

**EFEK EKSTRAK UMBI LOBAK (*Raphanus sativus*)  
TERHADAP PEMBENTUKAN BIOFILM *Staphylococcus*  
*aureus* SECARA *IN VITRO***

**TUGAS AKHIR**

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



**Oleh :  
Tia Maya Affrita  
0910710123**

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2013**

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

EFEK EKSTRAK UMBI LOBAK (*Raphanus sativus*) TERHADAP  
PEMBENTUKAN BIOFILM *Staphylococcus aureus* SECARA *IN VITRO*

Oleh:

Tia Maya Affrita

NIM. 0910710123

Telah diuji pada

Hari : Selasa

Tanggal : 18 Desember 2012

dan dinyatakan lulus oleh :

Penguji I

dr. Onggung MH. Napitupulu, M.Kes

NIP.19490123 198003 1 001

Penguji II/Pembimbing I

Penguji III/ Pembimbing II

dr. Roekistiningsih, DMM, MS, Sp.MK (K)

NIP.19490206 197803 2 001

dr. Imam Sarwono, Sp.PA

NIP.19521111 198002 1 001

Mengetahui

Ketua Jurusan Kedokteran

Prof. Dr. dr. Teguh Wahyu Sardjono, DTM&H, M.Sc, Sp.Par.K

NIP. 19520410 198002 1 001

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



*~ Tugas Akhir ini aku persembahkan*

*Untuk Ibu dan Bapak*

*Juga untuk Nenek, Vega, dan Dhika*

*Terima kasih atas cinta kasih dan semua bantuan yang ditujukan padaku*

*Juga untuk semua semangat yang terus diberikan tanpa kenal lelah*

*Untuk TOA*

*For our friendship, our everlasting memory, your support*

## KATA PENGANTAR

Segala puji hanya bagi Allah SWT atas semua petunjuk dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir yang berjudul “Efek Ekstrak Umbi Lobak (*Raphanus sativus*) terhadap Pembentukan Biofilm *Staphylococcus aureus* secara *in Vitro*” dengan lancar.

Tak lupa penulis menyampaikan terima kasih kepada pihak-pihak yang telah membantu proses pembuatan hingga penyelesaian karya ini, antara lain:

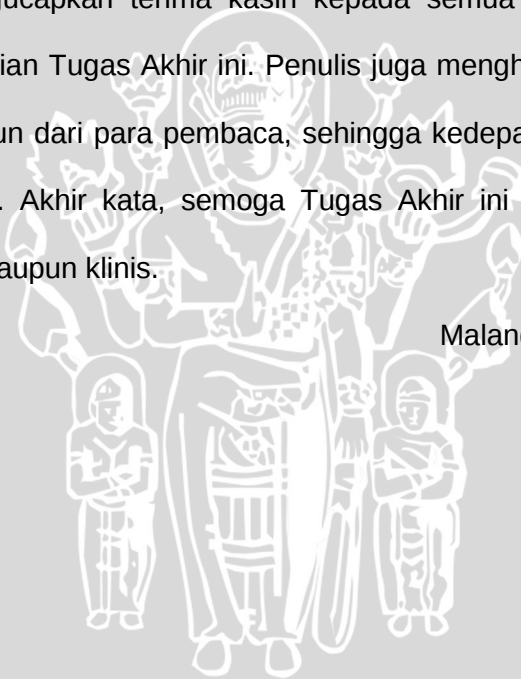
1. Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya.
2. Dr. dr. Karyono Mintaroem, Sp.PA, selaku dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
3. Prof. Dr. dr. Teguh Wahyu Sardjono, DTM&H, M,Sc, Sp. Par.K., selaku Ketua Jurusan Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
4. dr. Roekistiningsih, MS, Sp.MK selaku dosen pembimbing pertama yang telah membantu memberikan bimbingan sehingga penulisan Tugas Akhir ini berjalan dengan baik dan lancar.
5. dr. Imam Sarwono, Sp.PA selaku dosen pembimbing kedua yang telah membantu memberikan bimbingan sehingga penulisan Tugas Akhir ini berjalan dengan baik dan lancar.
6. dr. Onggung MH. Napitupulu, M.Kes selaku dosen penguji tugas akhir atas saran-saran yang telah diberikan kepada penulis saat ujian maupun saat revisi tugas akhir.
7. Ayah, Ibu dan keluarga besar penulis yang senantiasa memberikan dorongan, semangat dalam menyelesaikan Tugas Akhir ini.
8. Segenap anggota Tim Pengelola Tugas Akhir FKUB

9. Mbak Uci, atas tenaga dan keikhlasannya dalam membantu penulis dalam melakukan penelitian di Laboratorium Mikrobiologi FKUB. Juga kepada seluruh staf Laboratorium Mikrobiologi FKUB.
10. TOA khususnya teman-teman sesama peneliti di Laboratorium Mikrobiologi FKUB, Rayu Sili D dan Adiba Maulida. Terima kasih atas semangat dan saran yang diberikan selama proses penelitian berlangsung.
11. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu atas bantuannya kepada penulis dalam menyelesaikan Tugas Akhir ini.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah mendukung penyelesaian Tugas Akhir ini. Penulis juga mengharapkan kritik dan saran yang membangun dari para pembaca, sehingga kedepannya Tugas Akhir ini menjadi lebih baik. Akhir kata, semoga Tugas Akhir ini dapat bermanfaat dalam bidang ilmiah maupun klinis.

Malang, Desember 2012

Penulis



## ABSTRAK

Affrita, Tia Maya. 2012. **Efek Ekstrak Umbi Lobak (*Raphanus sativus*) terhadap Pembentukan Biofilm *Staphylococcus aureus* secara *in Vitro***. Tugas Akhir. Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing : (1) dr. Roekistiningsih, MS, Sp.MK (2) dr. Imam Sarwono, Sp.PA.

*Staphylococcus aureus* merupakan salah satu bakteri penghasil biofilm. Biofilm adalah suatu substansi yang terdiri dari bakteri yang diselubungi oleh matriks dari polimer ekstrasel yang dihasilkan oleh bakteri tersebut. Biofilm yang dihasilkan oleh *S. aureus* mampu melindungi bakteri ini sehingga menjadi lebih resisten terhadap antibiotik. Di sisi lain, umbi lobak memiliki kandungan flavonoid dan lisozim yang bisa menghambat pembentukan biofilm *S. aureus*. Penelitian ini menggunakan isolat bakteri *Staphylococcus aureus* milik Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Metode yang digunakan adalah *microtiter plate test*. Konsentrasi ekstrak umbi lobak yang digunakan adalah 0,375%; 0,187%; 0,094%; 0,047%; 0,023%; 0,011%; 0,0055%; 0,0028%. Hasil perlakuan diukur dengan menggunakan *ELISA reader* untuk diukur *Optical Density* (OD) dari biofilm. OD biofilm bakteri dengan pemberian ekstrak lebih rendah walaupun tidak signifikan daripada OD biofilm bakteri tanpa pemberian ekstrak.

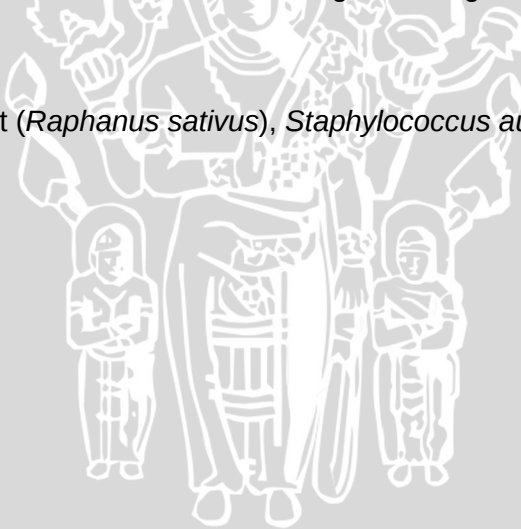
**Kata Kunci :** umbi lobak (*Raphanus sativus*), *Staphylococcus aureus*, biofilm

## ABSTRACT

Affrita, Tia Maya. 2012. **The Effect of Radish Root (*Raphanus sativus*) Extract towards Formation of *Staphylococcus aureus*'s Biofilm *in Vitro***. Final Assignment. Medical Faculty of Brawijaya University. Counselors : (1) dr. Roekistiningsih, MS, Sp.MK (2) dr. Imam Sarwono, Sp.PA.

*Staphylococcus aureus* is one of bacteria that produce biofilm. Biofilm is a substance consist of bacteria covers with polymer extracell matrix which is produced by the bacteria. The biofilm produced by *Staphylococcus aureus* able to protect this bacterium thus become more resistant toward antibiotic. In other side, radish root contain flavonoid and lizozyme which are able to inhibit *Staphylococcus aureus*'s biofilm formation process. This research use bacteria isolate owned by Microbiology Laboratorium of Medical Faculty of Brawijaya University. The method used in this research is *microtiter plate test*. Radish root extract concentration used are 0,375%; 0,187%; 0,094%; 0,047%; 0,023%; 0,011%; 0,0055%; 0,0028%. The result then measured using ELISA reader in order to get biofilm's *Optical Density* (OD). This research show that biofilm's OD with radish root extracts is lower even though not significant than without extracts.

**Keywords :** radish root (*Raphanus sativus*), *Staphylococcus aureus*, biofilm



## DAFTAR ISI

|                                                  | Halaman |
|--------------------------------------------------|---------|
| Judul .....                                      | i       |
| Halaman Pengesahan .....                         | li      |
| Halaman Peruntukan .....                         | iii     |
| Kata Pengantar .....                             | iv      |
| Abstrak .....                                    | vi      |
| Abstract .....                                   | vii     |
| Daftar Isi .....                                 | viii    |
| Daftar Gambar .....                              | xi      |
| Daftar Tabel .....                               | xii     |
| <br>BAB 1 PENDAHULUAN                            |         |
| 1.1 Latar Belakang .....                         | 1       |
| 1.2 Rumusan Masalah .....                        | 3       |
| 1.3 Tujuan Penelitian .....                      | 4       |
| 1.4 Manfaat Penelitian .....                     | 4       |
| <br>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA                       |         |
| 2.1 Umbi Lobak ( <i>Raphanus sativus</i> ) ..... | 5       |
| 2.1.1 Taksonomi .....                            | 5       |
| 2.1.2 Morfologi Tanaman .....                    | 5       |
| 2.1.3 Kandungan Kimia .....                      | 6       |
| 2.2 <i>Staphylococcus aureus</i> .....           | 7       |
| 2.2.1 Taksonomi .....                            | 7       |
| 2.2.2 Karakteristik Bakteri .....                | 7       |
| 2.2.2.1 Ciri-Ciri Organisme .....                | 7       |
| 2.2.2.2 Biakan .....                             | 8       |
| 2.2.2.3 Sifat <i>Staphylococcus aureus</i> ..... | 9       |
| 2.2.3 Struktur Antigen .....                     | 9       |
| 2.2.4 Toksin dan Enzim .....                     | 10      |

|                                |                                              |    |
|--------------------------------|----------------------------------------------|----|
| 2.2.4.1                        | Alpha Toxin .....                            | 10 |
| 2.2.4.2                        | B Toxin .....                                | 11 |
| 2.2.4.3                        | Delta Toxin .....                            | 11 |
| 2.2.4.4                        | Enterotoksin .....                           | 11 |
| 2.2.4.5                        | Exfoliatif Toxin .....                       | 11 |
| 2.2.4.6                        | Toxic Shock Syndrome Toxin .....             | 12 |
| 2.2.4.7                        | Leukocidin .....                             | 12 |
| 2.2.4.8                        | Coagulase and Clumping Factor .....          | 12 |
| 2.2.4.9                        | Staphylokinase .....                         | 13 |
| 2.2.4.10                       | Enzim Lain .....                             | 13 |
| 2.2.5                          | Patogenesis .....                            | 13 |
| 2.2.6                          | Patologi .....                               | 14 |
| 2.2.7                          | Diagnosis Laboratorium .....                 | 15 |
| 2.2.7.1                        | Spesimen .....                               | 15 |
| 2.2.7.2                        | Kultur .....                                 | 15 |
| 2.2.7.3                        | Tes Katalase .....                           | 15 |
| 2.2.7.4                        | Tes Koagulase .....                          | 16 |
| 2.2.7.5                        | Tes Kepekaan Antibiotik .....                | 16 |
| 2.3                            | Biofilm .....                                | 16 |
| 2.3.1                          | Definisi .....                               | 16 |
| 2.3.2                          | Struktur Biofilm .....                       | 17 |
| 2.3.3                          | Pembentukan Biofilm .....                    | 18 |
| 2.3.4                          | Pembentukan Biofilm pada Alat Medis .....    | 19 |
| 2.3.5                          | Resistensi Bakteri terhadap Antibiotik ..... | 19 |
|                                | karena Biofilm                               |    |
| <b>BAB 3 KERANGKA KONSEP</b>   |                                              |    |
| 3.1                            | Kerangka Konsep .....                        | 22 |
| 3.2                            | Hipotesis Penelitian .....                   | 23 |
| <b>BAB 4 METODE PENELITIAN</b> |                                              |    |
| 4.1                            | Rancangan Penelitian .....                   | 24 |
| 4.2                            | Populasi dan Sampel .....                    | 24 |
| 4.3                            | Tempat dan Waktu Penelitian .....            | 25 |
| 4.4                            | Variabel Penelitian .....                    | 25 |
| 4.4.1                          | Variabel Bebas .....                         | 25 |

|                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|                                                                                                           | x  |
| 4.4.2 Variabel Tergantung .....                                                                           | 26 |
| 4.5 Definisi Operasional .....                                                                            | 26 |
| 4.6 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian .....                                                             | 27 |
| 4.6.1 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Umbi Lobak ...                                                     | 27 |
| 4.6.2 Alat dan Identifikasi Bakteri .....                                                                 | 28 |
| 4.6.3 Alat dan Bahan Deteksi Biofilm dan Efek .....                                                       | 29 |
| Anti Biofilm                                                                                              |    |
| 4.7 Metode Pengumpulan Data .....                                                                         | 29 |
| 4.7.1 Identifikasi Bakteri .....                                                                          | 29 |
| 4.7.1.1 Pemeriksaan Mikroskopis .....                                                                     | 29 |
| 4.7.1.2 Tes Katalase .....                                                                                | 30 |
| 4.7.1.3 Tes Latex Agglutination .....                                                                     | 31 |
| 4.7.2 Pembuatan Pembenihan Cair Bakteri .....                                                             | 31 |
| 4.7.3 Deteksi Pembentukan Biofilm .....                                                                   | 32 |
| 4.7.4 Uji Hambatan Pembentukan Biofilm .....                                                              | 32 |
| 4.8 Pengolahan Data .....                                                                                 | 33 |
| BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA .....                                                            | 34 |
| 5.1 Hasil Penelitian .....                                                                                | 34 |
| 5.1.1 Hasil Uji Pembentukan Biofilm .....                                                                 | 34 |
| 5.1.2 Hasil Uji Efek Ekstrak Umbi Lobak Terhadap<br>Pembentukan Biofilm <i>Staphylococcus aureus</i> .... | 35 |
| 5.2 Analisis Data .....                                                                                   | 37 |
| 5.2.1 Uji One Way Anova .....                                                                             | 37 |
| 5.2.2 <i>Post Hoc Multiple Comparison Test</i> .....                                                      | 39 |
| BAB 6 PEMBAHASAN .....                                                                                    | 42 |
| Pembahasan .....                                                                                          | 42 |
| BAB 7 PENUTUP .....                                                                                       | 49 |
| 7.1 Kesimpulan .....                                                                                      | 49 |
| 7.2 Saran .....                                                                                           | 49 |
| Daftar Pustaka .....                                                                                      | 50 |
| Lampiran 1 .....                                                                                          | 53 |

