

**EFEK EKSTRAK ETANOL TEH HIJAU (*Camellia sinensis* var.
assamica) SEBAGAI PENGHAMBAT PEMBENTUKAN BIOFILM
Klebsiella pneumoniae SECARA IN VITRO**

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran**



Oleh:

Dennis Koresy

NIM 155070101111081

PROGRAM STUDI KEDOKTERAN

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2018

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Dennis Koresy

NIM : 155070101111081

Program Studi : Sarjana Kedokteran Fakultas Kedokteran

Universitas Brawijaya

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini adalah hasil karya 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, 29 Oktober 2018

Yang membuat pernyataan,



Dennis Koresy

NIM.155070101111081

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis haturkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa yang telah menuntun dan memberikan anugerah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir dengan judul “Efek Ekstrak Etanol Teh Hijau (*Camellia sinensis* var. *assamica*) sebagai Penghambat Pembentukan Biofilm *Klebsiella pneumoniae* secara *In Vitro*” dengan baik. Tugas Akhir ini disusun untuk memenuhi persyaratan memperoleh gelar Sarjana Kedokteran.

Tak lupa, penulis mengucapkan terima kasih setinggi-setingginya kepada:

1. **Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes.,** selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, yang telah memberikan wadah bagi penulis untuk menuntut ilmu di FK UB.
2. **Dr. dr. Masruroh Rahayu, M.Kes.,** selaku Ketua Jurusan Kedokteran FK UB, yang telah memberi kesempatan bagi penulis menempuh Pendidikan pre-klinik di FK UB.
3. **dr. Triwahju Astuti, M.Kes., Sp. P(K),** selaku Ketua Program Studi Kedokteran FK UB, yang telah memberikan kesempatan bagi penulis menempuh pendidikan pre-klinik di FK UB.
4. **Prof. Dr. dr. Noorhamdani AS, DMM., Sp. MK (K),** sebagai Pembimbing I yang telah memberikan banyak bimbingan, saran, semangat, dan doa bagi penulis serta dengan penuh kesabaran dan sepuh hati dalam membimbing penulis untuk menyelesaikan Tugas Akhir ini.
5. **dr. Iriana Maharani, Sp. THT-KL (K),** sebagai Pembimbing II yang telah membimbing penulis, memberi semangat, dan doa sehingga Tugas Akhir ini dapat terselesaikan.

6. **dr. Aulia Abdul Hamid Abdullah, M.Biomed.Sc., Sp. M**, selaku penguji

yang bersedia meluangkan waktu untuk menguji serta memberi masukan dan koreksi kepada penulis.

7. Segenap anggota Tim Pengelola Tugas Akhir FK UB, yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan Tugas Akhir ini.

8. Kepala laboratorium, laboran, dan jajaran staf di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, terutama kepada Pak Slamet selaku analis, atas kesempatan bagi penulis untuk melakukan penelitian di laboratorium.

9. Yang tercinta kedua orangtua saya, **Fajar Harapan** dan **Lilis Suriani**, kedua kakak saya, Theo Virgen dan Alben Olandi, adik saya, **Viona Anastasia Putri**, serta seluruh **keluarga besar Lambung** dan **Kalang** atas seluruh kasih sayang, semangat, doa, dan dukungan bagi penulis dalam menyelesaikan Tugas Akhir ini.

10. Teman-teman seperjuangan “Teh Hijau”, **Thea** dan **Edwin** yang senantiasa membantu dan memberi semangat guna menyelesaikan tugas akhir ini.

11. Teman-teman terkasih, **Ferdian**, **Adolf**, **Nabilah**, dan **Ajeng**, yang selalu memberi semangat untuk terus berusaha dengan giat.

12. Teman-teman seperjuangan PBL 14 PDB 2015, **Yurike**, **Rizal**, **Hafidh**, **Dwiky**, **Martin**, **Safira Nur**, **Shafa**, **Desy**, **Jaya**, **Annisa**, **Widhi**, dan **Unzila**, yang selalu menjadi pemberi semangat, canda, dan tawa selama 7 semester ini.

