

**EFEK EKSTRAK DAUN TEH (*Camellia Sinensis*) SEBAGAI
PENGHAMBAT PEMBENTUKAN BIOFILM PADA *Staphylococcus*
*aureus***

TUGAS AKHIR

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



Oleh :

DIMAS PRAKOSO

NIM. 105070106111017

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG 2016**

TUGAS AKHIR

EFEK EKSTRAK DAUN TEH (*Camellia Sinensis*) SEBAGAI PENGHAMBAT PEMBENTUKAN BIOFILM PADA *Staphylococcus* *aureus*

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran Umum



Oleh :

DIMAS PRAKOSO

NIM. 105070106111017

PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG 2016

LEMBAR PERSETUJUAN

Tugas Akhir

EFEK EKSTRAK DAUN TEH (*Camellia Sinensis*) SEBAGAI PENGHAMBAT
PEMBENTUKAN BIOFILM PADA *Staphylococcus aureus*

Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran Umum

Oleh :

Dimas Prakoso

105070106111017

Menyetujui Untuk Diuji:

Pembimbing I

Pembimbing II

Dr.dr. Dwi Yuni Nur Hidayati
NIP. 19660323 199703 2 001

dr.Soemardini, MPd
NIP. 110446417

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR
EFEK EKSTRAK DAUN TEH (*Camellia Sinensis*) SEBAGAI
PENGHAMBAT PEMBENTUKAN BIOFILM PADA *Staphylococcus*
aureus

Oleh :

Dimas Prakoso
105070106111017

Telah di Uji pada

Hari : Senin

Tanggal : 25 januari 2016

Dan di nyatakan lulus oleh :

Penguji I

Dr. dr. Nurdiana M.Kes
NIP 19551015 198603 2 001

Penguji II/Pembimbing I

Dr.dr. Dwi Yuni Nur Hidayati, M.Kes
NIP. 196603231997032001

Penguji III/ Pembimbing II

dr. Soemardini, MPd
NIP 110446417

Mengetahui
Ketua Program Studi Pendidikan Dokter

Prof. Dr. dr. TEGUH WAHJU SARDJONO, DTM&H, M.Sc, Sp.Park
NIP 19520410 198002 1 001

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa atas berkat dan kasih sayang-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir dengan judul “Efek Ekstrak Daun Teh (*Camellia Sinensis*) sebagai penghambat pembentukan Biofilm Pada *Staphylococcus aureus*.

Proses penulisan Tugas Akhir ini merupakan sebuah pengalaman yang sangat berharga. pengalaman yang dapat menjadi bekal penulis untuk menjadi insan cita yang terus memperbaiki diri. Dukungan, masukan, kritik dan saran dari berbagai pihak telah menjadikan sesuatu yang tidak bernilai menjadi bernilai karena adanya proses pembelajaran yang terus berlangsung.

Dengan selesainya Tugas Akhir ini, penulis mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada:

1. Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes selaku dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
2. Prof. Dr. dr. Teguh Wahyu Sardjono, DTM&H, M.Sc, Sp.ParK selaku Ketua Program Studi Pendidikan Dokter Universitas Brawijaya Malang.
3. Dr. dr. Dwi yuni Nur Hidayati, M.Kes, selaku dosen pembimbing I atas ilmu, bimbingan, dan saran yang diberikan dengan sangat penuh kesabaran dalam setiap konsultasi serta semangat sehingga Penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir ini.
4. Dr. Soemardini M.Pd, selaku dosen pembimbing II atas ilmu, bimbingan, dan saran yang diberikan serta selalu memberikan solusi dalam setiap hambatan dan tetap dengan penuh kesabaran membimbing Penulis.

5. Dr. dr. Nurdiana M.Kes, selaku dosen penguji yang telah memberikan Penulis saran dan telah hadir pada saat ujian Tugas Akhir Penulis.
6. Para personel Laboratorium Mikrobiologi FKUB: Mbak Ucik, Mas Slamet, Bu Yatik, yang tidak hanya membantu dalam proses penelitian dan administrasi tetapi juga memberi semangat pada penulis untuk segera menyelesaikan Tugas Akhir ini sekaligus sahabat bagi penulis dalam berkeluh kesah
7. Segenap anggota Tim Pengelola Tugas Akhir FKUB.
8. Keluarga besar Penulis , Siswanto dan H Surya Nirmala, dan kedua adik Penulis Dipo Agus Priyatna dan Defri Prawira Dinata atas kasih sayang, doa, dan dukungan yang tiada henti selama proses pembuatan Tugas Akhir ini berlangsung
9. Teman seperjuangan dan juga Sahabat terdekat Penulis Dia, Oky, Tina, Benny, Mutia, Wiena, Randa, Moditiara, Dinda Zahra, Adis yosephine, Favi P, Romi, Febri dan Dedi yang sudah menjadi mitra, memberi dukungan, serta membagi ilmunya selama proses pembuatan Tugas Akhir ini.
10. Semua pihak yang telah membantu dan mendoakan demi suksesnya penyelesaian Tugas Akhir ini.

Penulis menyadari bahwa penulisan ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis membuka diri untuk segala saran dan kritik yang membangun guna kesempurnaan Tugas Akhir ini. Semoga Tugas Akhir ini dapat menambah wawasan dan memberikan sumbangsih dalam ilmu pengetahuan khususnya ilmu kedokteran.

Malang, Januari 2016

Penulis

ABSTRAK

Prakoso, Dimas, 2016. **Efek Ekstrak Daun Teh (*Camellia sinensis*) sebagai penghambat pembentukan Biofilm pada *Staphylococcus Aureus***. Tugas Akhir, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing : (1) Dr. dr. Dwi Yuni Nur Hidayati, M.Kes (2) dr. Soemardini M.PH.

Biofilm merupakan suatu produk yang dihasilkan oleh bakteri dan membentuk lapisan padat yang menempel pada permukaan suatu benda. Dengan struktur tersebut, bakteri yang menghasilkan biofilm memiliki kelebihan dibandingkan dengan bakteri yang tidak menghasilkan biofilm. Bakteri pembentuk biofilm bersifat sangat resisten terhadap tekanan lingkungan dan terapi antibiotika. Pemberian ekstrak Daun Teh yang mengandung tannin, flavonoid dan polifenol diharapkan dapat menghambat pembentukan biofilm pada bakteri *Staphylococcus aureus*. Penelitian menggunakan studi *post-test only group design* pada bakteri *Staphylococcus aureus* pembentuk biofilm yang dibagi dalam 2 kelompok. Kelompok kontrol negatif tidak diberi ekstrak Daun Teh, sedangkan kelompok perlakuan diberi ekstrak Daun Teh dengan dosis 0.125 g/dL, 0.25 0.5g/dL, 1 g/dL, 1.5 g/dL dan kemudian dilakukan pengulangan sampai 5 kali. Biofilm kemudian diukur *Optical Density* dengan menggunakan ELISA reader secara spektrofotometris. Analisis data menggunakan metode *One way Anova* dilanjutkan uji *Post Hoc LSD*, menunjukkan bahwa pemberian ekstrak buah delima berpengaruh terhadap penghambatan pembentukan biofilm secara signifikan ($p < 0,05$). Kesimpulan penelitian ini adalah pemberian Efek Ekstrak Daun Teh (*Camellia sinensis*) sebagai penghambat pembentukan Biofilm pada *Staphylococcus Aureus*.

Kata Kunci : *Staphylococcus aureus*, *Daun Teh (Camellia sinensis)*



ABSTRACT

Prakoso, Dimas, 2016. **Tea Leaf Extract (*Camellia sinensis*) as inhibiting biofilm formation in *Staphylococcus aureus***. Final Project, UB School of Medicine. supervisors: (1) Dr. dr. Dwi Yuni Nur Hidayati, M.Kes (2) dr. Soemardini M.Ph.

Biofilm is a product produced by bacteria and form a solid layer on the surface of an object. With this structure, the bacteria produce biofilms has advantages compared to bacteria that do not produce biofilms. Biofilm forming bacteria are highly resistant to environmental stress and antibiotic therapy. The tea leaf extract contains tannins, flavonoids and polyphenols are expected to inhibit biofilm formation in bacteria *Staphylococcus aureus*. Research use only post-test study group design in biofilm-forming bacterium *Staphylococcus aureus* which are divided into 2 groups. Negative control group not given the extract of tea leaves, while the treatment group were given a tea leaf extract at a dose of 0.125 g / dL, 0.25 0.5g / dL, 1 g / dL, 1.5 g / dL and then be repeated up to 5 times. Biofilms then measured Optical Density by using ELISA reader is spektrofotometris. Analysis of the data using One way ANOVA followed LSD Post Hoc test, showed that administration of pomegranate extract effect on the inhibition of biofilm formation was significantly ($p < 0.05$). The conclusion of this study is the provision Effects Tea Leaf Extract (*Camellia sinensis*) as inhibiting biofilm formation in *Staphylococcus aureus*.

Keywords: biofilm, *Staphylococcus aureus*, Leaf Tea (*Camellia sinensis*)

DAFTAR ISI

Judul	i
Lembar Persetujuan	ii
Halaman Pengesahan	iii
Kata Pengantar	iv
Abtstrak	vi
Abstract	vii
Daftar Isi	vii
BAB 1 Pendahuluan	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.3.1 Tujuan Umum	3
1.3.2 Tujuan Khusus	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
BAB 2 Tinjauan Pustaka	5
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	5
2.1.1 Klasifikasi	5
2.1.2 Karakteristik Bakteri	5
2.1.2.1 Ciri Khas Organisme	5
2.1.2.2 Biakan	6
2.1.2.3 Sifat-sifat Pertumbuhan	7
2.1.3 Struktur Antigen	8
2.1.4 Toksin dan Enzim	8
2.1.4 patogenesis	11
2.1.5 patologi	12
2.1.6 Uji Laboratorium Diagnosis	13
2.1.6.1 Spesimen	13
2.1.6.2 Biakan	14
2.1.6.3 Uji Katalase	14
2.1.6.4 Uji Tes Koagulase.....	14
2.1.6.5 tes kepekaan antibiotika	15
2.1.6.6 tes serologis dan penentuan tipe	15
2.1.7 Epidemiologi dan Pengendalian	16

2.2 Biofilm	17
2.2.1 Definisi Biofilm	17
2.2.2 Struktur Biofilm	18
2.2.3 Pembentukan Biofilm	20
2.2.4 Faktor Lingkungan yang Mempengaruhi Pembentukan Biofilm	21
2.2.5 Pembentukan Biofilm pada Alat Medis	21
2.2.6 Tes Pembentukan Biofilm	22
2.2.6.1 Metode Tabung	22
2.2.6.2 Metode Congo Red Agar	22
2.2.6.3 Metode Microtiter Plate-Test	23
2.3 Daun Teh (<i>Camellia Sinensis</i>)	24
2.3.1 Taksonomi	24
2.3.2 Ciri fisik Daun Teh	25
2.3.3 Khasiat Daun Teh (<i>Camellia Sinensis</i>)	26
2.3.4 Kandungan Kimia Daun Teh (<i>Camellia Sinensis</i>)	26
BAB 3 Kerangka Penelitian	28
3.1 Kerangka Konsep Penelitian	28
3.2 Hipotesis Penelitian	30
BAB 4 Metode Penelitian	31
4.1 Rancangan dan Desain Penelitian	31
4.2 Populasi dan Sampel Penelitian.....	31
4.2.1 Pengulangan	31
4.3 Tempat dan Waktu Penelitian	32
4.4 Variabel Penelitian	32
4.4.1 Variabel Bebas	32
4.4.2 Variabel Tergantung	32
4.5 Definisi Operasional	33
4.6 Instrumen Penelitian	34
4.6.1 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Delima	34
4.6.2 Alat dan Bahan Identifikasi Bakteri Pembenihan Murni	34
4.6.3 Alat dan Bahan Deteksi Biofilm dan Efek Anti Biofilm	35
4.7 Prosedur Penelitian	35
4.7.1 Persiapan Buah Delima	35
4.7.1.1 Ekstraksi dan Evaporasi	35

4.7.2 Persiapan Biofilm <i>Staphylococcus aureus</i>	36
4.7.2.1 Identifikasi <i>Staphylococcus aureus</i>	36
4.7.2.2 Pembentukan Perbenihan Cair Bakteri	38
4.7.2.3 Uji Deteksi Pembentukan Biofilm	39
4.7.3 Uji Hambat Pembentukan Biofilm	40
4.7.4 Pengukuran Mean Gray Value	41
4.8 Analisa Data	41
4.9 Skema Penelitian	43
BAB 5 Hasil Penelitian dan Analisis Data	44
5.1 Hasil Penelitian	44
5.1.1 Hasil Identifikasi Bakteri	44
5.1.2 Hasil Uji Pembentukan Biofilm	46
5.1.3 Hasil Uji Hambat Pembentukan Biofilm	46
5.2 Analisa Data	48
5.2.1 Uji <i>One Way Anova</i>	49
5.2.2 <i>Post Hoc Comparison Test</i>	49
5.2.3 Uji Korelasi Person	51
BAB 6 Pembahasan	53
BAB 7 Penutup	55
7.1 Kesimpulan	55
7.2 Saran	55
Daftar Pustaka	58
Pernyataan Keaslian Tulisan	61
Lampiran 1	62
Lampiran 2	63
Lampiran 3	64

DAFTAR GAMBAR

2.1	<i>Staphylococcus aureus</i> pewarnaan gram	6
2.2	Lokasi Infeksi dan Penyakit karena <i>Staphylococcus aureus</i>	13
2.4	Tahap-Tahap Pembentukan Biofilm.....	20
2.5	Biofilm Development Cycle	21
3.1	Daun Teh (<i>Camellia sinensis</i>)	24
5.1	Pewarnaan gram, terlihat bakteri kokus gram positif (pembesaran 100 kali)	45
5.2	Uji katalase Positif	45
5.3	Uji Koagulase <i>Staphylococcus aureus</i>	45
5.4	Koloni <i>S. aureus</i> pada Chrom Agar	45
5.5	<i>Staphylococcus aureus</i> pada medium Congo Red Agar	46
5.6	Hasil Uji Hambat Pembentukan Biofilm dengan Pewarnaan Kristal Violet pada bakteri <i>Staphylococcus aureus</i> Pembentuk Biofilm	47



DAFTAR TABEL

4.9	Hasil Pengamatan Langsung Uji Hambat Pembentukan Biofilm	43
5.2	Hasil Pengukuran Intensitas Warna Biofilm (<i>Mean Gray Value</i>) (Kuantitatif)	48
5.3	Hasil Uji <i>Post Hoc Multiple Comparison Test</i>	50
5.1	Hasil Pengamatan Langsung Uji Hambat Pembentukan Biofilm (Kualitatif)	41
5.1	Hasil Pengamatan Langsung Uji Hambat Pembentukan Biofilm (Kuantitatif)	48

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Uji Normalitas Dan Homogenitas	62
Lampiran 2 Uji Oneway Anova	63
Lampiran 3 Uji Kolerasi Pearson	64



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Infeksi *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) saat ini telah berkembang menjadi masalah kesehatan yang serius pada neonatus, bayi, anak, dan dewasa. Sejak ditemukan epidemi pertamanya di Amerika Serikat pada 1968, hingga kini *S. aureus* masih menjadi masalah penyebab infeksi nosokomial. Menurut data WHO, *case fatality rate* infeksi *S. aureus* saat ini mencapai 30 %. Dalam beberapa dekade terakhir, insiden infeksi *S. aureus* terus meningkat di berbagai belahan dunia. Di Amerika Serikat, lebih dari 50% kasus infeksi nosokomial disebabkan oleh *S. aureus* (Fergie and Purcell, 2007). Di sejumlah negara Eropa, rata-rata 20.000 orang meninggal dunia tiap tahunnya dan sekitar 10 persen di antaranya dari *S. aureus* (Rachmawati, 2008).