## DAFTAR GAMBAR

|                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Gambar 2.1 Morfologi Umbi Lobak<br>( <i>Raphanus sativus</i> ) .....                 | 6  |
| Gambar 2.2 Koloni <i>Staphylococcus aureus</i><br>pada Medium NAP dan TSB .....      | 8  |
| Gambar 2.3 Uji Katalase <i>Staphylococcus aureus</i> .....                           | 9  |
| Gambar 2.4 Gambaran Mikroskop Elektron<br>Biofilm <i>Staphylococcus aureus</i> ..... | 17 |
| Gambar 2.5 Skema Pembentukan Biofilm .....                                           | 18 |
| Gambar 5.1 Koloni <i>Staphylococcus aureus</i><br>pada Medium Congo Red Agar .....   | 35 |
| Gambar 5.2 Grafik Mean OD Biofilm .....                                              | 36 |

## DAFTAR TABEL

|                                                          |    |
|----------------------------------------------------------|----|
| Tabel 5.1 Hasil Pengukuran ELISA Reader OD Biofilm ..... | 36 |
| Tabel 5.2 Tabel Tes Normalitas .....                     | 37 |
| Tabel 5.3 Tabel Tes Homogenitas .....                    | 38 |
| Tabel 5.4 Tabel Analisis <i>One Way Anova</i> .....      | 38 |
| Tabel 5.5 Tabel Hasil <i>Multiple Comparison</i> .....   | 39 |
| Tabel 5.6 Homogenous Subsets .....                       | 40 |



## PENDAHULUAN

**1.1. Latar Belakang**

*Staphylococcus aureus* merupakan bakteri kokus gram positif berdiameter sekitar 1  $\mu\text{m}$  yang tidak membentuk spora, dan tidak motil (Jawetz, 2010). Bakteri koagulase positif ini merupakan patogen oportunistik pada manusia. (Götz *et al*, 2006). Hampir setiap orang pernah mengalami infeksi yang disebabkan oleh *Staphylococcus aureus* baik dalam tingkat infeksi yang tidak membahayakan maupun tingkat yang mengancam jiwa. (Brooks, 2010).

Infeksi yang disebabkan oleh *Staphylococcus aureus* diantaranya adalah impetigo, osteomyelitis, pneumonia, endocarditis, myocarditis, pericarditis, enterocolitis, mastitis, cystitis, cervicitis, prostatitis, cerebritis, *toxic shock syndrome*, meningitis, bakterimia dan abses pada otot, kulit, dan organ dalam (Götz *et al*, 2006). Selain itu *Staphylococcus aureus* juga merupakan tiga penyebab infeksi nosokomial yang utama. Hal ini dibuktikan pada penelitian yang dilakukan sebelumnya di negara-negara lain seperti Amerika dan Inggris. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa *Staphylococcus aureus* merupakan organisme patogen yang berbahaya.

Selain itu, *Staphylococcus aureus* memiliki kemampuan untuk beradaptasi dengan perubahan lingkungan. Hal ini dilakukan dengan mengubah susunan

genetik dan/atau fenotip dari bakteri ini sendiri. Contoh adaptasi yang c  
oleh *Staphylococcus aureus* adalah resistensi terhadap  $\beta$ -lactam yang merujuk  
pada kemampuan resistensi *Staphylococcus aureus* terhadap antibiotik penisilin.  
Pembentukan biofilm juga merupakan salah satu bentuk adaptasi *S. aureus* ter-  
hadap perubahan lingkungannya (Götz *et al*, 2006).

Biofilm merupakan agregasi dari bakteri yang diselubungi oleh matriks polimer (Monroe, 2001). Biofilm dikenal sebagai salah satu faktor resistensi *Staphylococcus aureus* terhadap antibiotik (Patel, 2005). Dibuktikan pada penelitian bahwa infeksi oleh *Staphylococcus aureus* yang memiliki biofilm lebih sulit diberantas dibandingkan dengan *free-floating Staphylococcus aureus* (Monroe, 2007). Belum ada penggunaan obat khusus dalam menghambat pembentukan biofilm bakteri dalam penanganan penyakit infeksi oleh *S. aureus*, namun beberapa tanaman herbal terbukti memiliki aktivitas biologi dan antimikroba yang terdapat pada tannin dan flavonoid yang dapat menghambat proses pembentukan biofilm *S.aureus* (Min, 2008). Lisozim merupakan salah satu enzim yang dapat digunakan sebagai alat untuk mengeradikasi bakteri. Lisozim bekerja dengan merusak dinding sel dari bakteri, namun lisozim juga dapat digunakan untuk menghilangkan struktur biofilm pada *Staphylococcus aureus* (Ran Xu, dkk, 2011). Salah satu bahan herbal yang memiliki kandungan ini adalah umbi lobak (*Raphanus sativus*).

Lobak (*Raphanus sativus*) merupakan tanaman yang cukup dikenal dan mudah ditemukan di Indonesia. Umbi lobak memiliki beberapa kandungan zat aktif antara lain saponin, flavonoid, polifenol, enzim lisozim, glukosidase, oksidase, katalase, *allyl isothiosianat*, *methanethiol*, asam oksalat, kalsium,

fosfor, zat besi, karoten, vitamin B, dan vitamin C. Dalam penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, diketahui bahwa di antara tanaman umbi-umbian yang lain, lobak memiliki aktivitas enzim lisozim yang cukup tinggi (M. Sakthivel, dkk, 2010). Bahan aktif yang diduga memiliki aktivitas penghambatan terhadap pembentukan biofilm *S. aureus* diantaranya adalah flavonoid dan enzim lisozim. Flavonoid memiliki kemampuan untuk merusak membran sel bakteri sehingga tidak dapat melakukan fungsinya, termasuk melakukan perlekatan dengan lingkungan sekitar (Cushnie dan Lamb, 2005). Lisozim dapat merusak ikatan antara asam-N-asetil glukosamin dan asam-N-asetil muramat sehingga dapat merusak dinding sel sehingga tidak terjadi perlekatan bakteri dengan lingkungan (Madigan dkk, 2006). Perlekatan bakteri dengan lingkungan itu sendiri merupakan fase awal dari pembentukan biofilm.

Sampai saat ini belum ada penelitian yang menyatakan bahwa umbi lobak (*Raphanus sativus*) dapat menghambat pembentukan biofilm pada *S. aureus*. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk menguji apakah kandungan yang terdapat pada ekstrak umbi lobak dapat menghambat proses pembentukan biofilm *S. aureus*.

## 1.2. Rumusan Masalah

1. Apakah ekstrak umbi lobak (*Raphanus sativus*) mempunyai efek terhadap pembentukan biofilm dari bakteri *Staphylococcus aureus*?
2. Berapa dosis *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC) dari ekstrak umbi lobak (*Raphanus sativus*) terhadap biofilm bakteri *Staphylococcus aureus*?

3. Bagaimana efek antibiofilm pada berbagai konsentrasi ekstrak umbi lobak (*Raphanus sativus*)

### 1.3. Tujuan Penelitian

#### 1. Tujuan Umum :

Mengetahui efek ekstrak umbi lobak (*Raphanus sativus*) terhadap pembentukan biofilm bakteri *Staphylococcus aureus*.

#### 2. Tujuan Khusus :

- a. Menentukan Minimum Biofilm Inhibitory Concentration (MBIC) dari ekstrak umbi lobak (*Raphanus sativus*) terhadap biofilm bakteri *Staphylococcus aureus*.
- b. Mengetahui efek antibiofilm pada berbagai konsentrasi ekstrak umbi lobak (*Raphanus sativus*).

### 1.4. Manfaat Penelitian

1. Mengembangkan ilmu pengetahuan dalam bidang kesehatan, khususnya mengenai pencegahan penyakit infeksi yang disebabkan oleh biofilm suatu bakteri.
2. Dapat memanfaatkan umbi lobak sebagai tanaman herbal dalam menghambat pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus* sehingga antimikroba dapat bekerja secara efektif.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Umbi Lobak (*Raphanus sativus*)

##### 2.1.1 Taksonomi

- Kingdom : *Plantae*
- Divisi : *Spermatophyta*
- Sub-Divisi : *Angiospermae*
- Kelas : *Dicotyledonae*
- Famili : *Brassicaceae*
- Genus : *Raphanus*
- Spesies : *Raphanus sativus*

(Rahmat Rukmana, 1995)

##### 2.1.2 Morfologi Tanaman

Lobak (*Raphanus sativus*) merupakan tanaman perdu yang terdiri dari akar, batang, daun, bunga, buah, dan biji. Lobak memiliki tiga jenis akar, yaitu akar lembaga, akar tunggang, dan akar rambut. Akar lembaga adalah akar yang nantinya akan berubah bentuk dan fungsi menjadi tempat cadangan makanan atau biasa disebut umbi (umbi lobak berbentuk bulat panjang dengan kulit dan daging berwarna putih bersih). Akar lembaga ini juga yang menjadi tempat melekatnya akar rambut. Batang lobak sangat pendek sehingga tidak jelas terlihat. Struktur batang sedikit berkayu pada tempat menempelnya daun dan

berbulu. Bunga lobak berwarna putih dengan sedikit semburat ungu pada ujungnya. Buahnya mirip seperti polong dan bijinya berbentuk bulat dengan warna yang berubah seiring pertumbuhan tanaman. (Rahmat Rukmana, 1995).



Gambar 2.1 Morfologi Umbi Lobak (*Raphanus sativus*)

### 2.1.3 Kandungan Kimia

Umbi lobak (*Raphanus Sativus*) memiliki kandungan kimia antara lain flavonoid, lisozim, kalsium, zat besi, thiamin, riboflavin, asam askorbat, dan glukosa.

Flavonoid memiliki kemampuan untuk menghambat fungsi membran sitoplasma bakteri sehingga dapat mencegah perlekatan bakteri pada permukaan substrat (Cushnie dan Lamb, 2005). Sedangkan lisozim berperan dalam menghancurkan dinding sel bakteri dengan merusak ikatan antara *N-acetylglucosamine* dan asam *N-acetylmuramic* pada dinding sel (Mc-Graw Hill Dictionary, 2003).

