

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Staphylococcus adalah kokus gram positif yang berbentuk seperti anggur pada pewarnaan gram. *Staphylococcus* termasuk dalam flora normal tubuh, seperti di kulit, mukosa saluran respirasi, maupun di saluran urogenital (Chiller *et al.*, 2001). *Staphylococcus aureus* merupakan satu-satunya spesies *Staphylococcus* yang bereaksi positif terhadap tes koagulase dan merupakan bakteri yang paling virulen dibandingkan spesies *Staphylococcus* yang lain (Kasper, 2011). Infeksi *Staphylococcus aureus* dapat terjadi apabila terdapat inokulasi bakteri pada luka terbuka yang dapat memicu perubahan bakteri menjadi virulen (Liu, 2009). Faktor virulensi dari *Staphylococcus* dapat berupa protein permukaan dan protein yang disekresikan yang berfungsi sebagai mediator perlekatan pada *host cell* dan toksin (Gordon and Lowy, 2008). Infeksi *S. aureus* dapat menyebabkan endokarditis, osteomyelitis, pneumonia, bakteremia, *toxic shock syndrome*, *scalded skin syndrome*, dan lain-lain (Plata *et al.*, 2009).

Bakteremia yang diakibatkan *S.aureus* merupakan penyebab morbiditas dan mortalitas tertinggi diantara bakteremia oleh patogen yang lain (Naber, 2009). Penyebab infeksi nosokomial tersering dan peningkatan resistensi terhadap Methycillin dapat dilihat pada *S. aureus* (Stark, 2013). Peningkatan resistensi terhadap antibiotik ditambah dengan peningkatan frekuensi tindakan invasif, penggunaan alat intravaskular, dan pasien dengan status *immunocompromised* baik karena infeksi HIV, pengobatan kanker, maupun pasca transplantasi organ mengakibatkan kenaikan tajam pada bakteremia akibat *S.aureus* selama 30 tahun terakhir (Naber, 2009).

Staphylococcus aureus dikenal sebagai penyebab infeksi biofilm kronik yang dapat menetap dalam jaringan inang dan materi protein diduga berperan penting pada struktur biofilm (Mootz *et al.*, 2013). Respon imun inang tidak mampu melawan infeksi biofilm yang persisten menyebabkan terjadinya infeksi kronik (Archer *et al.*, 2011). Bakteri yang mampu menghasilkan biofilm dibungkus oleh *polysaccharide glycocalix* yang memberikan suatu proteksi terhadap sistem kekebalan tubuh inang dan antimikroba (Sambanthamoorthy, *et al.*, 2008). Biofilm sulit untuk dieradikasi dan memicu timbulnya resistensi terhadap antimikroba (Lewis, 2001)

Munculnya organisme yang *multi-drug resistance* telah menjadi isu kesehatan secara global. Penggunaan antibiotik secara rasional dengan dosis yang ketat sangat disarankan untuk mengurangi resistensi dari bakteri (Tseng *et al.*, 2011). Kompleksitas pengobatan infeksi bakteri *multi-drug resistance* menyebabkan banyaknya penelitian yang fokus mencari antibiotik yang efektif, khususnya struktur yang berasal dari bahan alami (Bodenstain *and* Du Toit, 2012). Bahan alami mempunyai struktur istimewa yang diduga mampu berinteraksi dengan protein spesifik, sehingga penelitian terhadap bahan alami lebih menjanjikan dibandingkan produk sintesis dan kimia kombinasi (Ngwoke *et al.*, 2011). Ketertarikan bahan alami ini akibat beberapa faktor yaitu: kepercayaan konsumen bahwa bahan alami mempunyai efek yang bagus, ketidakpuasan konsumen terhadap pengobatan konvensional, biaya kesehatan, dan lain-lain (Ciocan, 2007)

Camellia sinensis var. Assamica merupakan komoditi unggulan di Indonesia (Jatiwiramurti, 2010). Keunggulan varietas Assamica adalah kandungan polifenol yang tinggi. Oleh karena itu teh yang berasal dari perkebunan di Indonesia lebih berpotensi dalam hal kesehatan dibandingkan teh Jepang maupun teh China yang sebagian besar menggunakan bahan dasar

varietas *sinensis* (McKay and Blumberg, 2002). Selain itu data dari *International Tea Consumption ITC*) menunjukkan peningkatan konsumsi teh hitam di Indonesia. Pada tahun 2006 konsumsi teh hitam meningkat 20,3% dari konsumsi pada tahun 2004 (Sari, 2012).

Konsumsi teh (*Camellia sinensis var. Assamica*) diteliti memiliki banyak manfaat untuk kesehatan (Dimitrios, 2006). Komponen kimia yang terkandung di dalam daun teh meliputi alkaloid (teobromin, kafein, teofilin), polifenol (katekin, flavonoid, tanin), asam amino, polisakarida, asam volatil, vitamin, lemak, dan bahan-bahan inorganik (Adnan *et al.*, 2013). Di antara bahan-bahan berikut polifenol merupakan bahan yang paling menarik dan merupakan molekul bioaktif utama pada teh. Polifenol yang terdapat pada teh terdiri atas katekin, theaflavin, tannin, dan flavonoid (Subramaniam *et al.*, 2012). *Camellia sinensis* telah diteliti memiliki kandungan saponin yang memiliki berbagai efek farmakologi, salah satunya sebagai antibakteri (Zhang *et al.*, 2012). Laporan terbaru dari seorang militer yang berprofesi sebagai dokter bedah di Nigeria menyarankan penggunaan *C. sinensis* pada botol air minum sebagai profilaksis antibakteri (Funmilayo *et al.*, 2012).

Teh hitam mempunyai kandungan flavonoid, polifenol, saponin, dan tannin yang diperkirakan dapat menghambat pembentukan biofilm. Agar hal tersebut dapat terbukti, maka penelitian mengenai efek ekstrak teh hitam sebagai penghambat pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus* perlu dilakukan dan diharapkan dapat menghasilkan sebuah bahan alternatif yang dapat menghambat biofilm *S. aureus*.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah ekstrak teh hitam (*Camelia sinensis var. Assamica*) dapat menghambat pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui efek ekstrak teh hitam (*Camelia sinensis var. Assamica*) sebagai penghambat pembentukan biofilm pada *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*

1.3.2 Tujuan Khusus

1.3.2.1 Untuk mengetahui perbandingan masing-masing konsentrasi ekstrak teh hitam dalam menghambat pembentukan biofilm pada *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*.

1.3.2.2 Untuk mengetahui Kadar Hambat Minimal dari ekstrak teh hitam yang dapat menghambat pembentukan biofilm pada *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademis

1.4.1.1 Dapat menjelaskan manfaat ekstrak teh hitam (*Camelia sinensis varian Assamica*) dalam menghambat pembentukan biofilm pada *Staphylococcus aureus*.

1.4.1.2 Dapat menambah wawasan dan dapat digunakan untuk pengembangan penelitian lebih lanjut tentang biofilm pada *Staphylococcus aureus* dan pengobatannya.

1.4.2 Manfaat Praktis

1.4.2.1 Dapat memberikan alternatif terapi terhadap infeksi *Staphylococcus aureus* yang membentuk biofilm.

1.4.2.2 Dapat dijadikan sebagai dasar teori untuk meningkatkan pengetahuan masyarakat dalam pemanfaatan tanaman khususnya teh hitam.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus merupakan bakteri gram positif, tidak motil, berbentuk bulat kecil, dan sering ditemukan seperti bentuk anggur (Mandal, 2007). Bakteri ini merupakan flora normal manusia yang ada di kulit, konjungtiva mata, membran mukus saluran pernafasan atas, saluran gastrointestinal bawah, dan saluran urogenital (Lake, 2012). *S. aureus* merupakan patogen oportunistik pada manusia dan sering kali asimtomatik (Weese, 2009). Infeksi *S. aureus* dapat menyebabkan endokarditis, osteomyelitis, pneumonia, bacteremia, *toxic shock syndrome*, *scalded skin syndrome*, dan lain-lain (Plata *et al.*, 2009).

2.1.1 Taksonomi Staphylococcus aureus

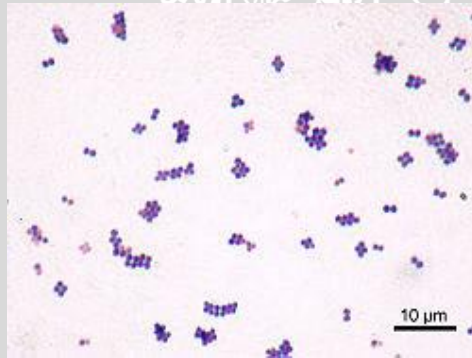
Staphylococcus dapat dikelompokkan ke dalam bakteri gram positif (Jawetz, 2005). Berikut adalah taksonomi dari bakteri *S. Aureus* :

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

2.1.2 Karakteristik *Staphylococcus aureus*

2.1.2.1 Morfologi

S. aureus adalah bakteri berbentuk bulat, bersifat gram positif, tidak bergerak, dan tidak berspora, biasanya tersusun dalam rangkaian tidak beraturan seperti buah anggur. Beberapa diantaranya tergolong flora normal pada kulit dan selaput mukosa manusia, menyebabkan penanahan, abses, berbagai infeksi piogen dan bahkan septikimia yang fatal. *S. aureus* mengandung polisakarida dan protein yang berfungsi sebagai antigen dan merupakan substansi penting didalam struktur dinding sel, tidak membentuk



spora, dan tidak membentuk flagel (Jawetz, 2005).

Gambar 2.1 Pewarnaan Gram *Staphylococcus aureus* dengan Perbesaran 1000x (Hunte, 2012)

2.1.2.2 Sifat Kultur

S. aureus merupakan bakteri fakultatif anaerob yang tumbuh optimal pada suhu 37°C dan pH 7,5 (Novick, 2000). Bakteri ini dapat tumbuh dengan baik pada media agar nutrient dengan menghasilkan pigmen berwarna keemasan sedangkan pada media darah akan terbentuk zona transparan di sekitar koloni akibat beta hemolisin (Riyono, 2011). *Mannitol Salt Agar* yang terdiri dari 1% manitol, 7,5% natrium klorida dan fenol merah sebagai indikator, *S. aureus*

memfermentasikan manitol dengan tanda munculnya zona kuning di sekitar



koloni (Amini *et al.*, 2012).

Gambar 2.2 Koloni *Staphylococcus aureus* pada Media *Blood Agar* (Berens and Armstrong, 2008)

2.1.2.3 Sifat Pertumbuhan

Bakteri bereproduksi secara aseksual, termasuk *Staphylococcus aureus*. Dengan *binary fusion*, *S.aureus* dapat terbagi menjadi dua bagian yang hampir sama besar yang seringnya tidak berpisah (Kraus and Preschel, 2008). *Staphylococcus* memfermentasikan karbohidrat dan menghasilkan asam laktat tanpa menghasilkan gas. Aktivitas proteolitik bervariasi. *Staphylococcus* relatif resisten terhadap pengeringan, panas (suhu 50°C, 30 menit) dan natrium klorida 9% tetapi mudah dihambat oleh bahan kimia seperti heksaklorofen 3% (Jawetz *et al.*, 2004)

2.1.3 Metabolit Bakterial

Staphylococcus menyebabkan infeksi dengan cara menghasilkan substansi ekstraselular. Baik toksin maupun enzim yang termasuk substansi tersebut dikontrol oleh plasmid genetik atau dapat juga dikendalikan kromosomal dan ekstrakromosomal (Jawetz *et al.*, 2004). *S. aureus* mengekspresikan

beberapa faktor virulen potensial, seperti: protein permukaan yang meningkatkan kolonisasi pada jaringan inang, invasin yang meningkatkan penyebaran bakteri di jaringan (leukosidin, kinase, hyaluronidase), faktor-faktor permukaan yang mencegah fagositosis (kapsul, Protein A), bahan-bahan biokimia yang menguatkan pertahanan dari fagosit (karotenoid, katalase), bahan-bahan imunologis (Protein A, koagulase), toksin pemecah membran yang melisiskan membran sel eukariot (hemolisin, leukotoksin, leukosidin), eksotoksin yang mampu merusak jaringan inang (SEA-G, TSST, ET), dan kemampuan resisten dari antimikroba (Todar, 2008).

2.1.4 Patogenesis

Staphylococcus aureus merupakan flora normal tubuh yang berada di kulit manusia dan termasuk infeksi oportunistik (Gordon and Lowy, 2008). *S. aureus* menjadi penyebab dari beragam penyakit, mulai infeksi kulit superfisial hingga infeksi yang serius seperti sepsis dan endokarditis bersama dengan metastase nya ke target organ (Kraus and Peschel, 2008). *S. aureus* dapat menyebabkan penyakit melalui invasi jaringan dan produksi toksin (Tolan, 2013). Produk struktural dan sekresi oleh *S.aureus* mempunyai peran penting pada pathogenesis dari infeksi (Gordon and Lowy, 2008).

Sekali *S.aureus* menempel pada jaringan inang atau materi prostetik, bakteri ini mampu tumbuh dan menetap dengan berbagai cara, salah satunya dengan cara membentuk biofilm untuk menghindari mekanisme pertahanan tubuh dan antimikroba (Donlan and Costerton, 2002). Cara lain *S. aureus* dalam menghindari fagositosis adalah dengan membentuk *antiphagocytic microcapsule* yang juga dapat menginduksi terbentuknya abses (O’Riordan and Lee, 2004). Abses ini terbentuk dari dinding fibrin yang dikelilingi oleh jaringan inflamasi yang menutupi inti abses (pus) yang mengandung bakteri dan leukosit. Fokus infeksi

inilah yang nantinya dapat menyebar secara hematogen ke bagian tubuh yang lain (Tolan, 2013). Selama infeksi, *S.aureus* juga memproduksi berbagai enzim yang mampu menginvasi dan menghancurkan jaringan inang dan metastase ke organ lain (Gordon and Lowy, 2008).

2.1.5 Patologi

Staphylococcus aureus menyebabkan berbagai infeksi supuratif pada manusia (Todar, 2008). Jenis lesi *S. aureus* adalah furunkel atau abses terutama di folikel rambut yang dapat memicu terjadinya nekrosis jaringan. Organisme dapat menyebar secara hematogen atau limfogen ke bagian tubuh lain dari fokus mana pun. Pada osteomyelitis, fokus primer *S.aureus* terdapat pada pembuluh darah terminal metafisis tulang panjang menyebabkan nekrosis tulang dan supurasi kronik (Jawetz, 2008).

S. aureus juga dapat menyebabkan infeksi yang serius seperti pneumonia, mastitis, phlebitis, meningitis, osteomyelitis, endocarditis dan infeksi saluran kencing. Selain itu bakteri ini merupakan penyebab terbanyak infeksi nosokomial di rumah sakit. *S. aureus* dapat menyebabkan keracunan makanan dengan melepaskan enterotoksin ke makanan dan *Toxic Shock Syndrome* dengan melepaskan superantigen ke aliran darah (Todar, 2008).

2.1.6 Epidemiologi

S.aureus merupakan bakteri patogen yang paling sering ditemukan pada isolat klinis pasien di rumah sakit di Amerika Serikat (Naber, 2009). Menurut SENTRY *Antimicrobial Surveillance Program* yang telah menguji lebih dari 81.000 isolat selama tahun 1997-2002 menunjukkan bahwa *S. aureus* merupakan bakteri yang paling sering menyebabkan infeksi nosokomial di Amerika Utara (prevalensi 26%), Amerika Latin (prevalensi 21,6%), dan Eropa

(prevalensi 19,5%) (Biedenbach *et al.*, 2004). Sebuah analisis retrospektif pada tahun 2000 dan 2001 oleh *Agency of Healthcare Research and Quality's Nationwide Inpatients Sample* menunjukkan bahwa pasien yang rawat inap di rumah sakit akibat infeksi *S. aureus* mempunyai rata-rata rawat inap tiga kali lebih panjang, biaya rumah sakit tiga kali lebih tinggi, dan resiko meninggal dunia di rumah sakit lima kali lebih besar (Noskin *et al.*, 2005). Kematian yang diakibatkan *Staphylococcus aureus* dengan resisten antibiotik meningkat (Rubin *et al.*, 1999).

