy*, 48 : 487-491.

Brooks Geo F., Butel James S. and Morse Stephen A. 1996. Medical Microbiology, Elferia R.N (Ed), 2007. Mikrobiologi Kedokteran, Hartanto Huriawati (penterjemah), ECG, Jakarta, Indonesia.

Chaverri J P, Rodríguez N C, Ibarra M O, and Pérez-Rojas J M. 2008. Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana). Food and Chemical Toxicology* 46 (2008) 3227-3239.

Chin Y. W., Jung H. A., Chai H., Keller W. J. and Kinghorn A. D. Xanthones with quinone reductase-inducing activity from the fruits of Garcinia mangostana (mangosteen). *Phytochemistry* . 2008;69(3):754-758.

Christensen *et. al.* 2000. *Handbook of Bacterial Adhesion*. New Jersey: Humana Press Inc.

Costerton J.W. Introduction to Biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 1999; 11: 217-221.

Cowan, M. M. 1999. *Clinical Microbiology Reviews - Plants Products as Antimicrobial Agents*. (Online). (http://cmr.asm.org/cgi/reprint/12/4/564, diakes tanggal 12 Desember 2011)

Cramton, S. E., Ulrich M., Gotz F. and Doring G.. 2001. Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun* 69: 4079-4085.

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

Domrachev M., Federhen S., Hotton C., Leipe D., Soussov V. and Sharma S. 2008. Taxonomy Browser – *S. aureus* (Online). (www.ncbi.nlm.nih.gov,diakses pada 20 Desember 2011).

Donlan R. M. and Costerton J. W. 2002. Biofilm: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, April 2002, p. 167-193

Dzen S. M. dkk.. 2010. *Bakteriologi Medik*. Surabaya: Putra Media Nusantara. Hal: 131-140

Forbes B. A., Sahm D. F. and Weissfeld A. S. 2007. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology 12th Edtion*. USA : Mosby.

Gad G.F.M., Ali M.E.F., Said M.E.R., Hassan M.A. Abolella H. and Mahmoud R.A.E.B. 2009. Detection of *ica*a, *ica*d Genes and Biofilm Production By *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* Isolated from Urinary Tract Cathetherized Patients. *J Infect Dev Ctries* 2009; 3(5): 342-351. Egypt

Gemmell, C.G., Edwards, D.I. and 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 8 Desember 2011).

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 8 Desember 2011).

Iinuma M. *et. al.* 1996. Antibacterial Activity of Xanthones from Guttiferaeous Plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Pharm. Pharmacol*. 1996, 48: 861-865

Jain A. and Agarwal A. 2009. Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci. *Journal of Microbiological Methods* 76 (2009) 88-92

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

Jawetz E., Melnick and Adelbergs. 2007. *Medical Microbiology 24th Edition*. New York: Lange Medical Book.

Kayser F. H., Bienz K. A., Eckert J. and Zinkernagel R. M. 2005. *Medical Microbiology*. Georg Thieme Verlag. Stuttgart, Germany.

Knobloch, J. K. M, Horstkotte M. A., Rohde H., Kaulfers P., and Mack D. 2002. Alcoholic ingredients in skin disinfectants increase biofilm expression of *Staphylococcus epidermidis. J Antimicrob Chemother* 49:683-687

Knobloch J., Horstkotte M., Rohde H. and Mack D. 2002. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Med Microbiol Immunol* (2002) 191: 101-106

Kwiecińskia J., Eickb, Wójcika K. 2009. Effects of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil on *Staphylococcus aureus* in biofilms and stationary growth phase (Online). (http://www.ijaaonline.com/article/S0924-8579%2808%2900444-5/abstract, diakses tanggal 2 Desember 2012).

Mack D. 1999. Molecular mechanism of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. *Journal of Hospital Infection* (1999) 43 (Supplement): S113-S125

Madigan M. T., Martinko J. M., Dunlap P. V. and Clark D. P. 2008. Biology of Microorganisms 12th edition. San Francisco: Pearson.