Sejak diketahui bahwa bakteri *S. aureus* dapat membentuk biofilm pada jaringan dan alat-alat medis, hal ini menjadi tantangan baru bagi klinisi dalam melawan infeksi *S. aureus* yang terkait dengan penggunaan alat medis seperti pada *prosthetic heart valves*, *central venous catheters*, *urinary catheters*, lensa kontak, IUD dan implan gigi (Donlan, 2002). Biofilm merupakan agregat multiseluler mikroorganisme yang berbentuk lapisan padat dan menempel pada permukaan suatu benda. Biofilm bersifat sangat resisten terhadap tekanan lingkungan dan terapi antibiotika. Kemampuan *S. aureus* menyebabkan infeksi tersebut di atas, disebabkan adanya kemampuan *S. aureus* untuk membuat biofilm, dimana bakteri mengeluarkan *extracellular polymer fibrils* yang sangat kuat dan melindungi permukaan bakteri. Dengan adanya bentukan tersebut,

maka bakteri menjadi lebih kuat dan tahan terhadap serangan antibiotika dan dari lingkungan. Mekanisme yang bertanggung jawab terhadap pertahanan bakteri ini dapat mencakup satu atau lebih alasan yaitu keterlambatan penetrasi dari agen antimikroba melalui matrix biofilm, dan perubahan kecepatan pertumbuhan dari organisme biofilm dan perubahan fisiologikal karena pertumbuhan biofilm (Donlan, 2002). Biofilm dapat menghambat respon imun host melalui inaktivasi leukosit, mekanisme ini menyebabkan terjadinya infeksi persisten pada pasien sehingga bakteri lebih mudah bermutasi menjadi strain yang lebih virulen (Leid *et al.*, 2002).

Melihat sulitnya terapi antibiotika terhadap infeksi bakteri pembentuk biofilm, saat ini banyak penelitian yang memfokuskan pada terapi dari bahan alami yang mampu mencegah pembentukan biofilm. Salah satunya adalah Daun Teh (*Camellia sinensis*). Tanaman ini diketahui memiliki kandungan flavonoid, Tannin dan polifenol yang mampu menghambat pembentukan biofilm (Toumy *et al.*, 2001).

Daun Teh (*Camellia sinensis*) telah lama dikenal di Indonesia sebagai minuman dengan aroma dan khasiat yang khas. Tanaman ini mudah ditemukan secara alami di Maluku (pulau Baru, Seram, Nusalaut, Ambon) dan Sumatra Selatan (sepanjang sungai Musi, Palembang) Sulawesi Tenggara, Bali, Nusa Tenggara Timur dan Irian Jaya. Tanaman ini juga dibudidayakan di Jawa Timur dan Jawa Barat (Anonymous, 2008).

Berdasarkan fakta diatas maka perlu penelitian lebih lanjut mengenai peran Daun Teh (*Camellia sinensis*) sebagai penghambat pembentukan biofilm pada *S. aureus*.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah ekstrak Daun Teh (*Camellia sinensis*) dapat menghambat pembentukan biofilm pada *Staphylococcus aureus* ?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Mengetahui efek ekstrak Daun Teh (*Camellia sinensis*) sebagai penghambat pembentukan biofilm pada *Staphylococcus aureus*.

1.3.2 Tujuan khusus

1.3.2.1 Mengetahui efek masing-masing dosis ekstrak Daun Teh (*Camellia sinensis*) sebagai penghambat pembentukan biofilm pada *Staphylococcus aureus*.

1.3.2.2 Mengetahui *Minimal Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC) ekstrak Daun Teh (*Camellia sinensis*) pada *Staphylococcus aureus*

1.4 Manfaat penelitian

1.4.1 Manfaat akademis

- Dapat menjelaskan manfaat ekstrak Daun Teh (*Camellia sinensis*) sebagai penghambat pembentukan biofilm pada *Staphylococcus aureus*.
- Dapat menambah masukan ilmu yang dapat digunakan untuk pengembangan penelitian lebih lanjut tentang biofilm pada *Staphylococcus aureus*.

1.4.2 Manfaat praktis

- Dapat memberikan alternatif terapi terhadap infeksi *Staphylococcus aureus* pembentuk biofilm.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Staphylococcus aureus*

2.1.1 Taksonomi

Domain : Bacteria

Kingdom : Bacteria

Phylum : Firmicutes

Class : Cocci

Order : Bacillales

Family : Staphylococcaceae

Genus : Staphylococcus

Species : *Staphylococcus aureus* (Todar., 2008)

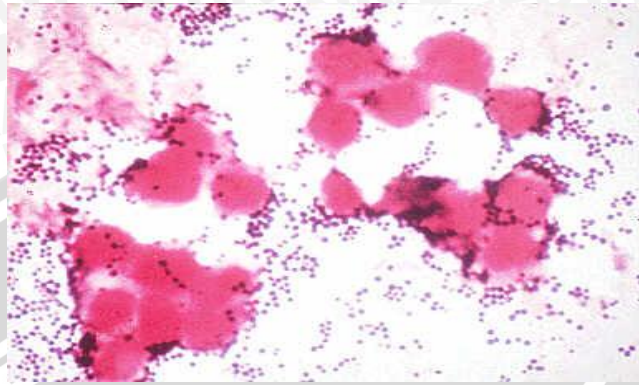
2.1.2 Karakteristik Bakteri

2.1.2.1 Ciri-Ciri Organisme

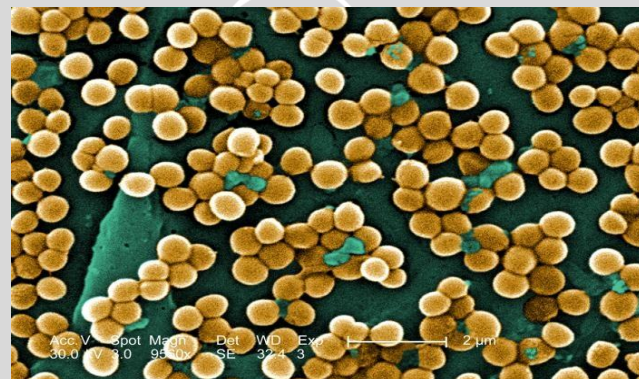
Staphylococcus aureus bersifat aerob atau anaerob fakultatif, tes katalase positif, dan tahan hidup di lingkungan yang mengandung garam dengan konsentrasi tinggi (halofilik), misalnya NaCl 10% (Jawetz *et al.*, 1996).

Bakteri *Staphylococcus aureus* berbentuk kokus dengan garis tengah sekitar 1 μm dan tersusun dalam kelompok-kelompok tak beraturan. Hasil pewarnaan yang berasal dari perbenihan padat menunjukkan susunan bakteri yang bergerombol seperti anggur, seperti terlihat pada Gambar 2.1 dan 2.2. Pada biakan cair tampak juga kokus tunggal, berpasangan, tetrad, dan berbentuk rantai. Kokus muda bersifat Gram positif kuat, sedangkan pada biakan yang lebih

tua banyak sel menjadi Gram negatif. *Staphylococcus aureus* tidak bergerak dan tidak membentuk spora (Jawetz *et al.*, 1996).



Gambar 2.1. Pewarnaan Gram *Staphylococcus aureus* (Todar, 2008).



Gambar 2.2. *Staphylococcus aureus* mikroskop elektron pembesaran 9650x (Car, 2005)

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

- Organisme yang berasal dari bagian tengah koloni.
- Organisme yang mengalami fagositosis
- Organisme yang berasal dari perbenihan yang sudah tua (Dzen *et al.*, 2003).

2.1.2.2 Biakan

Staphylococcus aureus mudah tumbuh pada kebanyakan perbenihan bakteri dalam keadaan aerobik atau mikroaerofilik. Bakteri ini tumbuh paling

cepat pada suhu 37 °C, tetapi membentuk pigmen paling baik pada suhu kamar (20-25 °C). Koloni pada perbenihan padat berbentuk bulat, halus, menonjol, dan berkilau. *Staphylococcus aureus* membentuk koloni berwarna abu-abu sampai kuning emas tua. *Staphylococcus aureus* juga menghasilkan berbagai tingkatan hemolisis seperti alpha, beta, dan gamma (Dzen et.al, 2003).

2.1.2.3 Sifat-Sifat Pertumbuhan

Staphylococcus aureus menghasilkan katalase yang membedakannya dengan *streptococcus*. Bakteri ini meragikan banyak karbohidrat dengan lambat, menghasilkan asam laktat, tetapi tidak menghasilkan gas. Aktivitas proteolitik sangat bervariasi untuk setiap strain. *Staphylococcus aureus* relatif resisten terhadap lingkungan kering dan panas (bakteri ini bisa tahan terhadap suhu 50 °C selama 30 menit), serta terhadap natrium klorida 9% tetapi mudah dihambat oleh zat-zat kimia tertentu seperti heksaklorofen 3% (Jawetz et al., 1996).

Kepekaan *Staphylococcus aureus* terhadap antibiotika dapat terjadi dengan berbagai mekanisme yang berbeda. Diantaranya: (1) sering membentuk enzim *beta lactamase* dibawah kendali plasmid, sehingga resisten terhadap antibiotika *beta lactam*. Plasmid dapat dipindahkan melalui mekanisme transduksi dan mungkin pula melalui konjugasi, (2) terjadinya perubahan genetik pada kromosom yang mengubah reseptor *PBP2* (*Penicillin Binding Protein 2*) menjadi *PBP2a* sehingga sulit dicapai oleh antibiotika, (3) toleransi yang berarti bahwa obat dapat menghambat *Staphylococcus aureus* tapi tidak dapat mematikannya, artinya terdapat perbedaan yang sangat besar antara kadar hambat minimal dan kadar letal minimal suatu obat antimikroba. Toleransi kadang disebabkan oleh adanya proses aktivasi enzim autolitik dalam dinding sel, (4) plasmid dapat pula

membawa gen resistensi terhadap tetrasiklin, eritromisin, dan aminoglikosida (Jawetz *et al.*, 1996).

2.1.3 Struktur Antigen

Dinding sel bakteri gram positif terdiri dari banyak lapis peptidoglikan dan *technoid acids*. Fungsi *technoid acids* adalah sebagai regulator sirkulasi keluar masuknya kation pada sel serta mencegah rusaknya dinding sel saat pertumbuhan sel. (Midlandstech, 2011).

Protein A merupakan komponen dinding sel kebanyakan strain *Staphylococcus aureus* yang terikat pada bagian Fc molekul IgG, kecuali IgG3. Bagian Fab pada IgG yang terikat pada protein A bebas berikatan dengan antigen spesifik. Beberapa strain *Staphylococcus aureus* mempunyai simpai yang dapat menghambat fagositosis oleh limfosit polimorfonuklear, kecuali kalau ada antibodi spesifik. Kebanyakan strain *Staphylococcus aureus* mempunyai koagulase atau faktor penggumpal pada permukaan di dinding sel. Koagulase berikatan secara non-enzimatik dengan fibrinogen sehingga bakteri beragregasi (Melnick *et al.*, 1996).

2.1.4 Toksin dan Enzim

Staphylococcus dapat menyebabkan penyakit baik melalui kemampuannya untuk berkembang biak dan menyebar luas di jaringan serta dengan cara menghasikan berbagai substansi ekstraseluler. Beberapa substansi tersebut adalah enzim, (Brooks *et.al*, 2007).

a. Katalase

Katalase mengubah hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen. Uji katalase membedakan *staphylococcus*, yang positif, dengan *streptococcus* yang negatif

b. Koagulase

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

c. Hialuronidase

Hialuronidase menjadi bakteri bersifat invasif, tapi sifat ini terjadi pada fase awal dari infeksi dan cepat dinetralkan pada reaksi peradangan.

d. Staphylokinase

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

e. Protease

Enzim ini bersifat proteolitik dan dapat menyebabkan nekrosis pada jaringan yang diinvasi, termasuk jaringan tulang (Dzen, 2003 and Brooks *et.al*, 2007).

f. Lipase

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

g. Fosfatase

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

h. DNAase

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

i. Eksotoksin

Alpha toxin (hemolisin) adalah protein heterogen yang dapat melisis eritrosit, merusak trombosit, pembuluh darah, dan mungkin identik dengan faktor letal dan faktor dermonekrotik eksotoksin. *Beta toxin* merusak spingomyelin dan bersifat racun untuk berbagai jenis sel, termasuk sel darah merah manusia. *Delta toxin* bersifat non toxin dan dapat merusak eritrosit manusia dan kuda (Brooks *et al.*, 2007 and Dzen, 2003).

j. Enterotoksin

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

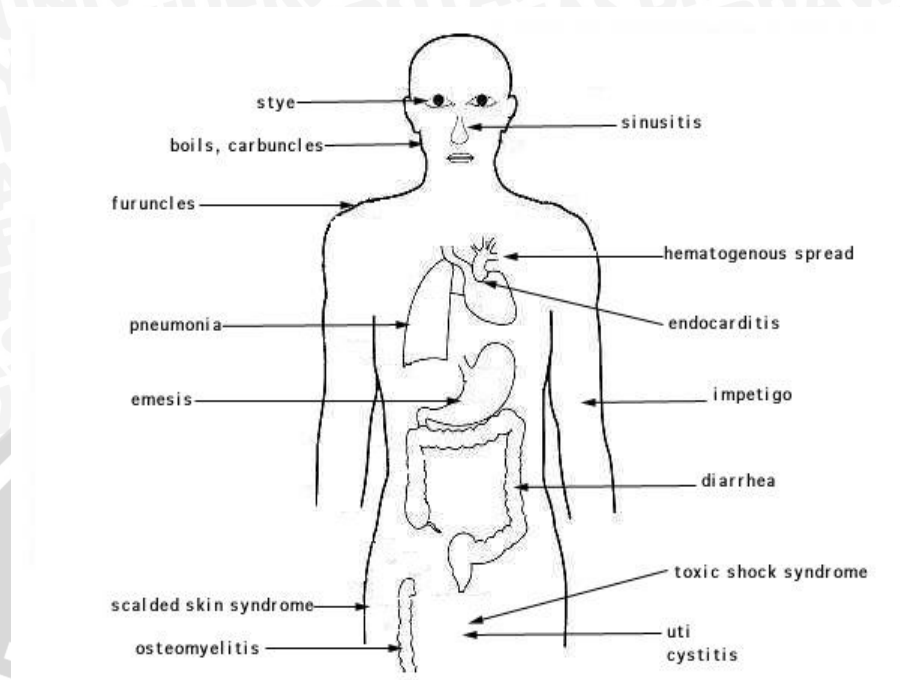
2.1.4 Patogenesis

Kemampuan patogenetik strain *Staphylococcus aureus* tertentu merupakan efek gabungan faktor-faktor ekstraseluler, toksin, serta sifat invasif strain tersebut. *Staphylococcus aureus* yang patogen dan invasif cenderung menghasilkan koagulase dan pigmen kuning, dan bersifat hemolitik. *Staphylococcus aureus* yang berada di hidung dan pada kulit orang sehat merupakan patogen oportunistik yang hanya menginfeksi jaringan atau bagian tubuh yang rusak atau pada orang dengan imunitas yang rendah. *Staphylococcus aureus* yang patogen dilengkapi dengan enzim (koagulase, lipase, esterase) dan toksin untuk dapat hidup bertahan pada jaringan host. Lesi yang disebabkan *Staphylococcus aureus* dikarenakan invasi pada folikel rambut dan kelenjar lemak oleh enzim lipase, esterase, koagulase, *alpha toxin* dan leukosidin yang melawan reaksi host dan fagositosis. Bahkan setelah fagositosis, destruksi intraseluler yang difasilitasi oleh komplemen berlangsung tidak sempurna. Resistensi ini dapat menyebabkan infeksi yang kronis (Jawetz *et al.*, 1996).

