

**UJI EFEKTIFITAS ANTIBAKTERI FLAVONOID EKSTRAK BUAH
MAHKOTA DEWA (*Phaleria macrocarpa*) TERHADAP
Pseudomonas aeruginosa SECARA IN VITRO**

TUGAS AKHIR
Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran Umum



Oleh :

Ferdian Tanaka

NIM : 155070100111051

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG
2018**

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

UJI EFEKTIFITAS ANTIBAKTERI FLAVONOID EKSTRAK BUAH MAHKOTA
DEWA (*Phaleria macrocarpa*) TERHADAP *Pseudomonas aeruginosa*

SECARA IN VITRO

Oleh :

Ferdian Tanaka

NIM. 155070100111051

Telah diuji pada

Hari : Selasa

Tanggal : 2 Oktober 2018

Dan dinyatakan lulus oleh :

Penguji I

dr. Sri Soenarti, Sp.PD, K-Ger
NIP. 197411262009122001

Pembimbing I/Penguji II,

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

Pembimbing II/Penguji III,

dr. Sony Agung Santoso, Sp.M(K)
NIP. 196603111996011001

Mengetahui,
Ketua Program Studi Pendidikan Dokter

dr. Triwahjti Astuti, M. Kes., Sp. P(K)
NIP. 196310221996012001

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ferdian Tanaka
NIM : 155070100111051
Program Studi : Sarjana Kedokteran Fakultas Kedokteran
Universitas Brawijaya

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini adalah hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilan 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 plagiat, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 19 September 2018

Yang membuat pernyataan,



Ferdian Tanaka

NIM. 155070100111051

KATA PENGANTAR

Segala syukur dan puji bagi Tuhan Yesus Kristus karena hanya dengan berkat seta kasih karunia-Nya penulis mampu menyelesaikan Tugas Akhir yang berjudul “Uji Efektifitas Antibakteri Flavonoid Ekstrak Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) Terhadap *Pseudomonas aeruginosa* Secara *In Vitro*”. Dengan terselesainya Tugas Akhir ini penulis mengucapkan terimakasih kepada:

1. **Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes.**, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
2. **dr. Triwahju Astuti, M.Kes.,Sp.P(K)**, selaku Ketua Program Studi Sarjana Kedokteran Universitas Brawijaya.
3. **Dr. dr Dwi Yuni Nur Hidayati, M.Kes.**, selaku dosen pembimbing I yang membantu dalam memberi arahan dan koreksi yang sistematis
4. **dr. Sony Agung Santoso, Sp.M(K)**, selaku dosen pembimbing II yang memberikan masukan dan koreksi yang sistematis
5. **Pak Ali Sabet** selaku analis Mikrobiologi yang membantu penulis dalam penelitian dan memberikan solusi dari masalah yang dihadapi peneliti dalam menyelesaikan Tugas Akhir.
6. Kedua orang tua saya yang saya sayangi, **Rachai Roi dan Ledyawati Onggara**, atas doa yang tidak pernah putus, limpahan kasih sayang dan motivasi yang telah diberikan sejak saya kecil hingga saat ini.

7. Kakak saya yang saya sayangi, **Arllen Tanaka**, atas doa, semangat, dan motivasi yang telah diberikan sampai saat ini.

8. Teman-teman seperjuangan saya, kelas **PD-B 2015** yang senantiasa mengisi hari-hari perkuliahan di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya baik dalam suka maupun duka.

9. Tim perjuangan Tugas Akhir Mahkota Dewa-Suket Teki yang saya banggakan, **Andy, Sharon, Imerisa, Beatrice, Becca, Donni, dan Vanno**.

10. Sahabat belajar yang selalu menyemangati dan memberi dukungan terhadap saya, **Adolf, Dennis, Bidong, dan Ajeng**

11. Sahabat Alumni SMAK Kolese Santo Yusup Malang yang selalu hadir untuk membantu dan bertukar pikiran mengenai Tugas Akhir, **Anthony, Geovan, Yonathan, dan Bagus**.

12. Dan semua pihak yang telah membantu menyelesaikan tugas akhir ini yang tidak bisa disebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa Tugas Akhir ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, penulis membuka diri untuk segala kritik dan saran. Semoga Tugas Akhir ini bermanfaat bagi pembaca khususnya profesi di bidang kesehatan.

Malang, 30 Agustus 2018

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

Halaman Judul.....	i
Halaman Pengesahan.....	ii
Pernyataan Keaslian Tulisan.....	iii
Kata Pengantar.....	iv
Abstrak.....	vi
Abstract.....	vii
Daftar Isi.....	viii
Daftar Tabel.....	xi
Daftar Gambar.....	xii
Daftar Singkatan.....	xiii
Daftar Lampiran.....	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Rumusan Masalah.....	4
1.2 Tujuan Penelitian.....	4
1.2.1 Tujuan Umum.....	4
1.2.2 Tujuan Khusus.....	4
1.3 Manfaat Penelitian.....	4
1.3.1 Manfaat Akademis.....	4
1.3.2 Manfaat Praktis.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
2.1.1 Taksonomi.....	7
2.1.2 Morfologi <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
2.1.3 Faktor Virulensi.....	8
2.1.3.1 Exotoxin S dan Exotoxin T.....	8
2.1.3.2 Exotoxin U.....	9
2.1.3.3 Exotoxin Y.....	9
2.1.3.4 Exotoxin A.....	9
2.1.3.5 Pyocyanin.....	9
2.1.3.6 Protease.....	10
2.1.3.7 Hemolisin.....	10
2.2 Penyakit yang Ditimbulkan <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
2.2.1 Otitis Externa Maligna.....	10
2.2.2 Infeksi Saluran Kemih.....	11
2.2.3 Pneumonia.....	11
2.2.4 Meningitis.....	11

2.2.5 Terapi.....	12
2.3 Mahkota Dewa (<i>Phaleria macrocarpa</i>).....	12
2.3.1 Taksonomi.....	12
2.3.2 Morfologi Mahkota Dewa (<i>Phaleria macrocarpa</i>).....	13
2.3.3 Kandungan Mahkota Dewa (<i>Phaleria macrocarpa</i>).....	13
2.3.4 Manfaat Mahkota Dewa (<i>Phaleria macrocarpa</i>).....	15
2.4 Antimikroba.....	15
2.4.1 Mekanisme Antimikroba.....	16
2.4.1.1 Menghambat Sintesis Protein.....	16
2.4.1.2 Menghambat Sintesis Asam Nukleat.....	16
2.4.1.3 Menghambat Sintesis Dinding Sel.....	16
2.4.1.4 Menghambat Metabolisme Sel.....	17
2.4.1.5 Merusak Membran Sel.....	17
2.5 Metode Ekstraksi.....	17
2.5.1 Macam-Macam Metode Ekstraksi.....	18
2.5.1.1 Maserasi.....	18
2.5.1.2 Perkolasi.....	18
2.5.1.3 Refluks.....	18
2.5.1.4 Sokletasi.....	18
2.5.1.5 Digestasi.....	19
2.5.1.6 Infundasi.....	19
2.6 Pemisahan Senyawa (Kromatografi).....	19
2.6.1 Partisi Cair.....	19
2.6.2 Sentrifugasi.....	19
2.7 Uji Kepekaan terhadap Antibakteri Secara In Vitro.....	20
2.7.1 Metode Dilusi.....	20
2.7.1.1 Dilusi Tabung.....	20
2.7.1.2 Dilusi Agar.....	20
2.7.2 Metode Difusi.....	21
2.7.3 Metode Kirby-Bauer.....	21
2.7.4 Metode Joan-Stokes.....	21
BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS.....	23
3.1 Kerangka Konsep.....	23
3.2 Hipotesis.....	24
BAB IV METODE PENELITIAN.....	25
4.1 Rancangan Penelitian.....	25
4.2 Sampel Penelitian.....	25
4.3 Variabel Penelitian.....	26
4.3.1 Variabel Terikat.....	26
4.3.2 Variabel Bebas.....	26
4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian.....	26
4.5 Definisi Operasional.....	26

4.6 Instrumenn Penelittan	28
4.6.1 Alat	28
4.6.2 Bahan	28
4.7 Operasional Penelitian	28
4.7.1 Pembuatan Ekstrak Buah Mahkota Dewa	28
4.7.1.1 Tahap Pengeringan	28
4.7.1.2 Tahap Ekstraksi	29
4.7.1.3 Tahap Evaporasi	29
4.7.2 Pemisahan Senyawa Flavonoid	29
4.7.2.1 Partisi dengan n-heksana	29
4.7.3 Identifikasi <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30
4.7.4 Identifikasi Koloni pada Nutrient Agar	30
4.7.4.1 Pewarnaan Gram	30
4.7.4.2 Uji Katalase	31
4.7.4.3 Uji Oksidase	31
4.7.5 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji	31
4.7.6 Uji Anti Bakteri	32
4.7.7 Alur Kerja Penelitian	34
4.8 Analisis Data	35
BAB V HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA	36
5.1 Hasil Penelitian	36
5.1.1 Hasil Ekstraksi Flavonoid Mahkota Dewa (<i>Phaleria macrocarpa</i>)	36
5.1.2 Hasil Identifikasi <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	37
5.1.3 Hasil Pengamatan Kekeruhan dan Analisis terhadap KHM	38
5.1.4 Hasil Penentuan KBM dan Analisis terhadap KBM	39
5.2 Analisis Data	42
5.2.1 Uji Normalitas dan Homogenitas	42
5.2.2 Uji <i>One-way Annova</i>	42
5.2.3 Uji Post Hoc Tukey	42
5.2.4 Uji Korelasi Pearson	43
5.2.5 Uji Regresi Linier Sederhana	43
BAB VI PEMBAHASAN	45
BAB VII PENUTUP	50
7.1 Kesimpulan	50
7.2 Saran	50
DAFTAR PUSTAKA	52
LAMPIRAN	57

DAFTAR TABEL

Tabel 5.1 Hasil dari Perhitungan Jumlah Koloni *Pseudomonas aeruginosa*41



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 *Pseudomonas aeruginosa* Secara Mikroskopis 6

Gambar 2.2 *Pseudomonas aeruginosa* pada Nutrient Agar 8

Gambar 2.3 Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) yang Matang 13

Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian 23

Gambar 4.1 Alur Penelitian Metode Dilusi Tabung 34

Gambar 5.1 Hasil Sampel Ekstrak Flavonoid Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) 36

Gambar 5.2 Hasil Pengamatan *Pseudomonas aeruginosa* secara mikroskopis 37

Gambar 5.3 Hasil Uji Katalase Positif *Pseudomonas aeruginosa* 38

Gambar 5.4 Hasil Uji Oksidase Positif *Pseudomonas aeruginosa* 38

Gambar 5.5 Hasil Inkubasi Tabung Selama 24 Jam 39

Gambar 5.6 Hasil Streaking Suspense Koloni *Pseudomonas aeruginosa* 40

Gambar 5.7 Rerata Jumlah Koloni *Pseudomonas aeruginosa* 41

DAFTAR SINGKATAN

NAP : *Nutrient Agar Plate*

KHM : Kadar Hambat Minimal

KBM : Kadar Bunuh Minimal

K(-) : Kontrol Negatif

K(+)
Kneg

Kneg : Kontrol Negatif

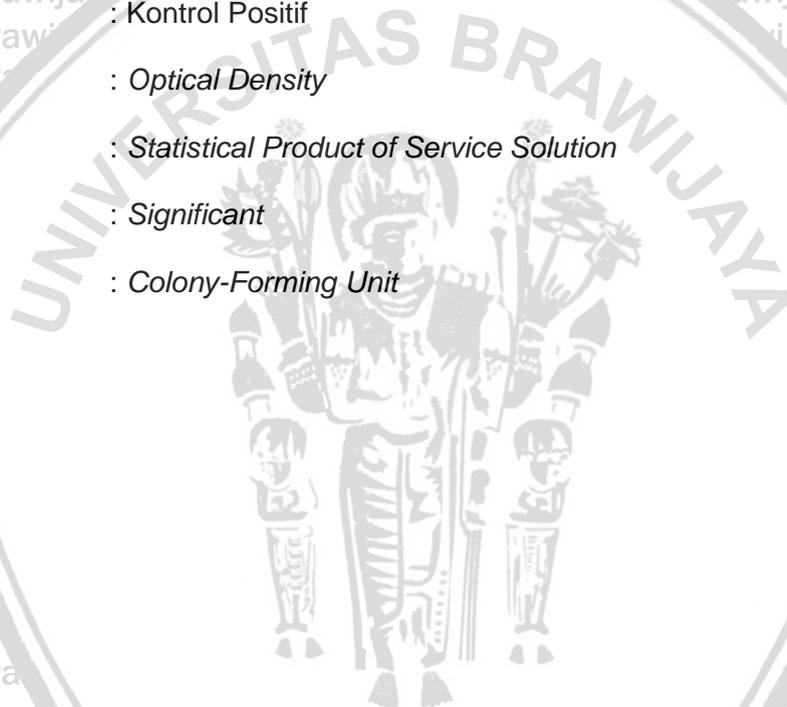
Kpos : Kontrol Positif

OD : *Optical Density*

SPSS : *Statistical Product of Service Solution*

sig : *Significant*

CFU : *Colony-Forming Unit*



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Penelitian Pendahuluan Metode Difusi Agar..... 55