2.1.7 Diagnosis Laboratorium

2.1.7.1 Bahan

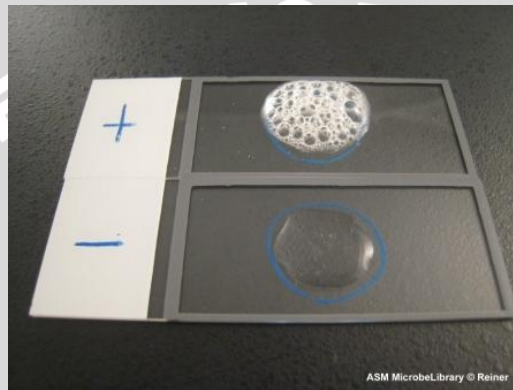
Bahan isolat *Staphylococcus aureus* berasal dari usapan permukaan, pus, darah, aspirat trakea, atau cairan serebrospinal. Pemilihan bahan untuk biakan bergantung pada lokasi proses infeksi (Jawetz *and* Levinson, 2008).

2.1.7.2 Biakan

Bahan yang dibiakkan pada cawan agar darah membentuk koloni yang spesifik dalam 18 jam pada suhu 37°C, namun biakan ini tidak dapat menghasilkan hemolisis dan pigmen sampai beberapa hari dengan suhu ruangan yang optimal (Cooper *and* Hausman, 2007). Spesifikasi yang dapat membedakan *Staphylococcus aureus* dengan spesies *Staphylococcus* yang lain adalah *S. aureus* dapat memfermentasikan manitol. Bahan yang terkontaminasi flora campuran dapat ditanam pada media yang mengandung NaCl 7,5% sebab garam mampu menginhibisi pertumbuhan flora normal kecuali *S.aureus* (Brooks *et al.*, 2007).

2.1.7.3 Tes Katalase

Enzim katalase dimiliki oleh bakteri aerob dan anaerob fakultatif. Satu molekul katalase mampu merubah jutaan molekul hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen dalam waktu beberapa detik. Produksi dan aktifitas katalase dapat dilihat dengan cara menambahkan substrat hidrogen peroksida ke kultur bakteri. Organisme yang memiliki enzim katalase mampu memecah hidrogen peroksida dan menghasilkan oksigen yang dapat dilihat dengan munculnya gelembung



udara yang mengindikasikan hasil positif pada tes katalase. Tes katalase utamanya digunakan untuk membedakan koloni *Staphylococcus* (katalase positif) dan *Streptococcus* (katalase negatif) (Pradhan, 2013).

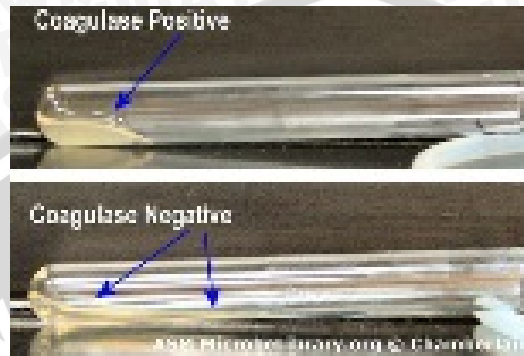
Gambar 2.3 Hasil Tes Katalase Positif dan Negatif (Chamberlain, 2009)

2.1.7.4 Tes Koagulase

Plasma kelinci atau manusia yang diberi sitrat dan diencerkan 1:5, kemudian dicampurkan dengan biakan kaldu (koloni) dan diinkubasi pada suhu 37°C. Tabung plasma yang telah dicampur dengan kaldu steril dijadikan kontrol. Dalam waktu 1-4 jam akan terbentuk bekuan yang disebut koagulase positif. *Staphylococcus* dengan hasil tes koagulase positif dianggap pathogen bagi manusia (Jawetz and Levinson, 2008).

S. aureus memproduksi koagulase yang dapat menyebabkan pembekuan plasma di dalam *tube* ataupun diatas *slide*. Tes ini berfungsi untuk

membedakan *S.aureus* dengan *staphylococcus* koagulase negatif. Kebanyakan *S.aureus* memproduksi dua tipe koagulase, yaitu *free coagulase* dan *bound coagulase*. *Free coagulase* merupakan sebuah enzim yang disekresikan ke



ekstraselular, sedangkan *bound coagulase* merupakan dinding sel yang mengandung protein. *Free coagulase* dapat dideteksi melalui *tube test* dan *bound coagulase* dideteksi pada *slide test*. Biasanya *slide test* digunakan untuk screening isolat, sedangkan *tube test* digunakan untuk mengonfirmasi hasil (Rao, 2006).

Gambar 2.4 Hasil Tes Koagulase Positif dan Negatif Menggunakan Metode Tube Test (Chamberlain, 2009)

2.1.7.5 Tes Kepekaan Antibiotik

Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mempelajari tentang pola resistensi antimikroba dari *Staphylococcus aureus* dan ditemukan bahwa organisme ini resisten terhadap antibiotik beta lactam, aminoglikosida, dan makrolida. Resistensi *Staphylococcus aureus* terhadap antibiotik dimediasi oleh plasmid yang mengandung enzim beta laktamase. Daya resistensi *Staphylococcus aureus* terbukti meningkat di berbagai rumah sakit di Amerika Serikat dari 17% menjadi 90%. Penggunaan terapi antibiotik menyebabkan strain bakteri sensitif akan terhambat pertumbuhannya, sedangkan strain bakteri resisten akan bertahan dan menyebabkan infeksi kronis (Shakibaie *et al.*, 1999)

Metode lempeng difusi oleh *Kirby and Bauer* menjadi standart pemeriksaan sensitifitas terhadap antibiotik. Alternatif pemeriksaan yang lain adalah dengan menggunakan metode *broth microdilution testing*. Jika tidak terjadi pertumbuhan koloni bakteri di sekitar antibiotik maka diambil kesimpulan bakteri tersebut sensitif terhadap antibiotik yang diberikan (Hudzicki, 2009).



Gambar 2.5 Tes Kepekaan Antibiotik dengan Metode Lempeng Difusi (Todar, 2008)

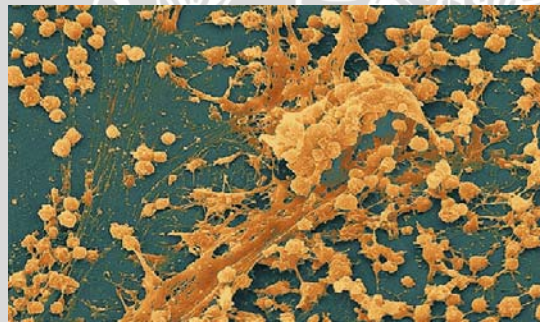
2.2 Biofilm

Biofilm dapat diartikan sebagai komunitas yang melekat pada permukaan mikroorganisme. Mikroorganisme mengalami perubahan selama transisi dari organisme plankton menjadi sel-sel yang merupakan bagian dari suatu kompleks, komunitas yang melekat di permukaan. Pendekatan molekular dan genetik belakangan ini mempelajari biofilm terdapat pada bakteri dan jamur sebagai suatu perkembangan mikroba (O'Toole *et al.*, 2000)

Biofilm terbentuk saat bakteri menempel pada permukaan yang mengandung air dan mulai mengekskresikan suatu bahan seperti lem yang mampu mengikatkan dirinya ke seluruh materi seperti logam, plastik, partikel tanah, materi implan medis, dan jaringan hewan maupun manusia (Proal, 2008). Biofilm digunakan untuk memurnikan air dengan metode penguraian senyawa berbahaya yang terkandung di dalamnya, sedangkan efek negatifnya adalah kontaminasi makanan dan peralatan medis (Ito, 2003).

2.2.1 Definisi Biofilm

Biofilm bakteri merupakan komunitas yang terstruktur dari sel bakteri yang dikelilingi oleh matriks polimer dan menempel pada permukaan yang inert atau hidup (Costerton, 1999). Bakteri dapat bergabung diatas hampir segala permukaan dan mulai membentuk matriks untuk melindungi koloni tersebut. Matriks terbuat dari polimer – bahan yang terbentuk dari molekul-molekul dengan unit struktural yang berulang dan tersambung dengan ikatan kimia. (Proal, 2008). “Film” dapat diartikan sebagai lapisan tipis, sedangkan “bio” berarti bahan alami. Dapat disimpulkan, biofilm merupakan lapisan tipis yang terdiri dari materi yang hidup. Biofilm dapat terbentuk pada permukaan abiotik seperti mineral, organisme yang mati, atau permukaan air. Biofilm juga dapat terbentuk pada



permukaan biotik seperti tumbuhan, mikroba lain, dan hewan (Karatan and Watnick, 2009).

Gambar 2.6 Bentuk biofilm *Staphylococcus aureus* pada Permukaan Jarum (Potera, 2010)

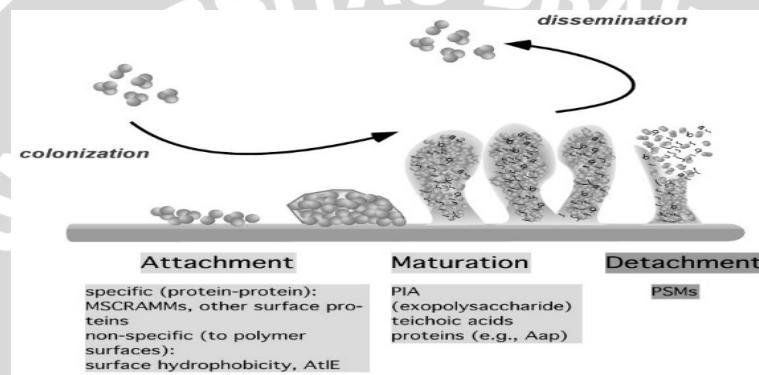
2.2.2 Struktur Biofilm

Biofilm lapisan tunggal secara umum menunjukkan kumpulan homogen dari sel-sel yang melekat di permukaan, tanpa membentuk kelompok bakteri yang nyata dan EPS (*Extracellular Polymer Substance*). Sebaliknya, biofilm lapisan banyak ditandai dengan kumpulan sel heterogen yang lebih kompleks

dan adanya EPS (Karatan *and* Watnick, 2009). Dua perbedaan struktur mikroskopik dari biofilm berlapis yaitu struktur biofilm yang padat, seragam, dan datar dan struktur multi selular seperti bentuk jamur tiga dimensi (Fredheim *et al.*, 2009).

2.2.3 Pembentukan Biofilm

Ada lima tahap pembentukan biofilm yaitu perlekatan awal, perlekatan



permanen, maturasi I, maturasi II, dan dispersi (Monroe, 2007)

Gambar 2.7 Fase Perkembangan Biofilm pada *Staphylococcus aureus* dimulai dari perlekatan, maturasi, dan pelepasan (Otto, 2008)

Deskripsi Gambar: Pembentukan Biofilm diawali proses *Attachment* yaitu perlekatan mikroba dengan permukaan dibantu beberapa protein spesifik, MSCRAMMs, dan protein non spesifik. Kemudian proses maturasi dimana mikroba membentuk lapisan *exopolysaccharide* dan diakhiri proses pelepasan.

Langkah awal pembentukan biofilm adalah *reversible attachment* dari bakteri plankton ke permukaan dengan menggunakan adhesin (Hoiby *et al.*, 2011). Pada *S.aureus* faktor protein SasC memainkan peran penting saat kolonisasi selama infeksi (Schroeder *et al.*, 2009). Proses adhesi juga dipengaruhi oleh keadaan fisiologis organisme, beberapa organisme tingkat perlekatan tinggi saat fase log sedangkan yang lain saat fase stasioner (Fletcher, 1999). Bakteri masih sensitif terhadap antibiotik pada stase ini. Langkah berikutnya pada pembentukan biofilm adalah perubahan dari perlekatan yang

reversible menjadi perlekatan yang *irreversible*, diikuti dengan replikasi bakteri yang menghasilkan pembentukan mikrokoloni setelah produksi matriks polimer di sekitar mikrokoloni dan merubahnya menjadi biofilm yang matur (Annous *et al.*, 2009).

Bentuk biofilm matur bervariasi mulai dari sel-sel lapisan homogen pipih hingga bentukan seperti jamur atau menara (Hoiby *et al.*, 2011). Maturasi ini dikontrol oleh sistem *Quorum Sensing* (Li Chen, 2011).

2.2.3.1 Perlekatan

Pada tubuh manusia, perlekatan dengan protein matriks merupakan gambaran langkah awal pembentukan biofilm. Perlekatan primer dimediasi oleh bahan-bahan permukaan sel baik kimiawi maupun fisik seperti halnya faktor spesifik yang memediasi perlekatan ke komponen matriks ekstraselular inang yang kemudian dengan cepat melapisi biomaterial segera setelah masuk ke tubuh inang. *S. aureus* mengekspresikan MSCRAMMs (*microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules*) yang mempunyai kemampuan untuk mengikat protein matriks manusia seperti fibrinogen atau fibronektin (Merino *et al.* 2009).

2.2.3.2 Dispersi

Keberadaan biofilm merupakan suatu keuntungan bagi mikroorganisme yang ada di dalamnya. Biofilm juga bertambah dari segi ukuran sehingga sel-sel yang terletak di sisi paling dalam lapisan biofilm ada kemungkinan tidak mendapatkan akses nutrisi dan terakumulasi produksi toksik, oleh karena itu, lingkungan tersebut bisa tidak kondusif lagi. Akibat hal tersebut, bakteri mampu mendeteksi dan merespon kondisi lingkungan yang tidak kondusif dengan berubah kembali menjadi bakteri plankton (Karatan *and* Watnick, 2009).

2.2.4 Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan Biofilm

Pertumbuhan biofilm dipengaruhi oleh beberapa hal seperti: nutrisi, temperatur, kondisi permukaan, kecepatan, turbulensi, hidrodinamik, pengaturan gen, dan *Quorum Sensing* (Momba and Binda, 2002). Biofilm dapat terbentuk di berbagai konsentrasi nutrisi, mulai konsentrasi tinggi sampai konsentrasi yang tidak terdeteksi (Praskash *et al.*, 2003). Namun tetap saja biofilm dapat terbentuk dengan kuat pada konsentrasi nutrisi tinggi (Allison *et al.*, 2000). Temperatur optimal pada pertumbuhan bakteri adalah 40⁰C. Perubahan suhu sekecil apapun dapat mempengaruhi pembentukan biofilm (Timothy and Hansen, 2006).

2.2.5 *Quorum Sensing Staphylococcus aureus*

Quorum sensing dapat diartikan komunikasi dalam spesies bakteri, baik sinyal kompetitif maupun kooperatif dapat terjadi antarkelompok bakteri atau antara bakteri dan inang. Sistem ini sering kali terintegrasi menjadi kompleks (jaringan transduksi sinyal berlapis) termasuk pembentukan biofilm dan lain-lain (Sifri, 2008). Perkembangan biofilm pada permukaan dimediasi oleh suatu sinyal kimia yang tergantung pada kepadatan dilepaskan oleh sel-sel bakteri yang secara padat terbungkus oleh matriks EPS (*extracellular polymeric substances*)(Xiong and Liu, 2010).