## 2.2 *Staphylococcus aureus*

### 2.2.1 Taksonomi

- Kingdom : *Bacteria*
- Filum : *Firmicutes*
- Kelas : *Bacilli*
- Ordo : *Bacillales*
- Famili : *Staphylococcaceae*
- Genus : *Staphylococcus*
- Spesies : *Staphylococcus aureus*

(Todar, 2011)

### 2.2.2 Karakteristik Bakteri

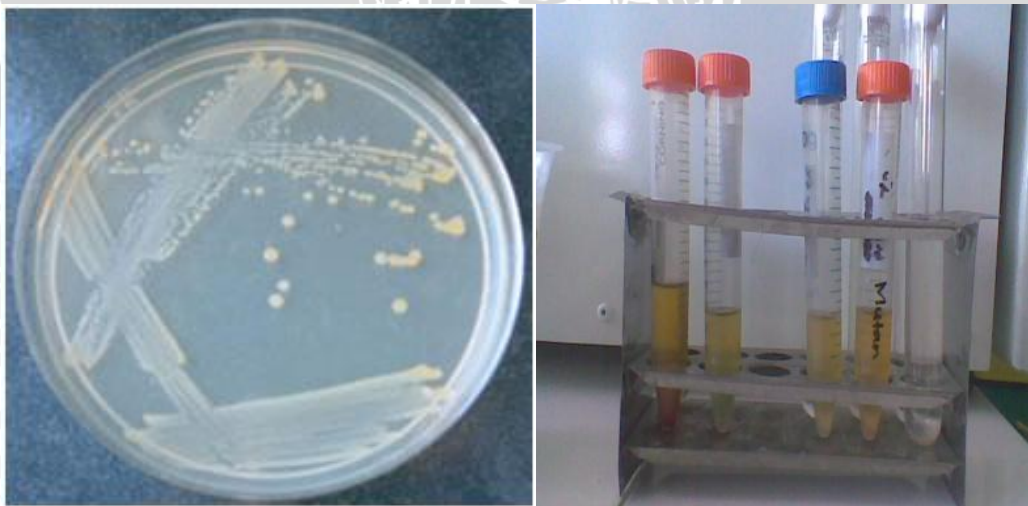
#### 2.2.2.1 Ciri-Ciri Organisme

*Staphylococcus aureus* adalah bakteri gram positif berbentuk sferis dengan diameter kurang lebih 1µm. Sel ini berbentuk cocci tunggal, berpasangan, dan tetrad, namun juga dapat terlihat dalam bentukan rantai pada biakan cair (Brooks et al, 2010). *Staphylococcus aureus* membentuk formasi yang tidak teratur karena membelah pada tiga bidang pembelahan yang tegak lurus terhadap sel utama. Selain itu formasi yang tidak teratur ini juga terbentuk akibat perubahan posisi dari bakteri ini sendiri ketika menempel pada permukaan tempat tumbuhnya (Todar, 2011)

### 2.2.2.2

### Biakan

Dalam pertumbuhan koloninya, *Staphylococcus aureus* membutuhkan derajat keasaman sekitar 7,4 untuk pertumbuhan optimal. Suhu optimal untuk pertumbuhannya adalah 28-38°C. Sedangkan suhu optimal untuk pembentukan pigmen koloni adalah 20-25°C. *S. aureus* dapat tumbuh pada medium yang mengandung asam amino dan beberapa vitamin, misal *threonin*, asam nikonat, dan biotin. Contoh medium pertumbuhan *S. aureus* adalah medium TSB (*Tryptone Soy Broth*), NAP (*Nutrient Agar Plate*), dan BAP (*Blood Agar Plate*) (Bennett and Lancett, 2001). Pada medium NAP, *S. aureus* membentuk koloni berwarna abu-abu sampai kuning keemasan, berbentuk bulat dengan diameter 1-2 mm, konveks dengan tepi rata dan permukaan mengkilat dengan konsistensi lunak. Sedangkan pada medium BAP tampak koloni *S.aureus* yang lebih besar. (Dzen et al., 2003)



Gambar 2.2 Koloni *Staphylococcus aureus* pada Medium NAP (kiri) dan pada Medium TSB (kanan)

### 2.2.2.3 Sifat *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* merupakan normal flora pada beberapa bagian tubuh manusia, misalnya pada jalan napas, kulit, dan membran mukosa. Namun *Staphylococcus aureus* juga bisa bersifat patogen dan menyebabkan beberapa penyakit seperti infeksi supurativa, keracunan makanan, dan *toxic shock syndrome*. *S. aureus* memfermentasikan glukosa dan umumnya menghasilkan asam laktat. *S. aureus* juga memfermentasikan *mannitol* yang nantinya akan membantu membedakannya dengan *S. epidermidis*. Selain itu, *S. aureus* juga bersifat katalase positif, koagulase positif, dan oksidase negatif. *S. aureus* umumnya juga menghemolisa darah pada medium BAP yang nantinya akan membedakannya dengan *S. epidermidis* yang merupakan bakteri non-hemolitik (Todar, 2011)



Gambar 2.3 Uji Katalase *Staphylococcus aureus*

### 2.2.3 Struktur Antigen

*S. aureus* memiliki polisakarida antigenik, protein, dan beberapa substansi lain di dalam struktur dinding sel. Struktur tersebut antara lain

peptidoglikan, asam teikoat, dan protein A. Selain itu beberapa strain *S. aureus* juga memiliki kapsul yang akan menghindarkannya dari fagositosis oleh sel limfosit polimorfonuklear (Brooks *et al*, 2010)

Peptidoglikan terdapat pada dinding sel, berfungsi untuk menyediakan eksoskeleton yang kaku. Merupakan polimer polisakarida yang mengandung subunit-subunit yang saling berhubungan. Dapat dihancurkan oleh bahan asam yang kuat dan oleh lisozim. Dapat mengandung IL-1 (Interleukin 1) yang merupakan pirogen endogen dan antibodi opsonisasi oleh monosit. Bersifat kemoatraktan pada sel PMN (polimorfonuklear) serta dapat mengaktivasi komplemen. Karena peptidoglikan terdapat pada dinding sel, maka peptidoglikan merupakan hal yang penting dalam patogenesis bakteri (Brooks *et al*, 2010)

Struktur antigen lain yang ditemukan pada *S. aureus* adalah asam teikoat yang merupakan polimer gliserol atau ribitol fosfat yang berhubungan dengan peptidoglikan. Selain itu, banyak diantara strain *S. aureus* yang juga memiliki protein A pada dinding selnya. Merupakan protein permukaan bakteri yang dikategorikan sebagai MSCRAMMS (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules) yang nantinya akan memperantarai proses adhesi bakteri pada sel inang. Protein A akan terikat pada bagian Fc dari molekul IgG, kecuali IgG3 (Brooks *et al*, 2010)

## 2.2.4 Toksin dan Enzim

### 2.2.4.1 Alpha Toxin

Merupakan eksotoksin, suatu toksin *membrane damage* yang paling kuat. Terikat pada membran sel dari sel inang. Sel platelet dan monosit adalah

sel yang paling rentan terhadap toksin ini karena memiliki reseptor spesifik tempat melekatnya toksin ini, mengaktivasi toksin dan menyebabkan lubang-lubang kecil yang nantinya akan menjadi tempat masuknya monovalen kation. Toksin ini bekerja secara lisis osmotik (Todar, 2001).

#### 2.2.4.2 Beta Toxin

Mengurai *sphingomyelin* menyebabkan lisis dari sel darah merah. Kebanyakan isolat *S. aureus* yang menginfeksi manusia tidak memproduksi toksin jenis ini. Namun, lisogenik bakteriofaga dapat mengkodekannya (Todar, 2001).

#### 2.2.4.3 Delta Toxin

Merupakan eksotoksin yang diproduksi oleh hampir semua strain *S. aureus* (Todar, 2001).

#### 2.2.4.4 Enterotoxin

Toksin yang bersifat *heat-stable* dan resisten terhadap enzim di usus. Merupakan toksin yang menyebabkan keracunan makanan (Brooks et al, 2010).

#### 2.2.4.5. Exfoliative Toxin

*Staphylococcus aureus* memproduksi dua jenis *exfoliative toxin*, yaitu *epidermolytic toxin A* yang bersifat *heat-stable* dan diproduksi oleh kromosom, serta *epidermolytic toxin B* yang bersifat *heat-labile* dan diproduksi oleh plasmid.

Kedua jenis toksin ini akan menyebabkan terkelupasnya kulit pada *Staphylococcal Scalded Syndrome* dengan cara melarutkan matriks mukopolisakarida dari epidermis (Brooks et al, 2010)

#### **2.2.4.6. Toxic Shock Syndrome Toxin (TSST)**

TSST-1 berikatan dengan MHC-II yang akan menstimulus sel T. Berhubungan dengan beberapa gejala, yakni demam, *shock*, dan *desquative skin rash* (Brooks et al, 2010).

#### **2.2.4.7. Leukocidin**

Adalah toksin multikomponen yang akan bekerja secara bersama-sama untuk merusak membran. Merupakan hemolitik yang kuat, namun tidak sekuat *alfa toxin*. Diduga sebagai faktor penting dalam infeksi kulit nekrotik (Todar, 2001).

#### **2.2.4.8. Coagulase dan Clumping Factor**

*Coagulase* menyebabkan klot dengan cara mengaktifkan fibrin lewat kompleks *Staphylothrombin*. Diduga merupakan mekanisme pertahanan dari *Staphylococcus aureus* dan juga sebagai marker tradisional untuk identifikasi *S. aureus* (Todar, 2001).

Sedangkan *Clumping factor* adalah salah satu contoh MSCRAMM, menjadi faktor perlekatan bakteri pada fibrinogen dan fibrin dan jika bercampur dengan plasma akan membentuk klem (Brooks et al, 2010).

#### 2.2.4.9. *Staphylokinase*

Berfungsi sama seperti *streptokinase*, yakni melisiskan fibrin. Namun kurang poten jika dibandingkan dengan *streptokinase* (Todar, 2001).

#### 2.2.4.10. Enzim Lain

Selain enzim-enzim di atas, terdapat beberapa enzim lain seperti protease, lipase, dan DNase. Ketiga enzim ini digunakan untuk menyediakan nutrisi bagi pertumbuhan bakteri. Selain itu juga ditemukan FAME (*Fatty Acid Modifying Enzyme*) yang berperan dalam pembentukan abses (Todar, 2011).

Didapatkan pula beberapa enzim lain yaitu *hyaluronidase* dan  $\beta$  *lactamase* (Brooks et al, 2010).

#### 2.2.5 Patogenesis

Patogenesis dari penyakit yang disebabkan oleh *S. aureus* melibatkan banyak faktor, dan sulit ditentukan faktor manakah yang berperan lebih penting. Bagaimanapun juga ditemukan korelasi antara isolat strain *S. aureus* dari beberapa penyakit dan ekspresi dari beberapa faktor virulensi, yang menyatakan adanya perannya dalam penyakit-penyakit tersebut. Aplikasi dari biologi molekular belum dapat mengungkap secara pasti dari patogenesis penyakit oleh karena *S. aureus* (Todar, 2011).

Respon imun oleh inang sangat bervariasi, mulai dari meningkatnya suhu dari daerah yang inflamasi, dapat terbentuk fibrin klot, pembengkakan, akumulasi pus, bahkan nekrosis (Todar, 2011).

Spektrum penyakit yang dapat disebabkan oleh *S. aureus* adalah keracunan makanan, bakteremia, dan abses dari semua organ. (Brooks et al, 2010).

#### 2.2.6 Patologi

Kolonisasi *S. aureus* dapat menyebabkan furunkel atau abses lokal di daerah lain. Pada folikel rambut, infeksi *Staphylococcus aureus* dapat menyebabkan nekrosis jaringan. *S. aureus* memproduksi *coagulase* yang akan mengkoagulasi fibrin di sekitar lesi dan di jaringan limfatik. Namun tubuh mampu membangun pertahanan di sekitar lesi dan diperkuat oleh akumulasi sel-sel inflamasi. Namun di tengah lesi akan terbentuk nekrosis dari jaringan nekrosis dan abses (Brooks et al, 2010).

Selain itu pada *osteomyelitis*, fokus primer pertumbuhan *S. aureus* adalah pada daerah pembuluh darah metafase tulang panjang yang nantinya akan menyebabkan nekrosis dari tulang. Jenis infeksi dari *S. aureus* lainnya antara lain adalah *impetigo*, *pneumonia*, *meningitis*, *emphysema*, dan *endocarditis* (Brooks et al, 2010).

## 2.2.7 Diagnosis Laboratorium

### 2.2.7.1 Spesimen

Spesimen dapat diperoleh dari swab pus, darah, aspirasi trakea, maupun cairan spinal bergantung dari tempat perkembangan penyakit. Spesimen dapat langsung dilihat lewat mikroskop maupun dikultur terlebih dahulu (Brooks *et al*, 2010).

### 2.2.7.2 Kultur

Dapat menggunakan NAP (*Nutrient Agar Plate*) maupun BAP (*Blood Agar Plate*). Pada medium BAP, *S. aureus* dikulturkan pada suhu 37<sup>0</sup> C selama 18 jam. Untuk hasil hemolisis maupun pigmen dari koloni dapat terlihat beberapa hari setelahnya dengan temperatur ruang. *S. aureus* memfermentasikan *mannitol* tidak seperti spesies *Staphylococcus* yang lain (Brooks *et al*, 2010).

### 2.2.7.3 Tes Katalase

Tes ini digunakan untuk menilai apakah terdapat enzim sitokrom oksidase pada hasil biakan. Caranya adalah dengan meneteskan larutan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% dan selanjutnya meletakkan sedikit koloni bakteri. Jika terbentuk gelembung udara (merupakan oksigen hasil dari oksidase) maka hasil tes ini adalah positif (Brooks *et al*, 2010).

#### 2.2.7.4 Tes Koagulase

Tes koagulase dilakukan dengan cara membandingkan terjadinya *clotting* pada dua tabung yang berisi plasma kelinci atau manusia yang telah ditambahkan sitrat.

#### 2.2.7.5 Tes Kepekaan Antibiotik

Tes ini menggunakan *agar plate* yang dilengkapi dengan satu *disk diffusion* berisi antimikroba. Jika bakteri tidak tumbuh di sekitar *disk diffusion* maka dikatakan bahwa bakteri tersebut sensitif terhadap antimikroba yang ada pada *disk diffusion*. (Brooks *et al*, 2010).

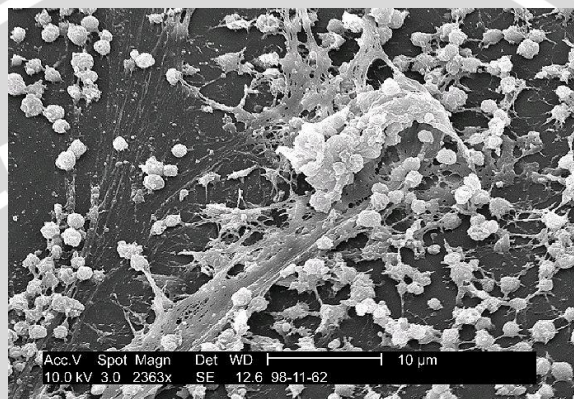
*Staphylococcus aureus* resisten terhadap *Penicilin G* karena adanya enzim  $\beta$  lactamase ((90%) *S. aureus* menghasilkan enzim ini). Sedangkan diketemukan 65% *S. aureus* resisten terhadap *Nafcilin* (Brooks *et al*, 2010).