2.1.5 Patologi

Ciri khas lesi *Staphylococcus aureus* adalah furunkel atau abses setempat lainnya. Koloni *Staphylococcus aureus* yang berada dalam folikel rambut dapat menimbulkan nekrosis jaringan (faktor dermonekrotik). Enzim koagulase dihasilkan dan mengkoagulasi fibrin di sekitar lesi dan di dalam saluran getah bening, mengakibatkan pembentukan dinding yang membatasi proses peradangan. Dinding ini diperkuat oleh penumpukan sel radang dan akhirnya terjadi fibrosis jaringan. Di tengah-tengah lesi, terjadi pencairan jaringan nekrotik (dibantu hipersensitivitas tipe lambat) dan abses mengarah pada daerah yang daya tahannya paling kecil. Setelah cairan di tengah cairan nekrotik keluar, rongga secara pelan-pelan diisi dengan jaringan granulasi dan akhirnya diikuti oleh proses penyembuhan (Gemmell *et al.*, 2006).

Pada tipe infeksi invasif, untuk tetap berada di tempat setelah penetrasi ke dermis dan mukosa akan tampak karakteristik berupa purulen, seperti furunkel, karbunkel, infeksi luka, sinusitis, otitis media, dll. Tipe ini juga dapat bermanifestasi sebagai post-operatif atau post-traumatik osteomyelitis, postinfluenza pneumonia. Keracunan makanan akibat enterotoksin *S. aureus* akan menimbulkan gejala seperti mual, muntah, dan diare yang masif. Terdapat pula tipe infeksi campuran seperti pada *Ritter disease*, *pemphigus neonatorum*, dan *bullous impetigo*. Penyakit-penyakit ini disebabkan oleh strain *S. aureus* yang memproduksi eksofoliatin yang menginfeksi permukaan kulit dan menghasilkan TSST-1 yang menyebabkan toksik syok sindrom. Gejalanya berupa hipotensi, demam, dan scarlatiniform rash (Kayser *et al.*, 2005)



Gambar 2.2. Lokasi Infeksi dan Penyakit karena *Staphylococcus aureus* (Todar, 2008)

Staphylococcus aureus juga menyebabkan penyakit melalui kerja toksin, tanpa memperlihatkan infeksi invasive. Bula eksfoliatif (sindroma lepuh kulit) disebabkan oleh toksin eksfoliatif. Sindroma syok toksik berhubungan dengan Toksin Syok Sindrom Toksik –I (TSST-1) (Jawetz *et al.*, 1996).

2.1.6 Diagnosis Laboratorium

2.1.6.1 Bahan

Bahan isolat *Staphylococcus aureus* berasal dari usapan permukaan, nanah, darah, aspirat trakea, atau cairan serebrospinal. Pemilihan bahan untuk biakan bergantung pada lokalisasi proses infeksi (Jawetz *et al.*, 1996).

2.1.6.2 Biakan

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

2.1.6.3 Uji Tes Katalase

Hidrogen peroksida 3 % sebanyak 0,2 mL dituangkan ke dalam tabung reaksi. Sedikit biakan bakteri diambil dengan menggunakan ose, dan dipaparkan ke atas permukaan H₂O₂ dalam tabung reaksi. Tabung reaksi kemudian digoyangkan dengan pelan dan diamati dalam waktu 10 detik. Pembentukan gelembung udara (pelepasan oksigen) menunjukkan tes positif. Tes juga dapat dilakukan dengan menuangkan larutan hidrogen peroksida di atas bakteri yang tumbuh subur pada *slant agar* dan meneliti gelembung yang muncul (Jawetz et al., 1996).

2.1.6.4 Uji Tes Koagulase

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

pembekuan dalam waktu 1-4 jam, menandakan tes itu positif. Kepentingan dari tes ini adalah untuk membedakan antara *staphylococcus* koagulase positif (*Staphylococcus aureus*) dan *staphylococcus* koagulase negatif. Semua *staphylococcus* yang bersifat koagulase positif dianggap patogen bagi manusia (Brooks et al., 2007).

2.1.6.5 Tes Kepekaan Antibiotika

Tes kepekaan antibiotika dengan metode dilusi medium atau difusi agar plate sebaiknya dilakukan secara rutin pada isolat *staphylococcus* yang berasal dari klinik. Resistensi terhadap penisilin G dapat diperkirakan dengan tes β -lactamase positif. Sekitar 90% *Staphylococcus aureus* akan menghasilkan β lactamase. Resistensi terhadap nafsilin terjadi pada 10-20% isolat *Staphylococcus aureus*. Resistensi nafsilin berkorelasi dengan adanya gen *Mec-A* yang menyandi protein terikat penisilin yang tidak dipengaruhi oleh antibiotika ini. Gen dapat dideteksi dengan menggunakan *Polymerase Chain Reaction* (PCR), tetapi hal ini tidak berguna karena *staphylococcus* yang tumbuh pada *Muller Hinton Agar* (mengandung 4% NaCl dan 6 μ g/mL oksasilin), secara khas mengandung gen *Mec-A* dan resisten terhadap oksasilin (Jawetz et al., 1996).

2.1.6.6 Tes Serologis dan Penentuan Tipe

Antibodi terhadap asam teikoat dapat dideteksi pada infeksi *Staphylococcus aureus* yang kronis (misalnya endokarditis). Tes serologis ini hampir tidak mempunyai nilai praktis (Dzen dkk, 2003).

Pola kepekaan antibiotika dapat membantu untuk melacak infeksi *Staphylococcus aureus* dan menentukan apakah isolat bakteri dari biakan darah

mewakili bakteremia yang disebabkan strain yang sama, yang berasal dari satu tempat infeksi.

Penentuan tipe faga hanya dipakai untuk melacak infeksi dalam penelitian epidemiologi pada wabah infeksi *Staphylococcus aureus* yang luas, yang dapat terjadi di rumah sakit (Jawetz *et al.*, 1996).

2.1.7 Transmisi dan Pengendalian

Staphylococcus aureus adalah bakteri patogen oportunistik yang dapat ditemukan dimana-mana. Sumber utama infeksi adalah luka-luka pada manusia, alat-alat medis yang terkontaminasi bakteri, saluran pernapasan, serta kulit manusia. Penyebaran infeksi melalui kontak langsung bertambah penting bila terjadi di rumah sakit, karena bakteri yang mengkolonisasi sebagian besar karyawan dan penderita bersifat resisten terhadap antibiotika. Kebersihan, higienitas, dan penanganan lesi secara aseptik dapat mengendalikan penyebaran bakteri dari lesi, tetapi penanganan tersebut sulit dilakukan bila sumber infeksi berasal dari karier (Jawetz *et al.*, 2010).

Daerah yang paling rawan terhadap infeksi *Staphylococcus aureus* di rumah sakit adalah kamar perawatan bayi baru lahir, unit perawatan intensif, ruang bedah, dan bagian kemoterapi kanker. *Staphylococcus aureus* patogen “epidemic” masuk secara besar-besaran ke daerah-daerah ini dan dapat menyebabkan infeksi nosokomial yang berbahaya. Karyawan dan pengunjung dengan lesi *Staphylococcus aureus* yang aktif dan karier mungkin harus dilarang memasuki daerah ini. Pada orang-orang ini, pemakaian antiseptik topikal di hidung atau daerah perineal dapat mengurangi penyebaran bakteri. Rifampin yang diberikan bersama dengan obat anti *staphylococcus* oral yang lain kadang-

kadang dapat menekan keadaan karier dalam jangka panjang dan mungkin dapat menyembuhkan karier ini; bentuk ini dicadangkan untuk karier *staphylococcus* yang sulit diatasi dengan cara lain karena *staphylococcus* cepat resisten terhadap rifampin. Selain itu, antiseptik seperti heksaklorofen dapat dipergunakan pada kulit bayi baru lahir untuk menghilangkan koloni *staphylococcus* tetapi sifat toksisitasnya membuat antiseptik ini tidak digunakan secara luas (Jawetz *et al.*, 1996).

2.2 Biofilm

2.2.1 Pengertian Biofilm

Biofilm merupakan komunitas mikroorganisme kompleks yang menempel pada permukaan substrat, diliputi oleh matriks eksopolisakarida mikroba, dan berbentuk sebuah struktur tiga dimensi yang terorganisir (christophf,2003) Mikroorganisme yang tumbuh dalam biofilm dapat menyebabkan infeksi yang kronis, kolonisasi pada alat-alat medis, serta menimbulkan plak pada gigi. Baik permukaan abiotik maupun biotik seperti mineral, logam, jaringan hewan dan tumbuhan, paru dan usus, serta alat-alat medis menjadi subjek kolonisasi dan pembentukan biofilm (Jass *et al.*, 2003).

Penelitian tentang biofilm bermula pada tahun 1650, ketika Anthony Von Leeuwenhoek pertama kali menyebutkan biofilm pada tulisannya. Lalu pada 1942, Zobell dapat mendefinisikan biofilm sebagai komunitas prokariotik multiseluler yang berasal dari lingkungan. Namun demikian, biofilm baru disadari keberadaannya oleh peneliti pada tahun 1970. Ketika itu, Costerton menunjukkan peran signifikan biofilm pada penyakit infeksi. Selanjutnya pada awal 90-an, terbukti bahwa biofilm berperan penting dalam kejadian infeksi alat-alat medis.

Biofilm dikaitkan dengan kejadian resistensi terhadap antibiotika dan ketahanan terhadap sistem imunitas seluler dan humoral *host*. Untuk mengendalikan biofilm, perlu adanya pengetahuan mengenai struktur biofilm, proses pembentukan biofilm, dan proses regulasi di tingkat molekuler (Pace *et al.*, 2006).

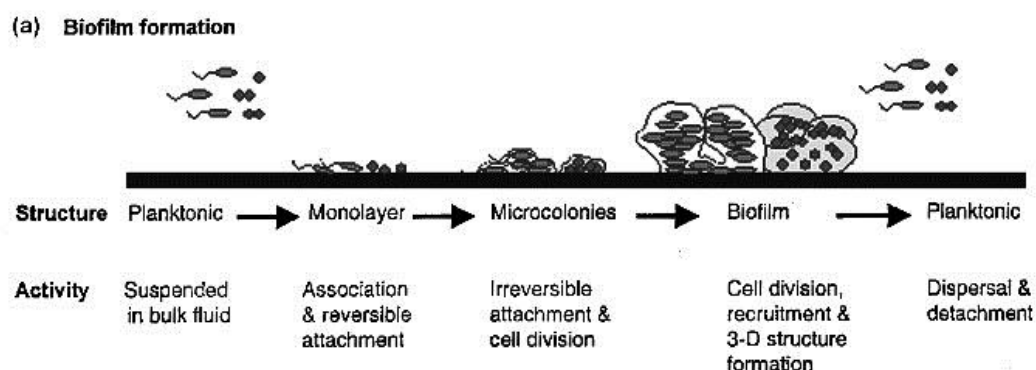
2.2.2 Struktur Biofilm

Terdapat keberagaman struktur dan arsitektur biofilm. Hal ini dipengaruhi oleh kondisi fisik (jenis permukaan dan pH), kondisi lingkungan (suhu, kelembaban, dll), nutrisi, dan status fisiologis mikroorganisme. Struktur biofilm secara umum yang dapat diidentifikasi meliputi: substrat dimana bakteri menempel; film yang terkondisi di atas substrat; matriks biofilm; cairan dan udara. Lapisan film terbentuk dari glikoprotein dan lipid, contohnya protein dari urine pada kateter atau sisa makanan pada gigi. Matriks biofilm merupakan bagian terpenting biofilm, terdiri dari sel bakteri, eksopolisakarida (EPS), dan air. Komponen utama matriks biofilm adalah air (95-99%), sel bakteri hanya sekitar 2-5%, sedangkan EPS sebanyak 2% dari total matriks. Substansi lainnya yang terkandung dalam matriks meliputi DNA, RNA, protein, dan enzim yang total berjumlah 2%. EPS merupakan struktur yang sangat terhidrasi, biopolimer berbentuk gel yang memerangkap bakteri menjadi struktur tiga dimensi yang menjadi karakteristik biofilm dan agregat bakteri. Komposisi EPS tidak hanya penting untuk perlekatan dan stabilisasi matriks, tetapi juga untuk membentuk heterogenitas dan meningkatkan ketersediaan nutrisi dalam biofilm. Pada lingkungan yang bernutrisi tinggi, bakteri dalam biofilm cenderung membentuk lebih banyak EPS dan sel, sehingga terbentuk struktur yang lebih tebal. Pada keadaan sedikit nutrisi, biofilm menjadi lebih tipis dan strukturnya terpisah-pisah

dengan kanal air, hal ini menyebabkan mudahnya perpindahan massa ke dalam biofilm. Lingkungan yang heterogen memudahkan bakteri untuk mengatur pertukaran nutrisi yang optimal, mengatur pembuangan sisa metabolisme, dan mengatur stabilitas sel, dengan kata lain heterogenisitas membantu pertumbuhan dan pertahanan bakteri.

Terdapat tiga variasi struktur matriks biofilm seperti yang dapat terlihat pada *Gambar 2.4* biofilm yang berbentuk mosaik heterogen, biofilm dengan matriks yang berongga (porous), dan biofilm dengan konstituen yang tebal. Mosaik heterogen adalah biofilm dengan bakteri yang membentuk lapisan basal setebal 5 mm dan struktur pilar besar setebal 100 mm. Biofilm seperti ini muncul pada kondisi rendah nutrisi dan mengandung bakteri patogen seperti *Legionella pneumoniae*. Pada matriks biofilm yang *porous* akan terbentuk struktur seperti jamur dengan kanal-kanal air. Struktur seperti ini memudahkan perpindahan materi dan nutrisi dari medium sekitar ke dalam biofilm. Variasi ketiga adalah biofilm dengan konstituen tebal, struktur ini biasanya ditemukan pada plak gigi. Perbedaan-perbedaan struktur tersebut terjadi akibat kombinasi dari faktor fisik, ketersediaan nutrisi, dan keberagaman populasi bakteri. Dalam ruang lingkup medis, biofilm lebih sering diidentifikasi dari fenotip dan aspek fisiologisnya daripada dari sisi struktur selnya (Jass *et al.*, 2003).

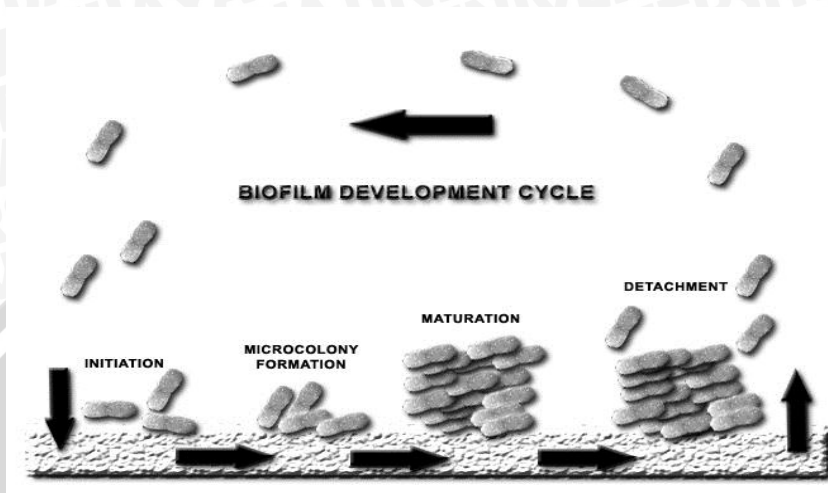
2.2.3 Pembentukan Biofilm



Gambar 2.4 Tahap-Tahap Pembentukan Biofilm (Jass *et al.*, 2003).