Quorum sensing dapat dibagi menjadi empat langkah: produksi molekul sinyal biokimia oleh sel bakteri, pelepasan molekul sinyal, baik aktif maupun pasif, ke sekitarnya, pengenalan molekul sinyal oleh reseptor-reseptor spesifik, dan perubahan regulasi gen. Hasil dari induksi *quorum sensing* dari ekspresi gen adalah meningkatnya sintesis protein yang terlibat dalam produksi molekul sinyal. Peningkatan sintesis dari molekul sinyal mengakibatkan siklus timbal balik positif

yang mana menyebabkan sinyal quorum sering disebut *autoinducers* (Sifri, 2008).



2.2.6 Pembentukan Biofilm pada Alat Medis

Mikroorganisme melekat ke permukaan dan memproduksi polisakarida ekstraselular secara universal yang menghasilkan terbentuknya biofilm. Biofilm merupakan masalah yang serius karena meningkatkan resistensi organisme terhadap antimikroba dan potensial untuk mengakibatkan infeksi pada pasien dengan alat medis (Donlan, 2001). Biofilm pada alat medis dapat terdiri dari bakteri gram positif, gram negatif, atau jamur. Organisme-organisme ini dapat berasal dari kulit pasien atau tenaga kesehatan, air keran yang merupakan jalan

Indwelling medical device	Organisms
Central venous catheter	Coagulase-negative staphylococci, <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Candida albicans</i>
Prosthetic heart valve	Viridans <i>Streptococcus</i> , coagulase-negative staphylococci, enterococci, <i>Staphylococcus aureus</i>
Urinary catheter	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Proteus mirabilis</i>
Artificial hip prosthesis	Coagulase-negative staphylococci, β -hemolytic streptococci, enterococci, <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Bacterioides</i> species, <i>Staphylococcus aureus</i> , viridans <i>Streptococcus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Artificial voice prosthesis	<i>Candida albicans</i> , <i>Streptococcus mitis</i> , <i>Streptococcus salivarius</i> , <i>Rothia dentocariosa</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Streptococcus sobrinus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Stomatococcus mucilaginosus</i>
Intrauterine device	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Corynebacterium</i> species, <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Micrococcus</i> species, <i>Lactobacillus plantarum</i> , group B streptococci, <i>Enterococcus</i> species, <i>Candida albicans</i>

masuk keterpaparan, atau sumber paparan lainnya (Stickler, 1996).

Gambar 2.8 Mikrorganisme terkait biofilm yang sering diisolasi dari alat medis (Donlan, 2001)

2.2.7 Resistensi Bakteri terhadap Antibiotik

Ketika bakteri tumbuh sebagai biofilm, bakteri tersebut menjadi 10-100 kali lebih resisten dibandingkan dengan bentuk bebasnya (Aaron *et al.*, 2002). Biofilm bakteri dapat menyebabkan infeksi kronik karena meningkatnya toleransi terhadap antibiotik dan bahan kimia disinfektan yang dapat menghindari fagositosis dan komponen lain yang terkait sistem pertahanan tubuh. Pertumbuhan biofilm terkait dengan meningkatnya mutasi sejalan dengan

mekanisme regulasi quorum sensing. Mekanisme resistensi konvensional seperti beta-laktamase meningkatkan mutasi pada molekul target antibiotik pada bakteri sehingga biofilm tetap bertahan (Hoiby *et al.*, 2010). Produksi EPS atau glikokaliks merupakan ciri khas dari biofilm. Salah satu fungsi matriks ini adalah mencegah terbentuknya akses antibiotik menuju sel bakteri (Mah *and* O'Toole, 2001).

2.2.8 Uji Pembentukan Biofilm

Biofilm merupakan sekelompok mikroorganisme yang dibungkus suatu lapisan eksopolimer. Biofilm sering dikaitkan dengan terjadinya berbagai infeksi yang kurang merespon antibiotik. Keberadaan biofilm pada *Staphylococcus* dapat dideteksi dengan menggunakan metode *Congo Red Agar* (CRA), metode tabung, dan metode *Tissue Culture Plate* (TCP) (Bose *et al.*, 2009).

2.2.8.1 Metode *Congo Red Agar*

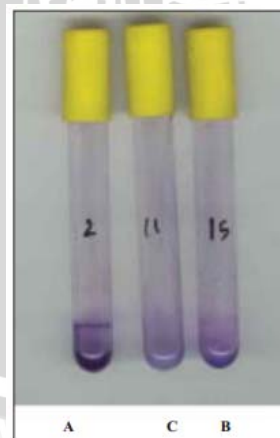
Sebuah metode alternatif untuk *screening* pembentukan biofilm oleh isolat *Staphylococcus aureus* menggunakan *Congo Red Agar*. Metode ini membutuhkan media yang solid yang terdiri dari *brain heart infusion broth* (BHI) dan ditambahkan sukrosa 5% dan *Congo red stain* (0,8 g/L). *Plate* ini kemudian diinokulasi dan diinkubasi secara aerob selama 24 sampai 48 jam pada suhu 37°C (Mathur *et al.*, 2006). Koloni berwarna hitam dengan konsistensi *dry crystalline* mengindikasikan produksi biofilm (Bose *et al.*, 2009)



Gambar 2.9 Hasil Screening Pembentukan Biofilm Positif Ditandai dengan Terbentuknya Koloni Hitam (Mathur et al., 2006)

2.2.8.2 Metode Tabung

Metode ini merupakan salah satu metode kualitatif untuk mendeteksi adanya biofilm. Organisme diinokulasi di *trypticase soy broth with glucose* (TSBglu) sebanyak 10ml di dalam tabung reaksi. Tabung tersebut diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37⁰C. Kemudian tabung dicuci dengan *phosphate buffer saline* (PBS) dengan pH 7,3 dan dikeringkan. Lalu tabung dicat dengan crystal violet (0,1%), cat sisa dicuci dengan deionized water. Tabung dikeringkan dengan posisi terbalik. Hasil positif terbentuk biofilm didapatkan jika ada garis pada



dinding dan dasar tabung (Hassan et al., 2011).

Gambar 2.10 Hasil Pembentukan Biofilm Positif Dapat Dilihat pada Tabung A (Mathur et al., 2006)

2.2.8.3 Metode *Tissue Culture Plate*

Metode ini merupakan suatu metode kuantitatif yang dianggap sebagai *gold-standard* pada deteksi biofilm. Organisme diisolasi dan diinokulasi pada TSBglu 10 ml. kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Kultur diencerkan 1:100 dengan media segar. Kemudian kultur yang sudah diencerkan, diambil sebanyak 200 µL dan dimasukkan ke dalam *sterile 96 well-flat bottom polystyrene tissue culture. Plates* diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah inkubasi, konten dipindahkan dengan *tapping* halus. *Wells* dicuci dengan 0,2 mL PBS (pH 7,2) sebanyak empat kali untuk memindahkan bakteri bebas. Biofilm yang terbentuk dengan perlekatan bakteri ke *wells* difiksasi menggunakan larutan *sodium acetate 2%* dan dicat dengan *crystal violet 0,1%*. Kelebihan cat dibersihkan menggunakan *deionized water* dan dikeringkan. *Optical Density* dari biofilm yang tercatat dianalisa menggunakan *micro ELISA autoreader* dengan panjang gelombang 570 nm (Hassan *et al.*, 2011).

2.3 Teh Hitam

2.3.1 Klasifikasi Teh

Teh dapat dikelompokkan menjadi tiga jenis berdasarkan pengolahannya yaitu: teh hijau (tanpa fermentasi), teh oolong (difermentasi sebagian), dan teh hitam (fermentasi sepenuhnya). Pengolahan teh yang berbeda inilah yang menyebabkan perbedaan kandungan katekin (Alamsyah, 2006).

2.3.1.1 Teh Hijau

Diantara jenis teh yang lain, teh hijau merupakan jenis yang banyak diteliti dalam bidang kesehatan manusia (Cabrera *et al.*, 2006). Teh hijau

pertama diekspor dari India ke Jepang pada abad ke-17. Saat ini diperkirakan sekitar 2,5 juta ton daun teh diproduksi tiap tahun di seluruh dunia dan 20% diproduksi sebagai teh hijau. Untuk memproduksi teh hijau, daun yang dipetik segar segera diuapi untuk mencegah fermentasi dan menghasilkan produk yang kering dan stabil. Proses penguapan ini bertujuan untuk menghancurkan enzim yang mampu memecah pigmen warna pada daun dan mempertahankan warna hijau dari daun teh selama proses penggulungan dan pengeringan. Proses-proses ini mempertahankan polifenol alami yang berguna untuk kesehatan (Chacko *et al.*, 2010).

2.3.1.2 Teh Oolong

Teh oolong didefinisikan sebagai teh dengan level oksidasi enzim tingkat sedang selama proses pengolahannya. Teh oolong memperlihatkan aktifitas antimutagenik yang lebih kuat dibandingkan teh hijau atau teh hitam. Bagaimanapun, katekin bukan zat yang diunggulkan dalam teh oolong dalam fungsinya sebagai antigenotoksis (Su *et al.*, 2007).

2.3.1.3 Teh Hitam

Teh hitam termasuk salah satu jenis teh yang difermentasi secara sempurna sehingga menghasilkan warna yang hitam (Wan *et al.*, 2009). Sekitar 80% daun teh dari seluruh dunia diproduksi menjadi teh oolong dan teh hitam. Banyak sekali tipe teh hitam, sebagian besar diberi nama sesuai daerah asal. Assamica adalah salah satunya. Tipe teh ini berasal dari India dan menimbulkan aroma yang kuat. Bila pada teh hijau kandungan katekin mencapai 90% dan pada teh hitam hanya sekitar 15%, namun teh hitam masih merupakan sumber polifenol yang berharga. Sebagian besar polifenolnya merupakan *oxytheotannins* yang dapat ditemukan dalam bentuk *theaflavins* dan *thearubigins*. Satu cangkir

teh hitam rata-rata mengandung kurang lebih 260 mg polifenol dan sebanyak 220 mg dari polifenol tersebut merupakan *theaflavins* dan *thearubigins* (Skotnicka *et al.*, 2011). Secara umum, kandungan *theaflavin* pada teh hitam berkontribusi terhadap rasa menyegarkan dan menenangkan pada teh hitam, sedangkan *thearubigin* berkontribusi terhadap kekuatan dan warna teh itu sendiri (Heiss, 2007).

2.3.2 Morfologi Teh

Tanaman teh berbentuk seperti pohon yang memiliki ujung ranting dan daun uda yang halus. Tanaman ini tumbuh pada ketinggian 200 hingga 2.300 meter di atas permukaan laut (Alamsyah, 2006). Daun teh berbentuk elips panjang, tunggal, pangkal runcing, dan bergerigi dengan ukuran 6-18 cm x 2-6 cm (Khairunisa, 2011).

Teh memiliki bunga berkelopak 5-6 buah. Mahkota daun dilekati oleh benang sari dalam bentuk melingkar. Biji teh sendiri mengandung minyak dan



saponin (Khairunisa, 2011).

Gambar 2.11 Tanaman Teh (*Camellia sinensis* var. *Assamica*) (Eliya, 2006)

2.3.3 Taksonomi Teh Hitam

Tanaman teh merupakan tanaman subtropics yang dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

Divisi	: <i>Spermatophyta</i>
Sub divisi	: <i>Angiospermae</i>
Kelas	: <i>Dicotyledoneae</i>
Sub kelas	: <i>Dialypetalae</i>
Ordo	: <i>Guttiferales (Clusiales)</i>
Famili	: <i>Camelliaceae (Theaceae)</i>
Genus	: <i>Camellia</i>
Species	: <i>Camellia sinensis</i> (Tuminah, 2004)

2.3.4 Kandungan Kimia

Daun teh yang merupakan bahan utama pembuatan semua jenis teh mengandung beberapa komponen yaitu: bahan anorganik (Al, Mn, P, Ca, Mg, Fe, Se, Cu, dan K), senyawa yang mengandung nitrogen (protein, alkaloid, kafein, dan asam amino), karbohidrat, polifenol (katekin, tanin, *theaflavin*, *thearubigin*), pigmen (klorofil, anthosianin, dan flavon), enzim (polifenol oksidase, peroksidase, dan pectinase), dan vitamin (C dan E). Proses pengolahan yang berbeda dalam hal ini fermentasi mengakibatkan perbedaan komponen yang terkandung pada masing-masing jenis teh. Komponen bioaktif yang terkandung dalam teh sendiri terdiri dari flavonoid yang sebagian besar merupakan katekin, alkaloid, saponin, asam organic, dan pigmen. Alkaloid yang ada pada teh seperti

Compound	Green tea ($\mu\text{g/ml}$)	Black tea ($\mu\text{g/ml}$)
catechin (C)	21	20
(-)-epicatechin (EC)	98	37
(-)-epicatechin-3-gallate (ECG)	90	73
(-)-epigallocatechin (EGC)	411	42
(-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG)	444	128
Total catechins	1064	300
theaflavin (TF1)	0	22
theaflavin-3-gallate (TF2a)	0	20

kafein, *theobromin*, dan *theofilin* besarnya sekitar 3-4% (Wong *et al.*, 2009).

Gambar 2.12 Perbedaan Kandungan Kimia yang Terdapat pada Teh Hijau Dan Teh Hitam (Skotnicka, 2011)

2.3.5 Komponen Bioaktif

Polifenol yang ada pada tanaman biasanya berupa asam fenolat, flavonoid, dan tanin (Astawan, 2008). Flavonoid juga terbagi dalam enam kelompok yaitu flavonol, flavon, flavanol, isoflavon, flavanon, dan anthosianin (Cadensas *and* Parker, 2002). Pada teh, jenis flavonoid yang banyak dijumpai adalah flavanol dan flavonol. Flavonoid yang terkandung dalam teh berupa katekin. Katekin sendiri merupakan kelompok flavanol. Katekin pada teh didominasi oleh *epicatechin* (EC), *epicatechin gallate* (ECG), *epigallocatechin* (EGC), dan *epigallocatechin gallate* (EGCG) (Hartoyo, 2003).

Katekin mudah terurai bila terkena oksigen, cahaya, atau panas (Chen *et al.*, 2001). Flavonol yang merupakan salah satu jenis flavonoid juga terkandung dalam teh dengan total lebih sedikit dibandingkan flavanol. Flavonol tidak terpengaruh oleh enzim polifenol oksidase (Miean *and* Mohamed, 2001).

Tannin termasuk golongan fenol yang mampu larut dalam air dan dapat mengikat alkaloid, protein, dan gelatin (Adisewodjo, 1964). Berdasarkan sifat kimianya, tannin dapat dikelompokkan menjadi dua yaitu tannin terkondensasi dan tannin terhidrolisis. Tannin terkondensasi adalah hasil dari kondensasi flavonol, sedangkan tannin terhidrolisis dapat membentuk asam galat, asam elegat, dan lain-lain (Hagerman, 2002). Jika tannin dilarutkan dalam air akan membentuk koloid dan saat airnya diuapkan residu yang terkumpul berupa bubuk merah kecokelatan (Hedqvist, 2004).

2.3.6 Khasiat Teh Hitam

2.3.6.1 Teh Hitam sebagai Penghambat Aterosklerosis

Teh hitam adalah salah satu penghasil flavonoid dan senyawa fenol lain yang memiliki manfaat sebagai antioksidan. Ekstrak teh hitam mampu mencegah oksidasi lipoprotein secara *in vivo* (Hodgson, 1999). Teh hitam juga mampu meningkatkan produksi Nitrooksida dan vasodilatasi sehingga menstimulasi aktivitas *endothelial-nitrite oxide synthase* (eNOS), fosforilasi sel endotel, dan vasorelaksasi (Jochmann et al., 2008). *Theaflavin*, *thearubigin*, dan EGCG menrangsang eNOS pada endotel untuk memproduksi NO. *Thearubigin* menstimulasi vasodilatasi dan produksi NO dengan kuat dan efisien (Lorenz et al., 2009)

2.3.6.2 Teh Hitam sebagai Antibakteri

Katekin bermanfaat sebagai antibakteri karena memiliki gugus *pyrogallol* dan *galloil*. Racun dapat dihambat oleh struktur tersier gugus *catechol* dengan *galloil*. Selain itu pertumbuhan flora usus besar juga dapat dihambat dengan meningkatkan keasaman dalam tubuh (Alamsyah, 2006)

2.3.6.3 Teh sebagai Perawatan Gigi

Teh memiliki kandungan fluoride yang berguna untuk memecah karang gigi dan menjaga kesehatan mulut. Teh mampu menginhibisi virus dalam rongga mulut dan bakteri pathogen yang dapat menimbulkan sakit pada gusi dan pembentukan karang gigi. Fluorida berfungsi juga sebagai penguat email gigi dan mencegah kerusakan gigi (Wiria, 2010).