Lampiran 2. Hasil Penelitian Pendahuluan Metode Dilusi Agar..... 55

Lampiran 3. Alat dan Bahan Penelitian..... 56

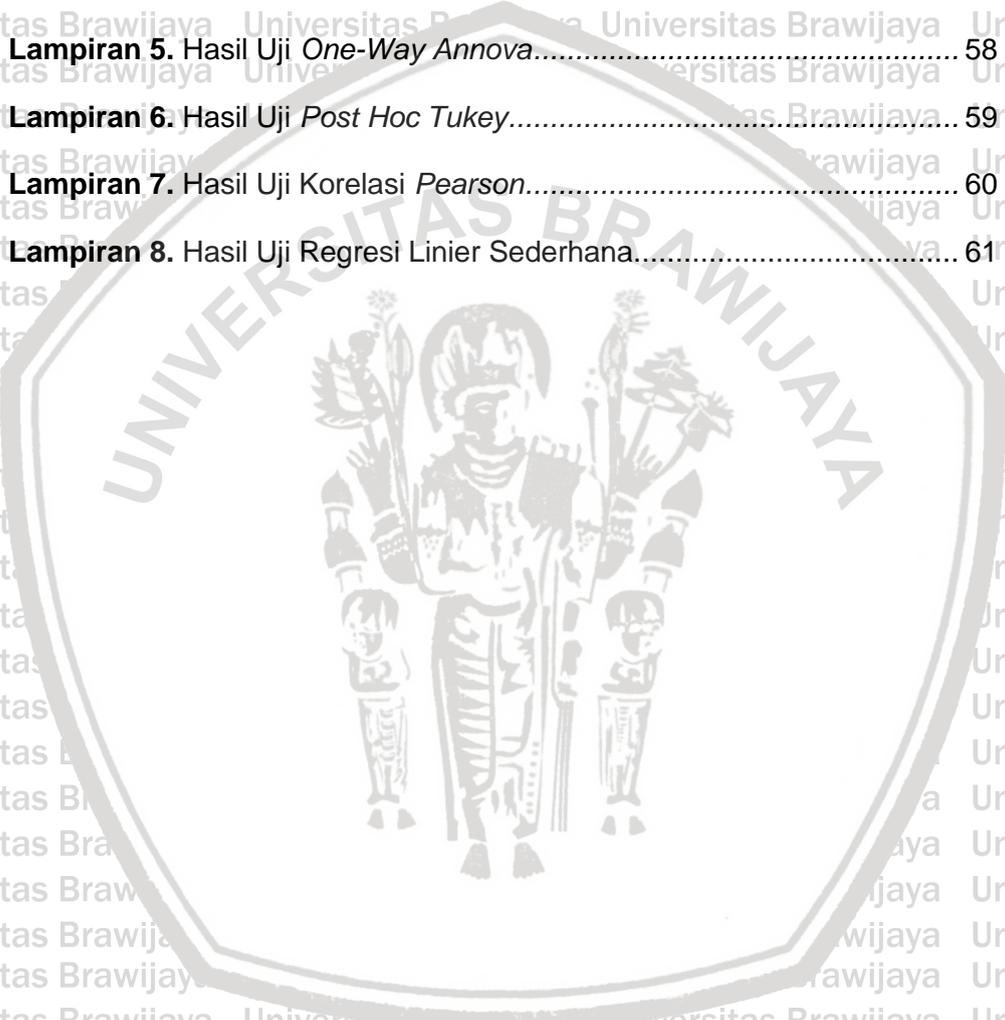
Lampiran 4. Hasil Uji Normalitas dan Homogenitas..... 58

Lampiran 5. Hasil Uji *One-Way Anova*..... 58

Lampiran 6. Hasil Uji *Post Hoc Tukey*..... 59

Lampiran 7. Hasil Uji Korelasi *Pearson*..... 60

Lampiran 8. Hasil Uji Regresi Linier Sederhana..... 61



HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

UJI EFEKTIFITAS ANTIBAKTERI FLAVONOID EKSTRAK BUAH MAHKOTA
DEWA (*Phaleria macrocarpa*) TERHADAP *Pseudomonas aeruginosa*
SECARA IN VITRO

Oleh :

Ferdian Tanaka

NIM. 155070100111051

Telah diuji pada

Hari : Selasa

Tanggal : 2 Oktober 2018

Dan dinyatakan lulus oleh :

Penguji I

dr. Sri Soenarti, Sp.PD, K-Ger
NIP. 197411262009122001

Pembimbing I/Penguji II,

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

Pembimbing II/Penguji III,

dr. Sony Agung Santoso, Sp.M(K)
NIP. 196603111996011001

Mengetahui,
Ketua Program Studi Pendidikan Dokter

dr. Triwahju Astuti, M. Kes., Sp. P(K)
NIP. 196310221996012001

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



Abstrak

Tanaka, Ferdian. 2018. **Uji Efektifitas Antibakteri Flavonoid Ekstrak Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) Terhadap *Pseudomonas aeruginosa* Secara *In Vitro***. Tugas akhir, Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Dr.dr. Dwi Yuni Nur Hidayati, M.Kes., (2) dr. Sony Agung Santoso, Sp.M(K).

Lebih dari 1,4 juta pasien di dunia menderita infeksi nosokomial. Salah satu bakteri yang sering menimbulkan infeksi nosokomial adalah *Pseudomonas aeruginosa*, yang merupakan flora normal dalam jumlah sedikit pada manusia. Untuk itu, diperlukan suatu terapi alternatif antibakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang berasal dari tanaman, seperti Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*). Tujuan penelitian ini untuk mengetahui efek dari pemberian flavonoid ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) terhadap pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* secara *in vitro*. Metode yang digunakan dalam penelitian adalah *true eksperimental* dengan design *post-test control design only* menggunakan dilusi tabung. Konsentrasi ekstrak flavonoid buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) yang digunakan adalah 0%, 2%, 4%, 6%, 8%, 10% dan 12%. Kadar Hambat Minimal (KHM) yang ditemukan ada pada konsentrasi 10%, sedangkan Kadar Bunuh Minimal (KBM) yang ditemukan ada pada konsentrasi 12%. Hasil dari uji normalitas Shapiro-Wilk didapatkan nilai sig $p=0,762$ ($p>0,05$) dan uji homogenitas Levene didapatkan nilai sig $p=0,109$ ($p>0,05$). Uji komparatif *One-way Annova*, didapatkan nilai sig $p=0,000$ ($p<0,05$). Hasil dari uji regresi linier sederhana adalah R Square= 0,843 yang berarti kemampuan ekstrak flavonoid buah Mahkota Dewa dalam menurunkan jumlah koloni *Pseudomonas aeruginosa* adalah sebesar 84%. Uji korelasi Pearson memberikan hasil nilai $r=-0,918$ yang menunjukkan semakin tinggi konsentrasi ekstrak flavonoid buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) maka semakin rendah jumlah koloni *Pseudomonas aeruginosa*. Berdasarkan penelitian tersebut, dapat disimpulkan bahwa ekstrak flavonoid buah Mahkota Dewa dapat sebagai antibakteri terhadap *Pseudomonas aeruginosa*.

Kata Kunci: *Pseudomonas aeruginosa*, antibakteri, ekstrak flavonoid buah Mahkota Dewa.

Abstract

Tanaka, Ferdian. 2018. **Effectiveness of Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) Fruit Extract's Flavonoid Antibacterial Trait towards *Pseudomonas aeruginosa* through *In Vitro* Application.** Final Assignment, Medical Medical Program, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Supervisors: (1) Dr.dr. Dwi Nur Hidayati, M.Kes., (2) dr. Sony Agung Santoso, Sp.M(K).

More than 1.4 million people in the world suffers from nosocomial infection. One of the most common bacteria that causes nosocomial infection is *Pseudomonas aeruginosa*, which, in small amount, is harmless to humans. Thus, a plant-based, alternative, antibacterial treatment for *Pseudomonas aeruginosa* is needed, such as using the Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) fruit extract. The goal of this research is to understand the effect of *Phaleria macrocarpa* fruit extract's flavonoid towards the growth of *Pseudomonas aeruginosa* through *in vitro* application. The method used in this research was True Experimental, with a post-test control design using only dilution tubes. The concentration of *Phaleria macrocarpa* fruit extract's flavonoid used was 0%, 2%, 4%, 6%, 8%, 10%, and 12%. The MIC was found at 10% concentration, and the MBC was found at 12% concentration. The following are the statistical test results: Shapiro-Wilk normality test result was sig $p=0.762$ ($p<0.05$), Levene's homogeneity test result was sig $p=0.109$ ($p<0.05$), One-Way ANOVA result was sig $p=0.000$ ($p<0.05$), the R-squared from Simple Linear Regression was 84%, and the Pearson's correlation test result was $r=0.918$, which shows a highly negative correlation between *Phaleria macrocarpa* fruit extract's flavonoid and the number of *Pseudomonas aeruginosa* colonies. In conclusion, the *Phaleria macrocarpa* fruit extract's flavonoid antibacterial feature can be used against *Pseudomonas aeruginosa*.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, antibacterial, Mahkota Dewa fruit extract's flavonoid.

BAB 1

PENDAHULUAN

Rumah Sakit menjadi sarana penting dalam mengobati penyakit pasien.

Rumah Sakit sendiri dapat menyebabkan hal yang tidak terduga seperti infeksi nosokomial. Lebih dari 1,4 juta pasien di dunia ini terindikasi terkena infeksi nosokomial, di Negara maju maupun di Negara berkembang (WHO,2009).

Di Indonesia, berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Marwoto (2007), didapatkan bahwa infeksi nosokomial terjadi di RSUP Dr. Sardjito sebesar 7,94%, RSUD Dr. Soetomo sebesar 14,6%, RS Bekasi sebesar 5,06%, RS Hasan Sadikin Bandung sebesar 4,6% dan RSCM Jakarta sebesar 4,6%. Insiden infeksi nosokomial di Jawa Timur mengalami kenaikan prevalensi dari 306 pada tahun 2011, 400 pada tahun 2012, dan 526 pada tahun 2013.

Menurut Depkes RI tahun 2009, Infeksi nosokomial atau *Health-Associated Infection* adalah infeksi yang didapat setelah 3x24 jam pasien dirawat di Rumah Sakit, dengan maksud bahwa pasien pada saat masuk Rumah Sakit tidak dalam keadaan infeksi atau tidak dalam masa inkubasi mikroorganismenya tertentu. Infeksi nosokomial adalah keadaan dimana tidak ada tanda klinis infeksi dari pasien pada saat mulai dirawat di Rumah Sakit, pasien tidak sedang dalam masa inkubasi saat mulai dirawat di Rumah Sakit, tanda klinis infeksi yang muncul minimal 3x24 jam saat dimulai perawatan, dan infeksi yang baru didapat bukan merupakan sisa dari infeksi yang sebelumnya sudah didapat (Kouchak and Askarian, 2012).

Infeksi nosokomial dapat disebabkan oleh bakteri, virus, dan jamur. Salah satu bakteri yang sering menimbulkan infeksi nosokomial adalah *Pseudomonas aeruginosa*. Berdasarkan Jawetz, *et al.* (2015), bakteri ini tersebar luas di alam dan biasanya muncul dalam keadaan lingkungan yang lembab di Rumah Sakit.

Pseudomonas aeruginosa sering muncul dalam jumlah sedikit sebagai normal flora di usus dan kulit manusia. *Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri oportunistik dapat menyerang manusia pada keadaan imun yang abnormal.

Sebagai bakteri oportunistik, *Pseudomonas aeruginosa* dapat menyebabkan infeksi yang dapat melalui luka terkontaminasi, luka bakar, saluran kemih, kulit, mata, telinga, dan saluran pernafasan yang dapat menyebabkan bakterimia. Bakterimia yang tidak segera ditangani dengan tepat dapat berujung pada kematian, terlebih lagi bakteri ini sudah resistan atau kebal dengan beberapa antibiotik. Kekebalan terhadap antibiotik ini disebabkan oleh karena struktur dan beberapa enzim dalam *Pseudomonas aeruginosa* (Sherris, 2014).

Pengobatan yang selama ini diberikan untuk *Pseudomonas aeruginosa* adalah *extended-spectrum* penisillin seperti piperacillin yang dikombinasikan dengan aminoglycoside seperti tobramycin. Antibiotik lainnya yang digunakan adalah aztreonam, carbapenem seperti imipenem atau meropenem, fluoroquinolones seperti ciprofloxacin. Golongan cephalosporins seperti ceftazidime, cefoparozone dan cefipime juga dapat digunakan untuk *Pseudomonas aeruginosa*. Ceftazidime sering digunakan dengan aminoglycoside sebagai terapi primer infeksi *Pseudomonas aeruginosa* terlebih lagi untuk pasien dengan neutropenia (Jawetz *et al.*, 2015).

Mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) berasal dari Indonesia. Tidak hanya dikenal sebagai tanaman hias, tanaman yang asli dari Indonesia ini sudah dikenal

dari dulu sebagai obat tradisional. Buah Mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) memiliki zat aktif seperti alkaloid untuk detoksifikasi racun dalam tubuh, saponin sebagai antibakteri, flavonoid sebagai antibakteri dan antiinflamasi serta polifenol sebagai antialergi (Astriyai *et al.*, 2017)

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Hendra tahun 2011, kandungan flavonoid tertinggi terdapat pada buahnya dibandingkan dengan bagian yang lainnya yaitu senyawa flavonoid seperti Kaempferol sebanyak 76 $\mu\text{g/g}$, Myricetin 59.90 $\mu\text{g/g}$, Naringin 39.80 $\mu\text{g/g}$ dan Rutin 17.80 $\mu\text{g/g}$. Di penelitian juga dipaparkan tentang efek antimikrobal terhadap beberapa Bakteri Gram Positif, Bakteri Gram Negatif, dan Fungi yang keefektifannya dalam rentang lemah sampai sedang. Beberapa di antaranya adalah *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Ganoderma lucidum*, dan *Mucor indicus*. Tetapi pada penelitian ini digunakan metode difusi cakram yang didapatkan zona inhibisi untuk *Pseudomonas aeruginosa* 1.40 cm, pada kontrol yang menggunakan kanamycin (1 $\mu\text{g/disc}$), zona inhibisinya adalah 1 cm, hal tersebut menunjukkan flavonoid ekstrak buah Mahkota Dewa mempunyai potensi antimikroba yang lebih besar daripada Kanamycin, dengan menggunakan pelarut methanol, sedangkan penelitian yang akan dilaksanakan menggunakan metoda dilusi dengan pelarut ethanol karena ethanol 96% mempunyai kandungan air yang sangat sedikit sehingga dapat menghasilkan ekstrak yang lebih kental dan murni, tidak seperti pada ethanol 70% yang memiliki perbandingan alkohol dan air 7:3 atau ethanol 50% yang memiliki perbandingan alkohol dan air 1:1 sehingga ekstrak yang dihasilkan kurang murni (Arifianti, 2014).

Berdasarkan pemaparan di atas, dibutuhkan penelitian tentang efektivitas ekstrak flavonoid buah mahkota dewa terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

Karena sebelumnya belum pernah dilakukan uji efektivitas ekstrak flavonoid buah mahkota dewa terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dengan metoda disc-diffusion secara *in vitro*, maka diharapkan ada alternatif pengobatan *Pseudomonas aeruginosa* baru yang alami.

1.1 Rumusan Masalah

Apakah pemberian flavonoid ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) menghambat pertumbuhan terhadap *Pseudomonas aeruginosa* secara *in vitro*?