13. Teman-temanku seperjuangan SMAK Kolese Santo Yusup Malang, **Erwin**, **Ferdian**, **Sharon**, **Geovan**, dan **Imerisa** yang sejak SMA berjuang bersama menempuh Pendidikan Kedokteran di FK UB.

14. Teman-teman Pendidikan Dokter Angkatan 2015 yang berjuang bersama dalam Pendidikan pre-klinik ini, terutama PDB 2015.

15. Semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan Tugas Akhir ini yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu.

Pepatah mengatakan “Tak ada gading yang tak retak”. Penulis menyadari bahwa Tugas Akhir ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, penulis membuka diri untuk segala saran dan kritik yang membangun.

Akhir kata, semoga Tugas Akhir ini dapat bermanfaat bagi yang membutuhkan dan berkontribusi dalam pembangunan kesehatan di Indonesia.

Malang, 3 Oktober 2018

Penulis



DAFTAR ISI

Halaman

Halaman Judul	i
Halaman Pengesahan	ii
Pernyataan Keaslian Tulisan	iii
Kata Pengantar	iv
Abstrak	vii
Abstract	viii
Daftar Isi	ix
Daftar Tabel	xii
Daftar Gambar	xiii
Daftar Singkatan	xiv
Daftar Lampiran	xv
BAB I 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	4
1.4.1 Manfaat Akademis	4
1.4.2 Manfaat Praktis	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	5
2.1.1 Taksonomi <i>Klebsiella pneumoniae</i>	6
2.1.2 Karakteristik Bakteri	7
2.1.3 Identifikasi Karakteristik Bakteri <i>Klebsiella pneumoniae</i>	8
2.1.3.1 Pewarnaan Gram	8
2.1.3.2 Uji Biokimia	8
2.2 Biofilm	9
2.2.1 Mekanisme Pembentukan Biofilm	10
2.2.2 Pembentukan Biofilm pada <i>Klebsiella pneumoniae</i>	11
2.2.3 Quorum Sensing	12
2.2.3.1 Quorum Sensing pada <i>K. pneumoniae</i>	13
2.2.4 Uji Pembentukan Biofilm	15
2.2.4.1 Metode Tabung	15
2.2.4.2 Metode Congo Red Agar	16
2.2.4.3 Metode Tissue Culture Plate	16

2.3 Teh (<i>Camellia sinensis</i>)	17
2.3.1 Morfologi Teh (<i>Camellia sinensis</i>)	17
2.3.2 Teh Hijau (<i>Camellia sinensis</i> var. <i>assamica</i>)	18
2.3.3 Taksonomi Teh Hijau (<i>Camellia sinensis</i> var. <i>assamica</i>)	19
2.3.4 Teh Hijau sebagai Antibakteri	20
2.3.4.1 Tanin	21
2.3.4.2 Katekin (Polifenol)	21
2.3.5 Senyawa Penghambat Biofilm	22
2.3.5.1 Tanin	22
2.3.5.2 Katekin (Polifenol)	22

BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep	24
3.2 Hipotesis Penelitian	26

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian	27
4.2 Waktu dan Tempat Penelitian	27
4.3 Sampel Penelitian	27
4.4 Pengulangan	28
4.5 Variabel Penelitian	28
4.5.1 Variabel Bebas	28
4.5.2 Variabel Tergantung	28
4.6 Definisi Operasional	29
4.7 Alat dan Bahan Penelitian	31
4.7.1 Alat dan Bahan untuk Pembuatan Ekstrak Daun Teh Hijau	31
4.7.2 Alat dan Bahan untuk Kultur dan Identifikasi Bakteri	31
4.7.3 Alat dan Bahan Deteksi Biofilm	32
4.8 Prosedur Penelitian	32
4.8.1 Identifikasi Bakteri	32
4.8.2 Pembuatan Ekstrak Daun Teh Hijau	39
4.8.2.1 Ekstraksi dan Evaporasi	39
4.8.3 Alur Kerja Penelitian	41
4.9 Analisis Data	42