Pembentukan biofilm merupakan sebuah proses dinamis yang kompleks. Penelitian terdahulu menyebutkan bahwa biofilm dapat terbentuk dalam berbagai ekosistem dengan mekanisme pembentukan yang sama. Lapisan perlekatan biasanya mengandung air, lemak, albumin, matriks polimer ekstraseluler, atau nutrisi lain yang berasal dari lingkungan sekitar. Pada awalnya, bakteri melekat pada permukaan secara reversibel lalu menjadi perlekatan irreversibel, lama kelamaan biofilm menjadi struktur kompleks. Biofilm yang matur biasanya terdiri dari struktur berbentuk jamur yang mengendap didalam matriks polimer ekstraseluler atau glikokaliks, diantara struktur tersebut terbentuk sebuah kanal berisi air yang memungkinkan adanya aliran nutrisi dan oksigen ke dalam bagian dalam biofilm serta aliran ekskresi sisa metabolisme sel. Proses perlekatan bakteri pada permukaan ditentukan oleh berbagai variabel, seperti spesies bakteri, komposisi permukaan sel, jenis permukaan, persediaan nutrisi, hidrodinamik, komunikasi antar sel, dan gen pengatur biofilm. Setidaknya terdapat tiga fase yang terlibat dalam proses pembentukan biofilm. Fase pertama dicirikan sebagai proses penyebaran perlekatan sel pada

permukaan. Fase kedua merupakan masa pembelahan sel, sedangkan fase ketiga adalah masa agregasi sel-sel menjadi bentukan biofilm (Pace *et al.*, 2006).



Gambar 2.5 *Biofilm Development Cycle* (Bilecen dan Yildiz, 2009)

2.2.4 Faktor Lingkungan yang Mempengaruhi Pembentukan Biofilm

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

2.2.5 Pembentukan Biofilm pada Alat Medis

Kriteria pembentukan biofilm sangatlah luas, sehingga lingkungan yang cocok bagi mikroorganisme untuk berkoloni dan membentuk biofilm tidaklah terbatas. Ada sebagian dari daftar peralatan medis yang telah dibuktikan dapat menjadi tempat pertumbuhan biofilm. Biofilm yang terdapat pada peralatan medis sudah diteliti selama kurang lebih 20 tahun. Berbagai peralatan medis yang

sudah diteliti dapat menjadi tempat pertumbuhan biofilm adalah *prosthetic heart valves*, *central venous catheters*, *urinary catheters*, lensa kontak dan *intrauterine devices*. Untuk beberapa peralatan medis seperti *urinary catheters* dan lensa kontak, penelitian juga menjelaskan kemungkinan dari ragam variasi material untuk *bacterial adhesion* dan pembentukan biofilm (Donlan, 2002).

2.2.6 Tes Pembentukan Biofilm

2.2.6.1 Metode Tabung

Staphylococcus aureus yang sudah teridentifikasi ditanam dalam Nutrient Broth dan diinkubasi pada suhu 37°C semalam. Bakteri yang sudah tumbuh pada Nutrient Broth ditanam kembali pada NAP kemudian diinkubasi pada suhu 37°C semalam. Mikroba kultur semalam dimasukan ke tabung TSBglu (10mL) dan diinkubasikan 37°C selama 24 jam. Lalu tabung dicuci dengan PBS (pH 7,3) dan dikeringkan airnya. Tabung yang sudah dikeringkan diberi kristal violet (0,1%) dan kelebihan warna dibuang dan tabung dicuci dengan *deionized water*. Tabung dikeringkan dan dilihat form (Christensen *et al.*,2000)

2.2.6.2 Metode Congo Red Agar

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

2.2.6.3 Metode *Microtiter-Plate Test*

Untuk melakukan tes terhadap pembentukan biofilm oleh bakteri *S. aureus* dapat digunakan *microtiter-plate test*. Langkah-langkahnya adalah dengan memindahkan sebanyak 200 µl bakteri yang telah dikultur sebelumnya ke dalam sterile 96-well flat-bottomed plastic tissue culture plate. Well yang sebagai kontrol negatif hanya diisi oleh *fresh broth*. Kemudian semua plates diinkubasi secara aerobik selama 24 jam dalam suhu 37°C. Setelah itu, isi setiap well di aspirasi dan dicuci 3 kali menggunakan 250 µl *sterile physiological saline*. *Well-plates* di kocok secara kuat untuk menghilangkan seluruh bakteri yang tidak menempel. Sisa bakteri yang menempel difiksasi dengan 200 µl 99% methanol di setiap *well* selama 15 menit. Kemudian dikosongkan dan dikeringkan. Kemudian setiap *well* dilakukan proses pewarnaan dengan menggunakan 0,2 ml 2% *crystal violet* selama 5 menit. Lalu dilakukan pembilasan dengan menggunakan air keran dan dikeringkan. Untuk menganalisis secara kuantitatif pembentukan biofilm, ditambahkan 200 µl dari 1M HCl isopropanol di setiap well. Kemudian dilakukan pengukuran Optical Density (OD) pada 595 nm menggunakan spektrofotometer. (Nuryastuti, 2010).

2.3 Daun Teh (*Camellia Sinensis*)

2.3.1 Taksonomi



Gambar 3.1 Daun Teh (*Camellia sinensis*) (Doran, 1999).

Genus *Melaleuca* terdiri dari sekitar 643 spesies. Tanaman ini tumbuh tersebar di Australia, Indonesia, China, bahkan diseluruh dunia. Salah satu spesies yang sering ditemui di Indonesia adalah Daun Teh (*Camellia sinensis*) (Doran, 1999).

Kingdom : Plantae

Subkingdom : Tracheobionta

SuperDivision : Spermatophyta

Division : Magnoliophyta

Class : Magnoliopsida

Subclass : Dilleniidae

Superorder : Myrtanae

Order : Theales

Family : Teaceae

Genus : Camellia

Species : Camellia sinensis (L.) Kuntze (Radford et al., 2012)

2.3.2 Ciri Fisik Daun Teh (*Camellia Sinensis*)

Tanaman teh umumnya ditanam di perkebunan, dipanen secara manual, dan dapat tumbuh pada ketinggian 200 - 2.300 m dpl. Teh berasal dari kawasan India bagian Utara dan Cina Selatan. Daun Teh mempunyai ujung yang runcing. Pohon kecil, karena seringnya pemangkasan maka tampak seperti perdu. Bila tidak dipangkas, akan tumbuh kecil ramping setinggi 5 - 10 m, dengan bentuk tajuk seperti kerucut. Batang tegak, berkayu, bercabang-cabang, ujung ranting dan daun muda berambut halus. Daun tunggal, bertangkai pendek, letak berseling, helai daun kaku seperti kulit tipis, bentuknya elips memanjang, ujung dan pangkal runcing, tepi bergerigi halus, pertulangan menyirip, panjang 6 - 18 cm, lebar 2 - 6 cm, warnanya hijau, permukaan mengilap. Bunga di ketiak daun, tunggal dan beberapa bunga bergabung menjadi satu, berkelamin dua, garis tengah 3 - 4 cm, warnanya putih cerah dengan kepala sari berwarna kuning, harum. Buahnya berbentuk kotak, berdinding tebal, pecah memiliki ruang, daun yang masih muda berwarna hijau dan daun berwarna coklat kehitaman berarti

tua. Biji keras, 1 - 3. Pucuk daun muda yang digunakan untuk pembuatan minuman teh. (IPTEK, 2005)

2.3.3 Khasiat Daun Teh (*Camellia sinensis*)

Camellia sinensis, terutama daunnya, telah lama dipercaya memiliki efek antibakteri, anti peradangan, dan flouride yang baik buat gigi. Secara tradisional Daun Teh telah dipakai untuk mengobati nyeri, mengurangi bau mulut, sakit kepala, menurunkan kadar kolesterol dalam darah, dan sebagai minuman yang bermanfaat bagi tubuh manusia. Saat ini, pemanfaatan Daun Teh adalah berupa minuman atau sebagai suplement diet kolesterol. (Rosdiana, 2013)

Daun Teh juga mencegah bau mulut dan plak yang ada di gigi. (lee IP, 2008).

2.3.4 Kandungan Kimia Daun Teh (*Camellia sinensis*)

Pada penelitian sebelum nya, bahwa Daun Teh mengandung kafein (2 - 3%), theobromin, theofilin, tanin, xan-thine, adenine minyak asiri, kuersetin, naringenin, dan natural fluoride. Tanin mengandung zat epigallocatechin galat, yang mampu mencegah kanker lambung dan kerongkongan. Setiap 100 g Daun Teh mempunyai kalori 17 kJ dan mengandung 75 - 80% air, polifenol 25%, protein 20%, karbohidrall, 4%, kafein 2,5 - 4,5%, serat 27%, dan pektin 6. Dari hasil penelitian, flavonoid yang merupakan antloksidan polifenol pada teh mampu mernperkuat dinding sel darah merah dan mengatur permeabilitasnya, mengurangi kecenderungan trombosis, dan menghambat oksidasi LDL sehingga mengurangi terjadinya proses Atherosklerosis di pembuluh darah yang

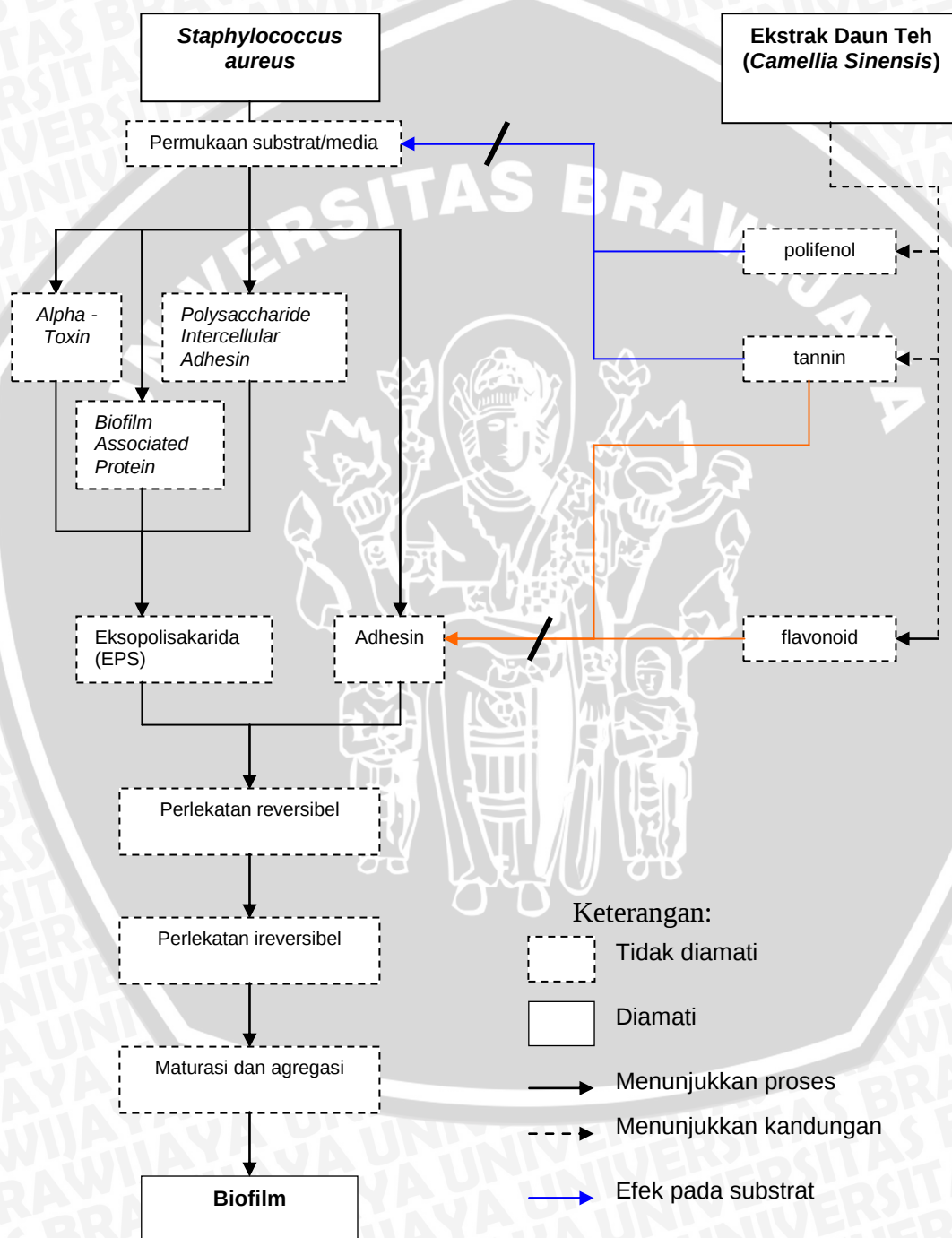
selanjutnya akan mengurangi risiko kematian akibat penyakit jantung koroner
(Endyah Liestyartic, 1986).



BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 3.1 Kerangka konsep penelitian

Pembentukan biofilm dimulai ketika bakteri *S.aureus* menempel pada permukaan media atau substrat. Bakteri kemudian melakukan perlekatan secara reversible dan membentuk mikrokoloni. *S.aureus* kemudian mengeluarkan zat yang disebut sebagai eksopolisakarida yang terdiri dari *Polysaccharide Intercellular Adhesin Alpha Toxin* dan *Biofilm Associated Protein*. EPS bersama dengan adhesin kemudian bertugas menahan matriks biofilm agar tetap menempel di permukaan (perlekatan reversibel), sehingga biofilm menjadi struktur tiga dimensi. Perkembangan biofilm terus berjalan sampai masa maturasi dimana rasio pertumbuhan biofilm setara dengan kematian sel. (Jass et al., 2003).

Pada penelitian ini digunakan ekstrak Daun Teh (*Camellia Sinensis*) yang diduga dapat menghambat pembentukan biofilm pada bakteri *S.aureus*. Bahan aktif penghambat biofilm pada Daun Teh adalah dari golongan polifenol, flavonoid dan tannin. Flavonoid menyebabkan tidak terjadinya perlekatan bakteri pada permukaan medium (Crespo et al., 2008). Polifenol menyebabkan kerusakan substrat serta penghambatan enzim sehingga bakteri tidak dapat tumbuh. Sedangkan tannin memiliki kemampuan menghambat pembentukan biofilm dengan cara menghambat terjadinya koagulasi plasma yang diperlukan oleh *S.aureus* untuk membentuk *fibrin-rich biofilm*. Penghambatan koagulasi plasma ini disebabkan oleh menurunnya konsentrasi ion kalsium, terhambatnya produksi enzim, dan terganggunya reaksi enzimatik pada bakteri *S.aureus* oleh karena pemberian tannin ini (Akiyama et al., 2001).

3.2 Hipotesis Penelitian

Ekstrak Daun Teh (*Camellia sinensis*) dapat menghambat pembentukan biofilm pada *Staphylococcus aureus*.



BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan dan Desain Penelitian

Penelitian dilakukan dengan rancangan eksperimental laboratoris untuk mengetahui pengaruh ekstrak Daun Teh (*Camellia sinensis*) terhadap pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus*. Desain penelitian ini adalah *true experiment post-test only group design* dengan menggunakan metode tabung.