### 2.3 Biofilm

#### 2.3.1 Definisi

Definisi dari biofilm sendiri berubah seiring waktu. Pada awalnya dikemukakan biofilm didefinisikan sebagai keterlibatan dari *extracellular polymer fibrils* dalam proses perlekatan bakteri pada suatu permukaan (Marshall, 1976). Setelah melalui penelitian dan pengamatan selama 25 tahun definisi terbaru mengenai biofilm adalah komunitas bakteri yang menempel satu sama lain atau pada *substratum* atau pada permukaan tertentu, terselubungi oleh matriks dari polimer ekstrasel yang dihasilkan oleh bakteri tersebut dan berperan dalam

perubahan fenotip dan bertanggung jawab pada kecepatan pertumbuhan dan transkripsi. Definisi ini sangat berguna karena ditemukan beberapa populasi yang juga memenuhi kriteria awal biofilm, namun tidak memenuhi kriteria terbaru biofilm (Donlan dan Costerton, 2002).



Gambar 2.4 Gambaran Mikroskop Elektron Biofilm *Staphylococcus aureus*

### 2.3.2 Struktur Biofilm

Biofilm terutama tersusun dari sel mikroba dan EPS (*Extracellular Polymeric Substance*). EPS sendiri menyusun 50%-90% dari total karbon organik yang menyusun biofilm (Flemming *et al*, 2000). EPS dipertimbangkan sebagai material matriks primer dari biofilm. Struktur EPS bervariasi baik secara fisik maupun kimia namun penyusun EPS yang paling utama adalah polisakarida. Beberapa polisakarida ini bersifat netral atau polianionik (sifat polisakarida ini biasanya dimiliki oleh bakteri gram negatif). Namun dengan adanya bahan yang bersifat asam, polisakarida ini akan berubah sifat menjadi anionik (Sutherland, 2001). Hal ini penting karena sifat polisakarida yang anionik akan memungkinkan terjadinya perlekatan divalent kation seperti  $\text{Ca}^{2+}$  dan  $\text{Mg}^{2+}$  yang nantinya akan

mengadakan *cross-link* dengan stran polimer sehingga menghasilkan ikatan antara biofilm dan permukaan yang lebih kuat (Flemming *et al*, 2000).

Bakteri gram positif memiliki komposisi EPS yang sedikit berbeda dan polisakarida yang terkandung utamanya bersifat kation. Ditemukan bahwa *slime* pada bakteri koagulasi negatif terdiri dari asam teikoat yang bercampur dengan sejumlah kecil protein (Hussain *et al*, 1993).

### 2.3.3 Pembentukan Biofilm

Pembentukan biofilm pada suatu permukaan terjadi dalam lima tahap. Tahap pertama terjadi *deconditioning* film. Dalam tahap ini permukaan substrat akan dikondisikan lalu terjadi perpindahan dan perlekatan bakteri pada permukaan substrat. Tahap kedua adalah *reversible* adhesi dari mikroba. Pada tahap ketiga telah terjadi adhesi mikroba yang *irreversible* disebabkan adanya aktivitas protein dan produksi EPS. Pada tahap keempat telah terbentuk mikrokoloni dari bakteri dan beberapa bakteri planktonik mulai terperangkap pada biofilm. Tahap kelima merupakan tahap desersi, yakni lepasnya sebagian bakteri dari biofilm dan tersebar ke daerah permukaan lain untuk membentuk koloni baru (Alfred *et al*, 2008).



Schematic representation of biofilm development. Stage 1, Reversible attachment; 2, Irreversible attachment; 3, Maturation I; 4, Maturation II; 5, Dispersion.

Gambar 2.5 Skema pembentukan biofilm

#### 2.3.4 Pembentukan Biofilm pada Alat Medis

Alat medis merupakan salah satu habitat yang dapat ditumbuhi oleh biofilm. Beberapa alat yang dilaporkan merupakan habitat dari biofilm antara lain adalah *prosthetic heart valves*, *central venous catheter*, *urinary catheter*, lensa kontak, *intrauterine device*, dan *dental unit water lines* (Donlan dan Costerton, 2002).

Biofilm yang melekat pada alat medis dapat berasal dari gram negatif maupun gram positif. Bisa berupa spesies tunggal maupun multispecies. Bakteri gram negatif yang biasanya diisolasi dari alat-alat ini adalah *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, sedangkan untuk bakteri gram positif antara lain *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, dan *Streptococcus viridians* (Donlan, 2001).

#### 2.3.5 Resistensi Bakteri terhadap Antibiotik karena Biofilm

Biofilm dapat menyebabkan mikroba menjadi lebih resisten terhadap antimikroba, dalam hal ini adalah antibiotik, disinfektan, dan anti kuman. Mekanisme yang bertanggung jawab atas terjadinya resistensi ini antara lain adalah 1) terjadinya penundaan dari zat antimikroba untuk mencapai target sel, 2) terjadinya perubahan pertumbuhan dari bakteri mikroorganisme yang ada di lingkungan biofilm, 3) adanya perubahan fisiologis pada mikroba yang ada di lingkungan biofilm (Donlan dan Costerton, 2002).

Antimikroba yang bekerja pada biofilm harus berdifusi terlebih dahulu melalui matriks pembentuk biofilm sebelum mencapai sel target. Hal ini

mempengaruhi kecepatan transpor zat aktif dalam antimikroba untuk mencapai reaksi yang dimaksud. Penelitian yang telah dilakukan Suci *et al* menyatakan bahwa antimikroba membutuhkan waktu 30 kali lebih lama untuk mencapai sel target pada biofilm *Pseudomonas aeruginosa* dibandingkan dengan planktoniknya (Donlan dan Costerton, 2002).

Mekanisme lain yang dapat menyebabkan resistensi ini adalah perubahan kecepatan tumbuh pada organisme biofilm. Mekanisme ini menyatakan bahwa jika perkembangan sel yang hidup dalam biofilm terjadi lebih lambat dibandingkan dengan sel planktonik. Hal ini menyebabkan *uptake* antimikroba terjadi lebih lambat dari seharusnya. Selain itu juga dibutuhkan dosis antimikroba yang lebih besar untuk mencapai hasil yang sama pada sel biofilm dibandingkan dengan sel planktonik (Donlan dan Costerton, 2002).

Pada teori mekanisme terakhir dikatakan bahwa bakteri akan menjadi lebih resisten terhadap antimikroba jika tumbuh dalam lingkungan yang penuh limitasi, misalnya dengan adanya nutrisi yang terbatas atau meningkatnya kadar toksik metabolit. Adanya biofilm memungkinkan terjadinya mekanisme ini (Donlan dan Costerton, 2002).

### 2.3.6 Biofilm dari *Staphylococcus aureus*

Seperti yang telah disebutkan, biofilm terdiri dari suatu kumpulan bakteri yang melekat pada substrat atau melekat satu sama lain. Bakteri yang terlibat dalam komunitas biofilm dapat terdiri dari beragam campuran bakteri (*mixed*-

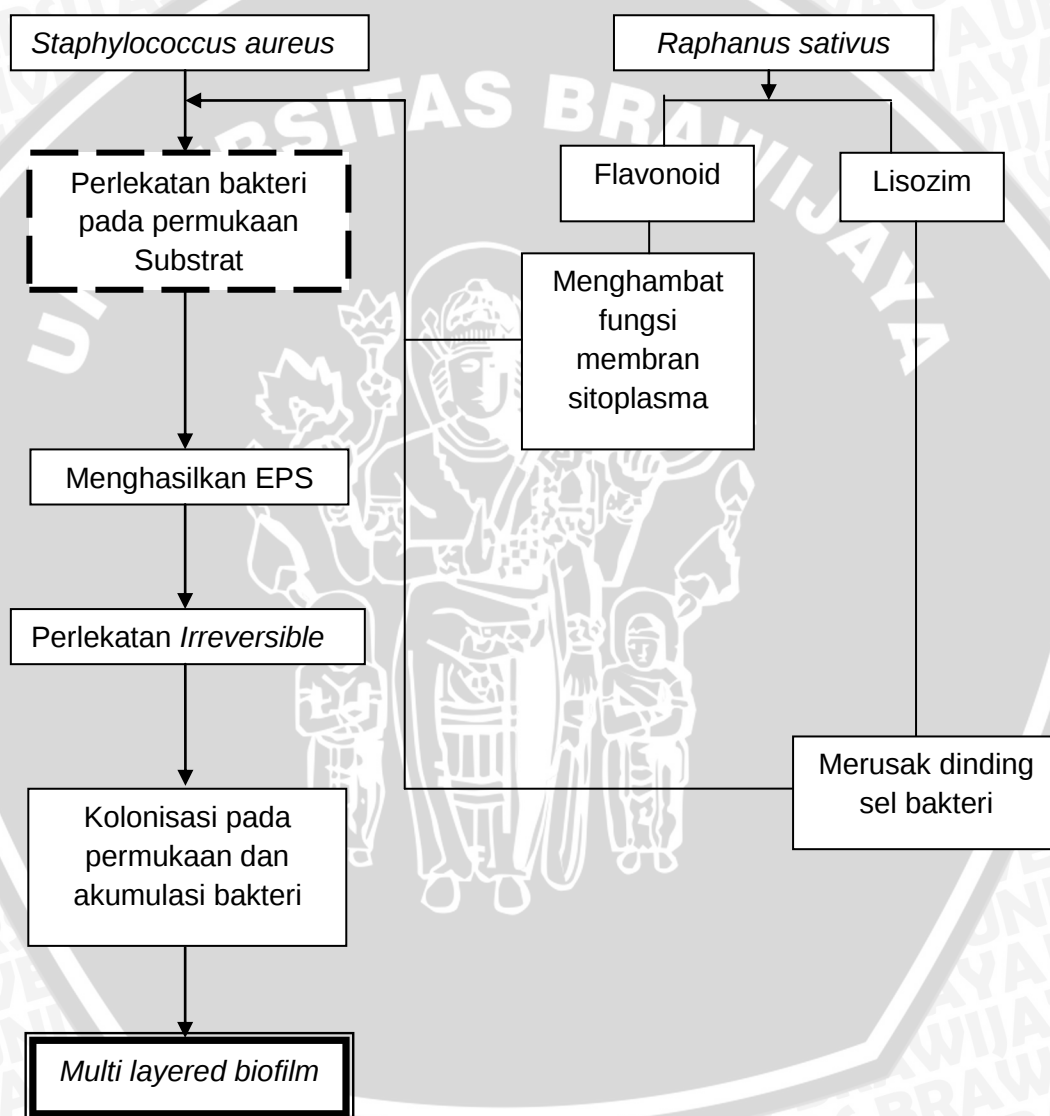
*species biofilm*). Namun berbeda dari kebanyakan komunitas biofilm tersebut, biofilm yang berhubungan dengan infeksi oleh *Staphylococci* biasanya tidak tercampur oleh bakteri spesies lainnya (Arciola et al, 2005).



### BAB III

## KERANGKA KONSEP

### 3.1 Kerangka Konsep



Cara kerja ekstrak



Hasil yang diamati

Umbi lobak (*Raphanus sativus*) memiliki dua kandungan penting di dalam mekanisme pembentukan biofilm, yaitu *flavonoid* dan lisozim. *Flavonoid* memiliki kemampuan untuk menghambat fungsi membran sitoplasma bakteri sehingga dapat mencegah perlekatan bakteri pada permukaan substrat (Cushnie dan Lamb, 2005). Sedangkan Lisozim berperan dalam menghancurkan dinding sel bakteri dengan merusak ikatan antara *N-acetylglucosamine* dan asam *N-acetylmuramic* pada dinding sel (Mc-Graw Hill Dictionary, 2003). Dua zat ini akan menghambat perlekatan bakteri ke permukaan substrat dan mengakibatkan terhambatnya pembentukan biofilm pada fase awal. Hal inilah yang mendasari dilakukannya penelitian ini.

### 3.2 Hipotesis Penelitian

Ekstrak umbi lobak (*Raphanus sativus*) memiliki efek terhadap pembentukan biofilm pada *Staphylococcus aureus*. Efek yang dimiliki merupakan penghambatan pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus*.

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Dalam penelitian ini, digunakan rancangan penelitian eksperimental laboratorium (*True Experiment*) dengan desain *Post Test Only (control group design)* dengan menggunakan metode *Microtiter-Plate Test* untuk mengetahui efek ekstrak umbi lobak (*Raphanus sativus*) terhadap proses pembentukan biofilm pada bakteri *Staphylococcus aureus* secara *in vitro* (Nuryastuti, 2010).

Kelompok kontrol adalah kelompok yang tidak mendapat perlakuan berupa pemberian ekstrak. Sedangkan kelompok perlakuan adalah kelompok yang mendapat perlakuan berupa pemberian ekstrak dengan konsentrasi 3%; 1,5%; 0,75%; 0,375%; 0,1875%; 0,0938%; 0,047%; 0,023%; 0,0118%.

#### 4.2 Populasi dan Sampel

Penelitian ini menggunakan isolat bakteri *Staphylococcus aureus* yang disimpan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Brawijaya. Jumlah sampel yang digunakan dalam penelitian dihitung dengan rumus : Notobroto (2005)

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

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

$$8n - 8 \geq 15$$

$$n \geq 2,875$$

$$n \geq 3$$

Keterangan :

n = jumlah pengulangan

p = jumlah perlakuan (3%; 1,5%; 0,75%; 0,375%; 0,1875%; 0,0938%; 0,047%; 0,023%; 0,0118%)

Sehingga dalam penelitian ini dilakukan minimal tiga kali pengulangan tiap perlakuan.

#### **4.3 Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian dilakukan pada bulan Maret sampai dengan bulan November di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Brawijaya Malang. Pembacaan menggunakan spektrofotometer dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Brawijaya.

#### **4.4 Variabel Penelitian**

##### **4.4.1 Variabel Bebas**

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah :

Ekstrak umbi lobak dengan konsentrasi 3%; 1,5%; 0,75%; 0,375%; 0,1875%; 0,0938%; 0,047%; 0,023%; 0,0118%.

#### 4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah pembentukan biofilm yang dideteksi dengan metode spektrofotometri.