Mardiana L. 2011. *Ramuan dan Khasiat Kulit Manggis*/ Lina Mardiana dan Tim Penulis PS. Jakarta: Penebar Swadaya 76 hlm.

Mathur T., Singhal S., Khan S., Upadhyay D. J., Fatma T. and Rattan A. 2006. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of Medical Microbiology*, (2006) 24 (I): 25-9

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

Notobroto B. H. 2005. Penelitian Eksperimental dalam Materi Praktikum Teknik Sampling dan Penghitungan Besar Sampel Angkata III. Surabaya : Lembaga Penelitian Universitas Airlangga.

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

Priya, Vishnu V., Jainu, M., Mohan, S.K., Saraswathi, Gopan C.S. 2010. Antimicrobial Activity of Pericarp Extract of *Garcinia mangostana Linn*. Vishnu Priya *et. al./ International Journal of Pharma Sciences and Research (IJPSR)* Vol.1(8), 2010, 278-281. India

Pace J. L., Rupp M. E. and Finch R. G.2006. Biofilm, Infection, and Antimicrobial Therapy. USA : CRC Press Taylor and Francis Group.

Pradipta I. S., Nikodemus T. W. dan Susilawati Y. 2004. *Isolasi dan Identifikasi Senyawa Golongan Xanton dari Kulit Buah Manggis (Garcinia mangostana* L.*)* hlm 64-77

Quave C L, Carmona M E, Compadre C M, Hobby G, Hendrickson H, et al. 2012. Ellagic Acid Derivatives from *Rubus ulmifolius* Inhibit *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation and Improve Response to Antibiotics. PLoS ONE 7(1): e28737. doi:10.1371/journal.pone.0028737

Rachid, S., K. Ohlsen, W. White, J. Hacker, and W. Ziebuhr. 2000. Effect subinhibitory antibiotic concentration on polysaccharide intercellular

adhesin expression in biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 44:3357-3363

Rachid, S., S. Cho, K. Ohlsen, W. White, J. Hacker, and W. Ziebuhr. 2000. Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation by environmental factors; the possible involvement of the alternative transcription factor SigB, p. 159-166. In: L. Emody, G. Blum-Oehler, J. Hacker, and T. Pad (eds.), *Genes and proteins underlying microbial urinary tract virulence*. Plenum Press, New York.

Ramage C. M., Sando L., Peace C. P., Carroll B. J. and Drew R. A. 2004. Genetic diversity revealed in the apomictic fruit species Garcinia mangostana L. (mangosteen). *Euphytica* . 2004;136:1-10.

Remel. 2011. Staphaurex, (Online), (http://www.remel.com/Clinical/DiagnosticTests/Staphaurex.aspx, diakses tanggal 10 Desember 2011).

Rohde H., Frankenberger S., Zahringer U., Mack D. 2010. Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. *European Journal of Cell Biology* 89 (2010) 103-111.

Speziale P, Visai L., Rindi S., Pietrocola G., Provenza G. and Provenzano M.. 2008. Prevention and Treatment of *Staphylococcus* Biofilms. *Current Medicinal Chemistry*, 2008,15, 3185-3195. Bentham Science Publishers Ltd: Italy.

Todar K. 2011. Web Review of Todar's Online Textbook of Bacteriology. *"The Good, the Bad, and the Deadly"*. (SCIENCE Magazine- June 4, 2004- Vol 304: p. 1421). (http://www.textbookofbacteriology.net/staph_2.htmL, diakses tanggal 5 Desember 2011)

WHO. *Bacterial Infections*, (Online), (http://www.who.int/vaccine_research/diseases/soa_bacterial/en/index2.htmL, diakses tanggal 5 Desember 2011)

LAMPIRAN

UJI PRE-ANALITIK

1. Uji *Kolmogorov-Smirnov*

Dalam penelitian ini digunakan Uji *Kolmogorov-Smirnov* terhadap tiap-tiap variabel untuk menguji apakah sampel penelitian mempunyai sebaran data yang normal,