2.3.6.4 Teh sebagai Stimulator Neurologi

Tanin yang terdapat dalam teh hitam mampu menurunkan neurotransmitter serotonin, akibatnya terjadinya penurunan tekanan darah. Serotonin juga mempengaruhi mental dan emosi. Selain itu dopamin dapat memberikan perasaan senang dan memperbaiki suasana hati sehingga dapat menghilangkan stress, Gabungan dopamine dan serotonin sangat berkorelasi dengan daya ingat, oleh karena itu konsumsi teh dapat meningkatkan daya ingat (Amiruddin, 2013)

2.3.7 Senyawa Penghambat Biofilm

2.3.7.1 Tanin

Tanin sebagai antibakteri akan mengganggu sintesis peptidoglikan sehingga dinding sel terbentuk tidak sempurna. Akibatnya sel bakteri akan lisis akibat tekanan osmotik ataupun fisik. Tanin juga mampu menginaktivasi adhesin pada bakteri yang digunakan untuk menempelkan dirinya pada inang yang ada pada permukaan sel (Naim, 2004). Jika tanin mampu mengikat protein sehingga tercipta ikatan hidrogen maka protein akan terendapkan dan terjadi denaturasi protein. Apabila denaturasi protein bakteri terjadi, enzim-enzim yang ada pada bakteri menjadi tidak aktif sehingga metabolisme bakteri terhambat yang memicu terjadinya kerusakan sel (Hagerman *et al.*, 1998). Akhirnya, tanin mampu menghambat pembentukan biofilm dengan merusak membran bakteri dan menghambat pembentukan matriks, menghasilkan kondisi bakteristatik (Trentin *et al.*, 2013)

2.3.7.2 Katekin

Katekin terbukti dapat menon-aktifkan protein dan mengacaukan bilayer lipid bakteri dengan mengubah morfologi membran (Ikigai *et al.*, 1993). Katekin memainkan peran penting dalam berbagai proses yang terkait dengan siklus sel seperti sinyal dan siklus sel, metabolisme asam arakidonat, apoptosis dan pemisahan sel. Katekin mampu menghambat pertumbuhan sel kanker (Saadat *et al.*, 2012)

2.3.7.3 Saponin

Pembentukan biofilm dapat diganggu dengan produk alami, salah satunya adalah saponin yang menyebabkan sel lebih rentan terhadap tegangan osmotik (Coleman *et al.*, 2010). Saponin merupakan fitokimia aktif yang berpengaruh ke berbagai organisme (Bernards *et al.*, 2011).

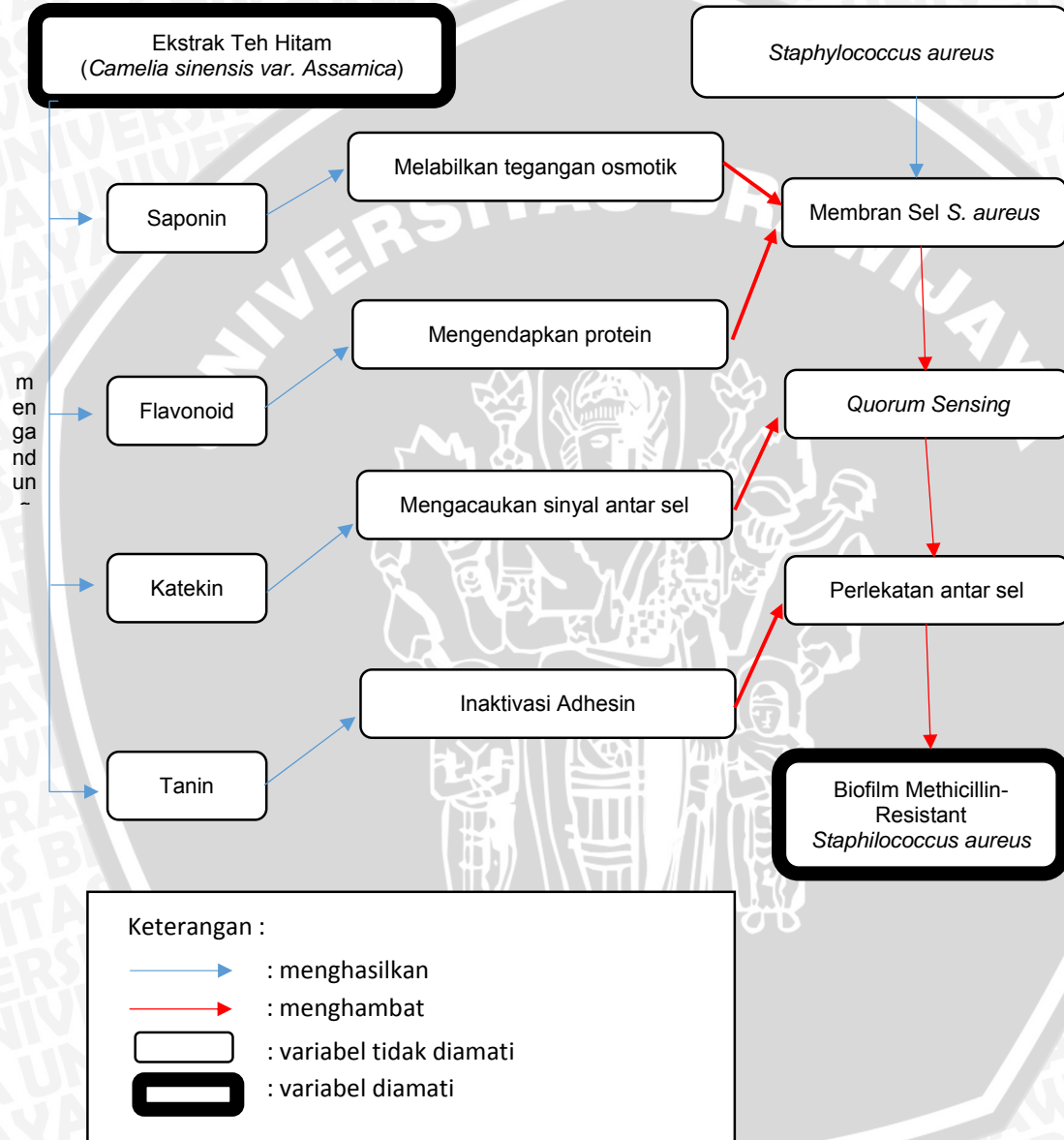
2.3.7.4 Flavonoid

Struktur hidroksil yang terdapat pada flavonoid dan kompleks besarnya seperti tannin, mengendapkan protein melalui pembentukan ion, hidrofilik dan ikatan hidrogen dengan sekelompok protein. Hal ini menjelaskan mengapa pembentukan epitel atau endotel dengan lesi biofilm mampu diperkuat secara struktur (Bishop and Hamilton, 2009).

BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep

Katekin yang terdapat pada teh, khususnya EGCG, mampu menghambat perlekatan sel melalui aktivasi enzim GTF sehingga mengganggu pembentukan biofilm (Xu *et al.*, 2011). Agen antimikroba yang mampu menghancurkan biofilm akan sangat membantu dalam pencegahan penyebaran infeksi. Katekin dapat dipertimbangkan menjadi agen penghancur biofilm karena perannya yang besar pada siklus sel, metabolisme asam arakidonat, dan apoptosis sel (Saadat *et al.*, 2012). Tanin mampu menghambat pembentukan biofilm yang disebabkan *Staphylococcus* dengan cara menghambat *quorum sensing* bakteri yang dapat mengurangi virulensinya (Cobrado *et al.*, 2012). Efek antimikroba oleh tannin yang lain dikaitkan dengan kemampuan menginaktivasi adhesin mikroba, enzim, protein transport sel, dan lain-lain. Flavonoid mampu membentuk kompleks dengan protein ekstraselular dan terlarut, juga membentuk kompleks dengan dinding sel bakteri itu sendiri, kemudian mengacaukan membran mikroba (Cowan, 1999). Saponin mampu menurunkan kemampuan sel mempertahankan biofilm dan menghancurkan membran sel, akibatnya biofilm terlepas (Crespo *et al.*, 2008)

3.2 Hipotesis Penelitian

Ekstrak Teh Hitam (*Camellia sinensis* var. *Assamica*) sebagai penghambat pembentukan biofilm Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian dilakukan dengan rancangan *true experimental* untuk mengetahui pengaruh ekstrak teh hitam (*Camellia sinensis* var. *Assamica*) terhadap pembentukan biofilm pada bakteri *Staphylococcus aureus*. Desain penelitian ini adalah *post-test only control group design* dengan menggunakan metode *tube-test*.

Kelompok kontrol adalah kelompok yang tidak mendapat pemberian ekstrak teh hitam. Kelompok perlakuan adalah kelompok yang mendapat perlakuan berupa pemberian ekstrak dengan dosis 1,625%, 2,125%, 2,625%, 3,125%, 3,625%, 4,125%, dan 4,625%. Hal ini didasarkan pada uji eksplorasi yang dilakukan sebelumnya yang menunjukkan bahwa ekstrak teh hitam dapat menghambat pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi 3,125%.

4.2 Populasi dan Sampel

Penelitian ini menggunakan sampel *Staphylococcus aureus* pembentuk biofilm. Sampel ini diperoleh dari isolat *Staphylococcus aureus* swab tenggorok pembentuk biofilm yang dimiliki Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Jumlah pengulangan penelitian dihitung dengan rumus sebagai berikut (Notobroto, 2005):

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

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

$$7n-7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 3,1$$

Keterangan:

n = jumlah pengulangan

p = jumlah perlakuan (dosis ekstrak teh hitam): 0% (kontrol), 1,625%, 2,125%, 2,625%, 3,125%, 3,625%, 4,125%, dan 4,625% = 8 perlakuan dipilih berdasarkan hasil uji eksplorasi yang dilakukan sebelumnya.

Berdasarkan hasil penghitungan menggunakan rumus tersebut, minimal harus dilakukan 4 kali pengulangan pada penelitian ini.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variable bebas penelitian adalah konsentrasi ekstrak teh hitam. Dalam penelitian ini digunakan konsentrasi 1,625%, 2,125%, 2,625%, 3,125%, 3,625%, 4,125%, dan 4,625%.

4.3.2 Variabel Tergantung

Variable tergantung pada penelitian ini adalah pembentukan biofilm oleh *Staphylococcus aureus* yang diukur dengan metode *tube-test*.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan mulai bulan Agustus 2014 sampai dengan bulan September 2014 di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembuatan ekstrak teh hitam dilakukan di Politeknik Negeri Malang.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Teh Hitam

1. Teh hitam (*Camelia sinensis var. Assamica*)
2. Kertas saring
3. Timbangan analitik
4. Sokhlet
5. Gelas kimia 250 ml
6. Cawan petri
7. Spatula
8. Desikator
9. Penjepit cawan petri
10. Timble
11. Pelarut etanol 96%
12. Pemanas aquades
13. Oven

4.5.2 Alat dan Bahan Identifikasi Bakteri

1. Isolat *Staphylococcus aureus*
2. NAP (*Nutrient Agar Plate*)
- 3.

4.5.3 Alat dan Bahan Deteksi Biofilm

1. Trypticase Soy Broth dengan 1% glukosa (TSBglu)
2. Biakan *Staphylococcus aureus* pembentuk biofilm
3. Tabung reaksi
4. Kristal Violet
5. *Phosphate Buffer Saline* (PBS) pH 7,3

6. Deionized water
7. Ose
8. Pipet
9. Beaker Glass
10. Inkubator

4.6 Definisi Operasional

1. *Staphylococcus aureus* adalah bakteri kokus Gram positif dengan hasil tes katalase positif, dan tes koagulase positif, dan membentuk koloni berwarna kuning emas pada medium *Nutrient Agar Plate* (Dezfulian *et al.*, 2010). Penelitian kali ini menggunakan *Staphylococcus aureus* pembentuk biofilm yang diidentifikasi menggunakan metode *tube-test*. Bakteri *Staphylococcus aureus* didapatkan dari swab tenggorok di Laboratorium Mikrobiologi FKUB.
2. Biofilm merupakan matriks polimer yang menyelimuti sel bakteri dan menempel pada permukaan yang inert atau hidup. Biofilm pada penelitian ini dihasilkan oleh *Staphylococcus aureus* yang dapat dilihat pada dinding medium tabung.
3. Ekstrak teh hitam adalah hasil ekstraksi cair teh hitam dengan pelarut etanol. Ekstrak yang didapat dianggap memiliki kandungan ekstrak sebesar 100%. Teh hitam berasal dari Teh hitam kemasan “Bless Tea” yang dibeli di distributor Surabaya.
4. Metode tabung merupakan metode standart kualitatif uji biofilm pada bakteri *Staphylococcus aureus* dengan menggunakan media tabung.
5. *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC) adalah konsentrasi paling kecil dari ekstrak teh hitam yang dapat menghambat pertumbuhan biofilm *Staphylococcus aureus* yang ditandai dengan menipisnya cincin biru pada dinding tabung

6. *Mean Gray Value* adalah rata-rata intensitas warna pada program Adobe Photoshop CS3 yang memiliki *range* 0-255. Semakin kecil angka menunjukkan semakin pekat warna yang dinilai.

4.7 **Prosedur Penelitian**

4.7.1 **Persiapan Teh Hitam**

4.7.1.1 **Ekstraksi Metode Soxhlet**

- Teh hitam kemasan “Bless Tea” yang siap pakai ditimbang sebanyak 100 gram dengan timbangan analitik kemudian ditempatkan pada gelas kimia 250 ml.
- Pelarut yang digunakan adalah etanol 96%.
- Timble yang sudah berisi bahan teh hitam dimasukkan ke dalam ekstraktor soxhlet.
- Soxhlet disambungkan dengan labu yang berisi batu didih dan ditempatkan pada pemanas air dan kondensor
- Alat pendingin juga disambungkan dengan Soxhlet, air pendingin dijalankan, pemanas mulai dinyalakan.
- Proses ekstraksi dilakukan selama 5 jam sampai senyawa terlarut benar-benar terpisah dari pelarutnya.
- Pelarut dipisahkan dari ekstrak dengan cara melepas timble dan dilanjutkan dengan proses destilasi dengan cara yang sama dengan ekstraksi Soxhlet sehingga ekstrak yang diperoleh menjadi lebih pekat.
- Ekstrak yang diperoleh dipindahkan ke dalam botol timbang (dapat menggunakan cawan petri atau *beaker glass*).

- Pelarut yang mungkin masih tersisa dihilangkan dengan cara memasukkan ke dalam oven pada suhu 70-80°C hingga diperoleh bobot yang konstan.
- Kadar ekstrak yang diperoleh kemudian dihitung.