#### 4.5 Definisi Operasional

- a. *Staphylococcus aureus* adalah bakteri kokus gram positif yang secara mikroskopis memiliki penampakan seperti buah anggur. Bakteri ini akan membentuk koloni besar berwarna kekuningan pada medium kaya nutrisi. *Staphylococcus aureus* yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Staphylococcus aureus* yang membentuk biofilm, yang diketahui dengan melakukan *Congo Red Agar Test*.
- b. Biofilm adalah komunitas bakteri yang memiliki karakteristik berupa menempel secara *irreversible* pada substrat atau permukaan atau saling menempel antara satu dengan yang lain, yang dilingkupi oleh sebuah matriks dari substansi polimer ekstraseluler yang diproduksinya. Biofilm yang digunakan dalam penelitian ini adalah biofilm yang dihasilkan oleh bakteri *Staphylococcus aureus*.
- c. Ekstrak umbi lobak yang dipakai dalam penelitian ini adalah hasil ekstraksi dengan etanol. Ekstrak yang didapat dianggap memiliki konsentrasi 100%.
- d. Metode yang digunakan untuk mendeteksi pembentukan biofilm adalah dengan *Congo Red Agar Plate*, dan menguji hambatan

terhadap pembentukan biofilm adalah dengan metode *Microtiter plate*.

Metode ini menggunakan 96-well microplate.

- e. Spektrofotometer adalah alat yang digunakan untuk menghitung *Optical Density* pada well-microplate yang diukur. Dari *Optical Density* dapat ditentukan biofilm yang terbentuk di setiap well-microplate. Dari pengukuran ini akan didapatkan *Minimal Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC). Spektrofotometer yang digunakan adalah milik Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Brawijaya.
- f. *Optical Density* adalah suatu proporsi langsung dari konsentrasi senyawa yang berwarna. *Optical Density* akan terukur dalam bentuk *Absorbance Units*.
- g. *Minimal Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC) adalah kadar minimal dari ekstrak umbi lobak, yang dapat menghambat pembentukan biofilm pada bakteri *Staphylococcus aureus*.

#### 4.6 Bahan dan Alat/ Instrumen Penelitian

##### 4.6.1 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Umbi Lobak

1. Umbi lobak segar 4 kg
2. Pelarut ekstrak (etanol 96%)
3. *Aquades*
4. Oven
5. Blender
6. Saringan
7. Kertas saring
8. Neraca analitik

#### 9. Seperangkat alat evaporasi vakum

- *Rotatory Evaporator*
- Pompa vakum
- Tabung pendingin dan alat pompa sirkulasi air dingin
- Bak penampung air dingin
- Labu penampung hasil evaporasi
- Labu penampung etanol
- Batu didih
- Cawan penguap
- Alat pemanas *aquades* (*waterbath*)
- Pipa plastik

#### 4.6.2 Alat dan Bahan Identifikasi Bakteri

1. Isolat *Staphylococcus aureus*
2. *Chrom Agar Plate*
3. Bahan tes Katalase :  $\text{H}_2\text{O}_2$  3 %
4. Bahan tes Koagulase : *Staphaurex*
5. Bahan pengecatan Gram : Kristal violet, lugol, *alcohol* 95%, 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. Isolat *Staphylococcus aureus*
2. 96-wll-flat-bottomed plastic tissue culture plate
3. Congo Red Agar Plates
4. TSBglu
5. Phosphate buffered saline
6. Ekstrak umbi lobak
7. 2% crystal violet
8. Spektrofotometer

#### 4.7 Metode Pengumpulan Data

##### 4.7.1 Identifikasi Bakteri

##### 4.7.2.1 Pemeriksaan Mikroskopis

1. Pembuatan Sediaan *Slide Glass*
  - a. *Object glass* dibersihkan dengan kapas kemudian dilewatkan di atas api untuk menghilangkan lemak yang ada. Setelah itu dibiarkan dingin terlebih dahulu.
  - b. Satu ose *aquades* steril ditetaskan pada *object glass*, kemudian bakteri kuman diambil sedikit dengan menggunakan ose, kemudian disuspensikan dengan *aquades* pada *object glass* dan diratakan. Jika sediaan berbentuk cair, tidak perlu disuspensikan dengan *aquades*.
  - c. Sediaan di *object glass* dibiarkan kering di udara, kemudian difiksasi dengan cara dilewatkan di atas api.

## 2. Perwarnaan Gram

- a. Setelah selesai difiksasi, sediaan pada *object glass* siap untuk diwarnai dengan pewarnaan gram.
- b. Sediaan ditetesi dengan pewarna *crystal violet* (*primary stain*) selama 30 detik, setelah itu *crystal violet* dibuang dan sediaan dibilas dengan air perlahan-lahan.
- c. Sediaan ditetesi dengan lugol (*mordant*) dan didiamkan selama 1 menit. Kemudian dibuang dan dibilas dengan air.
- d. Setelah itu, sediaan ditetesi dengan *alcohol* 95% (*decolorizing agent*) selama 10 detik, kemudian langsung dibilas dengan air.
- e. Sediaan ditetesi dengan safranin (*counter stain*), didiamkan selama 30 detik. Kemudian safranin dibuang dan dibilas dengan air.
- f. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap dan siap untuk dilihat di bawah mikroskop dengan pembesaran lensa objektif 100x.

### 4.7.2.2 Tes Katalase

- a. Biakan bakteri diambil dan diusapkan pada *reaction card* dengan menggunakan ose.
- b. Kemudian menuangkan 1 tetes  $\text{H}_2\text{O}_2$  3% di atas bakteri yang telah lebih dulu diusapkan pada *reaction card*.
- c. Ada tidaknya pembentukan gelembung diamati selama beberapa detik.

- d. Jika terbentuk gelembung, artinya hasil tes katalase adalah positif.  
Jika hasil tes adalah positif maka bakteri tersebut adalah *Staphylococcus spp.*

#### 4.7.2.3 Tes *Latex Agglutination* (Staphaurex® by Remel)

- Campur reagen latex di dalam botolnya dengan cara dikocok.
- Teteskan 1 drop Test Latex ke *reaction card*.
- Ambil biakan kuman dengan menggunakan ose, hapuskan pada reagen yang ada di *reaction card*.
- Tunggu selama 20 detik dan perhatikan terjadinya aglutinasi dengan kondisi pencahayaan yang normal.
- Jika terjadi penggumpalan, artinya hasil tes koagulase positif, yang artinya bakteri tersebut adalah *Staphylococcus aureus*.

#### 4.7.2 Pembuatan Perbenihan Cair Bakteri

*Staphylococcus aureus* yang sudah ditanam dalam medium *Chrom Agar* dikultur dalam medium *TSBglu* selama 24 jam dalam inkubator dengan suhu 37°C. Suspensi bakteri *S.aureus* pada medium ini diukur dengan menggunakan spektrofotometer diukur dengan panjang gelombang 610 nm sehingga diketahui kepadatan bakterinya. Kemudian dengan rumus pengenceran  $N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$ , encerkan bakteri untuk mendapatkan bakteri dengan kepadatan  $10^8$  bakteri/mL dengan menambahkan sebanyak 9 mL *TSBglu*, kemudian ulangi sekali lagi sehingga akhirnya didapatkan kepadatan bakteri  $10^6$  bakteri /mL.

#### 4.7.3 Deteksi Pembentukan Biofilm (*Congo Red Agar Test*)

- a. Bakteri *S.aureus* diinokulasi pada *Congo Red Agar Plates* (terdiri dari 0,8 gram *Congo Red Agar* dan 36 gram sukrosa yang dicampur dengan 1 liter *brain heart infusion agar*).
- b. Kemudian *Congo Red Agar Plates* ini diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan diteruskan selama semalaman dengan suhu ruangan (24°C).
- c. Jika terbentuk koloni berwarna hitam, maka hal tersebut menunjukkan strain bakteri yang memproduksi biofilm, jika koloni berwarna merah yang muncul, artinya strain tersebut tidak memproduksi biofilm.

#### 4.7.4 Uji Hambatan Pembentukan Biofilm

- a. Bakteri *S.aureus* dikultur semalaman di medium TSB di dilusi sampai 1:100 pada TSBglu.
- b. Kemudian 100 µl *S.aureus* konsentrasi 10<sup>6</sup> bakteri/mL TSBglu diisikan masing-masing pada baris pertama 96-well flat-bottomed plastic tissue culture plate dan diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C.
- c. Kemudian tiap kolomnya ditambahkan ekstrak umbi lobak dengan konsentrasi yang berbeda-beda.
- d. Mikrotiter diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C.

- e. Setelah itu, isi setiap mikrotiter diaspirasi dan dicuci 3 kali menggunakan *phosphate buffer saline* (pH 7,2). *Well-plates* dikocok secara kuat untuk menghilangkan bakteri yang tidak menempel.
- f. Kemudian dicat dengan *crystal violet* 2%.
- g. Lalu dilakukan pembilasan dengan menggunakan *aquades* steril dan dikeringkan.
- h. Untuk menganalisis secara kuantitatif pembentukan biofilm, ditambahkan 200  $\mu$ l dari Isopropanol 5% dalam 1M HCL di setiap *well*.
- i. Kemudian dilakukan pengukuran *Optical Density* (OD) pada 570 nm menggunakan spektrofotometer. Prosedur keseluruhan ini diulang sebanyak tiga kali.

#### 4.8 Pengolahan Data

Data yang diperoleh adalah data kuantitatif dari pembacaan di spektrofotometer yang berupa *Optical Density* setiap *well plates* yang diberi perlakuan berbeda, yaitu pemberian ekstrak umbi lobak dengan konsentrasi tertentu. Analisis yang digunakan adalah uji *one way Anova* dan *Post-hoc Multiple Comparison Test*.

## BAB V

## HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

## 5.1 Hasil Penelitian

Penelitian ini ditujukan untuk melihat ada atau tidaknya pengaruh ekstrak umbi lobak (*Raphanus sativus*) terhadap pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*. Bakteri *Staphylococcus aureus* yang digunakan pada penelitian ini merupakan isolat *S. aureus* dari urin yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Brawijaya. Langkah pertama dalam penelitian ini adalah dengan menguji apakah isolat *S.aureus* yang digunakan benar memproduksi biofilm dengan cara menginokulasikan bakteri pada medium *Congo Red Agar*. Setelah dilakukan uji pembentukan biofilm, baru dilakukan uji efek umbi lobak terhadap pembentukan produksi biofilm *S.aureus* menggunakan *microtiter-plate test* dan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali.

## 5.1.1 Hasil Uji Pembentukan Biofilm

Uji pembentukan biofilm dilakukan guna mengetahui apakah bakteri yang akan digunakan dalam penelitian benar menghasilkan biofilm. Uji pembentukan biofilm dilakukan dengan cara menginokulasikan bakteri pada medium *Congo Red Agar* selama 24 jam lalu dilihat bagaimana karakteristik warna koloni yang muncul pada media. Jika koloni yang muncul berwarna hitam maka bakteri yang digunakan menghasilkan biofilm. Isolat *S.aureus* yang digunakan dalam penelitian ini menghasilkan koloni berwarna hitam pada medium yang artinya *S.*

*aureus* yang digunakan menghasilkan biofilm sehingga dapat digunakan dalam penelitian (Gambar 5.1).



Gambar 5.1 Koloni *Staphylococcus aureus* pada Medium Congo Red Agar

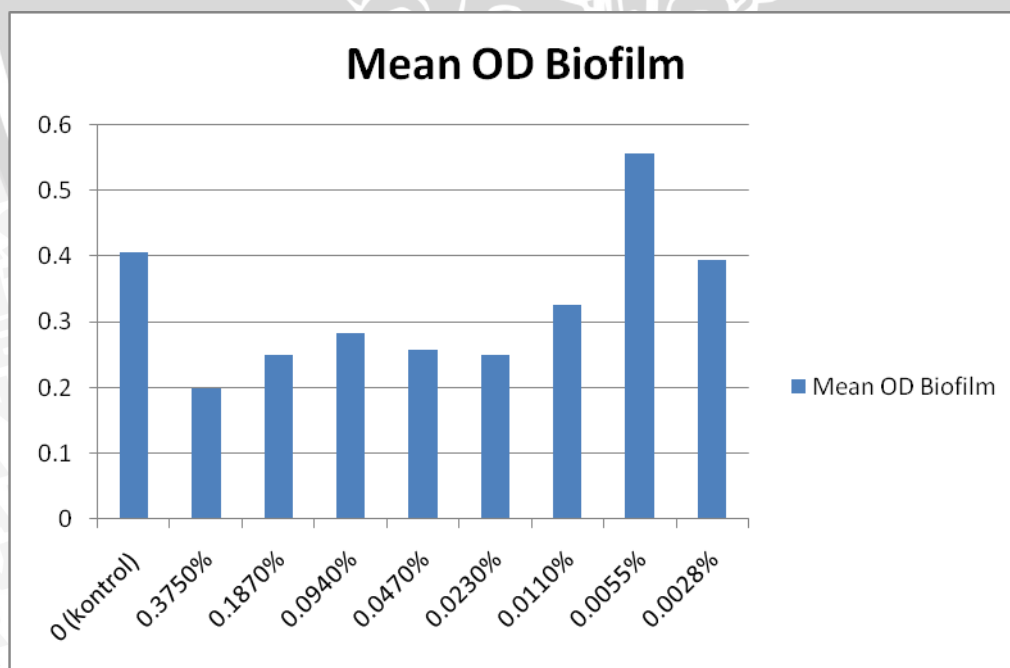
#### 5.1.2 Hasil Uji Efek Ekstrak Umbi Lobak terhadap Pembentukan Biofilm *Staphylococcus aureus*

Langkah selanjutnya adalah melakukan uji efektivitas ekstrak umbi lobak terhadap penghambatan pembentukan biofilm *S. aureus*. Penelitian ini menggunakan sembilan konsentrasi ekstrak, yaitu 0,375%; 0,187%; 0,094%; 0,047%; 0,023%; 0,011%; 0,0055%; 0,0028% dan kontrol (tanpa ekstrak). Sebelumnya telah dilakukan penelitian pendahuluan untuk menemukan rentang dosis yang akan digunakan. Dalam penelitian pendahuluan digunakan konsentrasi 3%; 1,5%; 0,75%; 0,375%; 0,1875%; 0,0938%; 0,047%; 0,023%; 0,0118%. Hasil yang didapatkan pada penelitian pendahuluan ini adalah bahwa pada konsentrasi 0,375% telah terjadi penghambatan pertumbuhan biofilm sehingga konsentrasi tersebut digunakan sebagai konsentrasi awal pada

penelitian yang dilakukan. Setelah melewati proses *microtiter-plate test*, hasil secara kualitatif dari uji efek dapat dilihat pada gambar 5.2. Hasil ini dibaca pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 570 nm. Hasil yang didapatkan berupa OD biofilm, yaitu sebagai berikut.