1.2 Tujuan Penelitian

1.2.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui efek dari pemberian flavonoid ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) terhadap pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* secara *in vitro*

1.2.2 Tujuan Khusus

- Mengetahui kadar hambat minimal (KHM) flavonoid ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) terhadap *Pseudomonas aeruginosa* secara *in vitro*
- Mengetahui kadar bunuh minimal (KBM) flavonoid ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) terhadap *Pseudomonas aeruginosa* secara *in vitro*

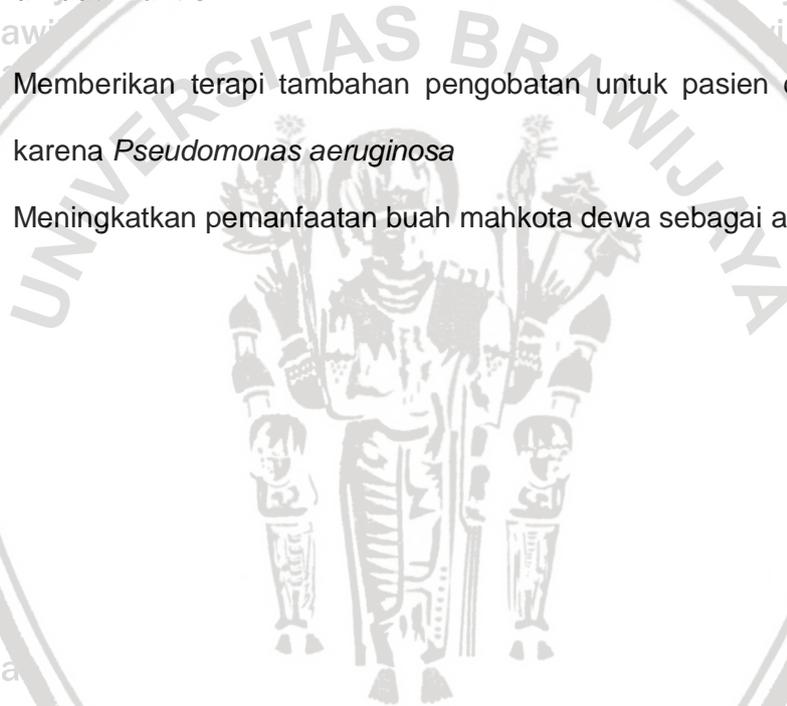
1.3 Manfaat Penelitian

1.3.1 Manfaat Akademis

- a. Melalui hasil penelitian ini, diharapkan dapat memberikan informasi tentang *Pseudomonas aeruginosa* yang dihambat dengan pemberian flavonoid ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*)
- b. Melalui hasil penelitian ini, diharapkan dapat memberikan informasi tentang flavonoid ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) sebagai referensi untuk penelitian selanjutnya

1.3.2 Manfaat Praktis

- a. Memberikan terapi tambahan pengobatan untuk pasien dengan infeksi karena *Pseudomonas aeruginosa*
- b. Meningkatkan pemanfaatan buah mahkota dewa sebagai antibakteri.



BAB 2

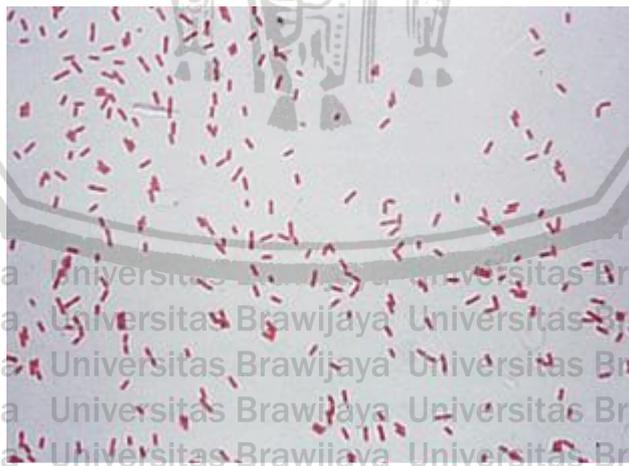
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa banyak terbesar di perairan dan daratan.

Pseudomonas aeruginosa merupakan patogen utama yang berada di tubuh manusia jika dibandingkan dengan *Pseudomonas* lainnya. *Pseudomonas aeruginosa* bersifat invasif dan toxigenik, menyebabkan infeksi di pasien dengan sistem imun yang abnormal dan sering menyebabkan infeksi nosocomial (Jawetz *et al*, 2015).

Pseudomonas aeruginosa menyebabkan infeksi nosocomial sebanyak 10-15% dari jumlah infeksi nosokomial di dunia. *Pseudomonas aeruginosa* sering kali susah untuk diterapi karena mempunyai resistansi alami yang dimilikinya. Beberapa enzyme dan mekanisme mutasional menyebabkan bakteri ini resisten terhadap antibiotik tertentu (Strateva and Yordanov, 2009).



Gambar 2.1 *Pseudomonas aeruginosa* secara mikroskopis pada pengecatan Gram, tampak bakteri berbentuk batang berwarna merah (Todar, 2012)

2.1.1 Taksonomi

Kingdom : Bacteria

Phylum : Proteobacteria

Class : Gammaproteobacteria

Order : Pseudomonadales

Family : Pseudomonadaceae

Genus : Pseudomonas

Spesies : *Pseudomonas aeruginosa*

2.1.2 Morfologi *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa merupakan bakteri gram negatif, berbentuk batang, dan mempunyai flagella tunggal. Panjang dari bakteri ini sekitar 1-5 μm dan mempunyai lebar sekitar 0.5-1 μm , seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.1.

Pseudomonas aeruginosa bersifat aerob dan bisa mengkatabolis banyak molekul organik seperti benzoat, hal ini yang menyebabkan *Pseudomonas aeruginosa* dapat ditemukan dimana-mana seperti di daratan, perairan, manusia, hewan, tumbuhan, selokan, dan rumah sakit (Lederberg, 2010).

Pseudomonas aeruginosa berkembang baik pada suhu 37 °C, dan dapat bertahan temperature antara 4 – 42 °C. *Pseudomonas aeruginosa* dapat juga tumbuh secara anaerob pada pemberian karbon dan nitrat sebagai akseptor terminal electron. *Pseudomonas aeruginosa* berkembang baik pada media Lysogeny Broth dan Nutrient Agar. Media lain yang selektif dan dapat digunakan untuk isolasi *Pseudomonas aeruginosa* adalah Cetrimide Agar (Badalà *et al.*, 2008).

Pseudomonas aeruginosa terkadang berbau manis atau seperti anggur atau seperti jagung. Beberapa strainnya menghemolisa darah. *Pseudomonas aeruginosa* membentuk koloni bulat dan halus dengan warna hijau fluoresens.

Seringkali bakteri ini menghasilkan pigment pyocyanin bewarna biru yang tidak fluoresens, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.2. Beberapa strain dari *Pseudomonas aeruginosa* juga memberikan pigmen fluoresens, pyoverdin yang bewarna hijau, beberapa strain lainnya menghasilkan pigmen pyorubin yang bewarna merah gelap dan pigmen pyomelanin yang bewarna hitam. (Jawetz *et al*, 2015).



Gambar 2.2 *Pseudomonas aeruginosa* pada Nutrient Agar, tampak koloni bulat dan halus

2.1.3 Faktor Virulensi

2.1.3.1 Exotoxin S dan Exotoxin T

Exotoxin bifungsional, bekerja sebagai faktor antifagositik, yang mengakibatkan *Pseudomonas aeruginosa* dapat menghindari dari sistem imun tubuh. Exotoxin S ini termasuk enzyme ADP-ribosyl transferase dan sebagai activator GTPase (Rocha *et al.*, 2003).

2.1.3.2 Exotoxin U

Merupakan fosfolipase, yang mengaktifasi jalur c-Jun NH2-terminal kinase, menstimulasi fosforilasi dan aktivasi dari mitogen-activated kinase 4, c-jun NH2-terminal kinase yang menginisiasi respon inflamasi dari tubuh penderita.

Hasilnya adalah peningkatan permeabilitas dan penyebaran bakteri (Cuzick *et al.*, 2016).

2.1.3.3 Exotoxin Y

Merupakan adenylil dan guanylyl siklase. Exotoxin ini menyebabkan hiperfosforilasi dan insolubilitas, pemecahan microtubules, dan edema. Pada pemeriksaan microscop fluoresens, didapatkan sel endotel microvaskular dari paru-paru yang terinfeksi mengandung microtubules yang sedikit dibandingkan dengan kontrol (Balczon *et al.*, 2013).

2.1.3.4 Exotoxin A

Exotoxin A merupakan toxin yang paling virulen dari bakteri patogen *Pseudomonas aeruginosa*. Toxin ini mempunyai 2 segment, segment A dan segment B. Segment B mempunyai fungsi untuk melekat di membran sel dan membuka jalan agar segmen A dapat masuk ke dalam sel. Segmen A mempunyai aktivitas enzim ADP-ribosylation untuk menginaktivasi EF-2, yang berujung pada pemberhentian sintesis protein dan kematian sel (Michalska and Wolf, 2015).

2.1.3.5 Pyocyanin

Pyocyanin menginduksi apoptosis dari sel imun granulosit, yaitu neutrofil. Neutrofil sendiri adalah sel imun yang merespon pertama kali untuk memfagosit benda asing yang masuk. Karena pyocyanin menginduksi apoptosis dari sel

neutrofil, maka *Pseudomonas aeruginosa* dapat terhindar dari aktivitas fagosit dari neutrofil (Allen *et al.*, 2005).

2.1.3.6 Protease

Protease bertanggung jawab atas terjadinya infeksi kornea seperti keratitis, terutama pada pengguna lensa kontak. *Pseudomonas aeruginosa* mempunyai 2 macam protease yang berhubungan dengan infeksi kornea, yaitu metalloproteinase elastase (LasB) dan alkaline protease (AP). AP dan LasB bisa menghancurkan komplemen, menyerang leukosit, dan menghambat fungsi dari beberapa sel imun, menghancurkan sitokin, mendegradasi immunoglobulin dan mengaktifkan endogenous kolagenase. Ketika *Pseudomonas aeruginosa* diletakkan di kornea yang terluka, enzim protease ini menyebabkan kerusakan dengan mencerna ekstraselular matriks stromal proteoglycan (Hobden, 2012).

2.1.3.7 Hemolisin

Hemolisin yang terdapat pada *Pseudomonas aeruginosa* merusak fosfolipid pada surfaktan paru dan mengganggu fungsi dari mukosiliari epitel pernapasan. Surfaktan merupakan cairan yang penting untuk melapisi dinding paru. Kehilangan surfaktan akan menyebabkan atelectasis (Wout *et al.*, 2015).

2.2 Manifestasi Klinis Infeksi *Pseudomonas aeruginosa*

2.2.1 Otitis Externa Maligna

Otitis Eksterna Maligna adalah infeksi telinga yang ditandai dengan nyeri pada telinga, keluarnya cairan/ sekret pada telinga, dan adanya kerusakan pada saraf kranial. Jika dilihat dengan otoskopi, akan ditemukan adanya granulasi pada lubang telinga. Infeksi ini biasanya dijumpai pada pasien dengan penyakit

Diabetes Melitus atau pada pasien dengan kondisi immunosupresi. Prognosis buruk jika ditemukan paralisis wajah (Jung, 2003).

2.2.2 Infeksi Saluran Kemih

Infeksi saluran kemih oleh *Pseudomonas aeruginosa* sering terjadi di Rumah Sakit. Hal ini terkait dengan pemasangan kateter melalui saluran kemih.

Untuk gejala klinis yang ditimbulkan oleh *Pseudomonas aeruginosa* dengan bakteri patogen lainnya sulit dibedakan. Gejalanya dapat berupa rasa sakit pada waktu akhir buang air kecil, peningkatan frekuensi buang air kecil, dan adanya nyeri pada daerah perut bagian bawah (Mittal *et al.*, 2009).

2.2.3 Pneumonia

Pneumonia karena *Pseudomonas aeruginosa* dapat terjadi karena pemasangan endotracheal tube. Gejala yang ditimbulkan adalah batuk dengan sekret purulent, nyeri pada bagian dada, dan demam dengan suhu $>38^{\circ}\text{C}$.

Pneumonia dapat juga terjadi pada pasien yang lama dirawat di rumah sakit dan pembedahan torakotomi (PDPI, 2014)

2.2.4 Meningitis

Meningitis dapat terjadi oleh *Pseudomonas aeruginosa* pada pungsi lumbal. Gejala yang dapat ditimbulkan dapat berupa nyeri kepala hebat, muntah, demam tinggi, kaku leher. Meningitis yang disebabkan oleh bakteri harus diterapi secara cepat, karena jika tidak, dapat menyebabkan kerusakan otak yang hebat dan dapat menginfeksi aliran darah menyebabkan bacteremia (Huang *et al.*, 2007).

2.2.5 Terapi Infeksi *Pseudomonas aeruginosa*

Pada otitis eksterna maligna, terapi yang diberikan adalah antibiotik

Ciprofloxacin 400 mg diberikan secara intravena tiap 12 jam selama 4 sampai 6 minggu, pilihan lain adalah Imipenem 0.5 g diberikan secara intravena tiap 6 jam selama 4 sampai 6 minggu (Rahman, 2007). Untuk kasus pneumonia, dapat menggunakan Azithromycin 10 mg/kgBB/hari selama 5 hari secara intravena.

Untuk kasus infeksi saluran kemih, dapat diberikan antibiotik Ampisilin 500 mg tiap 8 jam secara oral. Pengobatan untuk kasus meningitis, dapat memakai Cefazidime 100-300 mg/kgBB/hari selama 10-42 hari (Huang *et al.*, 2015).

2.3 Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*)

Phaleria macrocarpa atau yang lebih sering disebut Mahkota dewa merupakan tanaman obat yang berasal dari Indonesia. Ekstrak dari *Phaleria macrocarpa* telah digunakan selama bertahun-tahun sebagai pengobatan tradisional yang telah dievaluasi secara ilmiah. Ekstraknya dapat digunakan sebagai anti-kanker, anti-diabet, anti-hiperlipidemik, anti-inflamasi, anti-bakterial, anti-fungal, anti-oksidan dan efek vasorelaksan (Altaf, 2013).

2.3.1 Taksonomi

Kingdom : Plantae

Divisi : Spermatophyta

Sub Divisi : Dicotyledon

Kelas : Thymelaeales

Famili : Thymelaeaceae

Marga : *Phaleria*

Spesies : *Phaleria macrocarpa*

2.3.2 Morfologi Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*)

Phaleria macrocarpa merupakan tanaman yang komplit, yaitu adanya batang, daun, bunga, dan buah. Tinggi dari *Phaleria macrocarpa* bervariasi antara 1 m sampai 18 m, dengan panjang akar 1 m. Warna batang dan akarnya coklat kehijauan. *Phaleria macrocarpa* tumbuh pada ketinggian 10 m sampai 1200 m di atas permukaan laut, dengan umur produktif dari 10 tahun sampai 20 tahun.