4.7.2 **Persiapan Biofilm *Staphylococcus aureus***

4.7.2.1 **Identifikasi Bakteri *Staphylococcus aureus***

A. Pemeriksaan Mikroskopis

- Gelas objek yang akan digunakan dibersihkan dulu menggunakan kapas kemudian disterilkan dengan cara dilewatkan beberapa kali diatas api lalu didinginkan.
- Satu tetes aquades steril diteteskan di atas gelas objek kemudian disuspensikan dengan biakan kuman yang diambil menggunakan ose. Apabila biakan berupa biakan cair, tidak perlu disuspensikan terlebih dahulu dengan aquades.
- Sediaan dibiarkan mengering kemudian difiksasi dengan cara dilewatkan kembali diatas api.
- Kristal violet dituangkan ke atas gelas objek kemudian ditunggu selama 1 menit, lalu dibilas dengan air bersih
- Lugol diteteskan ke atas gelas objek kemudian ditunggu selama 1 menit, lalu dibilas dengan air bersih
- Alkohol 96% dituangkan ke atas gelas objek, ditunggu selama 5-10 detik atau sampai cat luntur, kemudian dibilas dengan air
- Safranin diteteskan ke atas gelas objek kemudian ditunggu selama 30 detik, kemudian dibilas dengan air.

- Sediaan dikeringkan dengan kertas kemudian diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x. (Gyure, 2010)

B. Tes Katalase

- Gelas objek yang akan digunakan disterilkan terlebih dahulu, dengan menggunakan kapas dan dilewatkan diatas api
- Suspensi bakteri yang akan diuji diletakkan diatas gelas objek
- Larutan H₂O₂ 3% diteteskan ke suspense bakteri kemudian dicampurkan kemudian ditunggu selama 5-10 detik.
- Hasil tes katalase positif apabila dihasilkan gelembung oksigen pada sediaan
- Hasil tes katalase negative apabila tidak didapatkan gelembung
- Tes katalase digunakan untuk membedakan bakteri kokus gram positif : tes katalase positif menunjukkan bakteri *Staphylococcus*, sedangkan tes katalase negatif menunjukkan bakteri *Streptococcus* atau *Enterococcus* (Reiner, 2010).

C. Tes Koagulase

- Plasma kelinci atau manusia dicampurkan dengan sitrat kemudian diencerkan dengan perbandingan 1:5
- Tabung steril disiapkan sebanyak dua buah. Satu tabung diberi perlakuan dan satu tabung sebagai kontrol
- Masing-masing tabung diberi 2 cc plasma yang telah diencerkan
- Tabung perlakuan diberi biakan koloni *Staphylococcus aureus* sedangkan

tabung kontrol diberi kaldu steril.

- Kedua tabung diinkubasi pada suhu 37°C dan dibiarkan 1-4 jam
- Hasil tes koagulase positif apabila ditemukan endapan pada dasar tabung.

D. **Pembiakan pada *Mannitol Salt Agar***

- Bakteri yang telah dibiakkan pada NAP diambil dan dihapus pada medium *Mannitol Salt Agar* yang sudah disiapkan.
- *Staphylococcus* kebanyakan tidak menfermentasikan manitol sehingga bakteri yang tumbuh tidak menyebabkan perubahan warna pada medium. *Staphylococcus aureus* memfermentasikan manitol sehingga tampak koloni berwarna kuning cerah.

4.7.2.2 **Perbenihan Cair Bakteri *Staphylococcus aureus***

Bakteri *Staphylococcus aureus* yang sudah ditanam pada medium NAP dikultur pada medium Nutrient Broth (NB) selama 24 jam pada suhu 37°C. Bakteri yang sudah dikultur kemudian dilakukan pengukuran kepadatan bakteri dengan spektrofotometri menggunakan panjang gelombang (λ) 610 nm dengan kepadatan bakteri yang diharapkan sebanyak 10^8 bakteri/ml. Pengenceran dilakukan dengan menggunakan rumus $V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$ kemudian kepadatan bakteri dicampur dengan TSBglu.

Rumus : $V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$

$$V_1 \times 1,521 = 30 \times 0,1$$

$$V_1 = 1,97$$

Keterangan :

V1 : jumlah suspense bakteri yang diambil (mL)

N1 : *Optical Density* (OD) bakteri hasil spektrofotometri (bakteri/mL)

V2 : Volume keseluruhan dalam satu tabung (mL)

N2 : OD bakteri dengan kepadatan 10^8 bakteri/mL

Suspensi bakteri akan diambil sebanyak 1,97 mL dan ditambahkan 28,3 mL TSBglu menjadi suspensi bakteri dengan kepadatan 10^8 bakteri/mL.

4.7.2.3 Uji Pembentukan Biofilm

Staphylococcus aureus yang sudah diidentifikasi sebelumnya, ditanam pada *Nutrient Broth* dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 38°C . Kultur ini kemudian ditanam pada *Nutrient Agar Plate* dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 38°C . *Trypticase Soy Broth* sebanyak 2 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril dan diinokulasikan dengan 1 loop ose bakteri yang berasal dari kultur NAP kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 38°C . Tabung yang telah diinkubasi dicuci dengan PBS (pH 7,3) dan dikeringkan pada suhu ruangan. Tabung tersebut kemudian dicat dengan Kristal violet. Cat yang berlebih dibuang dan dicuci dengan aquades. Tabung dikeringkan dan dilihat pembentukan biofilmnya (Taj *et al.*, 2012)

4.7.3 Uji Hambat Pembentukan Biofilm

- Delapan buah tabung steril disiapkan untuk penelitian kali ini dan diberi label. Masing-masing tabung akan diberi konsentrasi ekstrak yang berbeda, yaitu : 0%, 1,625%, 2,125%, 2,625%, 3,125%, 3,625%, 4,125%, dan 4,625%.
- Bakteri yang sudah dikultur sebelumnya disiapkan dengan kepadatan bakteri 1×10^8 bakteri/mL.

- Suspensi bakteri dengan TSBglu disiapkan berdasarkan perhitungan OD hasil spektrofotometri di dalam falcon.
- Tujuh tabung diisi dengan 2mL suspensi bakteri sedangkan tabung kontrol (0%) diisi dengan 4 mL suspense bakteri.
- Selanjutnya tujuh tabung yang berisi 2 mL suspense bakteri diberikan larutan ekstrak teh hitam sesuai konsentrasi yang ditentukan berdasarkan rumus : $V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$

Keterangan :

V1 : volume ekstrak teh hitam yang harus diberikan (mL)

N1 : Konsentrasi awal ekstrak teh hitam (%)

V2 : Volume keseluruhan ekstrak teh hitam (mL)

N2 : Konsentrasi yang diinginkan (%)

Tabel 4.1 Pengukuran Jumlah Ekstrak Teh Hitam dan Aquades

Konsentrasi (%)	Ekstrak Teh Hitam (mL)	Aquades (mL)
1,625	0,0325	1,9675
2,125	0,0425	1,9575
2,625	0,0525	1,9475
3,125	0,0625	1,9375
3,625	0,0725	1,9275
4,125	0,0825	1,9175
4,625	0,0925	1,9075

- Tabung tersebut kemudian diinkubasi dalam incubator selama 24 jam pada suhu 37°C.
- Kemudian tabung-tabung tersebut dikeluarkan dari incubator, dicuci dengan PBS (pH 7,3) lalu dikeringkan.

- Tabung-tabung yang sudah kering, dicat dengan Kristal violet (0,1%) sebanyak 5 mL lalu didiamkan selama 15 menit, kelebihan cat dibuang dan dibilas dengan *deionized water*.
- Tabung yang sudah dicat kemudian dikeringkan dan diamati pembentukan biofilmnya.

4.7.4 Pengukuran Mean Gray Value

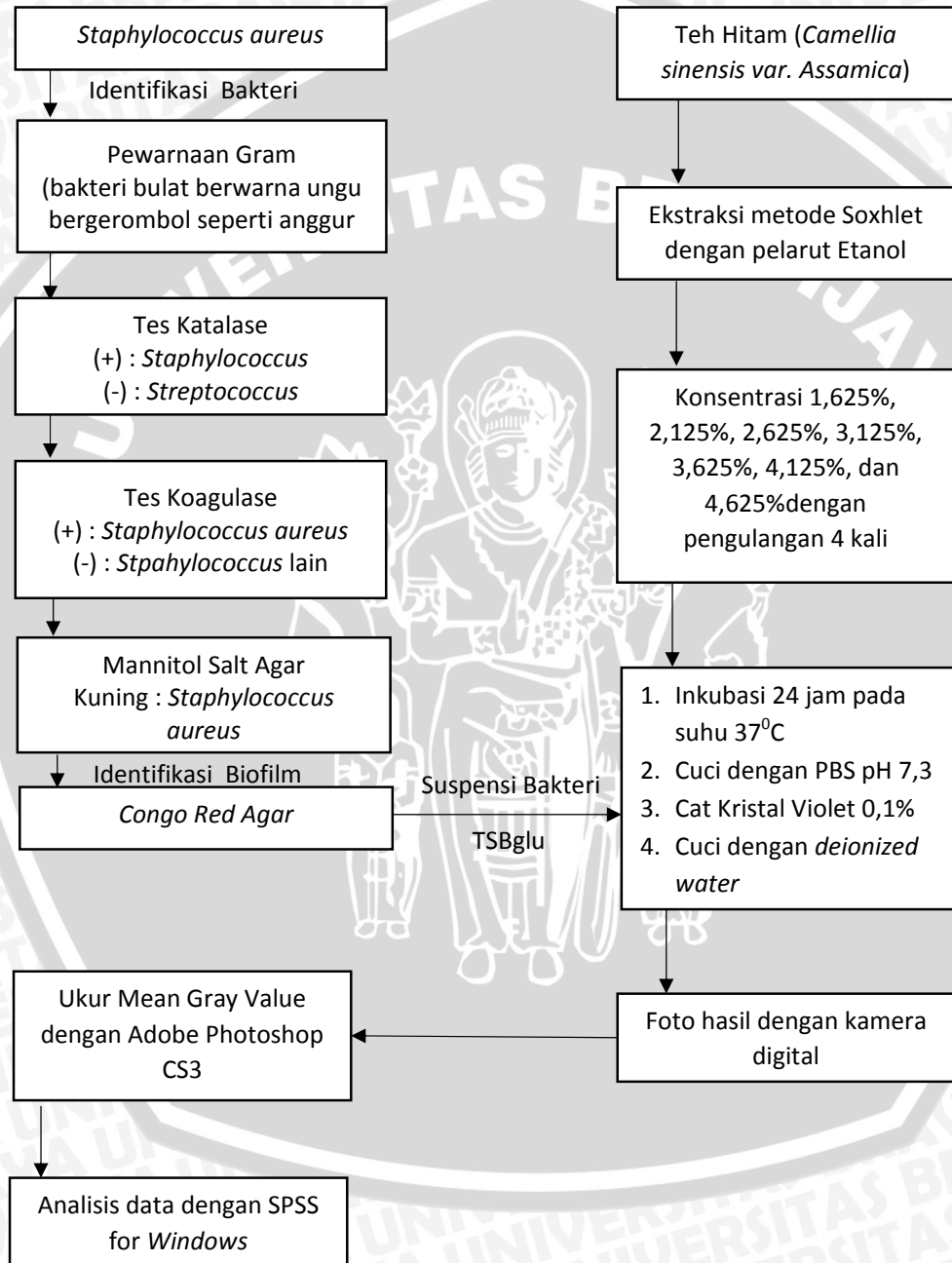
Hasil pembentukan biofilm pada tabung difoto dengan menggunakan kamera digital. Untuk mengetahui intensitas warna pada area cincin dan dinding tabung pada masing-masing kelompok digunakan program aplikasi *Adobe Photoshop CS3*. Langkah-langkahnya adalah dengan membuka *Photoshop CS3*, pilih *File* dan masukkan hasil fotonya. Selanjutnya pilih *tab Window* dan pilih *Measurement Log*, blok area yang akan dilihat intensitas warnanya dengan menggunakan *Rectangular Marquee Tool*, lalu klik *Record Measurements* maka akan didapatkan nilai *Mean Gray Value* yang merupakan rerata dari intensitas warna pengecatan tabung.

4.8 Analisis Data

Analisis data yang digunakan adalah Uji *One Way ANOVA* dan Uji Korelasi Pearson. Uji *One Way ANOVA* dengan derajat kepercayaan 95 % ($\alpha = 0,05$) digunakan untuk mengetahui adanya perbedaan pengaruh antara berbagai konsentrasi ekstrak rimpang jahe merah terhadap intensitas warna yang ditimbulkan oleh biofilm pada tabung (*Mean Gray Value*). Sedangkan Uji Korelasi Pearson digunakan untuk mengetahui hubungan antara masing-masing konsentrasi ekstrak teh hitam terhadap intensitas warna biofilm pada tabung

(Mean Gray Value). Analisis data menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) versi 17.0.

4.9 Rancangan Operasional Penelitian



BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian

5.1.1 Hasil Ekstraksi Teh Hitam (*Camelia sinensis var. Assamica*)

Teh Hitam yang digunakan pada penelitian ini merupakan teh hitam kemasan "Bless Tea" yang berupa bubuk dan dalam kemasan kedap udara. Teh hitam kemudian dilarutkan pada pelarut etanol 96% dan diekstraksi



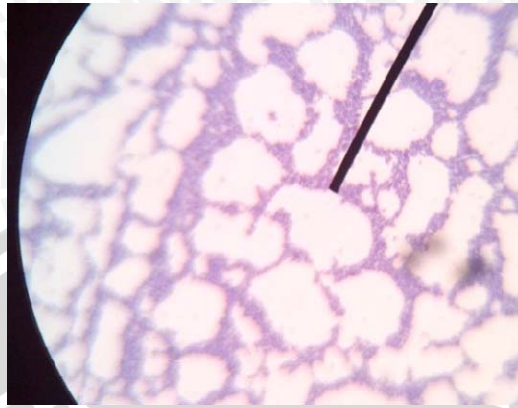
menggunakan rangkaian alat Soxhlet hingga didapatkan ekstrak murni yang berbentuk cair.

Gambar 5.1 Hasil Ekstraksi Teh Hitam dalam Bentuk Cair

5.1.2 Hasil Identifikasi Bakteri

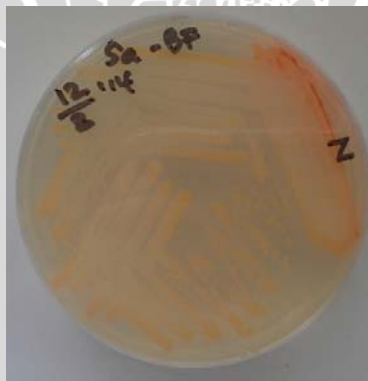
Pemeriksaan mikroskopis dengan pewarnaan gram dan perbesaran 1000x pada mikroskop ditunjukkan dengan adanya bentukan kokus bergerombol seperti buah anggur berwarna biru keunguan. Tes katalase dilakukan untuk membedakan strain *Staphylococcus* dan *Streptococcus* menunjukkan adanya

gelembung udara. Bakteri yang ditanam pada medium *Mannitol Salt Agar*



menunjukkan pertumbuhan koloni bakteri berwarna kuning terang. Dari uji-uji yang dilakukan diatas dapat disimpulkan bahwa isolat yang diuji adalah *Staphylococcus aureus*.

Gambar 5.2 Gambaran bakteri *Staphylococcus aureus*, Berwarna Ungu, Bulat, dan Bergerombol pada Pengamatan Gram dan Perbesaran Mikroskop 1000x



Gambar 5.3 Koloni *Staphylococcus Aureus* Pada Media Mannitol Salt Agar Menunjukkan Koloni Berwarna Kuning Cerah

5.1.3 Hasil Uji Hambat Pembentukan Biofilm

Uji hambat pembentukan biofilm didahului dengan uji pembentukan biofilm pada isolat *Staphylococcus aureus* yang telah terkonfirmasi. Uji pembentukan biofilm dilakukan dengan penanaman bakteri pada medium *Congo*

Red Agar. Koloni bakteri berwarna hitam akan ditemukan pada isolat



Staphylococcus aureus pembentuk biofilm.