Tabel 5.1 Hasil Pengukuran ELISA Reader OD Biofilm

| Ekstrak (%) | Percobaan 1 | Percobaan 2 | Percobaan 3 | mean  | Standar Deviasi |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------|-----------------|
| Tsb         | 0           |             |             |       |                 |
| 0           | 0.346       | 0.394       | 0.480       | 0.407 | 0.0679          |
| 0.375 %     | 0.213       | 0.169       | 0.218       | 0.200 | 0.0270          |
| 0.187 %     | 0.239       | 0.196       | 0.317       | 0.251 | 0.0613          |
| 0.094 %     | 0.293       | 0.198       | 0.362       | 0.284 | 0.0823          |
| 0.047 %     | 0.190       | 0.315       | 0.268       | 0.258 | 0.0631          |
| 0.023 %     | 0.329       | 0.206       | 0.217       | 0.251 | 0.0641          |
| 0.011 %     | 0.355       | 0.400       | 0.213       | 0.327 | 0.0977          |
| 0.0055 %    | 0.649       | 0.581       | 0.441       | 0.557 | 0.1061          |
| 0.0028 %    | 0.615       | 0.320       | 0.247       | 0.394 | 0.1948          |



Gambar 5.2 Grafik Mean OD Biofilm

## 5.2 Analisis Data

Hasil penelitian ini berupa data OD biofilm yang diukur menggunakan spektrofotometer dan selanjutnya dianalisis dengan menggunakan analisis statistik SPSS versi 20 untuk Windows. Hasil penelitian ini dianalisis dengan menggunakan Uji *One-Way Anova* untuk mengetahui adanya perbedaan antara kelompok data, kemudian dianalisis lebih lanjut dengan *Post-Hoc Multiple Comparison Test* untuk menentukan kelompok data mana yang memiliki perbedaan yang bermakna.

### 5.2.1 Uji *One-Way Anova*

Sebelum menganalisis data OD Biofilm hasil pembacaan spektrofotometer dengan menggunakan *One-Way Anova* ada beberapa syarat yang harus dipenuhi terlebih dahulu, diantaranya adalah data yang digunakan memiliki sebaran data yang normal dan varians yang sama. Data yang nantinya digunakan dianalisis untuk mengetahui sebaran datanya, hasil analisis dapat dilihat pada tabel 5.2.

Tabel 5.2 Tabel Tes Normalitas

|               | Ekstrak<br>(%) | Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup> |    |      | Shapiro-Wilk |    |      |
|---------------|----------------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
|               |                | Statistic                       | df | Sig. | Statistic    | df | Sig. |
| OD<br>Biofilm | .000000        | .241                            | 3  | .    | .974         | 3  | .690 |
|               | .002800        | .315                            | 3  | .    | .892         | 3  | .360 |
|               | .005500        | .256                            | 3  | .    | .962         | 3  | .623 |
|               | .011000        | .296                            | 3  | .    | .918         | 3  | .444 |
|               | .023000        | .356                            | 3  | .    | .816         | 3  | .155 |
|               | .047000        | .232                            | 3  | .    | .980         | 3  | .728 |

|         |      |   |   |      |   |      |
|---------|------|---|---|------|---|------|
| .094000 | .209 | 3 | . | .992 | 3 | .826 |
| .187000 | .242 | 3 | . | .973 | 3 | .684 |
| .375000 | .352 | 3 | . | .826 | 3 | .177 |

a. Lilliefors Significance Correction

Dari tabel 5.2 dapat disimpulkan bahwa data yang dimiliki memiliki sebaran yang normal.

Syarat kedua untuk dapat menganalisa data menggunakan *One-Way Anova* adalah data memiliki varians yang sama. Setelah dianalisis, data ini memiliki  $p = 0.059$  ( $p > 0.05$ ) seperti terlihat pada tabel 5.3.

Tabel 5.3 Tabel Tes Homogenitas

| Test of Homogeneity of Variances |     |     |      |
|----------------------------------|-----|-----|------|
| OD Biofilm                       |     |     |      |
| Levene Statistic                 | df1 | df2 | Sig. |
| 2.395                            | 8   | 18  | .059 |

Setelah kedua syarat dipenuhi, maka analisa menggunakan *One-Way Anova* dapat dilaksanakan.

Tabel 5.4 Tabel Analisis *One Way Anova*

| ANOVA          |                |    |             |       |      |
|----------------|----------------|----|-------------|-------|------|
| OD Biofilm     |                |    |             |       |      |
|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F     | Sig. |
| Between Groups | .294           | 8  | .037        | 3.979 | .007 |
| Within Groups  | .166           | 18 | .009        |       |      |
| Total          | .461           | 26 |             |       |      |

Dari tabel 5.4 dapat dilihat bahwa dari analisis One-Way Anova didapatkan nilai  $p = 0.07$  sehingga dapat didapatkan kesimpulan bahwa tidak terdapat perbedaan yang bermakna pada kelompok data. Data lengkap dapat dilihat pada Lampiran 1.

### 5.2.2 Post Hoc Multiple Comparison Test

Walaupun dari hasil analisa *One-Way Anova* tidak didapatkan adanya perbedaan yang signifikan antara kelompok data, masih akan dilakukan analisa *Post Hoc Multiple Comparison Test* untuk menentukan masing-masing nilai perbedaan antara kelompok data.

Metode *Post-Hoc* yang dipakai adalah *Tukey HSD*. Indikator yang digunakan untuk menentukan apakah perbedaan tersebut bermakna atau tidak adalah nilai signifikansi pada tabel. Suatu nilai dianggap ada perbedaan secara bermakna jika nilai signifikansinya kurang dari 0.05.

Tabel 5.5 Tabel Hasil *Multiple Comparison*

| Multiple Comparisons           |           |                       |            |       |                         |             |
|--------------------------------|-----------|-----------------------|------------|-------|-------------------------|-------------|
| Dependent Variable: OD Biofilm |           |                       |            |       |                         |             |
| Tukey HSD                      |           |                       |            |       |                         |             |
| (I)                            | (J)       | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig.  | 95% Confidence Interval |             |
|                                |           |                       |            |       | Lower Bound             | Upper Bound |
| VAR000001                      | VAR000001 |                       |            |       |                         |             |
|                                | .002800   | .012667               | .078521    | 1.000 | -.26246                 | .28779      |
|                                | .005500   | -.150333              | .078521    | .613  | -.42546                 | .12479      |
|                                | .011000   | .084000               | .078521    | .972  | -.19113                 | .35913      |
| .000000                        | .023000   | .156000               | .078521    | .570  | -.11913                 | .43113      |

|         |         |         |      |         |        |
|---------|---------|---------|------|---------|--------|
| .047000 | .149000 | .078521 | .624 | -.12613 | .42413 |
| .094000 | .122333 | .078521 | .814 | -.15279 | .39746 |
| .187000 | .156000 | .078521 | .570 | -.11913 | .43113 |
| .375000 | .206667 | .078521 | .240 | -.06846 | .48179 |

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

Di bawah ini adalah tabel dari Homogenous subsets yang memperjelas maksud dari tabel Hasil Multiple Comparison (Tabel 5.5). Tabel ini memperlihatkan kelompok konsentrasi mana yang memiliki perbedaan yang bermakna dan mana yang tidak.

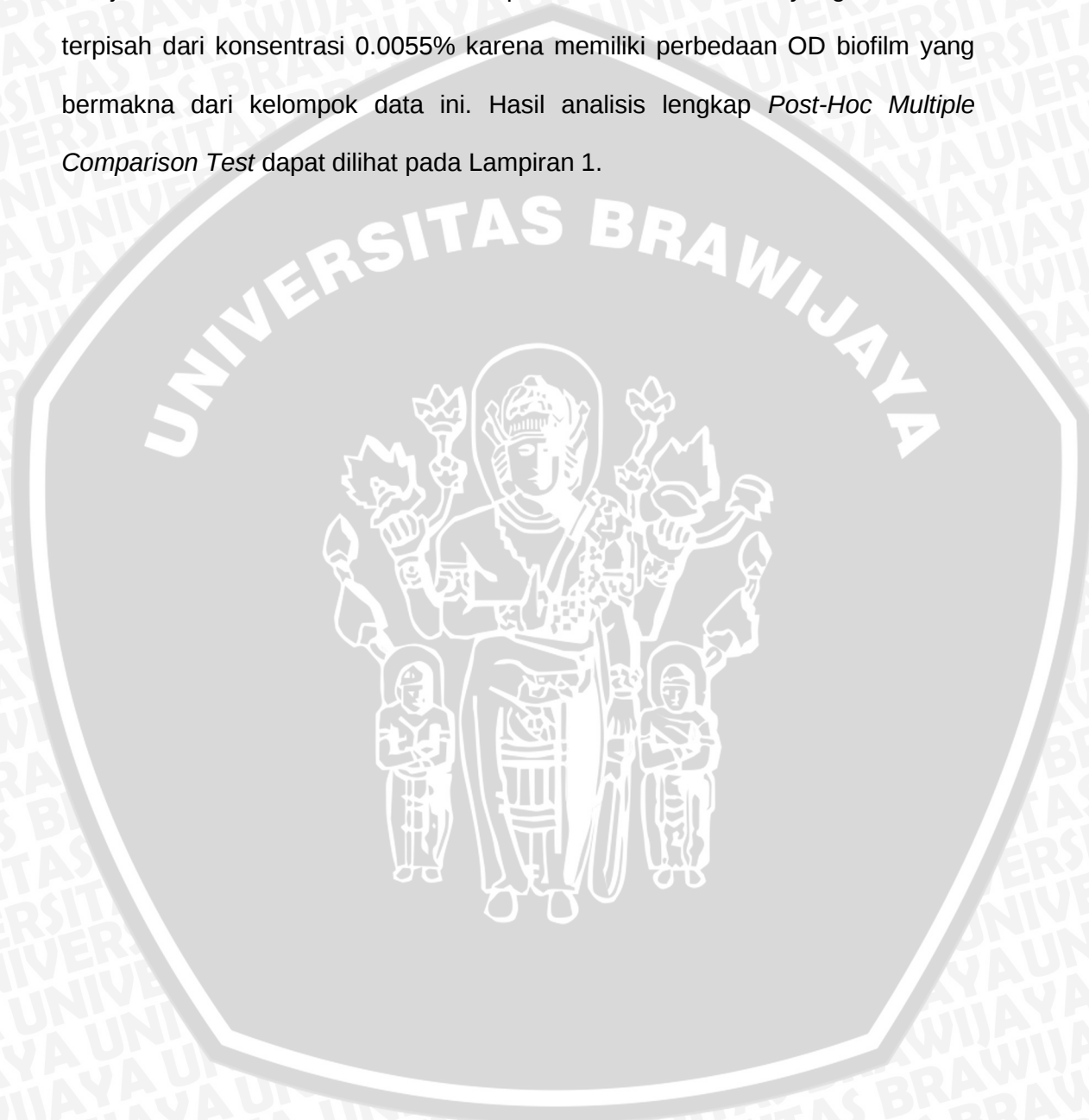
Tabel 5.6 Homogenous Subsets

| OD Biofilm  |   |                         |        |
|-------------|---|-------------------------|--------|
| Tukey HSD   |   |                         |        |
| Ekstrak (%) | N | Subset for alpha = 0.05 |        |
|             |   | 1                       | 2      |
| .375000     | 3 | .20000                  |        |
| .023000     | 3 | .25067                  |        |
| .187000     | 3 | .25067                  |        |
| .047000     | 3 | .25767                  |        |
| .094000     | 3 | .28433                  | .28433 |
| .011000     | 3 | .32267                  | .32267 |
| .002800     | 3 | .39400                  | .39400 |
| .000000     | 3 | .40667                  | .40667 |
| .005500     | 3 |                         | .55700 |
| Sig.        |   | .240                    | .053   |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Pada tabel 5.6 dapat dilihat bahwa kelompok konsentrasi 0 (kontrol), 0.375%; 0.187%; 0.94%; 0.47%; 0.23%; 0.11%; dan 0.028% dikelompokkan menjadi satu karena tidak memiliki perbedaan OD biofilm yang bermakna terpisah dari konsentrasi 0.0055% karena memiliki perbedaan OD biofilm yang bermakna dari kelompok data ini. Hasil analisis lengkap *Post-Hoc Multiple Comparison Test* dapat dilihat pada Lampiran 1.



## BAB VI

## PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek ekstrak umbi lobak (*Raphanus sativus*) terhadap pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus*. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah *microtiter plate test*. Sebelum penelitian ini dilakukan telah dilakukan beberapa penelitian pendahuluan, diantaranya adalah memastikan apakah bakteri yang digunakan menghasilkan biofilm dengan menginokulasikannya pada media *Congo Red Agar* dan eksplorasi konsentrasi bahan ekstrak untuk menentukan rentang konsentrasi yang akan digunakan dalam penelitian. Penilaian adanya hambatan pembentukan biofilm diukur menggunakan spektrofotometer yang akan menghasilkan nilai Optical Density (OD). Optical Density (OD) inilah yang nantinya akan dinilai untuk menentukan efek dari ekstrak terhadap pembentukan biofilm dengan statistika.