Daunnya berwarna hijau dengan panjang 7-10 cm, lebarnya 3-5 cm. Bunganya berwarna hijau dan merah tua. Buahnya berwarna hijau ketika belum matang dan berwarna merah ketika matang seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.3. Terdapat 1-2 biji di dalam buah yang berwarna coklat dengan bentuk oval (Sufi, 2007).



Gambar 2.3 Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) yang Matang (Altaf, 2013)

2.3.3 Kandungan Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*)

Pada penelitian sebelumnya, didapatkan pada buahnya kaya akan saponin, alkaloid, polifenol, flavonoid, dan tanin. Senyawa ini yang dapat membuat *Phaleria macrocarpa* berfungsi sebagai anti-oksidan, anti-bakteri, anti-inflamasi, dll. (Altaf, 2013).

a. Flavonoid

Flavonoid dapat menyebabkan denaturasi protein pada membrane sitoplasma mikroba melalui ikatan hydrogen yang dibentuk oleh kompleks flavonoid dengan protein mikroba. Hal ini menyebabkan kerusakan pada membrane sitoplasma mikroba dan menyebabkan kematian pada mikroba (Hendra, 2011).

Pada penelitian sebelumnya, kandungan flavonoid dari *Phaleria macrocarpa* didapatkan dengan metode Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC). Kandungan flavonoid adalah kaempferol, myricetin, naringin dan rutin pada pericarp buah, naringin dan quercetin pada mesocarp buah. Di biji *Phaleria macrocarpa* hanya ditemukan quercetin (Hendra, 2011).

b. Alkaloid

Alkaloid dapat bekerja sebagai penghambat sintesis asam nukleat, yaitu menghambat enzim dihidrofolat reduktase. Penghambatan sintesis asam nukleat dapat menyebabkan mikroba menjadi tidak berkembang dan pada akhirnya mikroba akan mati (Cushnie, Cushnie and Lamb, 2014).

c. Polifenol

Polifenol bekerja sebagai perusak membrane sitoplasma mikroba secara total dengan mengendapkan proten sel. Jika diberikan dalam konsentrasi rendah, polifenol akan merusak membrane sel yang menyebabkan kebocoran metabolit penting dan menginaktifkan bakteri. Selain itu polifenol juga dapat berfungsi sebagai antioksidan, penangkal radikal bebas (Karou *et al.*, 2005).

d. Saponin

Saponin merupakan molekul yang dapat bekerja sebagai agen pengubah permeabilitas membrane, menyebabkan membran sel menjadi lisis dan

mati. Selain itu saponin juga dapat sebagai stimulator imun, hypocholesterolemic, anti-karsinogenik, anti-inflamasi, anti-microbial, anti-protozoan, molluscicidal dan anti-oksidan. Saponin juga dapat mengganggu pencernaan protein, penyerapan vitamin dan mineral (Moses, 2014).

e. Tanin

Tanin mempunyai efek terhadap sintesis dinding sel dan mengubah permeabilitas membrane sel. Tanin menyebabkan penurunan volume sel dan memisahkan membrane sel dengan dinding sel, menyebabkan mikroba kehilangan keutuhan membrane dan dinding sel. Hal ini yang dapat menyebabkan mikroba mati (Sulaiman *et al.*, 2011).

2.3.4 Manfaat Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*)

Pada bagian buah *Phaleria macrocarpa* dapat digunakan sebagai anti-hipertensi dengan menurunkan tekanan sistolik dan diastolik secara bertahap (Ismanto *et al.*, 2014). Pada bagian daun *Phaleria macrocarpa* mempunyai efek analgesic (Tone, Wuisan and Mambo, 2013). Secara tradisonal, *Phaleria macrocarpa* digunakan sebagai pengobatan kanker, diabetes mellitus, alergi, penyakit jantung dan hati, gagal ginjal, hipertensi, stroke, dan penyakit kulit seperti jerawat (Lay *et al.*, 2014).

2.4 Antimikroba

Antimikroba adalah senyawa yang digunakan untuk membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri yang menyebabkan infeksi. Antimikroba berdasarkan kemampuan memamatkannya dibagi menjadi 2, yaitu yang dapat membunuh atau bakterisidal dan yang hanya menghambat pertumbuhan atau bakteriostatika. Berdasarkan cakupan memamatkannya, antimikroba dibagi menjadi 2, yaitu spektrum sempit yang hanya mempengaruhi beberapa jenis mikroba

tertentu dan spectrum luas yang cakupannya dapat mempengaruhi banyak jenis mikroba (Prescott JF, 2013).

2.4.1 Mekanisme Antimikroba

2.4.1.1 Menghambat Sintesis Protein

Pada dasarnya mikroba menyintesis protein untuk kelangsungan hidupnya. Sintesis protein terjadi dalam organel ribosom menggunakan mRNA dan tRNA. Ribosom pada bakteri adalah 70S, dimana ribosom tersebut tersusun atas unit 50S dan 30S. Antimikroba yang mempunyai mekanisme ini menghambat sintesis protein di ribosom 50S atau di ribosom 30S. Penghambatan pada ribosom 30S menyebabkan salah baca pada kode di mRNA. Salah baca pada saat sintesis protein di ribosom 30S ini akan menyebabkan terbentuknya protein yang bukan fungsional, melainkan yang nonfungsional. Penghambatan pada ribosom 50S menyebabkan terganggunya proses translokasi tRNA. Terganggunya proses ini dapat mencegah perpanjangan rantai polipeptida (Gunawan, 2007).

2.4.1.2 Menghambat Sintesis Asam Nukleat

Antimikroba yang mempunyai cara kerja seperti ini akan bekerja dengan cara menghambat enzim RNA polymerase dan enzim DNA girase. Kedua enzim ini digunakan dalam proses sintesis DNA dan RNA. Penghambatan kedua enzim ini akan berakibat tidak berkembangnya mikroba dan akan membunuhnya. (Thangamani *et al.*, 2016).

2.4.1.3 Menghambat Sintesis Dinding Sel

Antimikroba yang mempunyai cara kerja seperti ini akan bekerja secara optimal pada bakteri yang sedang aktif membelah. Antimikroba ini bekerja dengan menghambat enzim pembentuk dinding sel, menyebabkan tekanan osmotik yang

berada di dalam sel lebih tinggi daripada yang di luar sel. Hal ini mengakibatkan sel mikroba menjadi lisis. Jenis antimikroba ini bersifat bakterisidal, yaitu membunuh mikroba (Nafrialdi RS, 2007).

2.4.1.4 Menghambat Metabolisme Sel

Pada dasarnya mikroba menghasilkan sendiri asam folat untuk kelangsungan hidupnya. Antimikroba yang mempunyai mekanisme ini bekerja dengan cara membentuk analog asam folat yang sama dengan asam folat yang dihasilkan oleh mikroba. Tetapi analog yang dihasilkan bukan fungsional untuk kelangsungan hidup mikroba tsb., melainkan untuk menghambat kelangsungan hidup mikroba tsb. Jenis antimikroba ini bersifat bakteriostatik, yaitu menghambat pertumbuhan mikroba (Dowling PM, 2013).

2.4.1.5 Merusak Membran Sel

Membran sel pada mikroba berfungsi untuk menjaga keutuhan isi dan permeabilitas dari sel mikroba. Bila membran sel dirusak, permeabilitas membran akan terganggu dan akan terjadi kebocoran yang berakibat isi dari sel mikroba akan keluar dan menyebabkan kematian (Nikolaidis, 2014).

2.5 Metode Ekstraksi

Ekstraksi adalah kegiatan untuk mengambil kandungan kimia yang bersifat larut, untuk terpisah dari bahan sulit larut/ tidak dapat larut dengan bantuan pelarut cair. Ekstraksi menggunakan simplisia, yaitu bahan alami yang dapat digunakan sebagai obat dan belum mengalami perubahan. Biasanya pemilihan pelarut dan metode ekstraksi akan menjadi mudah jika kandungan kimia aktif telah diketahui (Ditjen POM, 2000).

2.5.1 Macam-Macam Metode Ekstraksi

2.5.1.1 Maserasi

Merupakan proses pencampuran simplisia dengan pelarut. Maserasi dilakukan pada suhu ruangan dan pelarut yang paling sering digunakan adalah air dan alkohol. Cairan yang didapat selanjutnya akan difiltrasi untuk mendapatkan kandungan zat aktif (Ghasemzadeh, 2015).

2.5.1.2 Perkolasi

Perkolasi merupakan proses ekstraksi sederhana yang mengalirkan pelarut ke dalam bubuk simplisia dalam sebuah wadah. Proses dilakukan perlahan untuk memastikan semua bubuk simplisia tercampur dengan pelarut (Ghasemzadeh, 2015).

2.5.1.3 Refluks

Merupakan metode ekstraksi dengan kondensasi uap menggunakan pelarut yang sudah dipanaskan terlebih dahulu pada temperatur titik didihnya. Refluks menggunakan jumlah pelarut yang relatif konstan dan dilakukan secara simultan (Ghasemzadeh, 2015).

2.5.1.4 Sokletasi

Sokletasi merupakan penyaringan yang dilakukan terus-menerus untuk mendapatkan penyaringan yang sempurna dengan menggunakan soklet. Sokletasi menggunakan simplisia dan pelarut yang terpisah. Pelarut yang digunakan dalam metode sokletasi relatif sedikit. (Nurhasnawati, 2017).

2.5.1.5 Infundasi

Infundasi merupakan metode ekstraksi yang mirip dengan maserasi, perbedaannya pelarut yang digunakan dalam infundasi adalah air dan direndam dalam temperature 90°C selama 15 menit untuk menghasilkan infus/rebusan (Handayani, 2015).

2.6 Pemisahan Senyawa (Kromatografi)

Prinsip kromatografi adalah perbedaan partisi zat, yaitu pada fase diam dan fase gerak. Biasanya kromatografi digunakan untuk memurnikan suatu senyawa. Fase diam di sini adalah fase zat yang dalam keadaan *stationary* yaitu tetap pada tempatnya, sedangkan fase gerak adalah zat dalam keadaan *mobile* atau bergerak (Tobo, 2001). Untuk mendapatkan senyawa flavonoid murni, dibutuhkan partisi cair dan sentrifugasi.

2.6.1 Partisi Cair

Metode partisi cair atau metode corong pisah digunakan untuk memisahkan zat terlarut dari larutan dengan menggunakan pelarut tertentu. Di dalam metode ini akan terjadi perpindahan masa, yaitu dari pelarut pertama menuju pelarut kedua atau dari media pembawa menuju media ekstraksi (Tobo, 2001).

2.6.2 Sentrifugasi

Sentrifugasi merupakan metode pemisahan senyawa dengan menggunakan gaya sentrifugal atau gaya putaran dengan kecepatan yang sangat tinggi. Metode ini menggunakan prinsip berat jenis molekul, dimana molekul yang lebih berat akan berada di bawah dan molekul yang lebih ringan akan berada di atas setelah diputar dengan kecepatan tinggi. Semakin besar ukuran partikel, dan

semakin besar densitas partikel, maka akan semakin cepat partikel tersebut terpisah dari campurannya (Leung, 2008).

2.7 Uji Kepekaan terhadap Antibakteri Secara In Vitro

Untuk menentukan uji kepekaan antimikroba secara in vitro, dapat menggunakan metode dilusi atau metode difusi (Jawetz *et al.*, 2015).

2.7.1 Metode Dilusi

Dilusi merupakan suatu metode uji kepekaan antimikroba dengan menentukan Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM) dari obat antimikroba, yang terdiri dari 2 macam, yaitu dilusi tabung dan dilusi agar (Wiegand, 2008). Konsentrasi mikroorganisme pada uji bakteri Gram negative ini adalah 10^6 CFU/ml.

2.7.1.1 Dilusi Tabung

Sesuai dengan namanya, metode dilusi ini menggunakan tabung reaksi yang diisi dengan media cair dan sel mikroba dengan jumlah tertentu untuk diuji. Selanjutnya mengisi tiap tabung tsb. dengan obat yang sudah diencerkan. Lalu dilakukan inkubasi masing-masing tabung pada suhu 37°C selama 18 sampai 24 jam dan diamati kekeruhan yang terjadi pada tabung. KHM dapat diamati pada tabung yang mulai tampak jernih, menandakan pada tabung tersebut tidak terdapat pertumbuhan mikroba (Hilpert, 2008).

2.7.1.2 Dilusi Agar

Sesuai dengan namanya, metode dilusi ini menggunakan media agar (padat) yang sudah diberi larutan antimikroba yang sebelumnya juga diencerkan.

Pencampuran antimikroba ini dilakukan pada saat media agar masih cair, lalu

dibiarkan memadat. Selanjutnya dilakukan inokulasi mikroba ke dalam agar dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 sampai 24 jam. KBM dapat diamati pada agar yang tidak menunjukkan adanya pertumbuhan koloni mikroba (Hancock, 2008).

2.7.2 Metode Difusi

Metode difusi ini menggunakan kertas saring atau cakram kertas. Obat dijenuhkan ke dalam kertas saring sehingga kertas saring tsb. mengandung obat.

Lalu kertas saring ditanam pada media agar padat yang sebelumnya sudah diberi mikroba yang akan diuji, kemudian diinkubasi dengan suhu 37°C selama 18 sampai 24 jam. Lalu diamati pada kertas saring, daerah yang jernih menunjukkan tidak ada pertumbuhan mikroba (Noorhamdani *et al.*, 2016).

2.7.3 Metode Kirby-Bauer

Metode ini menggunakan table standar yang dibuat oleh CLSI (*Clinical and Laboratory Standard Insititute*). Setelah obat dijenuhkan ke dalam kertas saring, kertas saring ditanam pada media agar padat yang sudah dicampuri mikroba dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 sampai 24 jam. Lalu diamati daerah jernih pada kertas saring. Tabel ini digunakan untuk menganalisis daerah jernih yang menunjukkan tidak ada pertumbuhan mikroba pada kertas saring tsb.

Dari hasil pembacaan dengan menggunakan metode Kirby-Bauer, bisa didapatkan bahwa obat yang digunakan sebagai antimikroba tsb. tergolong kriteria sensitive, sensitive intermediet, dan resisten (Noorhamdani *et al.*, 2016).