Kelompok kontrol adalah kelompok yang tidak mendapat perlakuan berupa pemberian ekstrak. Kelompok perlakuan adalah kelompok yang mendapat perlakuan berupa pemberian ekstrak dengan dosis 0.125 g/dL, 0.25 0.5g/dL, 1 g/dL, 1.5 g/dL

4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi dari penelitian ini adalah bakteri *Staphylococcus aureus*. Sampel penelitian ini diperoleh dari isolat *Staphylococcus aureus* pembentuk biofilm yang dimiliki Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.2.1 Pengulangan

Pada penelitian ini digunakan sampel *Staphylococcus aureus* strain pembentuk biofilm. Rumus untuk menghitung estimasi jumlah pengulangan yaitu (Notobroto, 2005):

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

$$(n-1)(6-1) \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

p : perlakuan → Dosis ekstrak Daun Teh (*Camellia sinensis*) (6 perlakuan) yaitu dosis 0 g/dL (kontrol positif), 0.125 g/dL, 0.25 0.5g/dL, 1 g/dL, 1.5 g/dL n pengulangan → Berdasarkan rumus banyaknya pengulangan yang dilakukan adalah minimal 4 kali.

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Pembuatan ekstrak Daun Teh dilakukan di Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang. Uji penghambatan biofilm dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian adalah konsentrasi ekstrak Daun Teh. Dalam penelitian ini digunakan konsentrasi 0.125 g/dL, 0.25 0.5g/dL, 1 g/dL, 1.5 g/dL.

4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah pembentukan biofilm oleh *Staphylococcus aureus*.

4.5 Definisi Operasional

1. *Staphylococcus aureus* adalah bakteri Gram positif berbentuk kokus, bergerombol seperti buah anggur, menunjukkan tes katalase positif dan tes koagulase positif, membentuk koloni berwarna kuning emas pada *Nutrient Agar Plate*. *Staphylococcus aureus* yang dipakai dalam penelitian ini adalah *Staphylococcus aureus* strain pembentuk biofilm yang diidentifikasi dengan metode tabung.
2. Biofilm adalah agregat multiseluler yang membentuk lapisan padat pada permukaan suatu substrat/media. Pada penelitian ini biofilm dibentuk oleh *Staphylococcus aureus* pada media tabung yang ditandai dengan bentuk cincin pada permukaan tabung.
3. Ekstrak Daun Teh adalah hasil ekstraksi cair Daun Teh dengan pelarut etanol 96%. Ekstrak yang didapat dianggap memiliki kandungan ekstrak sebesar 100%. Daun Teh berasal dari kota Batu. Daun dipilih yang muda, segar, berwarna hijau dari kebun teh sebanyak 1 kg.
4. Metode tabung adalah metode deteksi biofilm dengan menggunakan tabung.
5. *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC) adalah konsentrasi ekstrak Daun Teh terendah yang mampu menghambat pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus* yang ditandai dengan tidak tampaknya bentuk cincin dan lapisan ungu kebiruan pada dinding dan dasar tabung.
6. *Mean Gray Value* adalah skala intensitas warna pada program *Adobe Photoshop Creative Suite 3*. Skala berkisar antara 0 – 255. Angka

mendekati 0 menunjukkan kepekatan warna yang tinggi. Sebaliknya, angka mendekati 255 menunjukkan kepekatan warna yang rendah.

4.6 Instrumen Penelitian (Bahan dan Alat)

4.6.1 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Daun Teh (*Camellia sinensis*)

1. *vacuum oven* atau *drying oven*
2. timbangan analisis (*Analytical balance*)
3. *Beaker glass*
4. *Buchner funnel* (corong *Buchner*),
5. *lundum/soxhlet extraction thimble* (tabung berpori untuk memasukkan sampel) dengan ukuran pori 10-15 mm yang sesuai dengan ekstraktor *soxhlet water bath*
6. labu penampung (*collection flask*) berukuran 250 mL
7. evaporator dengan vakum
8. *desiccator*
9. *water pump* dan *water bath*
10. ekstraktor *soxhlet*, yang terdiri dari gelas *soxhlet* dengan ukuran 100 mL.
11. Pelarut methanol 80%

4.6.2 Alat dan Bahan Identifikasi Bakteri Pembenihan Murni

1. isolate *Staphylococcus aureus*
2. NAP (*Natrium Agar Plate*)
3. bahan tes Katalase : H_2O_2 3 %

4. bahan tes Koagulasi : plasma darah dengan EDTA
5. bahan pengecatan Gram : kristal violet, lugol, alkohol 96 %, dan safranin
6. minyak emersi, alat ose, dan mikroskop
7. lampu spiritus
8. tabung reaksi.

4.6.3 Alat dan Bahan Deteksi Biofilm

1. *Trypticase Soy Broth* (TSB) dengan 1% glukosa (TSBglu)
2. biakan *Staphylococcus aureus* pembentuk biofilm
3. tabung reaksi
4. *Phosphate Buffer Saline* (PBS) PH 7,3
5. kristal violet
6. *deionized water*
7. kawat ose
8. pipet
9. *Beaker glass*

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Persiapan Daun Teh (*Camellia sinensis*)

4.7.1.1 Ekstraksi dan Evaporasi (Ehrman, 1994)

A. Pengolahan Daun Teh (*Camellia sinensis*)

1. Daun Teh dicuci dari kotoran, tiriskan, lalu keringkan dari air, selanjutnya ditimbang dengan perbandingan (1 : 3) 1 Kg bahan dalam 3 Ltr pelarut

2. Daun dikeringkan dengan sinar matahari (diangin-anginkan).
3. Daun Teh yang sudah kering di hancur kan dengan menggunakan blender.

B. Prosedur Ekstraksi

1. Timbang bahan yang akan di esktrak dengan jumlah tertentu.
2. Masukkan ke dalam beker gelas dan tuangkan pelarut dengan perbandingan (1:3) 1 Kg bahan dalam 3 Ltr pelarut.
3. Rendam bahan dan diamkan pada suhu kamar selama minimal 2 x 24 jam dengan sesekali di aduk (proses ekstrak dapat di percepat dengan ultrasonic)
4. Setelah 2 x 24 jam, saring bahan menggunakan kertas saring *Whatman* no 40 dan pelarut yang di peroleh (yang mengandung bahan aktif) di evaporasi untuk menghilangkan sisa pelarut.
5. Oven sisa pelarut yang masih tersisa pada suhu $40 - 50\text{ C} \pm 1$ jam, pastikan hingga bahan benar-benar tidak mengandung pelarut.
6. Hasil akhir dari proses evaporasi ini adalah terbentuknya ekstrak Daun Teh dalam bentuk cair.

4.7.2 Persiapan Biofilm *Staphylococcus aureus*

4.7.2.1 Identifikasi *Staphylococcus aureus*

A. Pemeriksaan Mikroskopis (Forbes *et al*, 2007)

1. Pembuatan sediaan slide

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

- Teteskan satu ose aquades steril pada gelas objek. Ambil sedikit biakan kuman menggunakan ose, selanjutnya suspensikan dengan aquades pada gelas objek dan ratakan. Untuk sediaan cair tidak perlu disuspensikan dengan aquades.
- Biarkan sediaan kering di udara, kemudian lakukan fiksasi dengan cara melewatkan sediaan di atas api.

2. Pewarnaan Gram

- Tuang sediaan pada gelas objek dengan kristal violet selama 1 menit. Buang sisa kristal violet dan bilas dengan air.
- Tuang sediaan dengan lugol selama 1 menit. Buang sisa lugol dan bilas dengan air.
- Tuang sediaan dengan alkohol 96% selama 5-10 detik atau sampai warna cat luntur. Buang sisa alkohol dan bilas dengan air.
- Tuang sediaan safranin selama $\frac{1}{2}$ menit. Buang sisa safranin dan bilas dengan air.
- Keringkan sediaan dengan kertas penghisap
- Lihat di bawah mikroskop dengan lensa objektif perbesaran 100x

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

- Tuangkan 0,2 mL H_2O_2 3 % ke dalam tabung reaksi.
- Ambil sedikit biakan bakteri dengan ose.
- Usapkan ose pada dinding tabung di atas permukaan cairan.
- Tutup tabung reaksi, lalu goyangkan agar cairan H_2O_2 3 % dapat mengenai usapan biakan bakteri.
- Amati pembentukan gelembung dalam waktu 10 detik.

- Hasil positif bila ada gelembung
- Hasil negatif bila tidak ada gelembung

Hasil keseluruhan:

Hasil positif menunjukkan *Staphylococcus sp.*

Hasil negatif menunjukkan *Streptococcus sp.*

C. Tes Koagulase (Forbes et al, 2007)

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

Hasil keseluruhan:

Hasil positif menunjukkan *Staphylococcus aureus*

Hasil negatif menunjukkan *Staphylococcus koagulase negatif*

4.7.2.2 Pembuatan Perbenihan Cair Bakteri

Staphylococcus aureus yang sudah ditanam dalam medium *Nutrient Agar Plate* (NAP) dikultur dalam medium *Nutrient Broth* (NB) selama 24 jam dalam inkubator 37°C. Suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* pada medium

NB dilakukan pengukuran spektrofotometri dengan panjang gelombang (λ) 610nm sehingga diketahui kepadatan bakterinya (OD = *Optical density*) yang setara dengan kepadatan bakteri 10^8 bakteri/mL. Kemudian dengan rumus pengenceran $N1 \times V1 = N2 \times V2$, kepadatan bakteri tersebut diencerkan satu kali dengan NaCl dan satu kali dengan TSBglu menjadi 10^7 bakteri/mL. Dasar penghitungannya sebagai berikut:

Apabila diperoleh OD bakteri hasil spektrofotometri = 0,38 (N1)

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

Volume keseluruhan dalam satu tabung = 10 mL (V2)

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

$$0,38 \times V1 = 0,1 \times 10$$

$$V1 = 1/0,38 = 2,63 \text{ mL}$$

- Suspensi bakteri sebanyak 2,63 mL diambil dan ditambah dengan 7,37 mL NaCl menjadi suspensi bakteri dengan kepadatan 10^8 bakteri/mL.
- Suspensi bakteri sebanyak 0,5 mL diambil dari kepadatan 10^8 bakteri/mL ditambah dengan 4,5 mL TSBglu menjadi suspensi dengan kepadatan 10^7 bakteri/mL.

4.7.2.3 Uji Deteksi Pembentukan Biofilm (metode tabung)

(Christensen *et al.*, 2000)

Staphylococcus aureus yang sudah teridentifikasi ditanam dalam *Nutrient Broth* dan diinkubasi pada suhu 37°C semalam. Bakteri yang sudah tumbuh pada *Nutrient Broth*, ditanam kembali pada NAP (sebanyak 40 μ L) kemudian diinkubasi pada suhu 37°C semalam. Mikroba kultur semalam

dimasukkan ke tabung *TSBglu* (10 mL) dan diinkubasikan 37°C selama 24 jam. Lalu tabung di cuci dengan PBS (pH 7,3) dan dikeringkan airnya. Tabung yang sudah dikeringkan diberi kristal violet (0,1%) dan kelebihan warna dibuang dan tabung dicuci dengan *deionized water*. Tabung dikeringkan dan dilihat formasi biofilmnya.

4.7.3 Uji Hambat Pembentukan Biofilm

1. Menyediakan 1 tabung steril untuk larutan ekstrak, dan 6 tabung besar untuk mencampurkan ekstrak dengan biakan bakteri dalam *TSBglu*.
2. Aquadest sejumlah 1 mL dimasukkan dalam masing-masing tabung kecil. Ekstrak Daun Teh (dalam bentuk cair) di masukkan dalam masing-masing tabung kecil.
3. Menyiapkan perbenihan cair perbenihan bakteri dengan konsentrasi kuman 1×10^8 CFU/mL.
4. Mengisi tabung besar no 1-5 dengan medium *TSBglu* 3,5 mL, untuk tabung besar no 6 diisi medium *TSBglu* 4,5 mL.
5. Perbenihan cair bakteri 1×10^8 CFU/mL 0.5 mL dimasukkan dalam tabung besar no 1-6. Sehingga dalam masing-masing tabung terbentuk perbenihan bakteri dengan konsentrasi 1×10^7 CFU/mL. Selanjutnya larutan ekstrak dalam tiap tabung kecil dicampurkan dalam tabung besar sehingga didapatkan larutan sebanyak 5 mL dengan konsentrasi akhir ekstrak Daun Teh (*Camallia sinensis*) pada masing-masing tabung sebagai berikut:

Tabung Besar 1 : 1.5 g/L Tabung Besar 4 : 0.25 g/dL

Tabung Besar 2 : 1 g/dL Tabung Besar 5 : 0.125 g/dL

- Tabung Besar 3 : 0.5 g/dL Tabung Besar 6 : 0 g/dL (kontrol positif)
6. Seluruh tabung diinkubasikan selama 24 jam dengan suhu 37°C.
 7. Setelah 24 jam, tabung dikeluarkan dari inkubator dan di cuci dengan PBS (pH 7,3) dan dikeringkan airnya.
 8. Tabung yang sudah dikeringkan diberi kristal violet (0,1%) 0,5 mL lalu kelebihan warna dibuang dan tabung dicuci dengan *deionized water*
 9. Tabung dikeringkan. Formasi biofilm yang terbentuk dilihat dan dicatat.

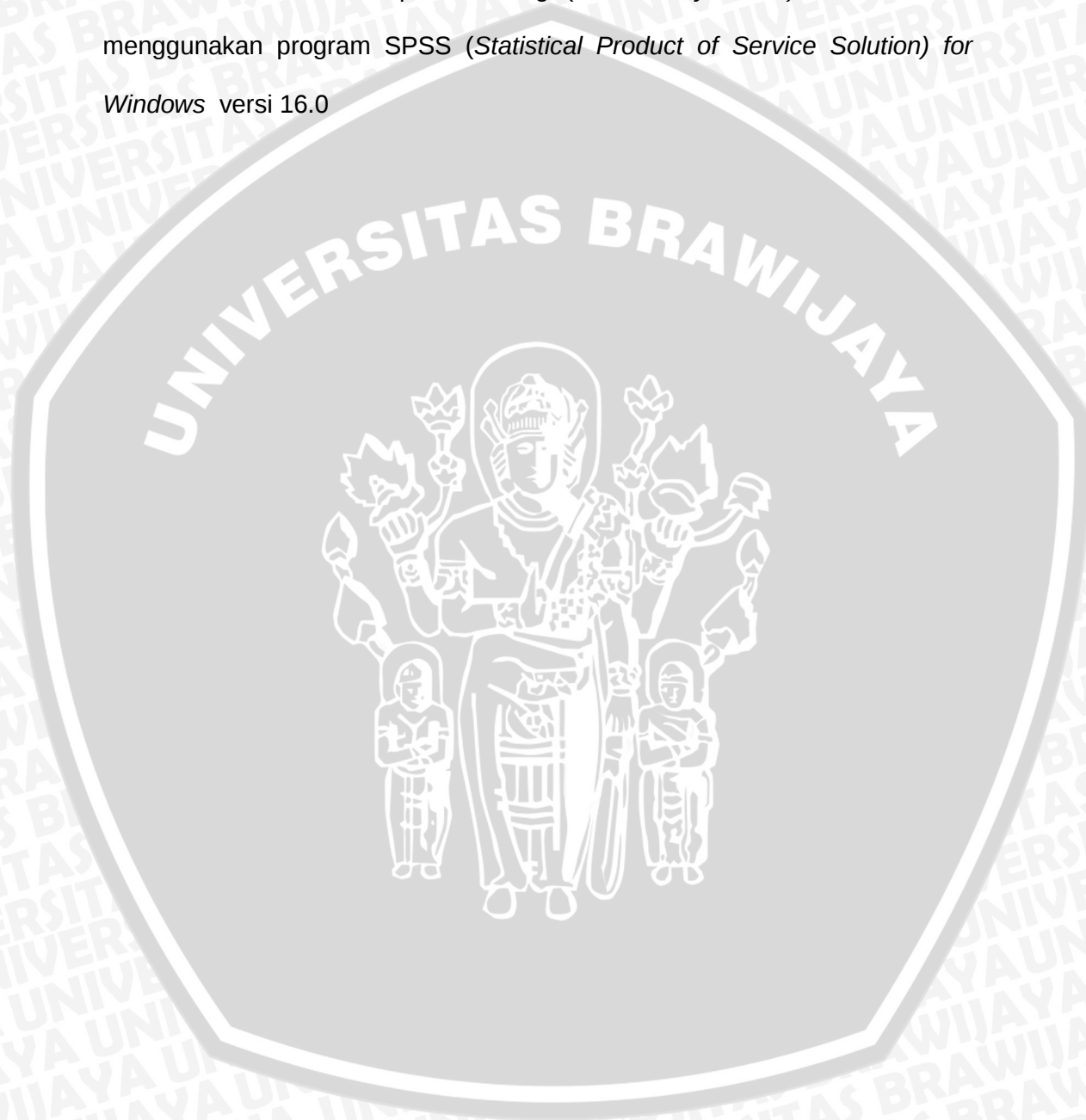
4.7.4 Pengukuran *Mean Gray Value*

Hasil pembentukan biofilm pada tabung difoto dengan menggunakan kamera *handphone iphone 8 megapixel* Untuk mengetahui intensitas warna pada area cincin dan dinding tabung pada masing-masing kelompok digunakan program aplikasi *Adobe Photoshop Creative Suite 3*. Langkah-langkahnya adalah dengan klik menu *Start* kemudian pilih *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 *mean* dari intensitas warna pengecatan tabung.