Bakteri *Staphylococcus aureus* yang digunakan dalam penelitian ini merupakan isolat *S. aureus* dari urin yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Untuk menentukan apakah bakteri yang digunakan dapat menghasilkan biofilm atau tidak maka dilakukan inokulasi bakteri pada medium *Congo Red Agar* selama 24 jam. Jika bakteri menghasilkan koloni berwarna hitam maka bakteri tersebut menghasilkan biofilm. Mariana et al pada tahun 2009 menyebutkan bahwa warna hitam yang dihasilkan pada koloni penghasil biofilm tersebut berhubungan dengan adanya kandungan glukosa pada medium.

Umbil lobak (*Raphanus sativus*) diekstraksi dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% sehingga didapatkan ekstrak yang berbentuk cairan yang kental. Bahan mentah ekstrak berupa umbi lobak akan dicacah menjadi bagian-bagian halus lalu dikeringkan sehingga berbentuk bubuk. Bentuk bubuk dari bahan kemudian akan direndam oleh larutan etanol kemudian dievaporasi sehingga didapatkan bahan ekstrak berupa cairan kental berwarna kecokelatan. Sebelum digunakan dalam penelitian maka dilakukan eksplorasi konsentrasi terlebih dahulu untuk menentukan rentang konsentrasi yang akan digunakan. Konsentrasi yang digunakan untuk eksplorasi adalah 3%; 1,5%; 0,75%; 0,375%; 0,1875%; 0,0938%; 0,047%; 0,023%; 0,0118%.

Data OD biofilm yang telah diperoleh dianalisis menggunakan SPSS untuk mengetahui apakah ada perbedaan pembentukan biofilm yang bermakna pada tiap konsentrasi. Setelah dilakukan analisis didapatkan hasil bahwa tidak terdapat perbedaan OD biofilm yang signifikan antara bakteri yang diberi ekstrak dengan bakteri yang tidak diberi ekstrak (kontrol). Hal ini bisa disebabkan oleh beberapa hal, diantaranya adalah kesalahan prosedur ekstraksi dan kesalahan prosedur penelitian baik saat inkubasi biofilm maupun saat pembacaan menggunakan spektrofotometer.

Terlihat dari data yang telah dipaparkan pada bab sebelumnya, bahan ekstrak memang memiliki kecenderungan untuk menghambat pembentukan biofilm. Dari grafik mean OD biofilm (gambar 5.2) dapat terlihat bahwa OD biofilm menurun seiring peningkatan konsentrasi walaupun terdapat beberapa konsentrasi ekstrak yang mengalami peningkatan OD biofilm. Hal ini mungkin disebabkan karena konsentrasi ekstrak yang digunakan terlalu kecil dan rentang

konsentrasi terlalu sempit sehingga hasil analisis statistika tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan antara OD biofilm yang diberi ekstrak dan tidak diberi ekstrak.

Setelah ditelaah, terdapat beberapa celah dalam penelitian yang memungkinkan terjadinya kesalahan sehingga mempengaruhi hasil penelitian. Beberapa faktor tersebut mungkin dapat mempengaruhi penelitian yang dilakukan sehingga ekstrak umbi lobak tidak terbukti menghambat pembentukan biofilm padahal jika dilihat secara teori ekstrak umbi lobak dapat menghambat pembentukan biofilm *S. aureus*. Faktor-faktor tersebut diantaranya adalah faktor ekstrak, baik bahan ekstrak yang digunakan maupun prosedur ekstraksi; prosedur penelitian; dan dosis ekstrak yang digunakan.

Bahan ekstraksi yang digunakan adalah umbi lobak (*Raphanus sativus*) yang dibeli di perkebunan di daerah Batu, Malang, Jawa Timur. Hal yang mungkin bisa menyebabkan hasil yang tidak signifikan adalah tidak adanya standarisasi bahan yang berupa umbi lobak. Peneliti tidak menelaah lebih lanjut bagaimana karakteristik umbi lobak yang bisa digunakan dalam penelitian ini, misalkan dalam hal umur panen umbi, keadaan geologis tempat penanaman lobak, dan lain sebagainya.

Ekstraksi adalah penyarian zat-zat berkhasiat atau zat-zat aktif dari bagian tanaman obat, hewan, dan beberapa jenis ikan termasuk biota laut. Tujuan dari ekstraksi bahan alam adalah untuk menarik komponen kimia yang terdapat pada bahan alam. Ekstraksi ini didasarkan pada prinsip perpindahan massa komponen zat ke dalam pelarut, dimana perpindahan mulai terjadi pada

lapisan antar muka kemudian berdifusi masuk ke dalam pelarut. Ada beberapa cara ekstraksi yang bisa dilakukan, diantaranya ekstraksi secara soxhletasi, ekstraksi secara perkolasi, ekstraksi secara maserasi, ekstraksi secara refluks, dan ekstraksi secara penyulingan (Harborne, 1987). Cara ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstraksi secara maserasi.

Faktor terkait metode ekstraksi yang dapat mempengaruhi hasil penelitian yang pertama adalah waktu lamanya ekstraksi dilakukan. Menurut Harborne pada tahun 1987, teknik ekstraksi secara maserasi membutuhkan waktu setidaknya 5 hari untuk membuat ekstrak yang baik dimana diharapkan zat-zat aktif dalam bahan alam tersebut telah terserap semaksimal mungkin ke dalam pelarut. Namun, dalam penelitian ini, waktu perendaman bahan dalam pelarut hanya berlangsung selama 3-4 hari. Walaupun hanya terjadi sedikit perbedaan dalam hal waktu perendaman hal ini mungkin saja bisa mempengaruhi jumlah zat aktif yang terlarut sehingga kandungan zat aktif dalam ekstrak tidak maksimal.

Selain itu, jika dipertimbangkan dari sudut pandang bentuk dari bahan alam yang ingin dibuat ekstrak adalah umbi, mungkin bisa dipertimbangkan untuk menggunakan teknik ekstraksi yang lain, yaitu teknik perkolasi. Cara ekstraksi secara perkolasi biasanya digunakan untuk bagian tumbuhan yang keras seperti akar, biji, dan batang.

Hal lain yang bisa mempengaruhi hasil penelitian adalah durasi penyimpanan ekstrak sampai masa digunakannya ekstrak tersebut. Walaupun disimpan dalam keadaan dingin, tentu saja ekstrak akan mengalami perubahan jika disimpan dalam waktu yang lama. Dalam hal ini ekstrak yang digunakan

dalam penelitian disimpan dalam waktu lebih dari dua bulan sebelum digunakan. Hal ini tentu mempengaruhi zat aktif yang terkandung dalam ekstrak baik secara fisik maupun efektivitasnya.

Faktor kedua yang bisa mempengaruhi hasil penelitian adalah kesalahan yang terjadi dalam prosedur penelitian, baik saat penelitian dilaksanakan maupun tahap persiapan pembacaan dengan spektrofotometri. Kesalahan prosedur penelitian disangka terjadi berdasarkan data pada tabel 5.1. Pada tabel tersebut dapat terlihat bahwa hasil OD biofilm yang terbaca oleh spektrofotometri pada kolom ekstrak 0,0055% mengalami perbedaan yang cukup signifikan diantara kelompok data lainnya. Berdasarkan teori, seharusnya OD biofilm pada kolom ekstrak 0,0055% menunjukkan angka yang lebih rendah daripada OD biofilm pada kolom ekstrak 0,011%. Ketiga hasil percobaan menunjukkan hasil yang sama, yakni mengalami peningkatan. Hal ini mungkin disebabkan karena kesalahan dalam menambahkan konsentrasi ekstrak pada *microtiter-plate test* dan juga kesalahan-kesalahan lainnya.

Teknik pengukuran biofilm secara kuantitatif dengan metode spektrofotometri. Pengukuran biofilm dengan metode spektrofotometri akan menghasilkan angka berupa *Optical Density* dari biofilm yang merupakan pengurangan dari intensitas cahaya yang dipancarkan oleh alat yang digunakan (dilaporkan sebagai absorbansi) dan setara dengan jumlah akumulasi biofilm (Koch, 1970; 1984). Cahaya yang dipancarkan akan melewati dinding *microtiter plate*, biofilm yang terbentuk, juga reagen yang digunakan yaitu isopropanol.

Kesalahan juga bisa terjadi pada tahap persiapan pembacaan biofilm menggunakan spektrofotometer, mulai dari tahap pencucian *well microtiter plate*

sampai tahap penambahan isopropanol. Tahap-tahap persiapan yang harus dilalui sebelum dilakukan pembacaan adalah :

1. Pencucian *well microtiter plate* dengan PBS (*Phosphate Buffer Saline*) sebanyak tiga kali. Hal ini dimaksudkan untuk menghilangkan sisa ekstrak yang ada dalam *well* sehingga tidak mempengaruhi hasil pembacaan. Kesalahan yang bisa terjadi dalam tahap ini antara lain pencucian yang tidak bersih atau sebaliknya pencucian yang terlalu bersih. Pencucian yang kurang bersih bisa berakibat salah pembacaan oleh spektrofotometer karena terpengaruh oleh sisa ekstrak yang masih tertinggal sehingga hasil pembacaan tidak akurat (terjadi *false positive* pada hasil pembacaan). Sebaliknya pencucian yang terlalu bersih dapat berakibat *false negative* pada pembacaan biofilm karena biofilm yang telah terbentuk rusak oleh proses pembersihan.
2. Pewarnaan dengan *crystal violet* lalu dibiarkan selama 5 menit dan kemudian dibersihkan. Kesalahan bisa terjadi jika *crystal violet* tidak dibersihkan dengan tuntas, *crystal violet* yang tersisa akan mengganggu pembacaan. Pertama jika terdapat *crystal violet* yang menempel pada *well* atau di sekitarnya maka hal ini akan menghalangi cahaya untuk mencapai biofilm sehingga absorbansi yang terbaca tidak akurat. Selain itu jika *crystal violet* bercampur dengan isopropanol maka *crystal violet* yang menempel pada sekitar *well* dan telah mengering dapat mencair lagi dan bahkan bisa masuk ke dalam *well* bercampur dengan biofilm yang akan diukur sehingga mempengaruhi pembacaan.

3. Penambahan isopropanol pada *well* yang siap dibaca. Faktor yang bisa mempengaruhi adalah ada jeda yang terlalu lama antara penambahan isopropanol pada satu *well* dengan *well* lainnya karena isopropanol sangat mudah menguap sehingga juga bisa mempengaruhi pembacaan.

Kesalahan terakhir yang bisa terjadi yaitu kesalahan acak (*random error*). Kesalahan ini merupakan bentuk kesalahan yang menyebabkan hasil dari suatu perulangan menjadi relatif berbeda satu sama lain, dimana hasil secara individual berada di sekitar harga rata-rata. Kesalahan ini memberi efek pada tingkat akurasi dan kemampuan dapat terulang (*reproducibilitas*). Kesalahan ini bersifat wajar dan tidak dapat dihindari, hanya bisa direduksi dengan kehati-hatian dan konsentrasi dalam bekerja.

Terakhir mungkin bisa dipertimbangkan untuk meningkatkan dosis ekstrak yang digunakan karena berdasarkan tabel rerata OD Biofilm memang tampak adanya kecenderungan bahan ekstrak menghambat pertumbuhan biofilm. Kemungkinan terjadi kesalahan dalam penelitian pendahuluan untuk menentukan dosis sehingga dosis yang dipakai dalam penelitian ternyata tidak menunjukkan hasil yang signifikan.

## BAB VII

### PENUTUP

#### 7.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa :

1. Ekstrak umbi lobak (*Raphanus sativus*) memiliki efek menurunkan pembentukan biofilm oleh *Staphylococcus aureus*, namun tidak signifikan.
2. Kadar MBIC (*Minimum Biofilm Inhibitory Concentration*) tidak dapat ditentukan karena besaran OD biofilm yang tidak stabil (naik-turun).

#### 7.2 Saran

1. Menggunakan teknik ekstraksi yang lain, yakni perkolasi yang mungkin lebih cocok untuk bahan alam berupa umbi. Selain itu teknik perkolasi bisa digunakan untuk mengekstraksi zat aktif yang terkandung dalam jumlah yang sedikit pada bahan alam.
2. Dilakukan waktu ekstraksi yang lebih lama (5 hari atau lebih) sehingga pemindahan zat aktif dari bahan alam ke pelarut lebih maksimal
3. Penelitian dilakukan segera setelah bahan ekstrak didapatkan sehingga mencegah kerusakan bahan ekstrak
4. Dilakukan penelitian ulang dengan dosis ekstrak yang lebih besar dengan rentang konsentrasi yang lebih besar pula.

## DAFTAR PUSTAKA

Arciola CR, An YH, Campoccia D, Donati ME, Montanaro L. Etiology of implant orthopedic infections: a survey on 1027 clinical isolates. *Int J Artif Organs*. 2005;28:1091–1100.

Brooks F, Geo, dkk. 2010. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, 25<sup>th</sup> edition. Lange. Atlanta.

Centers for Disease Control and Prevention. Antimicrobial Resistance: A Growing Threat to Public Health. DHQP/NCIDOD; November 2002. ([http://www.cdc.gov/ncidod/hip/aresist/am\\_res.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/hip/aresist/am_res.htm) )

Cunningham Alfred, Lennox John, Ross Rockford. 2008. Biofilm Hypertext Book (Online Text Book), Chapter 2; Section 3. <http://biofilmbook.hypertextbookshop.com/v003/r002/contents/chapters/chapter002/section003/blue/page002.html>.

Cushnie TPT and Lamb AJ. 2005. Antimicrobial Activity of Flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* 26: 343-356.

Donlan RM. 2001. Biofilm and Device-Associated Infections. *Journal* Vol.7, no2.

Donlan RM, Costerton JW. 2002. Biofilm : Survival Mechanism of Clinically Relevant Microorganisms. *Clin Microbiol. Rev.* 15:167-193.

Dzen SM, Roekistiningsih, Santoso S, Winarsih S. 2003. *Bakteriologi Medik*. Malang: Bayumedium Publishing.