2.7.4 Metode Joan-Stokes

Metode Joan-Stokes ini membandingkan daerah yang jernih yang ada antara daerah jernih pada mikroba kontrol yang sudah diketahui kepekaannya

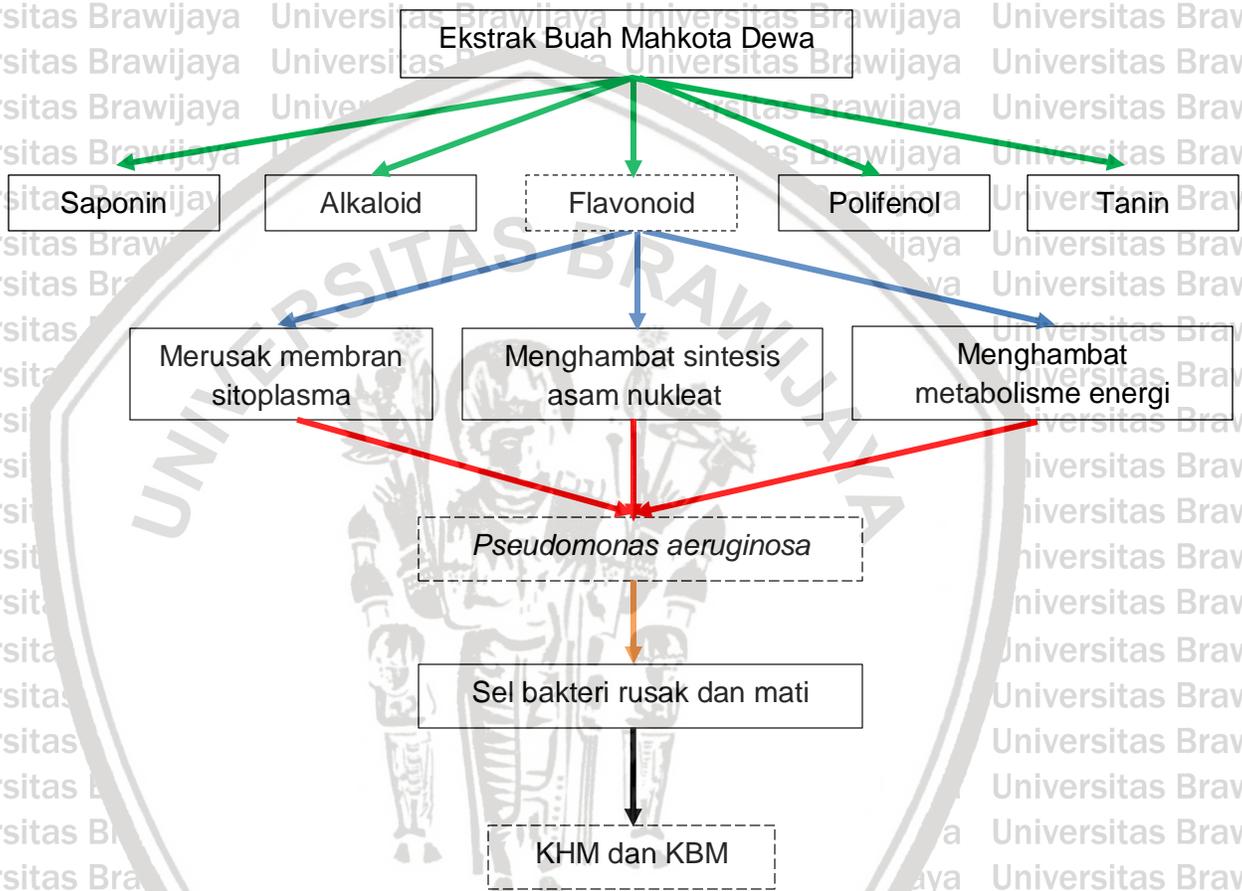
terhadap obat yang diuji dengan daerah jernih pada mikroba yang akan diuji kepekaannya. Pengamatan mikroba kontrol dengan mikroba yang akan diuji dilakukan dalam satu cawan agar secara bersama-sama (Noorhamdani et al, 2016).



BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konsep



Keterangan :

- : variable yang akan diteliti
- : kandungan senyawa ekstrak flavonoid dari buah mahkota dewa
- : mekanisme kerja ekstrak flavonoid dari buah mahkota dewa
- : pemberian ekstrak flavonoid dari buah mahkota dewa
- : hasil dari pemberian ekstrak flavonoid dari buah mahkota dewa
- : kadar efektif ekstrak flavonoid dari buah mahkota dewa

Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Senyawa flavonoid seperti kaempferol, myricetin, naringin, quercetin dan rutin di dalam mahkota dewa terlibat dalam mekanisme kerja antimikroba. Kerusakan pada membran sitoplasma mikroba terjadi karena adanya ikatan hydrogen yang dibentuk oleh kompleks flavonoid dengan protein mikroba, sehingga menyebabkan denaturasi protein pada membran sitoplasma mikroba. Proses sintesis asam nukleat akan terganggu karena adanya penghambatan pada enzim RNA polimerase dan enzim DNA girase. Padahal enzim-enzim ini berfungsi untuk proses sintesis DNA RNA dan proses replikasi DNA. Hasilnya mikroba tersebut tidak mengalami pertumbuhan. Metabolisme adalah proses pemecahan bahan baku menjadi energi untuk beraktivitas, jika proses metabolisme diganggu, kelangsungan hidup mikroba juga akan terganggu.

3.2 Hipotesis

Berdasarkan rumusan masalah yang ada, maka hipotesis yang diajukan adalah : Ada pengaruh pemberian ekstrak flavonoid buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) terhadap pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa* secara *in vitro*.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Dalam penelitian ini metode yang digunakan adalah *true* eksperimental *Pseudomonas aeruginosa* dengan design *post-test control design only*, karena hasilnya dilihat setelah dilakukan penelitian untuk mengetahui efek antimikroba dari ekstrak flavonoid buah mahkota dewa dalam konsentrasi yang sudah ditentukan terhadap *Pseudomonas aeruginosa*.

4.2 Sampel Penelitian

Sampel pada penelitian ini merupakan koloni *Pseudomonas aeruginosa* dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Dengan rumus Gomez, didapatkan hasil pengulangan sebagai berikut :

$$t(r-1) \geq 20$$

$$8(r-1) \geq 20$$

$$8r-8 \geq 20$$

$$8n \geq 28 \rightarrow n \geq 3,5$$

Keterangan:

t = jumlah perlakuan (8, yaitu 6 konsentrasi ekstrak flavonoid mahkota dewa, 1

kontrol positif dan 1 kontrol negatif)

n = jumlah pengulangan (4 kali pengulangan)

20 = derajat bebas untuk RAL

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Terikat

Variabel terikat adalah variabel yang dipikirkan sebagai akibat atau keadaannya tergantung dari variabel-variabel lain. Variabel terikat pada penelitian ini adalah jumlah koloni *Pseudomonas aeruginosa*

4.3.2 Variabel Bebas

Variabel bebas adalah variabel yang disengaja atau ditentukan, dan dipelajari pengaruhnya terhadap variabel terikat. Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak flavonoid mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) dengan konsentrasi 12%, 8%, 6%, 4%, dan 2% didapat dari hasil observasi.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi penelitian ini berada di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, pengekstrakan senyawa flavonoid dilakukan di Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang, proses pembuatan *crude extract Phaleria macrocarpa* dilakukan di Materia Medica.

Penelitian ini membutuhkan waktu selama 3 bulan.

4.5 Definisi Operasional

1. *Pseudomonas aeruginosa* yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan isolate sputum dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
2. Buah mahkota dewa yang digunakan adalah bagian buahnya yang dipanen dari perkebunan di daerah Lawang, Malang.
3. Ekstrak flavonoid mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari buah mahkota dewa yang di didapatkan di perkebunan di daerah Lawang, Malang. Pelarut yang digunakan dalam

penelitian ini adalah etanol 96% dan metode maserasi dari buah mahkota dewa. Pertama-tama buah mahkota dewa diekstrak dengan etanol 96%, lalu dipartisi sebanyak 2 tahap. Tahap pertama menggunakan n-heksana, tahap kedua menggunakan n-butanol untuk menarik senyawa flavonoid dari ekstrak total. Kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm untuk memisahkan senyawa berdasarkan berat molekul.

4. Kadar hambat minimum (KHM) adalah konsentrasi terendah dari ekstrak flavonoid buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) yang dapat mengurangi jumlah koloni *Pseudomonas aeruginosa* ditandai dengan warna jernih yang pertama pada tabung.
5. Kadar Bunuh Minimum (KBM) adalah konsentrasi terendah dari ekstrak flavonoid buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) yang dapat membunuh koloni *Pseudomonas aeruginosa* ditandai dengan tidak adanya jumlah koloni pada media atau maksimal 0,1% dari *original inoculum* setelah dilakukan inkubasi
6. Kontrol positif atau konsentrasi 0% yaitu tabung tanpa ekstrak flavonoid buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) dengan penambahan *Pseudomonas aeruginosa*.
7. Kontrol negatif yaitu tabung tanpa penambahan ekstrak flavonoid buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) maupun *Pseudomonas aeruginosa*.
8. Original inoculum adalah inokulum bakteri dengan konsentrasi 10^6 CFU/ml yang diinokulasi sebagai konsentrasi awal bakteri dengan tujuan mencari kategori KBM.
9. Kadar konsentrasi yang digunakan adalah 12%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% dan 0%, didapatkan dari hasil penelitian.

10. Uji kekeruhan di tabung dilusi menggunakan kertas putih yang sebelumnya sudah ada beberapa garis hitam dengan ketebalan yang berbeda, diletakkan di belakang tabung tsb.

4.6 Instrumen Penelitian

4.6.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain tabung reaksi, kertas saring, oven, toples, labu penampung hasil maserasi, *rotary evaporator*, timbangan analitik, objek glass, mikroskop, *colony counter*, spiritus, korek api, *staining jar*, spektrofotometri, autoklaf, incubator, lidi kapas, oase, rak tabung, lidi kapas, vortex dan cuvet.

4.6.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain buah mahkota dewa, pelarut etanol 96%, air, isolate *Pseudomonas aeruginosa*, media Nutrient Agar, alkohol 96%, Kristal violet, lugol, safranin, aquades, n-heksana, n-butanol, minyak inersi, kertas penghisap, kapas, dan H₂O₂ 3%, serbuk Mg dan larutan HCl.

4.7 Operasional Penelitian

4.7.1 Pembuatan Ekstrak Buah Mahkota Dewa

4.7.1.1 Tahap Pengeringan

1. Mencuci bersih buah mahkota dewa yang akan dikeringkan dan menimbangnyanya
2. Memotong menjadi beberapa buah mahkota dewa
3. Memasukkan buah mahkota dewa yang sudah dipotong pada oven dengan suhu 80°C selama kurang lebih 2 hari agar tidak terdapat air pada buah

4. Mem-*blender* atau menggunakan mesin penyerbuk potongan buah mahkota dewa yang sudah di oven untuk dijadikan serbuk

4.7.1.2 Tahap Ekstraksi

1. Menimbang serbuk dari buah mahkota dewa yang akan digunakan
2. Merendam serbuk tersebut dengan etanol 96% (dengan perbandingan 1 : 4, 1 kg bahan dengan 4 liter pelarut) lalu diaduk agar homogen
3. Diamkan selama 2 x 24 jam agar mengendap
4. Melakukan maserasi untuk mendapatkan filtrat dan residu yang berupa cairan agak pekat
5. Filtrat yang didapat disaring dengan kertas saring Whattman no. 40

4.7.1.3 Tahap Evaporasi

1. Mengeringkan filtrat menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 40°C untuk memperoleh ekstrak yang terpisah dengan pelarut
2. Memasukkan filtrate ke dalam labu di atas *waterbath*
3. Mengatur suhu dan kondensor *waterbath* sesuai titik uap pelarutnya, hasilnya nanti akan diperoleh pelarut terpisah berbentuk cairan di labu berbeda.

4.7.2 Pemisahan Senyawa Flavonoid

4.7.2.1 Partisi dengan n-heksana

Partisi menggunakan n-heksana, ekstrak dengan etanol 96% dilarutkan pada n-heksana sebanyak 1 liter untuk memisahkan lemak dan getah, lalu menambahkan air untuk memisahkan etanol dan air. Setelah didapatkan residu etanol dan n-heksana, larutan n-heksana dibuang dan residu etanol diuapkan dengan suhu $\pm 45^{\circ}\text{C}$.

4.7.3 Identifikasi *Pseudomonas aeruginosa*

Tes yang akan dilakukan untuk mengidentifikasi koloni *Pseudomonas aeruginosa* antara lain adalah identifikasi koloni pada Nutrient Agar, pewarnaan gram, dan uji katalase.

4.7.4 Identifikasi Koloni pada Nutrient Agar

Isolate bakteri dari Laboratorium Mikrobiologi diambil satu koloni dengan menggunakan ose. Kemudian dibiakkan pada media Nutrient Agar sedemikian hingga dihasilkan koloni terpisah dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

Setelah itu diamati karakteristik koloni bakteri, yaitu adanya pigmen pyocyanin, pyoverdine dan pyorubin.

4.7.4.1 Pewarnaan Gram

- a. Mengambil koloni *Pseudomonas aeruginosa* dengan lidi kapas dari Nutrient Agar ke kaca benda yang sebelumnya sudah diberi lingkaran dengan spidol permanen
- b. Menunggu sediaan sampai kering, lalu difiksasi di atas api bunsen, dengan mengayunkan sebanyak 3-5 kali
- c. Meneteskan Kristal violet di atas kaca benda, lalu ditunggu selama 1 menit, bilas dengan aquades
- d. Meneteskan lugol di atas kaca benda, lalu ditunggu selama 1 menit, bilas dengan aquades
- e. Meneteskan alcohol 96% di atas kaca benda, lalu ditunggu 5-10 detik, bilas dengan aquades
- f. Meneteskan safranin di atas kaca benda, lalu ditunggu selama 30 detik, bilas dengan aquades
- g. Mengeringkan sediaan dengan kertas penghisap

h. Mengamati sediaan dibawah mikroskop dengan perbesaran total dari terkecil yaitu 100x, 400x dan terbesar 1000x menggunakan minyak imersi

i. Mengamati adanya bakteri dengan bentuk batang dan bewarna merah

4.7.4.2 Uji Katalase

a. Mengambil koloni dengan menggunakan ose

b. Menggosokkan ose dan meneteskan 1-2 tetes H_2O_2 3% ke dalam petridish

c. Mengamati apakah ada gelembung yang terbentuk, positif jika terdapat gelembung

4.7.4.3 Uji Oksidase

a. Mengambil koloni *Pseudomonas aeruginosa* dengan ose kemudian menaruhnya di strip oksidase

b. Mengamati apakah terjadi perubahan warna, positif jika terjadi perubahan warna ungu

4.7.5 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

a. Mempersiapkan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dari media Nutrient Agar yang telah diuji konfirmasi kemudian dimasukkan ke dalam Broth Agar dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 – 24 jam.

b. Mengambil koloni dengan menggunakan ose kemudian dimasukkan ke dalam 10 ml NaCl 0,85%. Kemudian diukur Optical Density (OD) atau kepadatan optisnya dengan spektrofotometer pada $\lambda_{maks} = 600$ nm. Dari hasil yang diperoleh kemudian dibuat suspense sel yang mengandung 10^8 CFU/ml yang setara dengan OD 1. Lalu menggunakan rumus $v_1.n_1=v_2.n_2$ untuk pengenceran. Dalam rumus tsb., v_1 merupakan 10 ml NaCl 0,85%, n_1 merupakan OD yang didapat dari hasil spektrofotometer, v_2 adalah

variabel yang dicari untuk menemukan volume total dengan konsentrasi 10^8 dan n_2 merupakan 1 yang setara dengan 10^8 .