4.8 Analisis Data

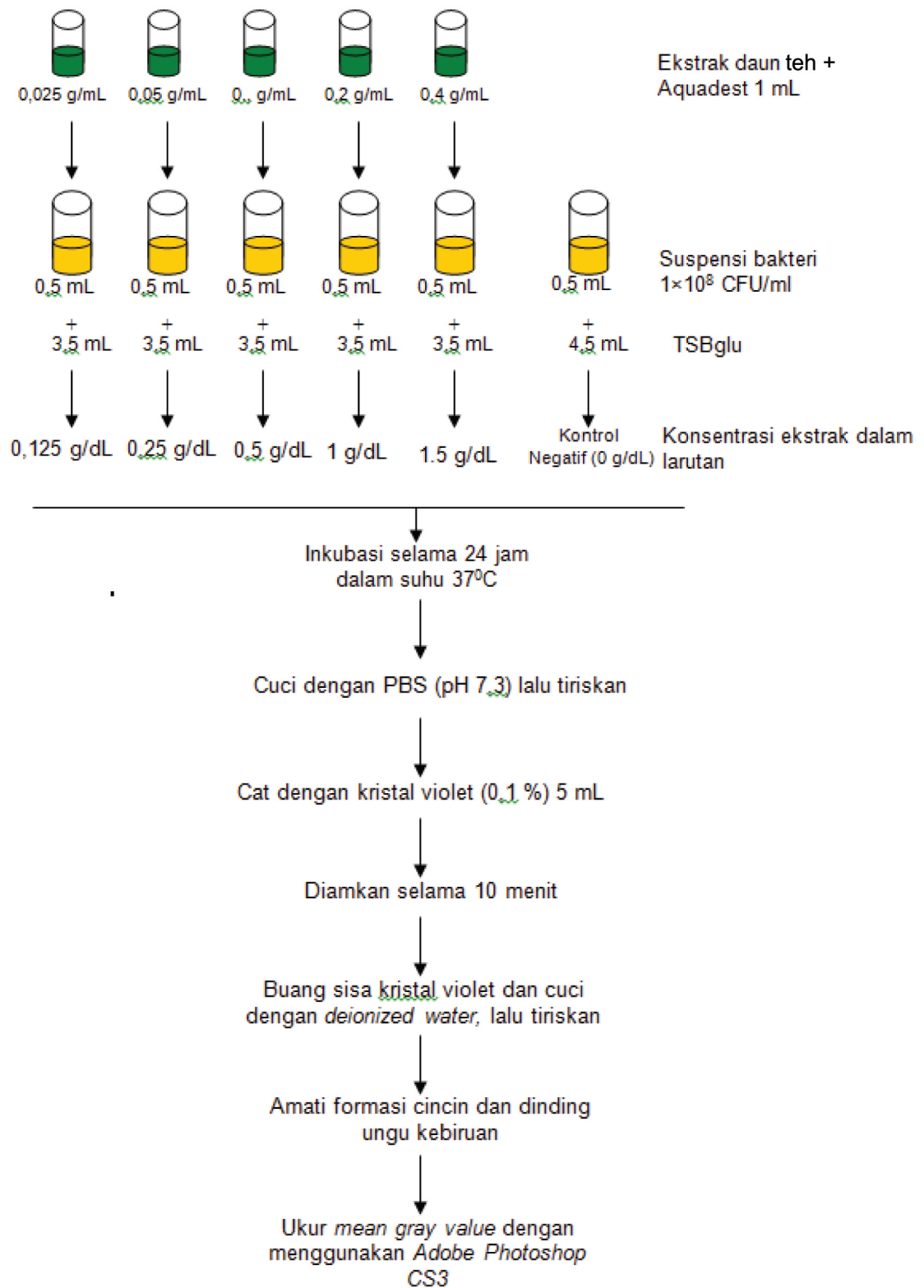
Analisis data yang digunakan adalah Uji *One Way ANOVA* dan Uji Korelasi *Pearson*. Uji *One Way ANOVA* dengan derajat kepercayaan 95 % ($\alpha = 0,05$) digunakan untuk mengetahui adanya perbedaan pengaruh antara berbagai konsentrasi ekstrak Daun Teh terhadap intensitas warna biofilm

pada tabung (*Mean Gray Value*). Sedangkan Uji Korelasi *Pearson* digunakan untuk mengetahui hubungan antara konsentrasi ekstrak Daun Teh terhadap intensitas warna biofilm pada tabung (*Mean Gray Value*). Analisis data menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) for Windows versi 16.0



4.9 Rancangan Operasional Penelitian

Uji hambat pembentukan biofilm



BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

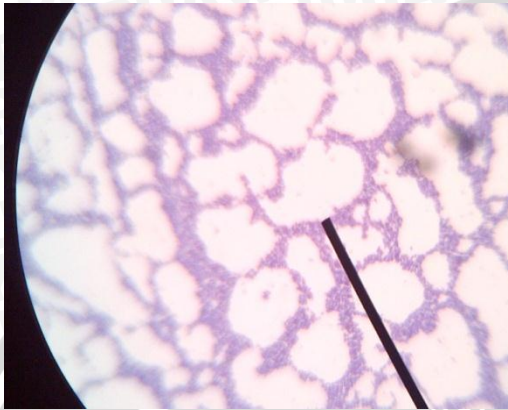
Penelitian ini menggunakan bakteri *S. aureus* yang didapat dari *stock culture* laboratorium Mikrobiologi FKUB. Tiap isolat dikultur ulang dalam medium *Trypticase Soy Agar* (TSA) kemudian dilakukan reidentifikasi bakteri dan uji deteksi pembentukan biofilm. Selanjutnya dilakukan uji efektifitas efek ekstrak Daun Teh terhadap pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus* pada isolat bakteri dengan menggunakan metode tabung dan dilakukan pengulangan sebanyak 4 kali.

5.1 Hasil Penelitian pada *Staphylococcus aureus*

5.1.1 Hasil Reidentifikasi Bakteri

Pada pewarnaan Gram dan pengamatan di bawah mikroskop dengan pembesaran 100 kali, didapatkan gambaran bakteri berbentuk bulat/*coccus* bergerombol seperti buah anggur, dan berwarna ungu yang menandakan bakteri kokus gram positif (Gambar 5.1). Tes katalase pada gelas objek menunjukkan adanya gelembung-gelembung *Staphylococcus sp.* (Gambar 5.2). Tes *Latex Agglutination* pada *test card* menunjukkan adanya penggumpalan dalam waktu kurang dari 10 detik yang menandakan *Staphylococcus aureus* (Gambar 5.3). Isolat bakteri ini juga diinkubasi pada *Chrom Agar Staphylococcus aureus* dan menghasilkan koloni bakteri yang berwarna merah muda menunjukkan koloni *S. aureus* (Gambar 5.4). Dari

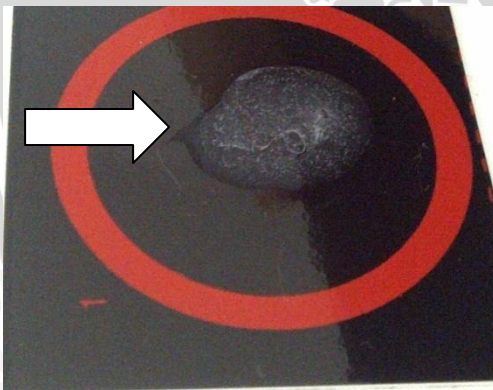
hasil-hasil tes tersebut dapat disimpulkan bahwa isolat yang diuji adalah bakteri *Staphylococcus aureus*.



Gambar 5.1 Pewarnaan gram, terlihat bakteri kokus gram positif. (pembesaran 100 kali)



Gambar 5.2 Tes Katalase Positif



Gambar 5.3 Tes Koagulase Positif



Gambar 5.4 Koloni *S. aureus* pada Chrom Agar

5.1.2 Hasil Uji Deteksi Pembentukan Biofilm

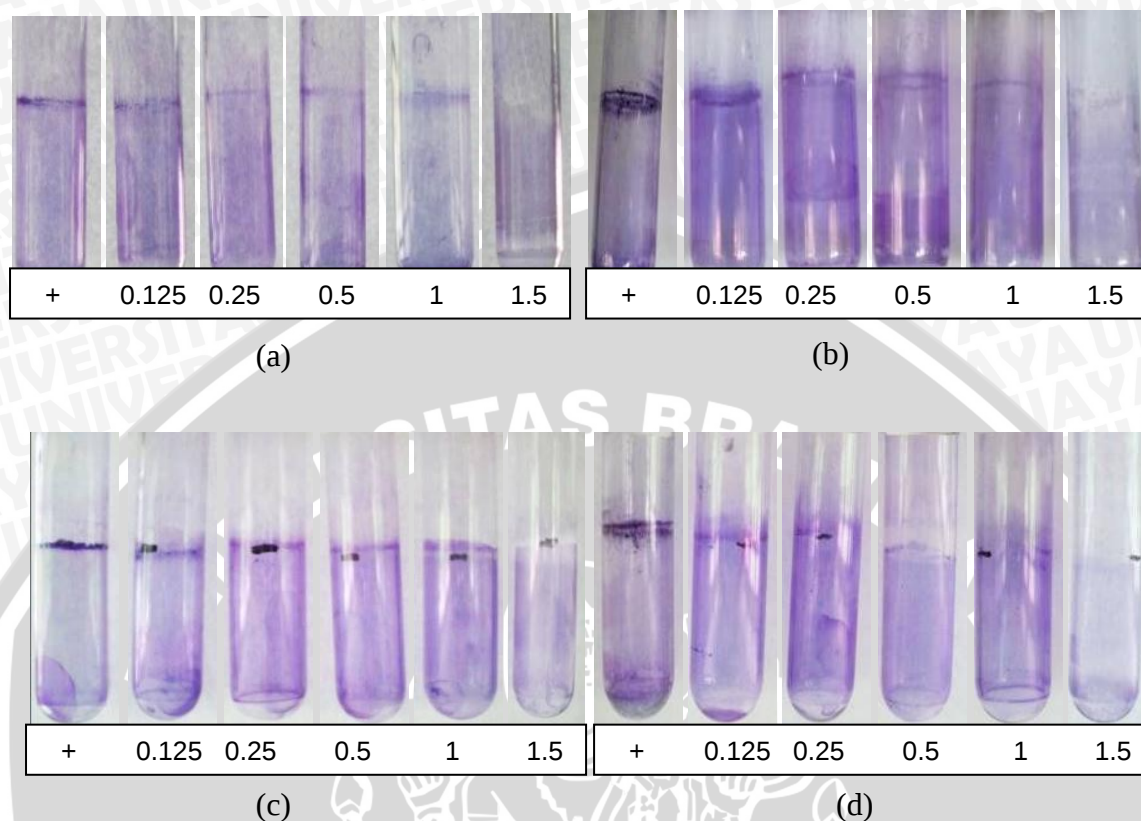
Untuk mendeteksi pembentukan biofilm digunakan medium *Congo Red Agar*. Setelah dilakukan inkubasi pada medium *Congo Red Agar* didapatkan koloni bakteri yang berwarna hitam, bulat, dan berkilau (Gambar 5.5). Bakteri tersebut menandakan *Staphylococcus aureus* pembentuk biofilm.



Gambar 5.5 Inkubasi pada *Congo Red Agar*

5.1.3 Hasil Uji Hambat Pembentukan Biofilm pada *Staphylococcus aureus*

Pada penelitian ini digunakan lima macam konsentrasi ekstrak Daun Teh (*Camellia sinensis*) yaitu 0.125 g/dL, 0.25 g/dL, 0.5g/dL, 1 g/dL, 1.5 g/dL serta konsentrasi 0 sebagai kontrol positif. Pengamatan langsung biofilm dinyatakan dalam tanda + (positif) atau – (negatif) berdasarkan ada atau tidaknya cincin dan dinding ungu kebiruan pada tiap tabung. Hasil uji hambat dapat dilihat pada metode tabung Gambar 5.6.



Gambar 5.6 Hasil Uji Hambat Pembentukan Biofilm
Keterangan:

- (a) Pengulangan 1
- (b) Pengulangan 2
- (c) Pengulangan 3
- (d) Pengulangan 4

Pengamatan terhadap pembentukan biofilm di masing-masing konsentrasi dan pengulangan dapat dilihat selengkapnya pada Tabel 5.1.

**Tabel 5.1 Hasil Pengamatan Langsung Uji Hambat Pembentukan Biofilm
(Kualitatif)**

Pengulangan	Konsentrasi					
	Kontrol positif	0.125	0.25	0.5	1	1.5
1	+	+	+	+	+	-
2	+	+	+	+	+	-
3	+	+	+	+	+	-
4	+	+	+	+	+	-

Keterangan:

+ = membentuk biofilm

- = tidak membentuk biofilm

Selanjutnya dilakukan pengamatan kuantitatif dengan mengukur intensitas warna pada masing-masing tabung untuk menilai efek hambat pembentukan biofilm pada masing-masing tabung. Pengukuran dilakukan dengan menggunakan program aplikasi *Adobe Photoshop CS3* sehingga didapatkan *Mean Gray Value* yang dinyatakan dalam skala 0 – 255. Hasil pengukuran selengkapnya dapat dilihat pada Tabel 5.2 dan Gambar 5.6.

**Tabel 5.2 Hasil Pengukuran Intensitas Warna Biofilm (*Mean Gray Value*)
(Kuantitatif)**

Konsentrasi	Pengulangan				Mean $\pm$ SD
	1	2	3	4	
Kontrol positif	107,9	93,1	101,9	96,8	99.955 $\pm$ 6.419
0.125	158,9	138,1	154	158,3	152.333 $\pm$ 9.757
0.25	157,8	142,5	161,6	160,1	155.519 $\pm$ 8.813
0.5	164,1	141,2	146,5	172,2	155.985 $\pm$ 14.582
1	164,2	151,1	134,8	179,3	157.324 $\pm$ 18.947
1.5	163,9	180,4	180,4	186,2	177.722 $\pm$ 19.589

5.2. Analisis Data

Hasil penelitian ini dianalisis menggunakan analisis statistik SPSS versi 16.0 untuk *Windows*. Data hasil pengukuran *Mean Gray Value* pada Tabel 5.2 dianalisis dengan menggunakan Uji *One Way ANOVA* yang dilanjutkan dengan analisis *Post-Hoc multiple comparison test* dan Uji Korelasi *Pearson*. Uji *One Way ANOVA* digunakan untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna

antar kelompok data. Analisis *Post-Hoc multiple comparison test* metode LSD untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara bermakna. Uji Korelasi *Pearson* dilakukan untuk membuktikan korelasi antara peningkatan dosis ekstrak ekstrak Daun Teh terhadap *Mean Gray Value*.