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Ekstrak	OD
N		36	36
Normal Parameters[a,b]	Mean	1.486111	8.028
	Std. Deviation	1.3815680	4.1541
Most Extreme Differences	Absolute	.207	.187
	Positive	.207	.187
	Negative	-.141	-.118
Kolmogorov-Smimov Z		1.241	1.123
Asymp. Sig. (2-tailed)		.092	.160

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Nilai signifikansi = 0,092 dan 0,160 ($p > \frac{1}{2}\alpha$ atau p>0,025) yang berarti bahwa distribusi data normal (untuk kedua variable)

2. Uji Homogenitas Variansi Data

Test of Homogeneity of Variances

OD

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.846	8	27	.112

Nilai signikansi = 0,112 (p>0,05) yang berarti data mempunyai ragam (varians) yang homogen.

LAMPIRAN 2
UJI ANOVA

One-Way ANOVA

Descriptives

OD

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
.0000	4	18.250	1.6902	.8451	15.561	20.939	16.9	20.5
.1250	4	9.925	.9287	.4644	8.447	11.403	9.0	11.2
.2500	4	8.800	.5099	.2550	7.989	9.611	8.1	9.3
.5000	4	7.600	.5292	.2646	6.758	8.442	7.1	8.3
1.0000	4	6.950	.4203	.2102	6.281	7.619	6.5	7.4
2.0000	4	6.475	.6652	.3326	5.417	7.533	5.7	7.3
2.5000	4	5.575	.7676	.3838	4.354	6.796	4.7	6.4
3.0000	4	4.725	.8221	.4110	3.417	6.033	3.8	5.8
4.0000	4	3.950	.7234	.3617	2.799	5.101	3.1	4.6
Total	36	8.028	4.1541	.6924	6.622	9.433	3.1	20.5

ANOVA

OD

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	583.992	8	72.999	98.549	.000
Within Groups	20.000	27	.741		
Total	603.992	35			

Nilai signifikansi = 0,000 ($p < 0,05$) yang berarti bahwa ada perbedaan signifikan pada perubahan konsentrasi terhadap mean OD bakteri

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: OD

Tukey HSD

(I) Ekstrak	(J) Ekstrak	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
.0000	.1250	8.3250*	.6086	.000	6.277	10.373
	.2500	9.4500*	.6086	.000	7.402	11.498
	.5000	10.6500*	.6086	.000	8.602	12.698
	1.0000	11.3000*	.6086	.000	9.252	13.348
	2.0000	11.7750*	.6086	.000	9.727	13.823
	2.5000	12.6750*	.6086	.000	10.627	14.723
	3.0000	13.5250*	.6086	.000	11.477	15.573
	4.0000	14.3000*	.6086	.000	12.252	16.348
.1250	.0000	-8.3250*	.6086	.000	-10.373	-6.277
	.2500	1.1250	.6086	.652	-.923	3.173
	.5000	2.3250*	.6086	.017	.277	4.373
	1.0000	2.9750*	.6086	.001	.927	5.023
	2.0000	3.4500*	.6086	.000	1.402	5.498
	2.5000	4.3500*	.6086	.000	2.302	6.398
	3.0000	5.2000*	.6086	.000	3.152	7.248
	4.0000	5.9750*	.6086	.000	3.927	8.023
.2500	.0000	-9.4500*	.6086	.000	-11.498	-7.402
	.1250	-1.1250	.6086	.652	-3.173	.923
	.5000	1.2000	.6086	.574	-.848	3.248
	1.0000	1.8500	.6086	.100	-.198	3.898
	2.0000	2.3250*	.6086	.017	.277	4.373
	2.5000	3.2250*	.6086	.000	1.177	5.273
	3.0000	4.0750*	.6086	.000	2.027	6.123
	4.0000	4.8500*	.6086	.000	2.802	6.898
.5000	.0000	-10.6500*	.6086	.000	-12.698	-8.602
	.1250	-2.3250*	.6086	.017	-4.373	-.277
	.2500	-1.2000	.6086	.574	-3.248	.848
	1.0000	.6500	.6086	.974	-1.398	2.698
	2.0000	1.1250	.6086	.652	-.923	3.173
	2.5000	2.0250	.6086	.054	-.023	4.073