- c. Untuk mendapatkan suspensi sel yang mengandung 10^6 CFU/ml dilakukan dengan cara mengambil 1 ml (dari tabung yang mengandung 10^8 CFU/ml) untuk dicampur dengan 9 ml NaCl 0.85% steril. Hasilnya didapatkan suspensi sel dengan konsentrasi 10^7 CFU/ml, dilanjutkan sekali lagi hingga mencapai konsentrasi suspensi yang digunakan untuk tes yaitu 10^6 CFU/ml

4.7.6 Uji Anti Bakteri

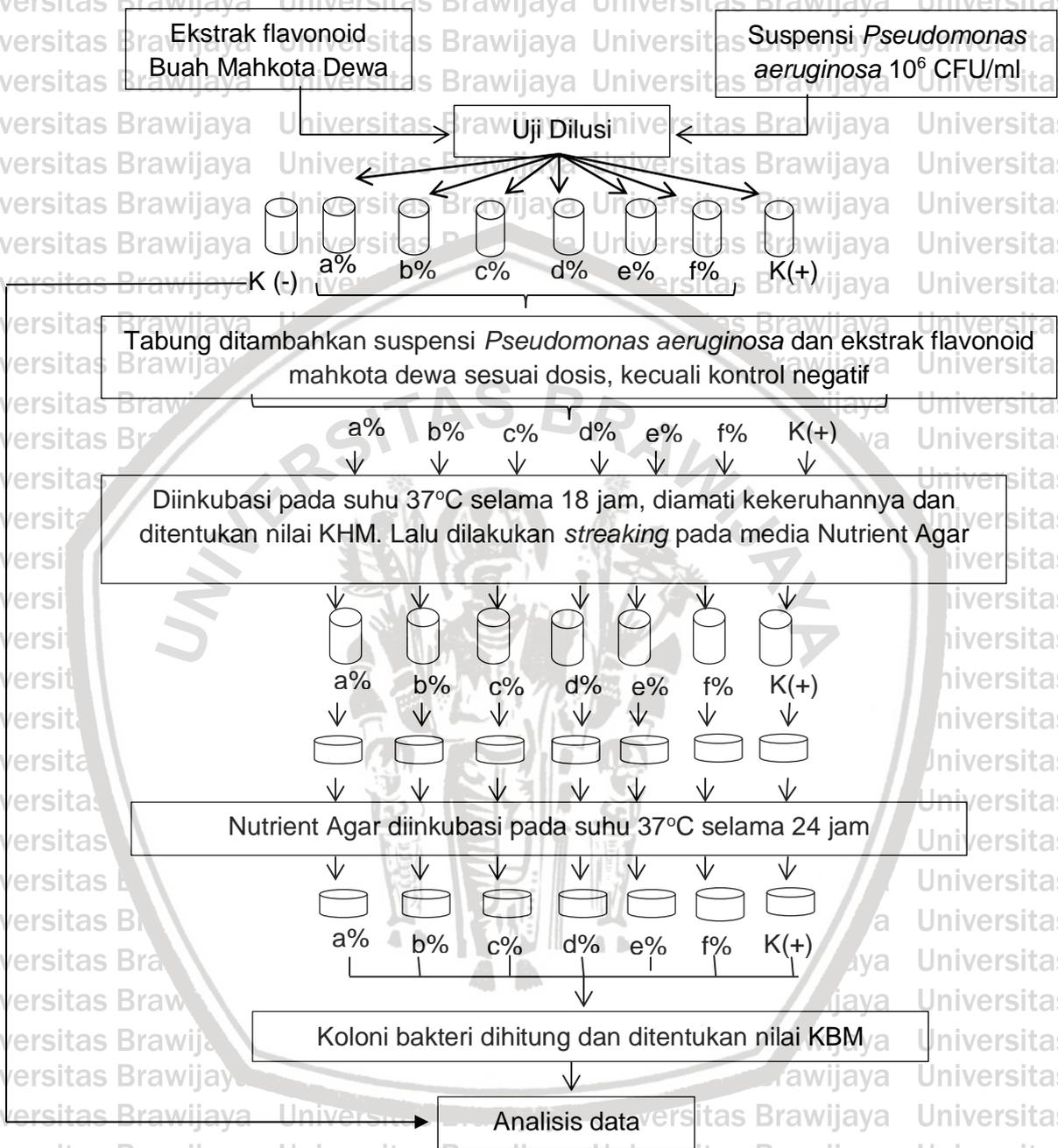
1. Disediakan 8 tabung reaksi steril dan diberi tanda 1,2,3,4,5,6,7 dan 8 dengan konsentrasi 12%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% dan 0%.
2. Dilakukan pembuatan larutan dengan konsentrasi 12%, 10%, 8%, 6%, 4%, 2% dan 0% dengan pelarut DMSO dan menggunakan rumus pengenceran $n_1.v_1 = n_2.v_2$, setelah itu agar homogen, larutan divortex
3. Tabung 7 diberikan konsentrasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* 10^6 CFU/ml sebanyak 1 ml tanpa ekstrak dan tabung 8 tidak diberikan bakteri dan ekstrak
4. Tabung 1-6 diberikan konsentrasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* 10^6 CFU/ml sebanyak 1 ml dan ekstrak flavonoid lalu divortex hingga homogen. Seluruh tabung termasuk kontrol negatif kemudian diinkubasikan dalam inkubator pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
5. Hari kedua semua tabung dikeluarkan dari inkubator. Tabung 1-7 dibandingkan kekeruhannya dengan tabung kontrol negatif untuk menentukan KHM menggunakan kertas putih yang sebelumnya sudah diberikan garis-garis

dengan ketebalan bervariasi, dikatakan tidak keruh jika garis paling tipis pada kertas putih terlihat.

8. Dari tabung yang menunjukkan warna jernih untuk pertama kalinya, diambil sebanyak 1 ose kemudian digoreskan pada Nutrient Agar dan diinkubasi selama 24-48 jam dengan suhu 37°C
9. Jumlah colony pada Nutrient Agar dihitung dengan menggunakan *colony counter* dan tentukan KBM. KBM ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri atau pertumbuhan bakteri kurang dari 0,1% dibandingkan dengan kontrol



Alur Kerja Penelitian



Gambar 4.1 Alur Penelitian Metode Dilusi Tabung

Keterangan : K (-) : Kontrol Negatif, K (+) : Kontrol Positif

4.8 Analisis data

Analisa data yang digunakan adalah analisa kuantitatif statistik *One Way ANOVA* dan uji statistik korelasi-regresi. Sebelumnya dilakukan uji normalitas dan homogenitas varian menggunakan Shapiro-Wilk. Uji statistik ANOVA one-way dengan derajat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) digunakan untuk mengetahui signifikasi hasil perhitungan jumlah koloni bakteri *Pseudomonas aeruginosa* terhadap ekstrak flavonoid buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*).

Sedangkan uji korelasi-regresi digunakan untuk mengetahui kekuatan hubungan dan besarnya pengaruh antara konsentrasi ekstrak flavonoid mahkota dewa terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Untuk mengetahui konsentrasi mana yang memberikan hasil/perbedaan yang signifikan, dilakukan uji perbandingan Post Hoc Tukey. Analisis data menggunakan software SPSS (Statistical Product of Service Solution) for Windows versi 25.0.

BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian

5.1.1 Hasil Ekstraksi Flavonoid Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*)

Ekstrak yang akan digunakan dibuat dari buah Mahkota Dewa sebanyak 4000 gram. Proses pengeringan dengan menggunakan oven pada suhu 80°C selama kurang lebih 2 hari. Setelah proses pengeringan selesai, dilanjutkan dengan mem-*blender* untuk dijadikan serbuk. Setelah itu dilakukan tahap ekstraksi dengan merendam serbuk tersebut dengan etanol 96% dan dilanjutkan dengan tahap evaporasi untuk memperoleh ekstrak yang terpisah dengan pelarut. Kemudian dengan partisi n-heksana untuk memisahkan lemak dan getah kemudian diuapkan dengan suhu $\pm 45^{\circ}\text{C}$.

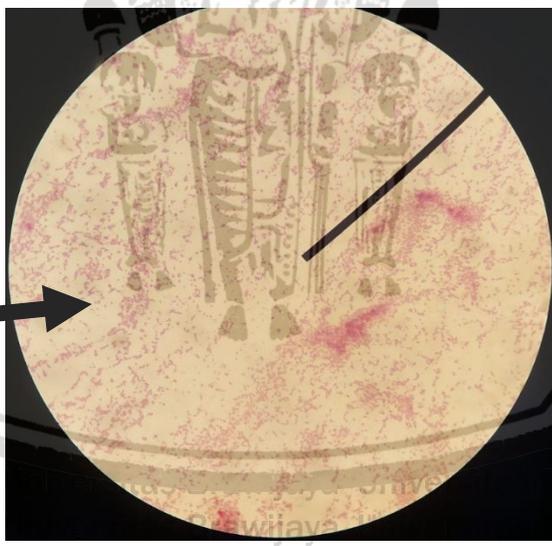


Gambar 5.1 Hasil sampel ekstrak flavonoid buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*).

5.1.2 Hasil Identifikasi *Pseudomonas aeruginosa*

Penelitian ini menggunakan isolat *Pseudomonas aeruginosa* yang disediakan oleh Laboratorium Mikrobiologi FKUB. Isolat tersebut didapatkan dari sputum lalu dikembangkan di Laboratorium Mikrobiologi FKUB. Isolat tersebut di-streaking ulang pada media Nutrient Agar Plate, kemudian dilakukan identifikasi menggunakan pewarnaan gram, uji katalase dan uji oksidase. Pada Nutrient Agar Plate, *Pseudomonas aeruginosa* menghasilkan koloni berbentuk bulat dan halus dengan warna hijau fluoresens.

Pada pewarnaan Gram dan pengamatan dibawah mikroskop dengan perbesaran 100x didapatkan gambaran *Pseudomonas aeruginosa* berbentuk batang dan bewarna merah seperti yang ditunjukkan pada Gambar 5.2.



Gambar 5.2 Hasil pengamatan *Pseudomonas aeruginosa* secara mikroskopis pada pengecatan Gram, tampak berbentuk batang berwarna merah dengan perbesaran 1000x.

Pada uji katalase, didapatkan adanya gelembung-gelembung udara yang menandakan bahwa uji katalase pada *Pseudomonas aeruginosa* positif.



Gambar 5.3 Hasil uji katalase positif *Pseudomonas aeruginosa* dengan terbentuknya gelembung udara

Pada uji oksidase, didapatkan kertas oksidase berubah warna menjadi ungu yang menandakan bahwa uji oksidase pada *Pseudomonas aeruginosa* positif.



Gambar 5.4 Hasil uji oksidase positif *Pseudomonas aeruginosa* dengan warna ungu pada oksidase strip

5.1.3 Hasil Pengamatan Kekeruhan dan Analisis terhadap KHM

Penelitian ini menggunakan 7 macam konsentrasi ekstrak flavonoid buah Mahkota Dewa yaitu 2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 12% serta 0% sebagai kontrol negatif (K-). Kadar Hambat Minimum (KHM) adalah konsentrasi terendah dari ekstrak flavonoid buah mahkota dewa yang dapat mengurangi jumlah koloni *Pseudomonas aeruginosa* ditandai dengan warna jernih yang pertama pada tabung. Tetapi karena ekstrak yang digunakan keruh, maka KHM ditentukan dengan tabung pertama yang

tidak ada pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa*. Pada penelitian ini penentuan KHM menggunakan metode dilusi tabung.



Gambar 5.5 Hasil inkubasi tabung selama 24 jam dengan berbagai konsentrasi ekstrak flavonoid buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*)

Berdasarkan hasil uji dilusi tabung, didapatkan hasil yaitu pada tabung konsentrasi 8% tidak terlihat adanya pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa*, sehingga dapat disimpulkan bahwa KHM dalam penelitian ini ada pada konsentrasi 8%.

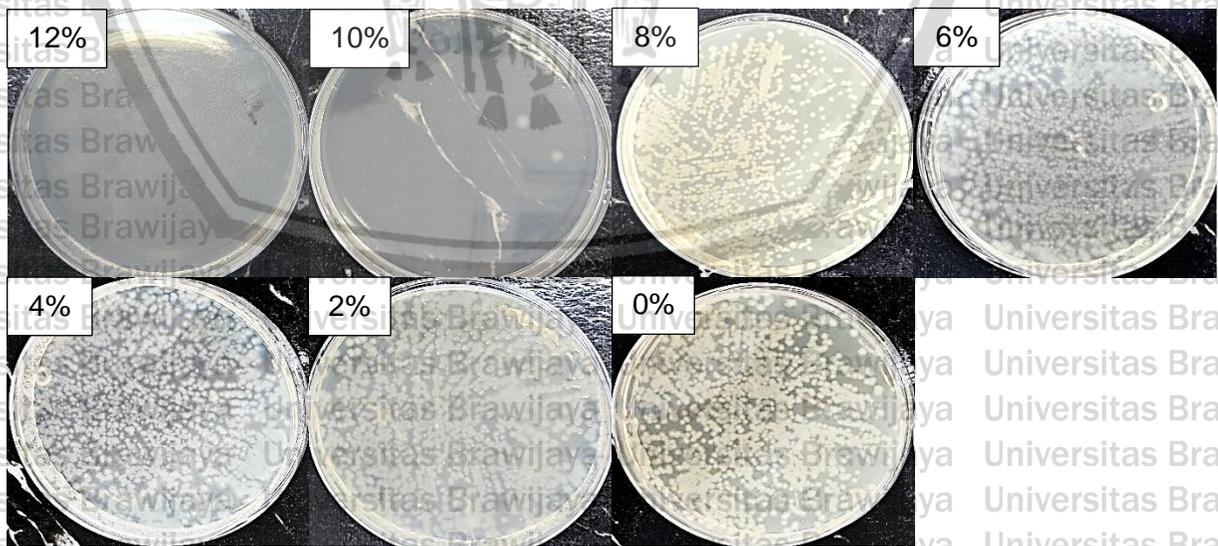
5.1.4 Hasil Penentuan KBM dan Analisis terhadap KBM

Untuk menentukan KBM, dilakukan *streaking* dengan mengambil 10 µL menggunakan pipet dan diteteskan pada medium Nutrient Agar Plate. *Streaking* menggunakan ose, kemudian diinkubasi pada suhu 18-24 jam. Setelah itu dilakukan perhitungan jumlah koloni pada masing-masing Nutrient Agar Plate menggunakan colony counter.