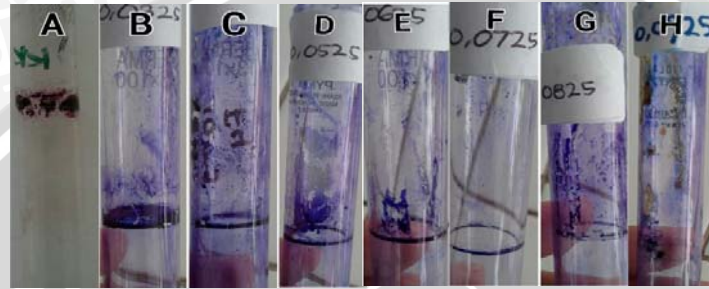
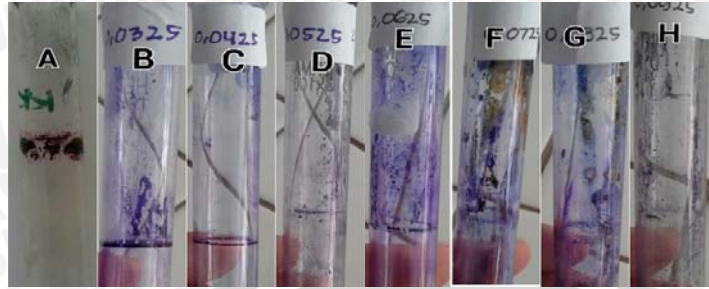
Gambar 5.4 Koloni *Staphylococcus aureus* pada Media *Congo Red Agar* Ditunjukkan dengan Koloni Berwarna Hitam

Ada 7 konsentrasi ekstrak teh hitam yang digunakan pada penelitian ini, yaitu : 1,625%, 2,125%, 2,625%, 3,125%, 3,625%, 4,125%, dan 4,625% serta konsentrasi 0% sebagai kontrol. Pengamatan terhadap biofilm yang terbentuk dapat dilihat pada dinding tabung terdapat cincin berwarna biru keunguan. Hasil

uji hambat pembentukan biofilm dapat dilihat pada Gambar 5.4.

(1)

(2)



(3)

(4)

Gambar 5.5 Hasil Uji Hambat Biofilm Pengulangan 1-4

Keterangan:

- A : Konsentrasi 0%
- B : Konsentrasi 1,625%
- C : Konsentrasi 2,125%
- D : Konsentrasi 2,625%
- E : Konsentrasi 3,125%
- F : Konsentrasi 3,625%
- G : Konsentrasi 4,125%
- H : Konsentrasi 4,625%

Kesimpulan hasil Pengamatan Langsung pada uji hambat pembentukan biofilm dapat dilihat pada Tabel 5.1.

Tabel 5.1 Hasil Pengamatan Kualitatif Uji Hambat Pembentukan Biofilm

Pengulangan	Konsentrasi (%)							
	0	1,625	2,125	2,625	3,125	3,625	4,125	4,625
1	++++	+++	++	++	++	+	+	+
2	++++	++++	+++	+++	++	+	+	+

3	++++	+++	+++	+++	++	+	+	+
4	++++	+++	+++	+++	++	+	+	+

Keterangan:

+ = membentuk biofilm

- = tidak membentuk biofilm

Kemudian sebagai hasil pengamatan kuantitatif dilakukan pengukuran intensitas warna cincin pada masing-masing tabung menggunakan program *Adobe Photoshop CS3*. Hasil yang didapatkan berupa *Mean Gray Value* pada range 0-255.

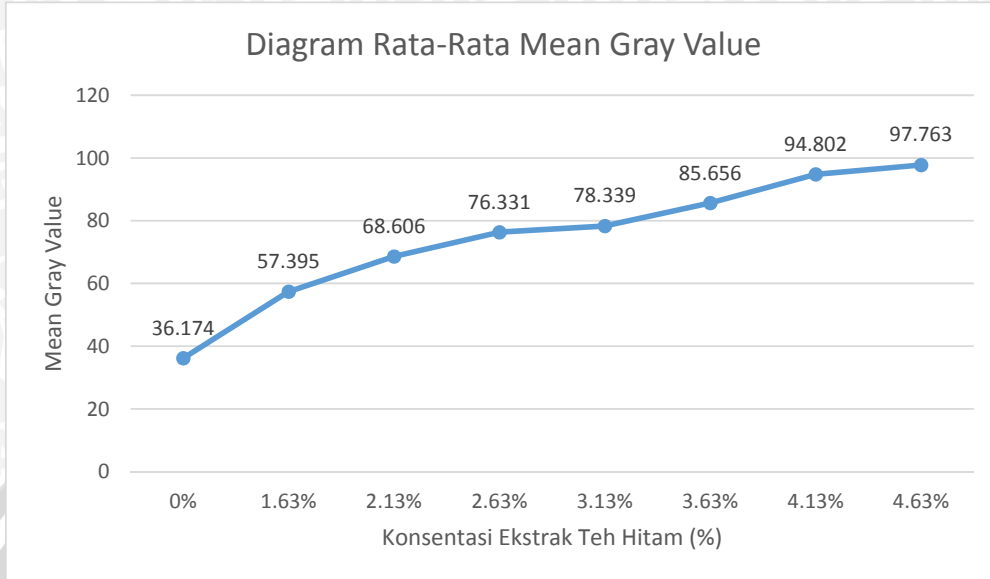
Tabel 5.2 Hasil *Mean Gray Value* Cincin Biofilm pada Tabung

Konsentrasi (%)	Pengulangan				Mean \pm SD
	1	2	3	4	
0	40,27	41,77	21,78	40,88	36,174 + 9,62
1,625	69,32	62,51	32,99	64,76	57,395 + 16,51
2,125	89,17	69,05	42,83	73,38	68,606 + 19,24
2,625	97,14	72,17	52,46	83,56	76,331 + 18,91
3,125	100,19	76,49	52,54	84,13	78,339 + 19,83
3,625	103,07	78,00	75,81	85,75	85,656 + 12,37
4,125	108,66	91,79	80,00	98,77	94,802 + 12,06
4,625	109,22	92,46	80,34	109,04	97,763 + 14,03

Keterangan:

Semakin kecil angka *Mean Gray Value* yang didapatkan maka semakin pekat warna yang dihasilkan, berarti cincin biofilm yang terbentuk masih tebal. Sedangkan semakin besar angka *Mean Gray Value* yang didapatkan maka semakin terang warna yang dihasilkan, berarti cincin

biofilm yang terbentuk menipis.



Gambar 5.6 Diagram rata-rata *Mean Gray Value*

5.2 Analisis Data

Penelitian ini menggunakan analisis statistic SPSS versi 17.0 untuk *Windows*. Hasil penelitian kuantitatif berupa data *Mean Gray Value* dianalisis dengan menggunakan Uji *One Way ANOVA* yang dilanjutkan dengan analisis *Post-Hoc Multiple Comparion Test* dan Uji Korelasi *Pearson*. Uji *One Way ANOVA* dilakukan untuk mengetahui adanya perbedaan yang berarti antar kelompok data sedangkan Uji *Post-Hoc Multiple Comparison Test* digunakan untuk mengetahui kelompok yang memiliki perbedaan yang bermakna. Uji Korelasi *Pearson* digunakan untuk menunjukkan adanya korelasi antara peningkatan dosis ekstrak teh hitam dengan hasil *Mean Gray Value*.

5.2.1 Uji *One Way ANOVA*

Persyaratan dilakukan Uji *One Way ANOVA* untuk kelompok data lebih dari dua dan tidak berpasangan adalah dilakukan uji sebaran data (hasil normal) dan

varian data (hasil sama). Setelah dilakukan uji normalitas, didapatkan bahwa data mempunyai sebaran yang normal yaitu $p = 0.914$ (uji Kolmogorov-Smirnov, $p > 0.05$) sehingga syarat untuk dilakukan uji *One Way ANOVA* terpenuhi. Syarat kedua yang juga harus terpenuhi adalah varian data harus sama, untuk itu dilakukan uji homogenitas varian. Uji homogenitas dilakukan untuk mengetahui apakah varian data homogen atau tidak.

Hasil uji homogenitas varian menghasilkan $p = 0.920$ ($p > 0.05$) yang artinya bahwa varian data sudah homogen sehingga dapat dilanjutkan dengan Uji *One Way ANOVA*. Hasil uji *One Way ANOVA* diperoleh nilai $p = 0.000$ ($p < 0.05$). Kesimpulan dari hasil tersebut adalah terdapat sedikitnya dua kelompok data yang mempunyai *Mean Gray Value* yang bermakna. Hasil selengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 1 dan 2.

5.2.2 Uji Post Hoc Multiple Comparison Test

Uji *Post Hoc Multiple Comparison* dilakukan untuk mengetahui perbedaan dari keempat kelompok. Dengan menggunakan metode *Tukey HSD*, *Mean Gray Value* antar kelompok diuji perbedaannya kemudian dianalisis nilai sigifikansi. Perbedaan dianggap signifikan apabila $p < 0.05$.

Tabel 5.3 Hasil Uji Post Hoc Multiple Comparison pada Mean Gray Value Biofilm

	0	1,625	2,125	2,625	3,125	3,625	4,125	4,625
0	-	.559	.114	.026	.017	.004	.000	.000
1,625	.559	-	.969	.686	.575	.227	.045	.025
2,125	.114	.969	-	.996	.986	.783	.307	.197
2,625	.026	.686	.996	-	1.000	.989	.711	.548

3,125	.017	.575	.986	1.000	-	.997	.810	.660
3,625	.004	.227	.783	.989	.997	-	.990	.953
4,125	.000	.045	.307	.711	.810	.990	-	1.000
4,625	.000	.025	.197	.548	.660	.953	1.000	-

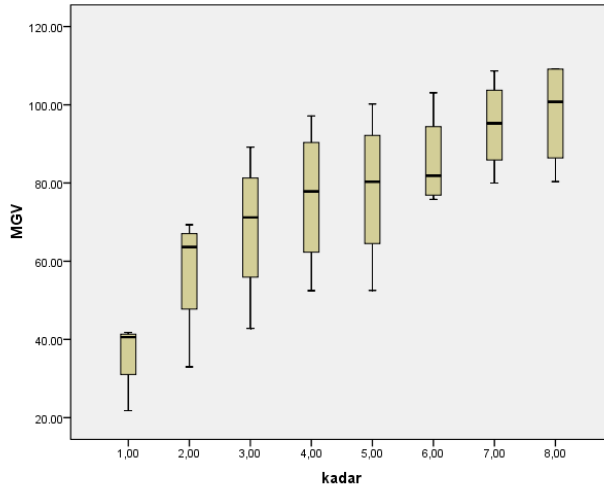
Keterangan:

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

Tabel diatas menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna pada *Mean Gray Value* setiap kelompok konsentrasi ekstrak (1,625%, 2,125%, 2,625%, 3,125%, 3,625%, 4,125%, 4,625%) jika dibandingkan dengan konsentrasi 0%. Beberapa konsentrasi menunjukkan perbedaan yang tidak bermakna ($p > 0,05$). Hal ini dapat dilihat pada konsentrasi 1,625%, 2,125%, 2,625%, dan 3,125% bila dibandingkan dengan masing-masing kelompok konsentrasi tidak menunjukkan perbedaan secara signifikan. Lain halnya dengan kelompok konsentrasi 3,625%, 4,125%, dan 4,625%. Ketiga konsentrasi tersebut menunjukkan perbedaan yang bermakna bila dibandingkan dengan konsentrasi 0%. Hal ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi 3,625%, 4,125%, dan 4,625% rata-rata *Mean Gray Value* yang dihasilkan berbeda secara signifikan dengan konsentrasi 0%.

5.2.3 Uji Korelasi Pearson

Hubungan peningkatan konsentrasi ekstrak teh hitam dan *Mean Gray Value* yang dihasilkan diukur kekuatan dan arahnya dengan menggunakan uji korelasi *Pearson*. Uji *Pearson* menghasilkan diagram sebagai berikut :



Gambar 5.7 Kurva Korelasi Pearson

Kriteria Korelasi :

- Koefisien korelasi 0 = tidak ada korelasi
- Koefisien korelasi >0 – 0,25 = sangat lemah
- Koefisien korelasi >0,25 – 0,5 = cukup
- Koefisien korelasi >0,5 – 0,75 = kuat
- Koefisien korelasi >0,75 – 0,99 = sangat kuat
- Koefisien korelasi 1 = sempurna

Analisis arah korelasi menunjukkan hubungan korelasi positif atau negative. Jika kedua variabel menunjukkan arah yang sama maka hubungan tersebut termasuk korelasi positif. Jika kedua variabel menunjukkan arah yang berbeda maka hubungan tersebut termasuk korelasi negatif.

Nilai signifikansi yang bermakna ditunjukkan dengan kriteria $p < 0,05$. Apabila $p > 0,05$, hubungan kedua variabel dianggap tidak signifikan. Dari hasil analisis, hasil yang didapatkan sebagai berikut :

- Koefisien Korelasi (r) = 0,783, artinya terdapat korelasi yang sangat kuat antara konsentrasi ekstrak teh hitam dengan *Mean Gray Value* dari biofilm yang terbentuk.
- Arah korelasi positif, artinya peningkatan konsentrasi ekstrak teh hitam diiringi dengan peningkatan nilai *Mean Gray Value* yang berarti biofilm yang terbentuk semakin sedikit.
- Nilai signifikansi (p) = 0,000, artinya hubungan antara konsentrasi ekstrak teh hitam dan *Mean Gray Value* dianggap signifikan karena $p < 0,05$. Perhitungan Uji Korelasi *Pearson* dapat dilihat di Lampiran 3.



BAB 6

PEMBAHASAN

Tujuan dilakukan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek ekstrak teh hitam (*Camelia sinensis var. Assamica*) terhadap penghambatan pertumbuhan biofilm pada *Staphylococcus aureus*. Masyarakat Indonesia merupakan salah satu Negara pengonsumsi minuman teh yang tinggi. Tanaman teh yang banyak ditanam di Indonesia merupakan jenis *Camelia sinensis var. Assamica* karena kemampuannya bertahan hidup di daerah tropis. Jenis teh yang digemari masyarakat Indonesia merupakan teh hitam, karena aroma dan rasa yang lebih kuat dibandingkan jenis teh yang lain. Perbedaan teh hitam dengan jenis teh yang lain (teh hijau dan teh oolong) terletak pada proses fermentasinya. Proses fermentasi ini yang akhirnya berpengaruh terhadap persentase kandungan kimia yang dimiliki masing-masing jenis teh.

Secara umum kandungan aktif yang dimiliki oleh masing-masing teh sama, seperti katekin, saponin, tannin, dan flavonoid. Namun yang membedakan teh hitam dengan teh yang lain adalah kandungan tannin yang relative lebih tinggi dibandingkan teh yang lain akibat proses fermentasi yang sempurna.

Teh hitam yang digunakan merupakan teh hitam kemasan “Bless Tea” kemudian diekstrak dengan metode Soxhlet. Kelebihan metode Soxhlet adalah proses kerja yang lebih cepat dibandingkan dengan metode maserasi. Proses ekstraksi teh hitam menggunakan pelarut etanol 96% karena pelarut ini mudah menguap, tidak berwarna, dan mampu menghasilkan ekstrak yang kental (murni).

Biofilm diamati menggunakan metode tabung. Hasil penelitian kualitatif akan tampak dari cincin ungu kebiruan yang terbentuk mewakili biofilm pada dinding tabung. Dari metode tabung ini akan diketahui Konsentrasi Hambat

Biofilm Minimum (*Minimum Biofilm Inhibitory Concentration*). Hasil kuantitatif penelitian ini diperoleh dengan pengukuran *Mean Gray Value* cincin ungu kebiruan untuk mengukur intensitas warna.

Bakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah *Staphylococcus aureus* pembentuk biofilm yang diperoleh dari swab tenggorok yang disimpan di Laboratorium Mikrobiologi FKUB. Isolat bakteri ini dilakukan identifikasi bakteri dan identifikasi biofilm yang kemudian terbukti positif *Staphylococcus aureus* pembentuk biofilm.

Penelitian eksplorasi dilakukan terlebih dahulu untuk mengetahui rentang konsentrasi dimana kadar hambat minimum bisa diamati. Dari hasil eksplorasi, ditemukan bahwa pertumbuhan biofilm terhambat secara signifikan pada konsentrasi 3,125%. Berdasarkan hasil penelitian eksplorasi, dilakukan perapatan konsentrasi ekstrak dengan interval 0,5% dengan menggunakan konsentrasi 3,125% sebagai median. Oleh karena itu pada penelitian ini digunakan konsentrasi 0% (kontrol), 1,625%, 2,125%, 2,625%, 3,125%, 3,625%, 4,125%, dan 4,625%. Konsentrasi ini dibuat serial dengan jarak antar konsentrasi tidak terlalu jauh untuk meningkatkan spesifisitas hasil kadar hambat minimum biofilm.

Penelitian kali ini menggunakan metode tabung. Menurut Oliveira dan Cunha (2010), diantara ketiga metode pendeteksi pembentukan biofilm secara kualitatif yaitu metode tabung, *Tissue Culture Plate*, dan *Congo Red Agar*, penggunaan metode tabung lebih dianjurkan sebagai deteksi rutin pembentukan biofilm karena caranya yang mudah, rendah biaya, dan hasil reliabel dengan sensitifitas dan spesifisitas yang tinggi. Pada penelitian ini pengamatan pembentukan biofilm dilakukan dengan dua cara yaitu pengamatan langsung yang bersifat kualitatif dan pengukuran intensitas warna yang bersifat kuantitatif.

Pengamatan secara kualitatif dilakukan dengan cara pengamatan langsung terhadap pembentukan cincin biru keunguan pada dinding tabung. Hasil pengamatan dilaporkan dalam bentuk kesimpulan subjektif berupa tebal dan tipis cincin yang terbentuk. Tanda (+) digunakan untuk mewakili adanya pembentukan biofilm, sedangkan tanda (-) digunakan untuk mewakili tidak adanya pembentukan biofilm. Berdasarkan hasil pengamatan kualitatif didapatkan penurunan tebal cincin biofilm secara signifikan pada tabung pada konsentrasi 3,625% pada seluruh pengulangan. Penentuan kadar hambatan minimum biofilm berdasarkan konsentrasi terkecil dimana pembentukan biofilm mulai menurun pada seluruh pengulangan. Pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa MBIC ekstrak teh hitam adalah konsentrasi 3,625%.

Pengamatan secara kuantitatif dilakukan dengan cara mengukur intensitas warna cincin biru keunguan pada tabung. Nilai kuantitatif ditentukan dengan *Mean Gray Value*. *MGV* memiliki *range* nilai dari 0 hingga 255. Semakin kecil angka *MGV* maka intensitas warna semakin pekat, sedangkan semakin besar angka *MGV* maka intensitas warna semakin terang. Intensitas warna yang diukur mewakili pembentukan biofilm yang dihasilkan. Semakin pekat warna yang dihasilkan maka semakin tebal biofilm yang terbentuk.

Nilai kuantitatif yang didapatkan kemudian dianalisa dengan program SPSS 17. Analisa statistik yang digunakan adalah Uji *One Way ANOVA* dan Uji korelasi *Pearson*. Dari Uji *One Way ANOVA* didapatkan nilai signifikansi $p = 0,000$ ($p < 0,05$), berdasarkan hasil tersebut dapat diartikan bahwa terdapat perbedaan efek yang bermakna antara tiap konsentrasi ekstrak teh hitam. Dari Uji korelasi *Pearson* didapatkan hasil $r = 0,783$, hal ini dapat diartikan bahwa adanya korelasi yang sangat kuat ($r > 0,75$) antara konsentrasi ekstrak teh hitam dengan *Mean Gray Value* dari biofilm yang terbentuk. Korelasi yang bersifat searah ditunjukkan hasil penelitian ini dengan nilai korelasi yang positif, hal ini

berarti semakin besar konsentrasi ekstrak teh hitam yang digunakan diiringi dengan peningkatan *Mean Gray Value*, yang berarti semakin rendah intensitas warna cincin yang dihasilkan dan semakin sedikit biofilm yang terbentuk.

Kandungan tanin, katekin, saponin, dan flavonoid yang terdapat pada ekstrak teh hitam (*Camelia sinensis var. Assamica*) yang cukup tinggi diduga mempengaruhi hasil penelitian ini. Tanin dan flavonoid memiliki kemampuan untuk menginaktivasi adhesin, mengganggu sintesis dinding sel dan menghambat pembentukan matriks. Katekin mampu merubah morfologi dinding sel bakteri dengan mempengaruhi lapisan lipid. Saponin dapat menurunkan tekanan osmotik sehingga dinding bakteri menjadi rentan.

Kekurangan penelitian ini adalah kurang spesifisitas jenis kandungan aktif pada ekstrak teh hitam yang memiliki efek hambat tinggi terhadap pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus*. Pada penelitian ini mencantumkan beberapa zat aktif yang diduga memiliki kemampuan menghambat pembentukan biofilm. Oleh karena itu penelitian lebih lanjut mengenai hal tersebut perlu dilakukan.

Penggunaan bahan baku teh hitam kemasan "Bless Tea" menjadikan penelitian ini kurang spesifik menjelaskan bagian daun teh yang manakah yang memiliki kandungan aktif sebagai antibakteri. Pada penelitian ini hanya dapat memastikan varietas dari teh yang digunakan sebagai bahan baku.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian uji hambat efek ekstrak teh hitam terhadap pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus* secara *in vitro* dan didukung hasil penelitian lain yang terkait, dapat ditarik kesimpulan :

1. Ekstrak teh hitam (*Camelia sinensis var. Assamica*) dapat menghambat pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*.
2. *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC) ekstrak teh hitam (*Camelia sinensis var. Assamica*) pada penelitian ini adalah konsentrasi 3,625%.

7.2 Saran

1. Sebaiknya dilakukan penelitian lebih lanjut untuk menentukan secara spesifik kandungan zat aktif pada teh hitam (*Camelia sinensis var. Assamica*) yang mampu menghambat pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus*.
2. Sebaiknya dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan metode pengamatan biofilm yang lebih spesifik dan sensitif untuk memastikan bakteri pembentuk biofilm termasuk strain kuat, sedang, atau lemah.

DAFTAR PUSTAKA

- Aaron SD, Ferris W, Ramotar K, Vandemheen K, Chan F, Saginur R. 2002. Single and combination antibiotic susceptibilities of planktonic, adherent, and biofilm-grown *Pseudomonas aeruginosa* isolates cultured from sputa of adults with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*; 40: 4172-4179
- Adnan M, Ahmad A, Ahmed A, Khalid N, Hayat I, Ahmed I. 2013. Chemical Composition and Sensory Evaluation of Tea (*Camellia Sinensis*) Commercialized in Pakistan. *Pak. J. Bot*; 45(3): 901-907
- Allison, DG. 2000. Microbial biofilms: Problems of control. *Cambridge University Press*: 309-327
- Amini R, AS Abdulmir, Chung C, Jahanshiri F, Wong CB, Poyling B, Hematian A, Sekawi Z, Zargar M, Jalilian FA. 2012. Circulation and transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among college students in Malaysia (cell phones as reservoir). *Asian Biomedicine*; 6(5): 659-673
- Annous B, Fratamico P, Smith JL. 2009. Quorum sensing in biofilms: why bacteria behave the way they do. *Journal of Food Science*; 74(1): 24-37
- Archer NK, Mazitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirliff ME. 2011. *Staphylococcus aureus* biofilms Properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence*; 2(5):1-15
- Biedenbach DJ, Moet GJ, Jones RN. 2004. Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2002). *Diagn Microbiol Infect Dis*; 50: 59-69
- Bishop N, Hamilton R. 2009. *Biofilms, GALT and Dysbiosis: A new understanding of microbial biofilms and drug resistance*, (Online), <http://www.drnitastbrand.com/articles/biofilms-galt.pdf>, diakses pada tanggal 1 Januari 2014
- Bodenstain J, Du Toit K. 2012. *Antimicrobial Agents*. Croatia: InTech
- Bose S, Khodke M, Basak S, Mallick SK. 2009. Detection of Biofilm Producing *Staphylococci*: Need of The Hour. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*; 3(6): 1915-1920
- Brooks GF, Butel JS, Morse SA. 1996. *Medical Microbiology* Elferia R.N (Ed), 2007. Mikrobiologi Kedokteran, Hartanto Huriawati (penterjemah), ECG, Jakarta, Indonesia.
- Cabrera C, Artacho R, Giménez R. 2006. Beneficial effects of green tea: a review. *J Am Coll Nutr*; 25: 79-99
- Chacko SM, Thambi PT, Kuttan R, Nishigaki I. 2010. Beneficial effects of green tea: A literature review. *Chinese Medicine*; 5: 1-9
- Chamberlain, N. 2009. *Coagulase Test for Staphylococcus Species*, (Online), <http://www.microbelibrary.org/library/laboratory-test/3207-coagulase-test-for-staphylococcus-species>, diakses pada tanggal 19 Desember 2013

- Chiller K, Selkin BA, Murakawa GJ. 2001. Skin Microflora and Bacterial Infections of the Skin. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*; 6:170-174
- Ciocan, LD. 2007. Plant Products As Antimicrobial Agents. *TOM*; 8:151-156
- Coleman JJ, Okoli I, Tegos GP, Holson EB, Wagner FF, Hamblin MR, Mylonakis E. 2010. Characterization of plant-derived saponin natural products against *Candida albicans*. *ACS Chem Biol*; 5(3): 321-322
- Cooper GM, Hausman RE. 2007. *The Cell: A Molecular Approach*. 4th ed. Sunderland: Sinauer Associates, Inc.
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. 1999. Bacterial Biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*; 284(5418):1318-1322
- Dezfulian A, Salehian MT, Amini V, Dabiri H, Azimirad M, Aslani MM, Zali MR, Fazel I. 2010. Catalase-negative *Staphylococcus aureus* isolated from a diabetic foot ulcer. *Iran J Microbiol*; 2(3):165-167
- Dimitrios, B. 2006. Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends Food Sci. Technol*; 17(9): 505-512
- Donlan, RM. 2001. Biofilm Formation: a clinically relevant microbiological process. *Clinical Infectious Disease*; 33(8): 1387-1392
- Donlan, RM. 2011. Biofilm Elimination on Intravascular Catheters: Important Considerations for the Infectious Disease Practitioner. *Clinical Infectious Disease*; 52(8): 1038-1045
- Donlan RM, Costerton JW. 2002. Biofilms: survival mechanism of clinically relevant microorganism. *Clin Microbiol Rev*; 15: 167-193
- Eliya, NN. 2006. *Teestrauch* (Tea Plant, *Camellia assamica*), (Online), http://www.fotoreiseberichte.de/srilanka/srilanka_pflanzen04.htm, diakses pada tanggal 6 Januari 2013
- Fletcher, M. 1999. Biofilm and biocorrosion. *American Society for Microbiology*; 704-714
- Funmilayo OO, Kamaldeen AS, Buhari ASM. 2012. Phytochemical Screening and Antimicrobial Properties of a Common Brand of Black Tea (*Camellia sinensis*) Marketed in Nigerian Environment. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*; 2(2):259-263
- Gordon RJ, Lowy FD. 2008. Pathogenesis of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *Clinical Infectious Disease*; 46:350-359
- Gyure, RA. 2010. An Eco-friendly, Scaled-down Gram Stain Protocol. *Journal of Microbiology & Biology Education*; 11(1)
- Hassan A, Usman J, Kaleem F, Omair M, Khalid A, Iqbal M. 2011. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*; 15(4)

- Hoiby N, Ciofu O, Johansen HK, Song ZJ, Moser C, Jensen P, Bjarnsholt T. 2011. The clinical impact of bacterial biofilms. *International Journal of Oral Sciences*; 3(2): 55-65
- Hudzicki, J. 2009. *Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol*, (Online), <http://www.microbelibrary.org/component/resource/laboratory-test/3189-kirby-bauer-disk-diffusion-susceptibility-test-protocol>, diakses pada tanggal 20 Desember 2013
- Hunte, R. 2012. *Microbiology Flashcards*, (Online), <http://www.studyblue.com/notes/n/microbiologyflashcards/deck/2545616>, diakses pada tanggal 6 Januari 2014
- Ikigai H, Nakae T, Hara Y, Shimamura T. 1993. Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochem Biophys Acta*; 1147: 132-136
- Jatiwiramurti, W. *Isolasi Senyawa Epigallocatechin-3-gallate dari Daun The (Camellia sinensis var. Assamica)*, (Online), <http://digilib.itb.ac.id/gdl.php?mod=browse&op=read&id=jbptitbpp-gdl-wisasuryaj-34033>, diakses pada tanggal 15 Desember 2014
- Karatan E, Watnick P. 2009. Signals, Regulatory Network, and Materials That Build and Break Bacterial Biofilms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*; 73(2): 310-347
- Kraus D, Preschel A. 2008. Staphylococcus aureus Evasion of Innate Antimicrobial Defense. *Future Microbiol*; 3(4): 437-451
- Lake, K. 2012. *Helpful Bacteria: Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis*, (Online), http://www.academia.edu/1255355/Helpful_Bacteria_Staphylococcus_Aureus_and_Staphylococcus_Epidermidis, diakses pada tanggal 13 Desember 2013
- Lewis, K. 2001. *Riddle of Biofilm Resistance*, (Online), <http://aac.asm.org/content/45/4/999.full>, diakses pada tanggal 1 Desember 2013
- Li Chen, Wen Y. 2011. The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies. *International Journal of Oral Science*; 3(2): 66-73
- Liu, GY. 2009. *Molecular Pathogenesis of Staphylococcus aureus Infection*, (Online), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2919328/>, diakses pada tanggal 17 November 2013
- Mah TFC, O'Toole GA. 2001. Mechanism of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*; 9(1): 34-39
- Mandal, A. 2009. *What is Staphylococcus aureus?*, (Online), <http://www.news-medical.net/health/What-is-Staphylococcus-Aureus.aspx>, diakses pada tanggal 13 Desember 2013
- Mathur T, Singhal S, Khan S, Upadhyay DJ, Fatma T, Rattan A. 2006. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Staphylococci: an evaluation of three different screening methods. *Indian Journal of Medical Microbiology*; 24(1): 25-29