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

Götz, F., T. Bannerman, and K.-H. Schleifer. 2006. The Genera *Staphylococcus* and *Macroccoccus*. In: *The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria: Firmicutes: Firmicutes with Low GC Content of DNA* (Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, H.-K., Stackebrandt, E., eds.). Springer New York, NY, pp. 11-59.

Harborne, J.B., (1987). Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan. Cetakan II, Diterjemahkan oleh K, Padinawinata dan I, Soediro, Penerbit ITB Bandung.

Hussain M, Wilcox MH, White PJ. The Slime of Coagulase-Negative Staphylococci: Biochemistry and Relation to Adherence. FEMS Microbiol Rev 1993; 104: 191-208.

Koch A.L. 1970. Turbidity Measurements of Bacterial Cultures in Some Available Commercial Instruments. Anal. Biochem. 38, 252-259

Koch A.L. 1984. Turbidity Measurements in Microbiology. ASM News 50, No. 10, 473-477

Lowy, Franklin. *Staphylococcus aureus* Infections. New England Journal of Medicine. Vol. 339:520-532, August 20, 1998.

Madigan MT, Martinko JM, Brock TD. 2006. Brock Biology of Microorganisms. 11<sup>th</sup> ed. New Jersey: Pearson Practice Hall.

Marshall KC, 1976. Interfaces in Microbial Ecology. Harvard University Press, Cambridge, Mass, page 44-47

McGraw-Hill Concise Encyclopedia of Bioscience. 2002. The McGraw-Hill Companies Inc.

Min BR. 2008. Comparative Antimicrobial Activity of Tannin Extracts from Perennial Plants on Mastitis Pathogens. Scientific Research and Essay Vol.3 (2), p. 066-073

Monroe, D. 2007. Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. PLoS Biology. 5(11): 2458.

Nuryastuti T. 2010. Environmental Signal Affecting ica-expression in staphylococcus epidermidis. Niaga Sejati. p21.

Patel R. 2005. Biofilms and antimicrobial resistance. Clin Orthop Relat; (437):41-47.

Reginald W. Bennett and Gayle A. Lancette. 2001. Bacteriological Analytical Manual, Chapter 12, Staphylococcus aureus (online), (<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm071429.htm>), diakses 2 Januari 2012).

Rukmana, Rahmat. 1995. Bertanam Lobak, Kanisius, Yogyakarta, hal. page 18-20).

Sakthivel M, Karthikeyan N, Palani P. 2010. Detection and Analysis of Lysozyme Activity in Some Tuberous Plants and Calotropis Procera's Latex. Journal of Phytologi 2010, 2(11): 65-72.

Sutherland IW. 2001. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. Microbiology 2001; 147:3-9.

Todar, Kenneth. 2011. Staphylococcus aureus and Staphylococcal Disease, (Online), ([www.textbookofbacteriology.net/staph.html](http://www.textbookofbacteriology.net/staph.html)), diakses 2 Januari 2012).

Richard, Wenzel et al. 2001 The Impact of Hospital-Acquired Bloodstream Infections. Emerging Infectious Diseases. Vol. 7:174-177, March - April 2001.

Xu, Ran., Wang, Haifeng., Li, Fengting. 2011. Lysozyme-liposome synthesis and its capability in biofilm removal.

## Lampiran 1

### Hasil Perolehan Data dan Analisis Statistika

Hasil pengukuran akumulasi biofilm secara kuantitative menggunakan spektrofotometri

| Ekstrak (%) | Percobaan 1 | Percobaan 2 | Percobaan 3 | mean  | Standar Deviasi |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------|-----------------|
| Tsb         | 0           |             |             |       |                 |
| 0           | 0.346       | 0.394       | 0.480       | 0.407 | 0.0679          |
| 0.375 %     | 0.213       | 0.169       | 0.218       | 0.200 | 0.0270          |
| 0.187 %     | 0.239       | 0.196       | 0.317       | 0.251 | 0.0613          |
| 0.094 %     | 0.293       | 0.198       | 0.362       | 0.284 | 0.0823          |
| 0.047 %     | 0.190       | 0.315       | 0.268       | 0.258 | 0.0631          |
| 0.023 %     | 0.329       | 0.206       | 0.217       | 0.251 | 0.0641          |
| 0.011 %     | 0.355       | 0.400       | 0.213       | 0.327 | 0.0977          |
| 0.0055 %    | 0.649       | 0.581       | 0.441       | 0.557 | 0.1061          |
| 0.0028 %    | 0.615       | 0.320       | 0.247       | 0.394 | 0.1948          |

Analisis Statistika menggunakan SPSS 20

#### Descriptive

OD Biofilm

|         | N  | Mean   | Std. Deviation | Std. Error | 95% Confidence Interval for Mean |             | Minimum | Maximum |
|---------|----|--------|----------------|------------|----------------------------------|-------------|---------|---------|
|         |    |        |                |            | Lower Bound                      | Upper Bound |         |         |
| .000000 | 3  | .40667 | .067892        | .039198    | .23801                           | .57532      | .346    | .480    |
| .002800 | 3  | .39400 | .194841        | .112491    | -.09001                          | .87801      | .247    | .615    |
| .005500 | 3  | .55700 | .106057        | .061232    | .29354                           | .82046      | .441    | .649    |
| .011000 | 3  | .32267 | .097603        | .056351    | .08021                           | .56513      | .213    | .400    |
| .023000 | 3  | .25067 | .068061        | .039295    | .08159                           | .41974      | .206    | .329    |
| .047000 | 3  | .25767 | .063137        | .036452    | .10082                           | .41451      | .190    | .315    |
| .094000 | 3  | .28433 | .082343        | .047541    | .07978                           | .48888      | .198    | .362    |
| .187000 | 3  | .25067 | .061338        | .035413    | .09829                           | .40304      | .196    | .317    |
| .375000 | 3  | .20000 | .026963        | .015567    | .13302                           | .26698      | .169    | .218    |
| Total   | 27 | .32485 | .133134        | .025622    | .27219                           | .37752      | .169    | .649    |

### Test of Homogeneity of Variances

OD Biofilm

| Levene Statistic | df1 | df2 | Sig. |
|------------------|-----|-----|------|
| 2.395            | 8   | 18  | .059 |

### ANOVA

OD Biofilm

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F     | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|-------|------|
| Between Groups | .294           | 8  | .037        | 3.979 | .007 |
| Within Groups  | .166           | 18 | .009        |       |      |
| Total          | .461           | 26 |             |       |      |

### Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

Dependent Variable: OD Biofilm

Tukey HSD

| (I)      | (J)      | Mean Difference (I-J) | Std. Error | Sig.  | 95% Confidence Interval |             |
|----------|----------|-----------------------|------------|-------|-------------------------|-------------|
|          |          |                       |            |       | Lower Bound             | Upper Bound |
| VAR00001 | VAR00001 |                       |            |       |                         |             |
|          | .002800  | .012667               | .078521    | 1.000 | -.26246                 | .28779      |
|          | .005500  | -.150333              | .078521    | .613  | -.42546                 | .12479      |
|          | .011000  | .084000               | .078521    | .972  | -.19113                 | .35913      |
|          | .023000  | .156000               | .078521    | .570  | -.11913                 | .43113      |
|          | .047000  | .149000               | .078521    | .624  | -.12613                 | .42413      |
|          | .094000  | .122333               | .078521    | .814  | -.15279                 | .39746      |
|          | .187000  | .156000               | .078521    | .570  | -.11913                 | .43113      |
| .000000  | .375000  | .206667               | .078521    | .240  | -.06846                 | .48179      |

|         |         |           |         |       |         |         |
|---------|---------|-----------|---------|-------|---------|---------|
| .002800 | .000000 | -.012667  | .078521 | 1.000 | -.28779 | .26246  |
|         | .005500 | -.163000  | .078521 | .516  | -.43813 | .11213  |
|         | .011000 | .071333   | .078521 | .990  | -.20379 | .34646  |
|         | .023000 | .143333   | .078521 | .667  | -.13179 | .41846  |
|         | .047000 | .136333   | .078521 | .719  | -.13879 | .41146  |
|         | .094000 | .109667   | .078521 | .885  | -.16546 | .38479  |
|         | .187000 | .143333   | .078521 | .667  | -.13179 | .41846  |
|         | .375000 | .194000   | .078521 | .307  | -.08113 | .46913  |
| .005500 | .000000 | .150333   | .078521 | .613  | -.12479 | .42546  |
|         | .002800 | .163000   | .078521 | .516  | -.11213 | .43813  |
|         | .011000 | .234333   | .078521 | .132  | -.04079 | .50946  |
|         | .023000 | .306333*  | .078521 | .023  | .03121  | .58146  |
|         | .047000 | .299333*  | .078521 | .027  | .02421  | .57446  |
|         | .094000 | .272667   | .078521 | .053  | -.00246 | .54779  |
|         | .187000 | .306333*  | .078521 | .023  | .03121  | .58146  |
|         | .375000 | .357000*  | .078521 | .006  | .08187  | .63213  |
| .011000 | .000000 | -.084000  | .078521 | .972  | -.35913 | .19113  |
|         | .002800 | -.071333  | .078521 | .990  | -.34646 | .20379  |
|         | .005500 | -.234333  | .078521 | .132  | -.50946 | .04079  |
|         | .023000 | .072000   | .078521 | .989  | -.20313 | .34713  |
|         | .047000 | .065000   | .078521 | .994  | -.21013 | .34013  |
|         | .094000 | .038333   | .078521 | 1.000 | -.23679 | .31346  |
|         | .187000 | .072000   | .078521 | .989  | -.20313 | .34713  |
|         | .375000 | .122667   | .078521 | .812  | -.15246 | .39779  |
| .023000 | .000000 | -.156000  | .078521 | .570  | -.43113 | .11913  |
|         | .002800 | -.143333  | .078521 | .667  | -.41846 | .13179  |
|         | .005500 | -.306333* | .078521 | .023  | -.58146 | -.03121 |
|         | .011000 | -.072000  | .078521 | .989  | -.34713 | .20313  |
|         | .047000 | -.007000  | .078521 | 1.000 | -.28213 | .26813  |
|         | .094000 | -.033667  | .078521 | 1.000 | -.30879 | .24146  |
|         | .187000 | .000000   | .078521 | 1.000 | -.27513 | .27513  |
|         | .375000 | .050667   | .078521 | .999  | -.22446 | .32579  |
| .047000 | .000000 | -.149000  | .078521 | .624  | -.42413 | .12613  |
|         | .002800 | -.136333  | .078521 | .719  | -.41146 | .13879  |
|         | .005500 | -.299333* | .078521 | .027  | -.57446 | -.02421 |
|         | .011000 | -.065000  | .078521 | .994  | -.34013 | .21013  |
|         | .023000 | .007000   | .078521 | 1.000 | -.26813 | .28213  |
|         | .094000 | -.026667  | .078521 | 1.000 | -.30179 | .24846  |
|         | .187000 | .007000   | .078521 | 1.000 | -.26813 | .28213  |
|         | .375000 | .057667   | .078521 | .997  | -.21746 | .33279  |

|         |         |           |         |       |         |         |
|---------|---------|-----------|---------|-------|---------|---------|
| .094000 | .000000 | -.122333  | .078521 | .814  | -.39746 | .15279  |
|         | .002800 | -.109667  | .078521 | .885  | -.38479 | .16546  |
|         | .005500 | -.272667  | .078521 | .053  | -.54779 | .00246  |
|         | .011000 | -.038333  | .078521 | 1.000 | -.31346 | .23679  |
|         | .023000 | .033667   | .078521 | 1.000 | -.24146 | .30879  |
|         | .047000 | .026667   | .078521 | 1.000 | -.24846 | .30179  |
|         | .187000 | .033667   | .078521 | 1.000 | -.24146 | .30879  |
|         | .375000 | .084333   | .078521 | .971  | -.19079 | .35946  |
| .187000 | .000000 | -.156000  | .078521 | .570  | -.43113 | .11913  |
|         | .002800 | -.143333  | .078521 | .667  | -.41846 | .13179  |
|         | .005500 | -.306333* | .078521 | .023  | -.58146 | -.03121 |
|         | .011000 | -.072000  | .078521 | .989  | -.34713 | .20313  |
|         | .023000 | .000000   | .078521 | 1.000 | -.27513 | .27513  |
|         | .047000 | -.007000  | .078521 | 1.000 | -.28213 | .26813  |
|         | .094000 | -.033667  | .078521 | 1.000 | -.30879 | .24146  |
|         | .375000 | .050667   | .078521 | .999  | -.22446 | .32579  |
| .375000 | .000000 | -.206667  | .078521 | .240  | -.48179 | .06846  |
|         | .002800 | -.194000  | .078521 | .307  | -.46913 | .08113  |
|         | .005500 | -.357000* | .078521 | .006  | -.63213 | -.08187 |
|         | .011000 | -.122667  | .078521 | .812  | -.39779 | .15246  |
|         | .023000 | -.050667  | .078521 | .999  | -.32579 | .22446  |
|         | .047000 | -.057667  | .078521 | .997  | -.33279 | .21746  |
|         | .094000 | -.084333  | .078521 | .971  | -.35946 | .19079  |
|         | .187000 | -.050667  | .078521 | .999  | -.32579 | .22446  |

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

## Homogeneous Subsets

VAR00002

Tukey HSD

| VAR00001 | N | Subset for alpha = 0.05 |        |
|----------|---|-------------------------|--------|
|          |   | 1                       | 2      |
| .375000  | 3 | .20000                  |        |
| .023000  | 3 | .25067                  |        |
| .187000  | 3 | .25067                  |        |
| .047000  | 3 | .25767                  |        |
| .094000  | 3 | .28433                  | .28433 |
| .011000  | 3 | .32267                  | .32267 |
| .002800  | 3 | .39400                  | .39400 |
| .000000  | 3 | .40667                  | .40667 |
| .005500  | 3 |                         | .55700 |
| Sig.     |   | .240                    | .053   |

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.