Kadar Bunuh Minimum (KBM) adalah konsentrasi terendah dari ekstrak flavonoid buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) yang dapat membunuh koloni *Pseudomonas aeruginosa* ditandai dengan jumlah koloni yang semakin sedikit bahkan tidak terdapat pertumbuhan.

Pada konsentrasi 0%, 2%, 4%, dan 6% dilakukan pengenceran 1000x, pada konsentrasi 8% dilakukan pengenceran 10x. Pengenceran karena pada konsentrasi tersebut, jumlah bakteri terlalu banyak dan merata, sehingga susah untuk dilakukan perhitungan. Sedangkan pada konsentrasi 10% dan 12% tidak dilakukan pengenceran.

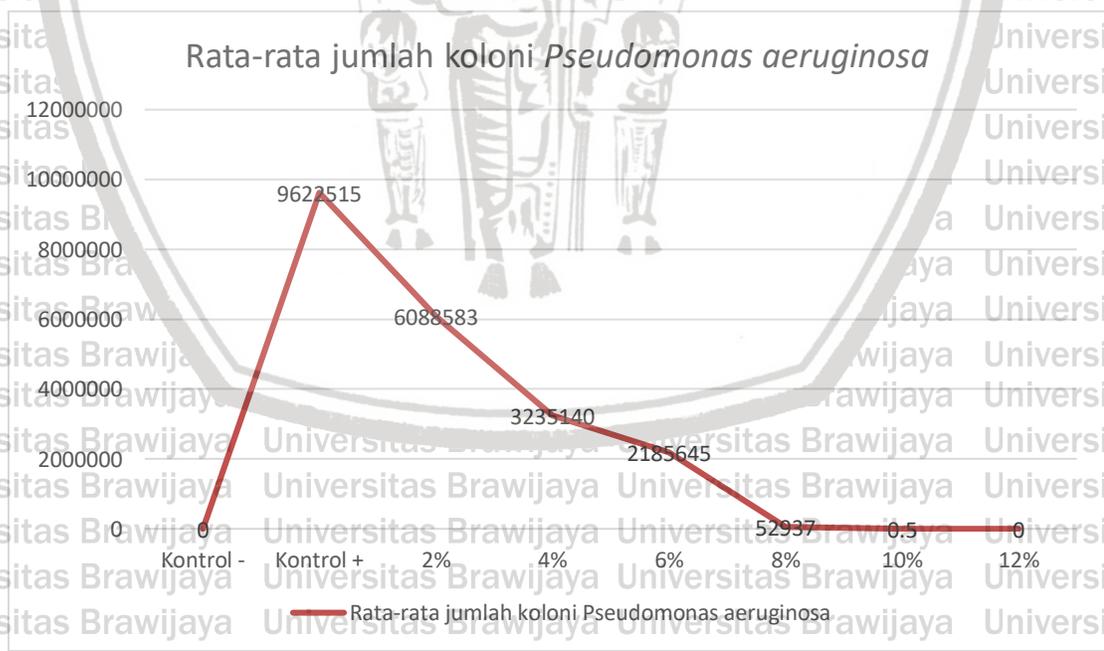
Dari hasil perhitungan *colony counter*, didapatkan Kadar Bunuh Minimal ekstrak flavonoid buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ada pada konsentrasi 12%, ditandai dengan tidak terdapat pertumbuhan koloni *Pseudomonas aeruginosa* pada Nutrient Agar Plate pada semua pengulangan.



Gambar 5.6 Hasil streaking suspense koloni *Pseudomonas aeruginosa* dan ekstrak flavonoid dengan berbagai konsentrasi pada media NAP

Tabel 5.1 Hasil dari perhitungan jumlah koloni *Pseudomonas aeruginosa*

Konsentrasi	Pengulangan				Rata-rata	Standard deviasi
	1	2	3	4		
Kontrol -	0	0	0	0	0	0
Kontrol +	10161830	9026430	8572270	10729530	9622515	995770.2
2%	6755630	5393150	7493640	4711910	6088583	1264647
4%	3235890	3292660	3519740	2895270	3235140	258080
6%	2724960	1986950	2214030	1816640	2185645	394677
8%	53931	47119	59040	51660	52937	4956.96
10%	0	0	0	2	0.5	1
12%	0	0	0	0	0	0



Gambar 5.7 Rerata jumlah koloni *Pseudomonas aeruginosa* setelah pemberian berbagai konsentrasi ekstrak flavonoid buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*)

5.2 Analisis Data

5.2.1 Uji Normalitas dan Homogenitas

Analisis data dalam penelitian ini menggunakan *software* SPSS for Windows versi 25.0, hasil signifikansi dari uji normalitas Shapiro-Wilk adalah sig $p=0,762$ ($p>0,05$) yang berarti data berdistribusi normal. Dari hasil uji homogenitas Levene, didapatkan nilai sig $p=0,109$ ($p>0,05$) yang berarti bahwa data bervariasi sama. (Lampiran 4)

5.2.2 Uji *One-way Anova*

Syarat untuk melakukan uji komparatif *One-way Anova* adalah data berdistribusi normal dan bervariasi sama. Hasil dari uji komparatif *One-way Anova* (taraf kepercayaan 95%) adalah sig $p=0,000$ ($p<0,05$) pada perubahan konsentrasi ekstrak flavonoid buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) terhadap jumlah koloni *Pseudomonas aeruginosa*. (Lampiran 5)

5.2.3 Uji Post Hoc Tukey

Untuk mengetahui konsentrasi mana yang memberikan hasil/perbedaan yang signifikan, dilakukan uji perbandingan Post Hoc Tukey. Disebut signifikan jika $p<0,05$, tetapi pada penelitian ini yang bertujuan untuk mengurangi jumlah koloni bakteri, hasil yang harus didapatkan adalah tidak signifikan. Didapatkan hasil tidak signifikan pada konsentrasi 0% terhadap 8%, 10%, 12% yang menandakan bahwa konsentrasi 8%, 10% dan 12% dapat mengurangi jumlah koloni bakteri hingga

jumlah koloninya mendekati konsentrasi 0% yang merupakan kontrol negatif.

(Lampiran 6)

5.2.4 Uji Korelasi Pearson

Untuk mengetahui kekuatan hubungan antara konsentrasi ekstrak flavonoid buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) dengan jumlah koloni *Pseudomonas aeruginosa* dilakukan uji korelasi Pearson dengan hasil didapatkan nilai signifikansi 0,000 dan nilai korelasi Pearson adalah $r=-0,918$. Notasi negatif pada nilai korelasi Pearson menunjukkan hubungan terbalik yang berarti semakin tinggi konsentrasi ekstrak flavonoid buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) maka semakin rendah jumlah koloni *Pseudomonas aeruginosa*. (Lampiran 7)

5.2.5 Uji Regresi Linier Sederhana

Didapatkan hasil dari uji regresi linier sederhana adalah R Square= 0,843 yang berarti kemampuan ekstrak flavonoid buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) dalam menurunkan jumlah koloni *Pseudomonas aeruginosa* adalah sebesar 84%, untuk 16% merupakan faktor lain yang tidak diidentifikasi seperti kualitas alat yang digunakan untuk menyimpan ekstrak, alat inkubator untuk menginkubasi bakteri, lama penyimpanan ekstrak flavonoid buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*), dan karakteristik *Pseudomonas aeruginosa*. Hubungan antara kenaikan konsentrasi ekstrak flavonoid Buah Mahkota Dewa dengan penurunan jumlah koloni *Pseudomonas aeruginosa* dapat dinyatakan dengan rumus $Y = (-789780X) + 7765188$, dimana X merupakan konsentrasi ekstrak flavonoid Buah Mahkota Dewa. Hal ini menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi ekstrak

flavonoid Buah Mahkota Dewa yang digunakan, maka semakin besar penurunan jumlah koloni *Pseudomonas aeruginosa* (Lampiran 8)



BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian eksperimental ini menggunakan *Pseudomonas aeruginosa* yang didapat dari isolat sputum dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan ditanam pada media Nutrient Agar Plate. Buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) yang digunakan berasal dari perkebunan di daerah Lawang, Malang. Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 96%, karena etanol 96% mempunyai kandungan air yang sangat sedikit sehingga dapat menghasilkan ekstrak yang lebih kental dan murni, tidak seperti pada etanol 70% yang memiliki perbandingan alkohol dan air 7:3 atau etanol 50% yang memiliki perbandingan alkohol dan air 1:1 sehingga ekstrak yang dihasilkan kurang murni (Arifianti, 2014). Kemudian dilakukan maserasi dan evaporasi untuk memisahkan pelarut dengan ekstraknya. Lalu dilakukan partisi dengan n-heksana untuk memisahkan lemak dan getah dan diluapkan untuk menghilangkan residu n-heksana dan etanol.

Sebelum menggunakan metode dilusi agar, dilakukan metode difusi agar, dikarenakan ekstrak flavonoid buah mahkota dewa yang digunakan keruh sehingga sangat susah untuk menentukan KHM. Tetapi hasil dari metode difusi agar adalah *Pseudomonas aeruginosa* resisten terhadap semua konsentrasi, yaitu 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, dan 3.125%. Hal ini dikarenakan metode difusi agar dapat menyebabkan *false-resistance* pada *Pseudomonas aeruginosa* dan angka *false-resistance* tersebut cukup tinggi (Livermore, D.M. dan Chen, H.Y., 1999).

Pada penelitian menggunakan metode dilusi agar, dilakukan penelitian pendahuluan dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.125% dan 0%.

Pada konsentrasi 12.5% terlihat tidak adanya pertumbuhan koloni *Pseudomonas aeruginosa*. Kemudian dilakukan perapatan dengan konsentrasi 12%, 10%, 8%, 6%,

4%, 2% dan 0% untuk menentukan konsentrasi efektifnya. Setelah itu dilakukan pengulangan sebanyak 4x untuk tiap konsentrasi. Dari hasil penelitian didapatkan

KHM ada pada konsentrasi 8% sedangkan KBM ada pada konsentrasi 12%.

Konsentrasi yang rendah menunjukkan bahwa *Pseudomonas aeruginosa* tidak resistan terhadap ekstrak flavonoid buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*).

Hasil penelitian ini membuktikan bahwa ekstrak flavonoid buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) terbukti mampu menghambat pertumbuhan terhadap

Pseudomonas aeruginosa secara in vitro. Penelitian ini sejalan dengan penelitian

yang dilakukan oleh Hendra (2011) tentang efek ekstrak flavonoid buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) terhadap pertumbuhan *Pseudomonas aeruginosa*,

tetapi dalam penelitian ini menggunakan pelarut methanol dan metodenya difusi agar, sedangkan penelitian yang dilakukan menggunakan pelarut ethanol dan

metodenya dilusi agar. Pada penelitian ini juga dipaparkan tentang efek antimikrobal terhadap beberapa Bakteri Gram Positif, Bakteri Gram Negatif, dan Fungi yang

keefektifannya dalam rentang lemah sampai sedang. Beberapa di antaranya adalah *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus. luteus*, *Staphylococcus aureus*,

Enterobacter aerogenes, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Ganoderma lucidum*, dan *Mucor indicus*. Hal ini menunjukkan

bahwa ekstrak flavonoid buah mahkota dewa dapat berfungsi sebagai antimikroba berspektrum luas.

Penelitian lain yang dilakukan oleh Shodikin (2010) menggunakan ekstrak flavonoid daun mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) terhadap *Pseudomonas aeruginosa*, dengan hasil potensi antimikrobanya lemah. Hal ini dikarenakan ekstrak flavonoid yang diambil bukan dari buah tetapi dari daun, padahal penelitian yang dilakukan oleh Hendra (2011) mengatakan bahwa konsentrasi tertinggi flavonoid ada pada buah, bukan pada daun.

Senyawa flavonoid seperti kaempferol, myricetin, naringin, quercetin dan rutin di dalam mahkota dewa terlibat dalam mekanisme kerja antimikroba. Kerusakan pada membran sitoplasma mikroba terjadi karena adanya ikatan hydrogen yang dibentuk oleh kompleks flavonoid dengan protein mikroba, sehingga menyebabkan denaturasi protein pada membran sitoplasma mikroba. Proses sintesis asam nukleat akan terganggu karena adanya penghambatan pada enzim RNA polimerase dan enzim DNA girase. Padahal enzim-enzim ini berfungsi untuk proses sintesis DNA RNA dan proses replikasi DNA. Hasilnya mikroba tersebut tidak mengalami pertumbuhan. Metabolisme adalah proses pemecahan bahan baku menjadi energi untuk beraktivitas, jika proses metabolisme diganggu, kelangsungan hidup mikroba juga akan terganggu (Hendra, 2011).

Senyawa flavonoid dapat menghancurkan lapisan dinding bakteri Gram positif yang berupa *Peptidoglycan* pada *Pseudomonas aeruginosa*. Hal ini berakibat pada perubahan permeabilitas dinding sel bakteri, dimana tekanan osmotik di dalam sel bakteri lebih besar daripada tekanan osmotik di luar sel bakteri, yang

menyebabkan cairan akan berpindah dari luar sel menuju ke dalam sel bakteri dan sel bakteri akan lisis (Shodikin, 2010).

Selain itu, senyawa flavonoid dapat menghambat fosforilasi protein, sehingga menurunkan efisiensi katalitik enzim, afinitas enzim terhadap substrat, dan dapat menonaktifkan banyak enzim protein sehingga regulasi sel terganggu. Hal ini dapat menghambat pertumbuhan dari bakteri *Pseudomonas aeruginosa* (Or, Ja and Oa, 2016). Senyawa flavonoid dapat merusak lapisan alginat bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, sehingga tidak dapat mengikat kation serta dapat merusak membran luar yang bersifat hidrofobik, yang normalnya menjadi penghalang penetrasi bahan antimikroba. Dua mekanisme tersebut menjadi dasar terjadi perubahan permeabilitas dinding sel terhadap bahan antimikroba pada *Pseudomonas aeruginosa* (Ozcelik B, 2012). Selain itu, senyawa flavonoid juga dapat bekerja sebagai penghambat sintesis asam nukleat dengan menghambat enzim dihidrofolat reductase yang menyebabkan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* tidak bisa berkembang dan dapat menyebabkan kematian bakteri (Nascimento, 2014).