5.2.1 Uji One Way ANOVA

Sebelum menganalisa data *Mean Gray Value* dengan *One Way ANOVA* dilakukan pengujian syarat ANOVA untuk > 2 kelompok data tidak berpasangan, yaitu pengujian terhadap sebaran data (harus normal) dan varians data (harus sama). Setelah dilakukan uji normalitas, didapatkan bahwa data mempunyai sebaran yang normal yaitu $p = 0.573$ (uji Kolmogorov-Smirnov, $p > 0.05$) sehingga syarat Uji ANOVA terpenuhi. Syarat ANOVA lainnya adalah varian data harus sama, maka dilakukan uji homogenitas varian untuk menguji apakah varian data homogen atau tidak. Dari hasil uji homogenitas varian didapatkan $p = 0.163$ ($p > 0.05$) yang berarti bahwa varian antar perlakuan sudah homogen sehingga syarat Uji ANOVA terpenuhi.

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

5.2.2 Uji Post Hoc Multiple Comparison Test (LSD)

Analisis mengenai perbedaan rata-rata dari keempat kelompok dapat diketahui dalam Uji *Post Hoc Multiple Comparison*. Metode *Post Hoc* yang

digunakan adalah Uji *Least Significant Difference* (LSD). Indikator yang digunakan untuk melihat apakah perbedaan *Mean Gray Value* antar kelompok dianggap bermakna adalah nilai signifikansi pada tabel. Perbedaan dianggap signifikan jika nilai $p < 0,05$. Berdasarkan uji tersebut didapatkan hasil sebagai berikut :

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

Nilai p	Kontrol positif	0.125 g/dL	0.25 g/dL	0.5 g/dL	1 g/dL	1.5 g/dL
Kontrol positif	-	.000	.000	.000	.000	.000
0.125 g/dL	.000	-	.714	.674	.567	.008
0.25 g/dL	.000	.714	-	.957	.835	.018
0.5 g/dL	.000	.674	.957	-	.877	.020
1 g/dL	.000	.567	.835	.877	-	.028
1.5 g/dL	.000	.008	.018	.020	.028	-

Keterangan

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

Dari tabel diatas terlihat bahwa terdapat perbedaan *Mean Gray Value* yang bermakna ($p < 0,05$) pada setiap kelompok konsentrasi ekstrak (0.125 g/dL, 0.25 g/dL, 0.5 g/dL, 1 g/dL, 1.5 g/dL) bila dibandingkan dengan kontrol positif. Namun tidak ada perbedaan yang bermakna ($p > 0,05$) pada kelompok konsentrasi 0.125 g/dL, 0.25 g/dL, 0.5 g/dL, 1 g/dL bila saling dibandingkan antar masing-masing kelompok. Hal ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi 0,125 g/dL, 0.25 g/dL, 1 g/dL, dan 1.5 g/dL rata-rata *Mean Gray Value* yang terbentuk adalah tidak berbeda secara signifikan. Sedangkan pada kelompok konsentrasi 1.5 g/dL

terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$) terhadap kelompok konsentrasi lainnya.

5.2.3 Uji Korelasi *Pearson*

Selanjutnya, untuk mengetahui kekuatan hubungan antara peningkatan dosis pemberian ekstrak Daun Teh dan *Mean Gray Value*, dilakukan Uji Korelasi *Pearson*. Agar penafsiran dapat dilakukan sesuai dengan ketentuan, kita perlu mempunyai kriteria yang menunjukkan kuat atau lemahnya korelasi. Kriterianya sebagai berikut:

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

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

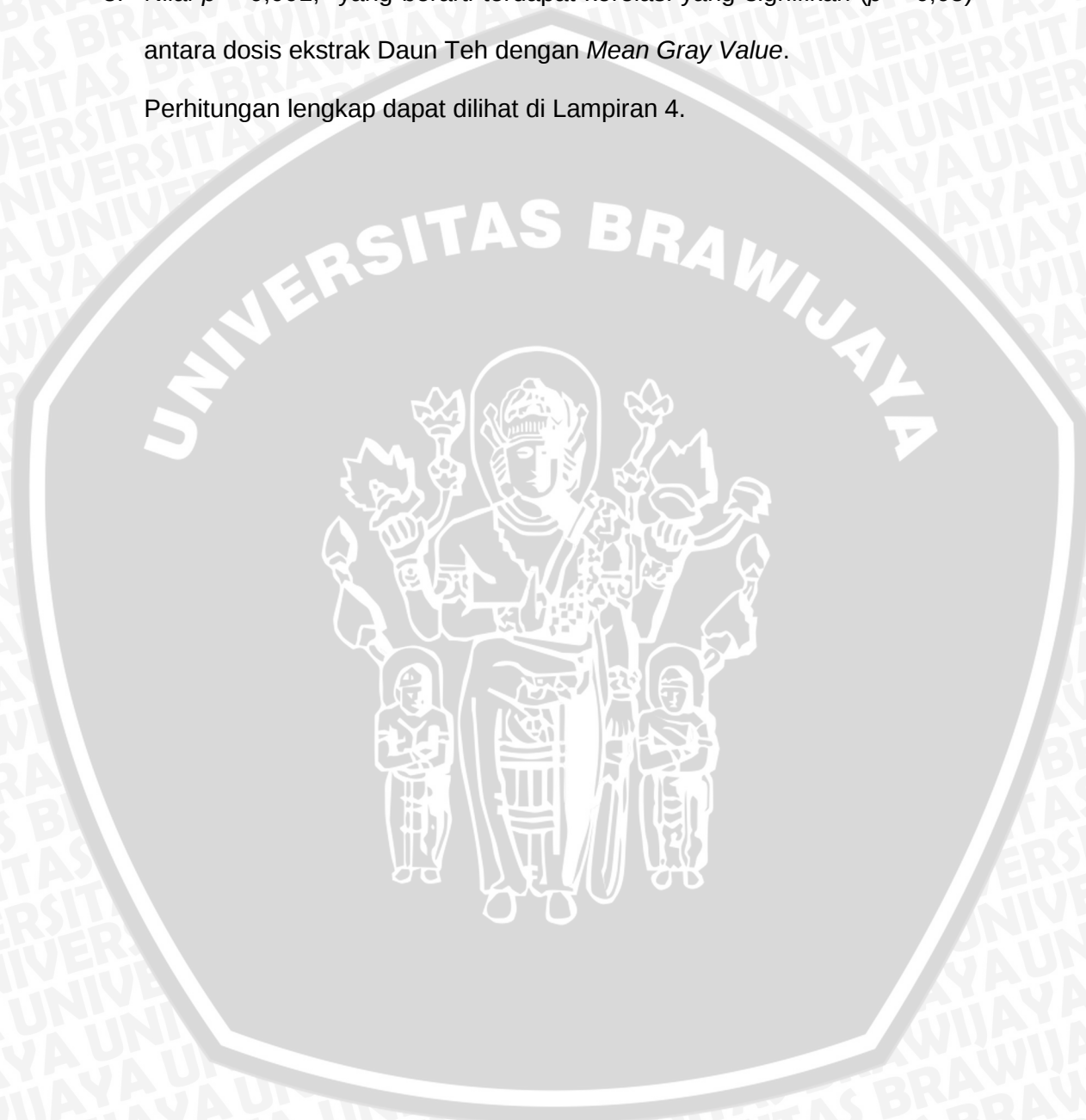
Signifikansi hubungan dua variabel dapat dianalisis dengan ketentuan, jika probabilitas atau signifikansi $< 0,05$, hubungan kedua variabel signifikan. Jika probabilitas atau signifikansi $> 0,05$, hubungan kedua variabel tidak signifikan.

Dari hasil perhitungan, didapatkan hasil sebagai berikut:

1. Kekuatan korelasi (r) = 0,637, yang berarti terdapat korelasi yang kuat antara dosis ekstrak Daun Teh dengan *Mean Gray Value*.

2. Arah korelasi adalah positif, sehingga semakin besar ekstrak daun Teh, maka semakin besar pula *Mean Gray Value*.
3. Nilai $p = 0,001$, yang berarti terdapat korelasi yang signifikan ($p < 0,05$) antara dosis ekstrak Daun Teh dengan *Mean Gray Value*.

Perhitungan lengkap dapat dilihat di Lampiran 4.



BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek ekstrak Daun Teh (*Camellia sinensis*) dalam menghambat pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus*. Pengamatan pembentukan biofilm dalam penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode tabung (*tube method*). Dengan metode ini akan diketahui *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC) yang diamati dari formasi cincin dan dinding berwarna ungu kebiruan pada tabung (Christensen *et al*, 2000). Pengamatan biofilm secara kuantitatif dilakukan dengan mengukur intensitas warnanya yang dinyatakan dalam *mean gray value*.

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat bakteri *Staphylococcus aureus* strain pembentuk biofilm yang berasal dari *stock culture* bakteri yang disimpan di laboratorium Mikrobiologi FKUB. Bakteri yang berasal dari *stock culture* diregenerasi kembali dalam medium *Nutrient Agar Plate* (NAP) lalu diinkubasi selama 18-24 jam. Setelah dilakukan regenerasi maka dilakukan identifikasi bakteri. Pemeriksaan pertama dilakukan secara makroskopis dengan melihat bentuk dan warna koloni bakteri yang dibentuk dalam medium NAP, pada bakteri *Staphylococcus aureus* didapatkan koloni bakteri yang berbentuk bulat, halus, menonjol, berkilau; berwarna abu-abu sampai kuning keemasan. Pemeriksaan selanjutnya adalah pewarnaan Gram. Pada pewarnaan Gram dan pengamatan di bawah mikroskop perbesaran 100x didapatkan gambaran bakteri kokus berwarna ungu yang menunjukkan sifat Gram positif, serta bergerombol seperti anggur. Untuk membedakan antara genus *Staphylococcus sp* dan *Streptococcus sp*, dilakukan tes katalase. Hasil positif mengindikasikan bahwa

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

Ekstrak yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak Daun Teh (*Camellia sinensis*). Ekstrak didapatkan dengan cara ekstraksi metode *Soxhlet*. Ekstraksi dilakukan di Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang ekstrak Daun Teh mempunyai kandungan *flavonoid*, *polifenol*, dan *tannin* yang bersifat aromatik sehingga pelarut yang digunakan adalah pelarut organik golongan alkohol (yaitu etanol 96%) (Cowan, 1999). Ekstraksi metode *Soxhlet* digunakan karena dengan metode ini, pelarut yang digunakan (etanol 96%) akan berkurang secara signifikan dan konsentrasi bahan aktif akan meningkat sehingga didapatkan hasil ekstrak yang murni (Ehrman, 1994; Anonymous, 2003).

Sebelum dimulai penelitian, dilakukan eksplorasi dahulu untuk mendapatkan konsentrasi perlakuan. Dari penelitian eksplorasi dapat diketahui rentang konsentrasi dimana sudah tidak didapatkan lagi pembentukan biofilm pada tabung. Berdasarkan hasil penelitian eksplorasi diketahui bahwa pembentukan biofilm tidak dapat diamati lagi pada konsentrasi 0.5-1 g/dL. Dari angka ini dapat ditentukan konsentrasi yang tepat pada penelitian. Konsentrasi ekstrak yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 0 g/dL (kontrol positif), 0.125 g/dL, 0.25 g/dL, 0.5 g/dL, 1 g/dL dan 1.5 g/dL. Konsentrasi dibuat secara serial

untuk memudahkan pembuatan larutan ekstrak, selain itu jarak yang tidak terlalu dekat akan menurunkan kemungkinan kesalahan dalam pengambilan ekstrak.

Metode yang digunakan dalam uji hambat pembentukan biofilm adalah metode tabung. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Mathur (2006), metode tabung mempunyai angka sensitivitas sebesar 77,9% dan spesifisitas sebesar 96 %. Pengamatan biofilm dilakukan dengan dua cara, yang pertama adalah pengamatan langsung untuk menentukan MBIC, sedangkan yang kedua adalah pengamatan secara kuantitatif untuk melihat efek hambat dari masing-masing kelompok konsentrasi.

Pengamatan langsung dilakukan dengan mengamati formasi cincin dan dinding berwarna ungu kebiruan. Hasil pengamatan hanya dinyatakan dengan “pembentukan positif” (+) dan “pembentukan negatif” (-), hal ini dilakukan karena metode ini tidak mampu membedakan antara pembentukan biofilm kuat, sedang, dan lemah. Berdasarkan hasil pengamatan langsung, pada pengulangan ke-1, 2, 3 dan 4 didapatkan bahwa pada konsentrasi 1.5 g/dL sudah tidak didapatkan pembentukan biofilm lagi. Dari keseluruhan hasil pengamatan tersebut lalu ditentukan besar MBIC-nya dengan melihat konsentrasi terkecil dimana sudah tidak didapatkan pembentukan biofilm pada semua pengulangan. Pada penelitian ini disimpulkan bahwa MBIC ekstrak Daun Teh adalah sebesar 1.5 g/dL.

Pengamatan secara kuantitatif dilakukan dengan mengukur intensitas warna hasil pengecatan tabung. Nilai ini dinyatakan dengan *Mean Gray Value* (MGV). Skala yang dapat ditunjukkan MGV berkisar antara 0 sampai 255. Semakin mendekati angka 0 maka intensitas warnanya semakin pekat, sebaliknya bila mendekati angka 255 maka intensitas warnanya semakin terang.

Intensitas warna ini menunjukkan efek pembentukan biofilm pada tabung. Semakin pekat warna tabung mengindikasikan semakin tebal permukaan biofilm, begitu pula sebaliknya.

Hasil pengukuran MGTV kemudian dianalisa dengan program SPSS 16. Uji statistik yang digunakan adalah Uji *One Way ANOVA* dan Uji korelasi *Pearson*. Dari Uji *One Way ANOVA* didapatkan nilai signifikansi $p=0,000$ ($p < 0,05$), hal ini berarti terdapat perbedaan efek yang bermakna antara tiap konsentrasi ekstrak daun Teh. Hasil Uji *Pearson* menunjukkan nilai $r = 0,637$, hal ini membuktikan adanya korelasi yang kuat ($r > 0,5$) antara ekstrak Daun Teh dan *Mean Gray Value*. Tanda korelasi positif menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi ekstrak Daun Teh maka semakin besar MGTVnya, yang berarti semakin rendah kepekatan warnanya dan semakin rendah pembentukan biofilmnya. Hal ini diduga disebabkan oleh kandungan *polifenol*, *tannin*, dan *flavonoid* dalam ekstrak Daun Teh yang dapat menghambat pembentukan biofilm. *Flavonoid* menghambat terjadinya perlekatan bakteri pada permukaan medium (Crespo *et al.*, 2008). *Polifenol* menyebabkan kerusakan substrat serta penghambatan enzim sehingga bakteri tidak dapat tumbuh. Sedangkan *tannin* memiliki kemampuan menginaktivasi adhesin, enzim, protein, transport dinding sel, kerusakan substrat, dan berikatan dengan polisakarida dinding sel bakteri (Cowan, 1999; Naim, 2004).

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian uji hambat ekstrak Daun Teh terhadap pembentukan biofilm bakteri *Staphylococcus aureus* secara yang telah dilakukan dan dianalisis serta diperkuat dengan bukti-bukti penelitian lain yang terkait, maka dapat ditarik beberapa kesimpulan.