	3.0000	2.8750*	.6086	.002	.827	4.923
	4.0000	3.6500*	.6086	.000	1.602	5.698
	.0000	-11.3000*	.6086	.000	-13.348	-9.252
	.1250	-2.9750*	.6086	.001	-5.023	-.927
	.2500	-1.8500	.6086	.100	-3.898	.198
	.5000	-.6500	.6086	.974	-2.698	1.398
1.0000	2.0000	.4750	.6086	.997	-1.573	2.523
	2.5000	1.3750	.6086	.399	-.673	3.423
	3.0000	2.2250*	.6086	.026	.177	4.273
	4.0000	3.0000*	.6086	.001	.952	5.048
	.0000	-11.7750*	.6086	.000	-13.823	-9.727
	.1250	-3.4500*	.6086	.000	-5.498	-1.402
	.2500	-2.3250*	.6086	.017	-4.373	-.277
	.5000	-1.1250	.6086	.652	-3.173	.923
2.0000	1.0000	-.4750	.6086	.997	-2.523	1.573
	2.5000	.9000	.6086	.855	-1.148	2.948
	3.0000	1.7500	.6086	.140	-.298	3.798
	4.0000	2.5250*	.6086	.008	.477	4.573
	.0000	-12.6750*	.6086	.000	-14.723	-10.627
	.1250	-4.3500*	.6086	.000	-6.398	-2.302
	.2500	-3.2250*	.6086	.000	-5.273	-1.177
	.5000	-2.0250	.6086	.054	-4.073	.023
2.5000	1.0000	-1.3750	.6086	.399	-3.423	.673
	2.0000	-.9000	.6086	.855	-2.948	1.148
	3.0000	.8500	.6086	.889	-1.198	2.898
	4.0000	1.6250	.6086	.205	-.423	3.673
	.0000	-13.5250*	.6086	.000	-15.573	-11.477
	.1250	-5.2000*	.6086	.000	-7.248	-3.152
	.2500	-4.0750*	.6086	.000	-6.123	-2.027
	.5000	-2.8750*	.6086	.002	-4.923	-.827
3.0000	1.0000	-2.2250*	.6086	.026	-4.273	-.177
	2.0000	-1.7500	.6086	.140	-3.798	.298
	2.5000	-.8500	.6086	.889	-2.898	1.198
	4.0000	.7750	.6086	.931	-1.273	2.823
	.0000	-14.3000*	.6086	.000	-16.348	-12.252
	.1250	-5.9750*	.6086	.000	-8.023	-3.927
4.0000	.2500	-4.8500*	.6086	.000	-6.898	-2.802
	.5000	-3.6500*	.6086	.000	-5.698	-1.602
	1.0000	-3.0000*	.6086	.001	-5.048	-.952

2.0000	-2.5250*	.6086	.008	-4.573	-.477
2.5000	-1.6250	.6086	.205	-3.673	.423
3.0000	-.7750	.6086	.931	-2.823	1.273

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

Keterangan :

Dari tabel diatas terlihat bahwa terdapat perbedaan mean OD bakteri yang bermakna (p<0,05) pada setiap kelompok konsentrasi ekstrak (4%, 3%, 2,5%, 2%, 1%, 0,5%, 0,25%, dan 0,125%) bila dibandingkan dengan kontrol.

LAMPIRAN 3
UJI KORELASI *PEARSON*

Correlations

		Ekstrak	OD
Ekstrak	Pearson Correlation	1	-.723**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	36	36
OD	Pearson Correlation	-.723**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	36	36

**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

- Nilai signifikansi = 0,000 ($p < 0,05$) berarti ada hubungan yang signifikan antara kedua variabel.
- Nilai koefisien korelasi ($r = -0,723$) berarti kekuatan korelasinya kuat dan mempunyai hubungan terbalik.

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Christian Setiawan

NIM : 0910714065

Program Studi : Program Studi Pendidikan Dokter
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,

Yang membuat pernyataan,

Christian Setiawan
NIM. 0910714065