Kekurangan dari penelitian ini adalah menggunakan ekstrak flavonoid buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) yang sudah disimpan lama dan membeku dalam freezer lebih dari 6 bulan, sehingga tidak diketahui apakah hal tersebut berpengaruh pada potensi antimikroba yang dihasilkan.

Keterbatasan lainnya adalah referensi tentang penelitian ekstrak flavonoid buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) terhadap *Pseudomonas aeruginosa* masih sedikit. Selain itu biaya untuk melakukan ekstrak flavonoid pada penelitian ini

cukup mahal sehingga diperlukan metode pengekstrakan lain dengan hasil yang sama atau lebih bagus dengan harga yang lebih murah.



BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil pemberian ekstrak flavonoid buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, dapat disimpulkan bahwa :

- a. Ekstrak flavonoid buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) dapat sebagai antibakteri terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.
- b. Kadar Hambat Minimum (KHM) ekstrak flavonoid buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ada pada konsentrasi 8%.
- c. Kadar Bunuh Minimum (KBM) dari ekstrak flavonoid buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) terhadap *Pseudomonas aeruginosa* ada pada konsentrasi 12%

7.2 Saran

Adapun saran yang dapat diberikan dari penelitian ini adalah :

- a. Perlu dilakukan lebih lanjut penelitian tentang ekstrak flavonoid buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) terhadap bakteri, jamur dan parasit lainnya.
- b. Perlu dilakukan perbandingan efektifitas antibakteri flavonoid ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) dengan antibiotik terhadap *Pseudomonas aeruginosa* secara in vitro.

c. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang ekstrak flavonoid buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) terhadap *Pseudomonas aeruginosa* secara in vivo untuk mengetahui efek samping, dosis efektif serta toksisitasnya yang akan ditimbulkan.



DAFTAR PUSTAKA

- Allen, L., Dockrell, D. H., Pattery, T., Daniel, G., Cornelis, P., Hellewell, P. G., Moira, K. B. and Whyte, M. K. B. (2017) 'Pyocyanin Production by *Pseudomonasaeruginosa* Induces Neutrophil Apoptosis and Impairs Neutrophil-Mediated Host Defenses In Vivo'. doi: 10.4049/jimmunol.174.6.3643.
- Altaf, R., Zaini, M., Asmawi, B., Dewa, A., Sadikun, A. and Umar, M. I. (2013) 'Phytochemistry and medicinal properties of *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl. extracts', 7(13). doi: 10.4103/0973-7847.112853.
- Anonymous, 2017. Microbiology In Pictures. *Pseudomonas aeruginosa*, (Online), (<https://www.microbiologyinpictures.com/bacteria-photos/pseudomonas-aeruginosa-photos/p-aeruginosa-cetrimide.html>), diakses 1 Oktober 2017).
- Arifianti, L. et al. (2014) 'Pengaruh Jenis Pelarut Pengekstraksi E-Journal Planta Husada Vol.2, No.1 April 2014', 2(1), pp.3-6.
- Astriyai, W. et al. (2017) 'DAYA HAMBAT EKSTRAK BUAH MAHKOTA DEWA (*Phaleria macrocarpa* L.) DENGAN PELARUT ETHANOL DAN AQUADES', 18(2), pp. 8–13. doi: 10.21776/ub.jtapro.2017.018.02.2.
- Balczon, R., Prasain, N., Ochoa, C., Prater, J., Zhu, B., Alexeyev, M., Sayner, S., Frank, D. W. and Stevens, T. (2013) 'Pseudomonas aeruginosa Exotoxin Y-Mediated Tau Hyperphosphorylation Impairs Microtubule Assembly in Pulmonary Microvascular Endothelial Cells', *PLoS ONE*, 8(9). doi: 10.1371/journal.pone.0074343.
- Carolina, N. (2017) 'The Effect of Pyruvate and Acetate on the Rate of Decrease in Optical Density of Suspensions of *Pseudomonas aeruginosa* in Sodium, Potassium or Sodium -Potassium Phosphate Buffers'.
- Cushnie, T. P. T., Cushnie, B. and Lamb, A. J. (2014) 'Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities', *International Journal of Antimicrobial Agents*, 44(5), pp. 377–386. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2014.06.001.
- Cuzick, A., Stirling, F. R., Lindsay, S. L. and Evans, T. J. (2016) 'The type III pseudomonas exotoxin U activates the c-Jun NH 2-terminal kinase pathway and increases human epithelial interleukin-8 production', *Infection and Immunity*, 74(7), pp. 4104–4113. doi: 10.1128/IAI.02045-05.
- Difference, T., Tract, U., Risk, I., Urine, C., Weisela, E., Sari, P., Satyabakti, P., Ua, F. K. M., Epidemiologi, D. and Ua, F. K. M. (2014) 'BERDASARKAN KATETERISASI URIN, UMUR, DAN', pp. 205–216.
- Ditjen POM. (2000). *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Cetakan Pertama. Jakarta: Departemen Kesehatan RI. Halaman. 10-12.

- Fedora, M. (2012) 'Nosocomial Infections: The Definition Criteria', 37(2), pp. 72–73. doi: 10.1053/jhin.1998.0550.
- Ghasemzadeh, A. *et al.* (2015) 'Comparative Evaluation of Different Extraction Techniques and Solvents for the Assay of Phytochemicals and Antioxidant Activity of Hashemi Rice Bran', pp. 10822–10838. doi: 10.3390/molecules200610822.
- Giguere S, Prescott JF, Dowling PM. 2013. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. Edisi ke-5. USA: Wiley Blackwell.
- Gopalan, H. K., Salih, N. D., Roslan, F. H., Azmi, N., Lumpur, U. K., Sentral, T. K., Ehsan, S. D., Sciences, A. H. and Lumpur, K. (2015) 'EVALUATION OF ANTIBACTERIAL EFFECT OF PHALERIA MACROCARPA
- Gunawan SG, Nafrialdi RS, Elysabeth. 2007. *Farmakologi dan Terapi*. Edisi ke-5 Jakarta: Departemen Farmakologi dan Terapeutik FKUI.
- Handayani, V. (2015) 'The Aqueous Extract of Potato (Ipomea batatas L.) Effect Against Bacteris Causing Acne (Propionibacterium acne)', 7(1), pp. 10–15.
- Hendra, R., Ahmad, S., Sukari, A. and Shukor, M. Y. (2011) 'Flavonoid Analyses and Antimicrobial Activity of Various Parts of Phaleria macrocarpa (Scheff .) Boerl Fruit', pp. 3422–3431. doi: 10.3390/ijms12063422.
- Huang, C. R., Lu, C. H., Chuang, Y. G., Tsai, N. W., Chang, C. C., Chen, S. F., Wang, H. C., Chien, C. C. and Chang, W. N. (2007) 'Adult Pseudomonas aeruginosa meningitis: High incidence of underlying medical and/or postneurosurgical conditions and high mortality rate', *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 60(6), pp. 397–399.
- Huang, X. *et al.* (2015) 'Research on the treatment of Pseudomonas aeruginosa pneumonia in children by macrolide antibiotics', pp. 479–482. doi: 10.1515/med-2015-0082.
- Ismanto, A. Y., Rompas, S., Studi, P., Keperawatan, I., Kedokteran, F., Sam, U. and Manado, R. (2012) 'Pengaruh Buah Mahkota Dewa Terhadap Penurunan Tekanan Darah Pada Penderita Hipertensi di Desa Werdhi Agung Kecamatan Dumoga Tengah Kabupaten Bolaang Mongondow'.
- Jawetz, Melnick, Adelberg's, Karen C, Janet S, *et al.* 2016. *Medical Microbiology, Pseudomonads and Acinetobacter*, 27th Ed., McGraw-Hill Education, New York, p. 245 – 247.
- Jung TK, Jinn TY. Diseases of the External Ear, Otitis Media and Middle Ear Effusions. In: Ballenger's Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, Sixteenth edition, BC. Decker, Hamilton, Ontario, 2003 : 238-41.
- Karou, D., Dicko, M. H., Simpoire, J. and Traore, A. S. (2005) 'Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso', *Journal of Biotechnology*, 4(August), pp. 823–828. doi: 10.5897/AJB09.1302.

- Lay, M. M., Karsani, S. A., Banisalam, B., Mohajer, S. and Abd Malek, S. N. (2014) 'Antioxidants, phytochemicals, and cytotoxicity studies on *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl Seeds', *BioMed Research International*, 2014. doi: 10.1155/2014/410184.
- Lederberg, Joshua et al. *Pseudomonas*. Encyclopedia of Microbiology. Second Edition. Volume 3. San Diego, 2010. p. 876-891.
- Leung, Wallace Woon-Fong. 2008. *Industrial Centrifugation Technology*. New York, NY: McGraw-Hill.
- Liebert, M. A. (2002) 'Pseudomonas aeruginosa Proteases and Corneal Virulence', 21, pp. 391–396.
- Lim, S. H., Darah, I. and Jain, K. (2006) 'Antimicrobial Activities Of Tannins Extracted From *Rhizophora Apiculata* Barks', 18(1), pp. 59–65.
- Livemore, D. M. dan Chen, H. Y. (1999) 'Quality of Antimicrobial Susceptibility Testing in the UK', pp.517-522.
- Manuscript, A. (2015) 'NIH Public Access', pp. 1–11. doi: 10.1002/9780471729259.mc06e01s25.Growth.
- Marwoto, A, Hari Kusnato, danDwi Handono.2007. Analisis Kinerja Perawat dalam PengendalianInfeksi Nosokomial di Ruang IRNA 1 RSUP. Dr. Sardjito Yogyakarta. Tesis. Yogyakarta: Universitas Gadjah Mada.
- Mencit, P. and Wuisan, J. (no date) 'Uji efek analgesik ekstrak daun mahkota dewa', pp. 873–878.
- Michalska, M. and Wolf, P. (2015) 'Pseudomonas Exotoxin A: Optimized by evolution for effective killing', *Frontiers in Microbiology*, 6(SEP), pp. 1–7. doi: 10.3389/fmicb.2015.00963.
- Mittal, R., Aggarwal, S., Sharma, S., Chhibber, S. and Harjai, K. (2009) 'Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: A minireview', *Journal of Infection and Public Health*, 2(3), pp. 101–111. doi: 10.1016/j.jiph.2009.08.003.
- Moses, T., Papadopoulou, K. K. and Osbourn, A. (2014) 'Metabolic and functional diversity of saponins , biosynthetic intermediates and semi-synthetic derivatives', 9238, pp. 1–24. doi: 10.3109/10409238.2014.953628.
- Nascimento, 2014. Antibacterial Activity of Flavonoid in Plant Extract and Phytochemicals on *Pseudomonas aeruginosa*, *Braz.J.Microbiol.* 31(4).
- Nikolaidis, I. and Dessen, A. (2014) 'Resistance to antibiotics targeted to the bacterial cell wall', 23, pp. 243–259. doi: 10.1002/pro.2414.
- Noorhamdani, et al. 2016. *Bakteriologi Medik, Bakteri Batang Gram Negatif*, Edisi Kedua, Laboratorium Mikrobiologi FKUB, Malang, hal 225 – 228.
- Nurhasnawati, H., Handayani, F. and Samarinda, A. F. (2017) 'SOKLETASI TERHADAP AKTIVITAS ANTIOKSIDAN EKSTRAK ETANOL DAUN JAMBU

BOL Syzygium malaccense L.), 3(1), pp. 91–95.

Or, Ja and Oa, O. (2016) 'Drug Designing : Open Access Review on Phaleria macrocarpa Pharmacological and Phytochemical Properties', 5(3), pp. 12–16. doi: 10.4172/2169-0138.1000134.

Ozcelik B. 2012. Antimicrobial Activity of Flavonoid Against *Pseudomonas aeruginosa*, Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 7(4): 1151-1157.

PDPI. 2014. Pneumonia Nosokomial Pedoman Diagnosis & Penatalaksanaan Di Indonesia. Jakarta, hal. 2-3.

Rahman A, Rizwan S, Waycaster C, Wall GM. Pooled analysis of two clinical trials comparing the clinical outcomes of topical ciprofloxacin/dexamethasone otic suspension and polymyxin B/neomycin/hydrocortisone otic suspension for the treatment of acute otitis externa in adults and children. *Clin Ther.* 2007 Sep. 29(9):1950-6

Rocha, C. L., Coburn, J., Rucks, E. A. and Olson, J. C. (2003) 'Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Exoenzyme S as a Bifunctional Enzyme in J774A . 1 Macrophages', *Society*, 71(9), pp. 5296–5305. doi: 10.1128/IAI.71.9.5296.

Sherris, Kenneth J, et al. 2014. *Medical Microbiology, Pseudomonas and Other Opportunistic Gram-negative Bacilli*, 4th Ed., McGraw-Hill Education. United States, p. 385 – 388.

Shodikin, M. A. (2010)'Antimicrobial Activity of Mahkota Dewa', 46(3), pp. 172-178.

Strateva, T. and Yordanov, D. (2017) 'Pseudomonas aeruginosa – a phenomenon of bacterial resistance', (2009), pp. 1133–1148. doi: 10.1099/jmm.0.009142-0.

Sufi A. Mataram: Heinrich-Heine-University Dusseldorf; 2007. Lignans in *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl and in *Linum flavum* var *compactum* L. Faculty of Mathematics and Natural Sciences; p. 104.

Thangamani, S., Mohammad, H. and Abushahba, M. F. N. (2016) 'Antibacterial activity and mechanism of action of auranofin against multi-drug resistant bacterial pathogens', *Nature Publishing Group*. Nature Publishing Group, (February), pp. 1–13. doi: 10.1038/srep22571.

Tobo, Fachruddin, (2001), *Buku Pegangan Laboratorium Fitokimia*, Laboratorium Fitokimia Jurusan Farmasi Unhas, Makassar

Todar, K., 2012. Online Textbook of Bacteriology. *Pseudomonas aeruginosa*, (Online), (<http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>), diakses 1 Oktober 2017).

Wiegand, I., Hilpert, K. and Hancock, R. E. W. (2008) 'Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances', *Nature Protocols*, 3(2), pp. 163–175. doi: 10.1038/nprot.2007.521.

Wout, E. F. A. Van *et al.* (2015) 'Virulence Factors of *Pseudomonas aeruginosa* Induce Both the Unfolded Protein and Integrated Stress Responses in Airway Epithelial Cells', pp. 1–23. doi: 10.1371/journal.ppat.1004946.