1. ekstrak Daun Teh dapat menghambat pembentukan biofilm bakteri *Staphylococcus aureus*.
2. *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC) ekstrak Daun Teh (*Camellia sinensis*) dalam penelitian ini adalah sebesar 1.5 g/dL

7.2 Saran

1. Diperlukan penelitian lebih lanjut tentang metode pengamatan biofilm yang spesifisitas dan sensitifitasnya lebih tinggi serta mampu membedakan antara strain bakteri pembentuk biofilm sedang dan lemah.
2. Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai zat-zat aktif lainnya dari ekstrak Daun Teh yang dapat menghambat pembentukan biofilm.
3. Diperlukan penelitian lebih lanjut tentang hubungan antara *Minimal Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC) dengan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) bakteri.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous. 2005. IPTEKnet - Tanaman Obat Indonesia. (Online). (<http://www.iptek.net.id/ind/pdtanobat/view.php?id=79>, diakses pada 17 November 2008)
- Akiyama, H., *J Antimicrob Chemother.* 2001 Oct;48(4):487-91.
- Christensen, Gordon D., Simpson W., Anglen, Jeffrey O., Gainor, Barry J., 2000. *Handbook of Bacterial Adhesion*. New Jersey: Humana Press Inc.
- Crespo I., García-Mediavilla M. V., Gutiérrez B., Sánchez-Campos S., Tuñón M. J., González-Gallego J. 2008. A comparison of the effects of kaempferol and quercetin on cytokine-induced pr inflammatory status of cultured human endothelial cells. *Br J Nutr* 100: 968-976.
- Donlan Rodney M., Costerton J.William. Biofilm: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbial Reviews*, 15(2) : 167-193.
- Doran, J.C., 1999. Plant Resources of South-East Asia. No. 19: Essential-oils plants. Bogor : Prosea Foundation.
- Dzen SM, Roekistiningsih, Santoso S., Winarsih S. 2003. *Bakteriologi Medik*. Malang: Bayumedia Publishing.
- Dzen, S.J.; Roekistiningsih; Santoso, S.; Winarsih, S. 2003. *Bakteriologi Medik*. 1st Ed. Malang: Bayumedia Publishing. Hal 132-140
- Endyah L., Jurusan Biologi FMIPA UNAIR, 1986
- <http://textbookofbacteriology.net/staph.html>
- <http://www.hpa.org.uk/Topics/InfectiousDiseases/InfectionsAZ/StaphylococcusAureus/>
- <http://europepmc.org/abstract/MED/16111912/reload=0;jsessionid=c2hWHhtyQwvj3n6bPUXI.20>
- <http://www.labome.org/topics/organisms/plants/plant/angiosperms/theales/theaceae/camellia/camellia-sinensis-4536.html>
- <http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=profile&symbol=CASI16&display=31>
- http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/8/9/02-0063_article.htm

<http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/phytochemicals/flavonoids/>

Fox, Christoph A, Paul S, Luanne H, and Costerton JW. 2003. *Bacterial Biofilm: A Diagnostic and Therapeutic Challenge*. *Expert Rev. Anti-infect.* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15482163>, diakses pada 15 Desember 2008)

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

IP lee, *Chemopreventive effect of green tea (Camellia sinensis) against cigarette smoke-induced mutations (SCE) in humans*. 2008 (NBCI)

Ikedo I, Imasato Y, Sasaki E, Nakayama M, Nagao H, Takeo T, Yayabe F, Sugano M. *Tea catechins decrease micellar solubility and intestinal absorption of cholesterol in rats*. *Biochim Biophys Acta*. 2005 Jul 29;1127(2):141–146. [PubMed]

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

Kayser F. H., Bienz K. A., Eckert J., Zinkernagel R. M. 2005. *Medical Microbiology*. Thieme Stuttgart, New York, p. 229-233

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

Melnick, Adelberg. 1996. *Medical Microbiology*. New York: Lange Medical Book.

Midlandstech. 2011. *Functional Anatomy of Prokaryotic and Eukaryotic Cells: The Cell Wall*. <http://classes.midlandstech.edu/carterp/Courses/bio225/chap04/ss4.htm>, diakses tanggal 08 Januari 2011.

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

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

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

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

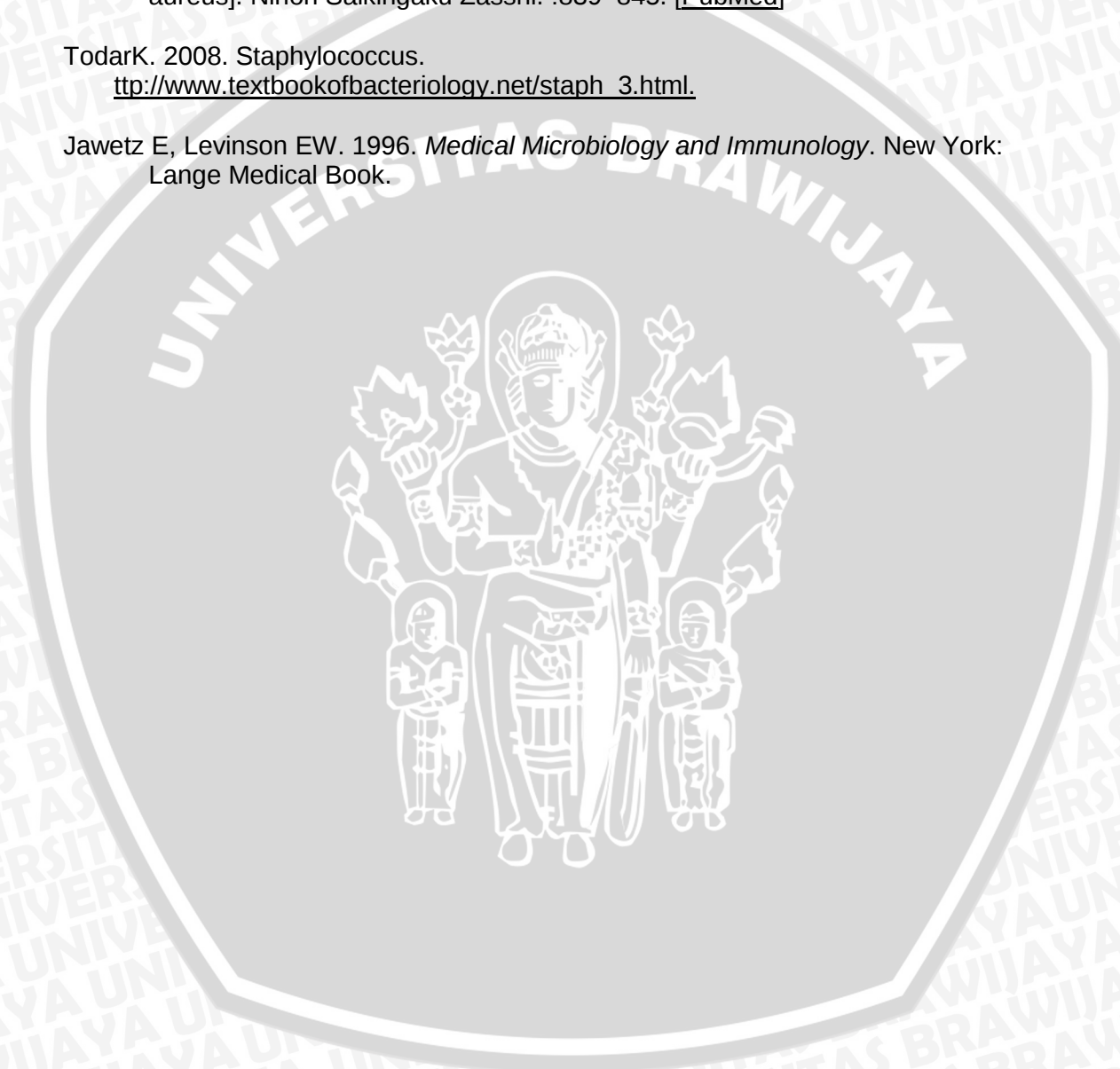
Staphylococcus aureus Biofilm Formation of the Tympanostomy Tube: An *In Vitro* Study (Online). (<http://iv.iiarjournals.org/content/21/6/1027.abstract>, diakses tanggal 2 Juni 2010).

Toumy S. A., Marzouk M. S., Moharram F. A., Aboutabl E. A. 2001. Flavonoids of *Melaleuca quinquenervia* (Online). (<http://www.ubka.uni-karlsruhe.de/pharm/ altehefte.html>)

Toda M, Okubo S, Hara Y, Shimamura T. [Antibacterial and bactericidal activities of tea extracts and catechins against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*]. *Nihon Saikingaku Zasshi*. :839–845. [PubMed]

TodarK. 2008. *Staphylococcus*.
http://www.textbookofbacteriology.net/staph_3.html.

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



PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Dimas Prakoso

NIM : 105070106111017

Program Studi : Program Studi Pendidikan Dokter

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

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

Malang, September 2016

Yang membuat pernyataan,

Dimas Prakoso
NIM. 105070106111017

LAMPIRAN 1

UJI NORMALITAS DAN HOMOGENITAS

1. Uji Normalitas Sebaran Data untuk Jumlah Koloni

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

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		dosis	grey_value
N		24	24
Normal Parameters ^a	Mean	2.583	149.806
	Std. Deviation	2.8040	26.5605
Most Extreme Differences	Absolute	.249	.160
	Positive	.249	.109
	Negative	-.178	-.160
Kolmogorov-Smirnov Z		1.220	.782
Asymp. Sig. (2-tailed)		.102	.573

a. Test distribution is Normal.

Nilai signifikansi = 0,573 ($p > 0,05$) yang berarti bahwa distribusi data normal

2. Uji Homogenitas Variansi Data Untuk Jumlah koloni

Test of Homogeneity of Variances

Gray value

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.804	5	18	.163

Nilai signifikansi = 0,163 ($p > 0,05$) yang berarti data mempunyai ragam (varians) yang relatif homogen.

LAMPIRAN 2

UJI ONEAWAY ANOVA

Descriptives

Gray value

dosis	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0	4	99.955	6.4191	3.2095	89.741	110.169	93.1	107.9
0.125	4	152.333	9.7571	4.8786	136.807	167.859	138.1	158.9
0.25	4	155.519	8.8134	4.4067	141.495	169.543	142.5	161.6
0.5	4	155.985	14.5821	7.2911	132.782	179.189	141.2	172.2
1	4	157.324	18.9471	9.4736	127.174	187.473	134.8	179.3
1.5	4	177.722	9.5893	4.7947	162.463	192.981	163.9	186.2
Total	24	149.806	26.5605	5.4216	138.591	161.022	93.1	186.2

Gray_Value	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	13592.575	5	2718.515	18.585	.000
Within Groups	2633.010	18	146.278		
Total	16225.584	23			

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

Post Hoc Tests

Dengan uji Post Hoc Tukey dapat diketahui perbedaan antar tiap pasangan kelompok sampel. Hanya kelompok konsentrasi 1,5 g/dL yang mempunyai perbedaan yang signifikan dengan kelompok konsentrasi lainnya.

LAMPIRAN 3

UJI KORELASI PEARSON

Descriptive Statistics

	Mean	Std. Deviation	N
dosis	2.583	2.8040	24
grey_value	149.806	26.5605	24

Correlations

		dosis	grey_value
dosis	Pearson Correlation	1.5	.637**
	Sig. (2-tailed)		.001
	N	24	24
grey_value	Pearson Correlation	.637**	1
	Sig. (2-tailed)	.001	
	N	24	24

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

- Nilai signifikansi = 0,001 ($p < 0,05$) berarti ada hubungan yang signifikan antara kedua variabel.
- Nilai koefisien korelasi ($r = 0,637$) berarti kekuatan korelasinya kuat dan mempunyai hubungan sejajar.

DAFTAR PUSTAKA

Anonymous. 2005. IPTEKnet - Tanaman Obat Indonesia. (Online). (<http://www.iptek.net.id/ind/pdtanobat/view.php?id=79>, diakses pada 17 November 2008)

Akiyama, H., *J Antimicrob Chemother.* 2001 Oct;48(4):487-91.

Christensen, Gordon D., Simpson W., Anglen, Jeffrey O., Gainor, Barry J., 2000. *Handbook of Bacterial Adhesion*. New Jersey: Humana Press Inc.

Crespo I., García-Mediavilla M. V., Gutiérrez B., Sánchez-Campos S., Tuñón M. J., González-Gallego J. 2008. A comparison of the effects of kaempferol and quercetin on cytokine-induced pr inflammatory status of cultured human endothelial cells. *Br J Nutr* 100: 968-976.

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

Doran, J.C., 1999. Plant Resources of South-East Asia. No. 19: Essential-oils plants. Bogor : Prosea Foundation.

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

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

Endyah L., Jurusan Biologi FMIPA UNAIR, 1986

<http://textbookofbacteriology.net/staph.html>

<http://www.hpa.org.uk/Topics/InfectiousDiseases/InfectionsAZ/StaphylococcusAureus/>

<http://europepmc.org/abstract/MED/16111912/reload=0;jsessionid=c2hWHhtyQwvj3n6bPUXI.20>

<http://www.labome.org/topics/organisms/plants/plant/angiosperms/theales/theaceae/camellia/camellia-sinensis-4536.html>

<http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=profile&symbol=CASI16&display=31>

http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/8/9/02-0063_article.htm

<http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/phytochemicals/flavonoids/>

Fox, Christoph A, Paul S, Luanne H, and Costerton JW. 2003. *Bacterial Biofilm: A Diagnostic and Therapeutic Challenge*. *Expert Rev. Anti-infect.* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15482163>, diakses pada 15 Desember 2008)

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

IP lee, *Chemopreventive effect of green tea (Camellia sinensis) against cigarette smoke-induced mutations (SCE) in humans*. 2008 (NBCI)

Ikeda I, Imasato Y, Sasaki E, Nakayama M, Nagao H, Takeo T, Yayabe F, Sugano M. Tea catechins decrease micellar solubility and intestinal absorption of cholesterol in rats. *Biochim Biophys Acta*. [PubMed]

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

Kayser F. H., Bienz K. A., Eckert J., Zinkernagel R. M. 2005. *Medical Microbiology*. Thieme Stuttgart, New York, p. 229-233

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

Melnick, Adelberg. 1996. *Medical Microbiology*. New York: Lange Medical Book.

Midlandstech. 2011. Functional Anatomy of Prokaryotic and Eukaryotic Cells: The Cell Wall. <http://classes.midlandstech.edu/carterp/Courses/bio225/chap04/ss4.htm>, diakses tanggal 08 Januari 2011.

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

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

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

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

Staphylococcus aureus Biofilm Formation of the Tympanostomy Tube: An *In Vitro* Study (Online). (<http://iv.iijournals.org/content/21/6/1027.abstract>, diakses tanggal 2 Juni 2010).

Toumy S. A., Marzouk M. S., Moharram F. A., Aboutabl E. A. 2001. Flavonoids of *Melaleuca quinquenervia* (Online). (<http://www.ubka.uni-karlsruhe.de/pharm/altehefte.html>)

Toda M, Okubo S, Hara Y, Shimamura T. [Antibacterial and bactericidal activities of tea extracts and catechins against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*]. *Nihon Saikingaku Zasshi*. :839–845. [PubMed]

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

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

<http://textbookofbacteriology.net/staph.html>

<http://www.hpa.org.uk/Topics/InfectiousDiseases/InfectionsAZ/StaphylococcusAureus/>

<http://europepmc.org/abstract/MED/16111912/reload=0;jsessionid=c2hWHhtyQwvj3n6bPUXI.20>

<http://www.labome.org/topics/organisms/plants/plant/angiosperms/theales/theaceae/camellia/camellia-sinensis-4536.html>

<http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=profile&symbol=CASI16&display=31>

http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/8/9/02-0063_article.htm

<http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/phytochemicals/flavonoids/>