- McKay DL, Blumberg JB. 2002. The role of tea in human health: an update. *Am J Clin Nutr*, 21(1):1-13
- Merino N, Toledo-Arana A, Vergara-Irigaray M, Valle J, Solano C, Calvo E, Lopez JA, Foster TJ, Penades JR, Lasa I. 2009. Protein A-Mediated Multicellular Behaviour in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol*; 191(3):832-843
- Momba MNB, Binda MA. 2002. Combining chlorination and chloramination processes for the inhibition of biofilm formation in drinking surface water system models. *Journal of Applied Microbiology*; 92(4): 641-648
- Mootz JM, Malone CL, Shaw LN, Horswill AR. 2013. Staphopains Modulate *Staphylococcus aureus* Biofilm Integrity. *Infection and Immunity*; 81(9):3227-3238s
- Naber, CK. 2009. *Staphylococcus aureus* Bacteremia: Epidemiology, Pathophysiology, and Management Strategies. *Clinical Infectious Disease*; 48:231-237
- Ngwoke KG, Odimegwu DC, Esimone CO. 2011. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. Badajoz: Formatex
- Noskin GA, Rubin RJ, Schentag JJ. 2005. The burden of *Staphylococcus aureus* infections on hospitals in the United States: an analysis of the 2000 and 2001 Nationwide Inpatient Sample Database. *Arch Intern Med*; 165:1756-1761
- O’Riordan K, Lee JC. 2004. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clin Microbiol Rev*; 17: 218-234
- O’Toole G, Kaplan HB, Kolter R. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol*; 54:49-79.
- Oliveira A, Cunha MLRS. 2010. Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. *BMC Research Notes*; 3:260
- Otto, M. 2008. Staphylococcal Biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol*; 322: 207-228
- Plata K, Rosato AE, Wegrzyn G. 2009. *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. *Acta Biochimica Polonica*; 56(4):597-612
- Potera, C. 2010. Biofilm Dispersing Agent Rejuvenates Older Antibiotics, (Online), <http://ehp.niehs.nih.gov/118-a288/>, diakses pada tanggal 17 Desember 2014
- Pradhan, P. 2013. *Catalase test: a test to differentiate Staphylococcus and Streptococcus*, (Online), <http://edusanjalmedmicro.blogspot.com/2013/05/catalase-test-test-to-differentiate.html>, diakses pada tanggal 19 Desember 2013.
- Prakash B, Veeregowda BM, Krishnappa G. 2003. Biofilms: A survival strategy of bacteria. *J. Cur. Sci.*; 85: 9-10

- Proal, A. 2008. *Understanding Biofilm*, (Online), <http://bacteriality.com/2008/05/26/biofilm/>, diakses pada tanggal 20 Desember 2013
- Rao, S. 2006. *Coagulase Test*, (Online), <http://www.microrao.com/micronotes/coagulase.pdf>, diakses pada tanggal 19 Desember 2013
- Reiner, K. 2010. *Catalase Test Protocol*, (Online), <http://www.microbelibrary.org/library/laboratory-test/3226-catalase-test-protocol>, diakses pada tanggal 30 Oktober 2014
- Riyono, A. 2011. *Makalah Staphylococcus Sp*, (Online), <http://mazzagus.blogspot.com/2011/12/makalah-staphylococcus-sp.html>, diakses pada tanggal 15 Desember 2013
- Rubin RJ, Harrington CA, Poon A, Dietrich K, Greene JA, Moiduddin A. 1999. The economic impact of *Staphylococcus aureus* infection in New York City hospitals. *Emerg Infect Dis*; 5:9-17.
- Sambanthamoorthy K, Schwartz A, Nagarajan V, Elasri MO. 2008. The Role of msa in *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation. *BMC Microbiology*; 8:221
- Sari, KR. 2012. *Pengaruh Pemberian Air Seduh Teh Hitam terhadap Kadar Triglicerida dan Kolesterol VLDL pada Tikus Wistar yang Diberi Diet Tinggi Fruktosa*, (Online), <http://eprints.undip.ac.id/35605/>, diakses pada tanggal 15 Desember 2014
- Schroeder K, Jularic M, Horsburgh SM, Hirschhausen N, Neumann C, Bertling A, Schulte A, Foster S, Kehrel BE, Peters G, Heilmann C. 2009. Molecular characterization of a novel *Staphylococcus aureus* surface protein (SasC) involved in cell aggregation and biofilm accumulation. *Public Library of Science*; 4(10): 1-14
- Shakibaie MR, Mansouri S, Hakak S. 1999. Plasmid Pattern of Antibiotic Resistance in Beta-Lactamase Producing *Staphylococcus aureus* Isolated from Hospitals in Kerman, Iran. *Archive of Iranian medicine*; 2(2):93-97
- Sifri, CD. 2008. Quorum Sensing: Bacteria Talk Sense. *Clinical Infectious Disease*; 47(8): 1070-1076
- Skotnicka M, Wymnicki JC, Jankun J, Jankun ES. 2011. The black tea bioactivity: an overview. *Central European Journal of Immunology*; 36(4): 284-292
- Stark, L. 2013. *Staphylococcus aureus: aspect of pathogenesis and molecular epidemiology*, (Online), <http://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:647005/FULLTEXT01.pdf>, diakses pada tanggal 24 November 2013
- Stickler, DJ. 1996. Bacterial biofilms and the encrustation of urethral catheters. *Biofouling*; 94: 293-305
- Su X, Duan J, Jiang Y, Duan X, Chen F. 2007. Polyphenolic Profile and Antioxidant Activities of Oolong Tea Infusion under Various Steeping Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*; 8: 1196-1205

- Subramaniam P, Eswara U, Maheshwar RKR. 2012. Effect of different types of tea on *Streptococcus mutans*: An *in vitro* study. *Indian J Dent Res*; 23:43-48
- Taj Y, Essa F, Aziz F, Kazmi SU. 2012. Study on biofilm-forming properties of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dev Ctries*; 5(6): 403-409
- Timothy CE, Hansen LT. 2006. Strain and growth temperature influence *Listeria* spp attachment to intact and cut cabbage. *Int. J. Food Microbiol*; 111: 34-42
- Todar, K. 2008. *Pathogenesis of S.aureus infection*, (Online), http://textbookofbacteriology.net/staph_2.html, diakses pada tanggal 18 Desember 2013
- Tolan RW. 2013. *Staphylococcus aureus infection*, (Online), <http://emedicine.medscape.com/article/971358-overview#aw2aab6b2b3>, diakses pada tanggal 18 Desember 2013
- Tseng SH, Lee CM, Lin TY, Chang SC, Chang FY. 2011. Emergence and spread of multi-drug resistant organisms: Think globally and act locally. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*; 44: 157-165.
- Tuminah, S. 2004. *Teh (Camellia sinensis O.K. Var Assamica) sebagai salah satu sumber antioksidan*, (Online), http://www.kalbe.co.id/files/cdk/files/144_16AntioxidantTea.pdf/144_16AntioxidantTea.html, diakses pada tanggal 26 Desember 2013
- Weese, J S. 2009. *Treating Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Infection*, (Online), https://s3.amazonaws.com/assets.prod.vetlearn.com/mmah/56/110c4c213a4c34a22e9adb72c02af0/filePVE_04_06_274.pdf, diakses pada tanggal 13 Desember 2013
- Wiria, F. 2010. *Perbandingan Efektifitas Berkumur Dengan Larutan The Hijau Seduh Konsentrasi 100% dan 50% Dalam Menghambat Pembentukan Plak Gigi Secara Klinis Pada Enam Permukaan Gigi*, (Online), <http://lib.ui.ac.id/file?file=digital/125716-R17-PER-216%20Perbandingan%20efektivitas-Literatur.pdf>, diakses pada tanggal 18 Desember 2014
- Xu X, Zhou XD, Wu CD. 2011. The Tea Catechn Epigallocatechin Gallate Suppresses Cariogenic Virulence Factors of *Streptococcus mutans*. *Antimicrob Agents Chemother*; 55(3): 1229-1236
- Zhang XF, Han YY, Bao GH, Ling TJ, Zhang L, Gao LP, Xia T. 2012. A New Saponin from Tea Seed Pomace (*Camellia oleifera* Abel) and Its Protective Effect on PC12 Cells. *Molecules*; 17:11721-11728

LAMPIRAN 1
UJI NORMALITAS DAN HOMOGENITAS

1. Uji Normalitas Sebaran Data

Tujuan dilakukan uji normalitas adalah untuk mengetahui apakah sampel data yang didapat mempunyai sebaran data yang normal, oleh karena itu dilakukan Uji Kolmogorov-Smirnov terhadap tiap variable pada penelitian ini.

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
		MGV
N		32
Normal Parameters ^{a, b}	Mean	74.3832
	Std. Deviation	23.76744
Most Extreme Differences	Absolute	.099
	Positive	.095
	Negative	-.099
Kolmogorov-Smirnov Z		.559
Asymp. Sig. (2-tailed)		.914

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

Nilai signifikansi = 0.914 ($p > 0.05$) yang artinya bahwa sebaran data normal.

2. Uji Homogenitas Varians Data

Test of Homogeneity of Variances			
MGV			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.353	7	24	.920

Nilai signikansi = 0.920 ($p > 0,05$) yang artinya varian data memiliki varian yang homogen.

LAMPIRAN 2
UJI ANOVA

Oneway

Descriptives

MGV

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					1.00	4		
2.00	4	57.3945	16.51318	8.25659	31.1184	83.6706	32.99	69.32
3.00	4	68.6063	19.23691	9.61846	37.9960	99.2165	42.83	89.17
4.00	4	76.3308	18.90743	9.45372	46.2448	106.4167	52.46	97.14
5.00	4	78.3390	19.83423	9.91711	46.7783	109.8997	52.54	100.19
6.00	4	85.6558	12.36690	6.18345	65.9773	105.3342	75.81	103.07
7.00	4	94.8023	12.05510	6.02755	75.6199	113.9846	80.00	108.66
8.00	4	97.7637	14.02568	7.01284	75.4458	120.0817	80.34	109.22
Total	32	74.3833	23.76744	4.20153	65.8142	82.9523	21.78	109.22

ANOVA

MGV

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	11568.202	7	1652.600	6.673	.000
Within Groups	5943.430	24	247.643		
Total	17511.633	31			

Nilai signifikansi = 0,000 ($p < 0,05$) yang berarti bahwa ada perbedaan signifikan pada perubahan konsentrasi ekstrak terhadap *Mean Gray Value*.

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

MGV
Tukey HSD

(I) kadar	(J) kadar	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1.00	2.00	-21.22075	11.12751	.559	-58.0741	15.6326
	3.00	-32.43250	11.12751	.114	-69.2858	4.4208
	4.00	-40.15700	11.12751	.026	-77.0103	-3.3037
	5.00	-42.16525	11.12751	.017	-79.0186	-5.3119
	6.00	-49.48200	11.12751	.004	-86.3353	-12.6287
	7.00	-58.62850	11.12751	.000	-95.4818	-21.7752
	8.00	-61.59000	11.12751	.000	-98.4433	-24.7367
2.00	1.00	21.22075	11.12751	.559	-15.6326	58.0741
	3.00	-11.21175	11.12751	.969	-48.0651	25.6416
	4.00	-18.93625	11.12751	.686	-55.7896	17.9171
	5.00	-20.94450	11.12751	.575	-57.7978	15.9088
	6.00	-28.26125	11.12751	.227	-65.1146	8.5921
	7.00	-37.40775	11.12751	.045	-74.2611	-.5544
	8.00	-40.36925	11.12751	.025	-77.2226	-3.5159
3.00	1.00	32.43250	11.12751	.114	-4.4208	69.2858
	2.00	11.21175	11.12751	.969	-25.6416	48.0651
	4.00	-7.72450	11.12751	.996	-44.5778	29.1288
	5.00	-9.73275	11.12751	.986	-46.5861	27.1206
	6.00	-17.04950	11.12751	.783	-53.9028	19.8038
	7.00	-26.19600	11.12751	.307	-63.0493	10.6573
	8.00	-29.15750	11.12751	.197	-66.0108	7.6958
4.00	1.00	40.15700	11.12751	.026	3.3037	77.0103
	2.00	18.93625	11.12751	.686	-17.9171	55.7896
	3.00	7.72450	11.12751	.996	-29.1288	44.5778
	5.00	-2.00825	11.12751	1.000	-38.8616	34.8451
	6.00	-9.32500	11.12751	.989	-46.1783	27.5283
	7.00	-18.47150	11.12751	.711	-55.3248	18.3818
	8.00	-21.43300	11.12751	.548	-58.2863	15.4203
5.00	1.00	42.16525	11.12751	.017	5.3119	79.0186
	2.00	20.94450	11.12751	.575	-15.9088	57.7978
	3.00	9.73275	11.12751	.986	-27.1206	46.5861
	4.00	2.00825	11.12751	1.000	-34.8451	38.8616
	6.00	-7.31675	11.12751	.997	-44.1701	29.5366
	7.00	-16.46325	11.12751	.810	-53.3166	20.3901
	8.00	-19.42475	11.12751	.660	-56.2781	17.4286
6.00	1.00	49.48200	11.12751	.004	12.6287	86.3353
	2.00	28.26125	11.12751	.227	-8.5921	65.1146
	3.00	17.04950	11.12751	.783	-19.8038	53.9028

	4.00	9.32500	11.12751	.989	-27.5283	46.1783
	5.00	7.31675	11.12751	.997	-29.5366	44.1701
	7.00	-9.14650	11.12751	.990	-45.9998	27.7068
	8.00	-12.10800	11.12751	.953	-48.9613	24.7453
7.00	1.00	58.62850	11.12751	.000	21.7752	95.4818
	2.00	37.40775	11.12751	.045	.5544	74.2611
	3.00	26.19600	11.12751	.307	-10.6573	63.0493
	4.00	18.47150	11.12751	.711	-18.3818	55.3248
	5.00	16.46325	11.12751	.810	-20.3901	53.3166
	6.00	9.14650	11.12751	.990	-27.7068	45.9998
	8.00	-2.96150	11.12751	1.000	-39.8148	33.8918
8.00	1.00	61.59000	11.12751	.000	24.7367	98.4433
	2.00	40.36925	11.12751	.025	3.5159	77.2226
	3.00	29.15750	11.12751	.197	-7.6958	66.0108
	4.00	21.43300	11.12751	.548	-15.4203	58.2863
	5.00	19.42475	11.12751	.660	-17.4286	56.2781
	6.00	12.10800	11.12751	.953	-24.7453	48.9613
	7.00	2.96150	11.12751	1.000	-33.8918	39.8148

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

Uji *Post Hoc Tukey* digunakan untuk mengetahui perbedaan antar kelompok sampel secara berpasangan. Kelompok konsentrasi 3,625%, 4,125%, dan 4,625% menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap kelompok 0%.

LAMPIRAN 3
 UJI KORELASI PEARSON

Descriptive Statistics

	Mean	Std. Deviation	N
MGV	74.3832	23.76744	32
kadar	4.5000	2.32795	32

Correlations

		MGV	kadar
MGV	Pearson Correlation	1	.783**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	32	32
kadar	Pearson Correlation	.783**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	32	32

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

- Koefisien korelasi ($r = 0,783$) artinya kekuatan korelasi sangat kuat dan mempunyai hubungan searah
- Nilai signifikansi ($p = 0,000$) artinya ada hubungan yang signifikan antara kedua variabel.

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Sovira Prashanti

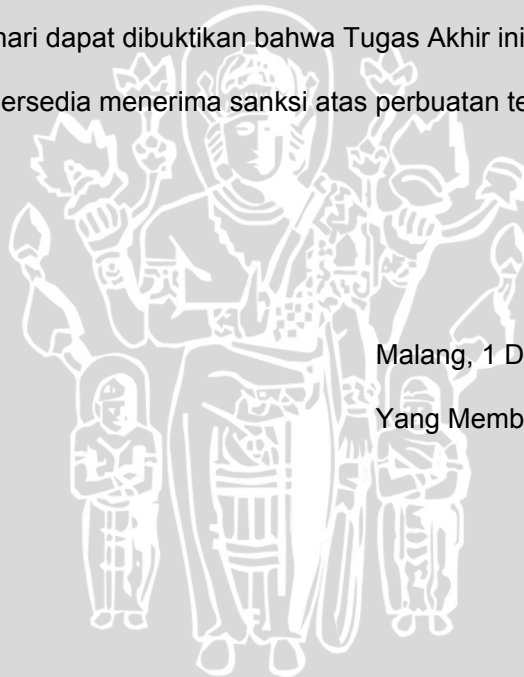
NIM : 115070107111006

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 aku sebagai tulisan atau pikiran saya sendiri.

Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.



Malang, 1 Desember 2014

Yang Membuat Pernyataan,

Sovira Prashanti

NIM. 115070107111006