BAB V HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian	43
5.1.1 Hasil Ekstraksi Daun Teh Hijau (<i>Camellia sinensis</i> var. <i>assamica</i>)	43
5.1.2 Hasil Identifikasi Bakteri	44
5.1.3 Hasil Uji Hambat Pembentukan Biofilm	46
5.2 Analisis Data	48
5.2.1 Uji Normalitas dan Homogenitas	49
5.2.2 Uji Oneway ANOVA	49

5.2.3 Uji <i>Post Hoc</i>	49
5.2.4 Uji Korelasi Pearson	51
BAB VI PEMBAHASAN	53
BAB VII PENUTUP	58
7.1 Kesimpulan	58
7.2 Saran	58
Daftar Pustaka	60
Lampiran	68



DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 5.1 Hasil Pengukuran <i>Mean Gray Value</i> dengan Aplikasi <i>Adobe Photoshop CS6</i>	47
Tabel 5.2 Nilai Signifikan Kelompok terhadap Kelompok Lainnya pada Uji <i>Post Hoc</i>	51
Tabel 5.3 Rangkuman Hasil Uji <i>Post Hoc</i>	51



DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 2.1 Bakteri <i>Klebsiella pneumoniae</i> secara Mikroskopis pada Pengecatan Gram	6
Gambar 2.2 Pembentukan Biofilm	11
Gambar 2.3 <i>Quorum Sensing</i> pada Bakteri Gram Negatif	13
Gambar 2.4 Dedaunan <i>Camellia sinensis</i>	18
Gambar 2.5 Diagram Alir Pengolahan Teh	19
Gambar 2.6 Susunan dari <i>Epicatechin</i> , <i>Epicatechin-3-gallate</i> , <i>Epigallocatechin</i> , dan <i>Epigallocatechin-3-gallate</i>	22
Gambar 3.1 Kerangka Konsep	24
Gambar 4.1 Alur Kerja Penelitian	41
Gambar 5.1 Hasil Ekstrak Etanol Daun Teh Hijau (<i>Camellia sinensis</i> var. <i>assamica</i>)	43
Gambar 5.2 Hasil Pewarnaan Gram Bakteri <i>Klebsiella pneumoniae</i>	44
Gambar 5.3 Hasil Perbenihan Bakteri <i>Klebsiella pneumoniae</i> pada media MacConkey	45
Gambar 5.4 Hasil Uji <i>Microbact</i> 12A pada Bakteri <i>Klebsiella pneumoniae</i>	45
Gambar 5.5 Grafik Pengukuran <i>Mean Gray Value</i>	48

DAFTAR SINGKATAN

AHL : *N-acyl Homoserine Lactone*

AI : *Auto Inducer*

BHI : *Brain Heart Infusion*

EGCG : *Epigallocatechin Gallate*

EPS : *Eksopolisakarida*

KBM : *Kadar Bunuh Minimum*

KHBM : *Kadar Hambat Biofilm Minimum*

KHM : *Kadar Hambat Minimum*

L : *Liter*

MBIC : *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration*

OD : *Optical Density*

ONPG : *O-nitrophenyl-beta-D-galactopyranoside*

QS : *Quorum Sensing*

RSAB : *Rumah Sakit Anak dan Bunda*

TDA : *Tryptophan Deamination*

VAP : *Ventilator Associated Pneumonia*

VP : *Voges-Proskauer*

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Proses Ekstraksi.....	68
Lampiran 2 Hasil Penelitian Pendahuluan	68
Lampiran 3 Hasil Penelitian Inti	69
Lampiran 4 Hasil Uji Identifikasi <i>Microbact</i> 12A.....	70
Lampiran 5 Hasil Uji Normalitas Metode <i>Kolmogorov-Smirnov</i>	71
Lampiran 6 Hasil Uji Homogenitas	72
Lampiran 7 Hasil Uji <i>Oneway ANOVA</i>	72
Lampiran 8 Hasil Uji <i>Post Hoc</i>	73
Lampiran 9 Hasil Uji Korelasi <i>Pearson</i>	75

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

**EFEK EKSTRAK ETANOL TEH HIJAU (*Camellia sinensis* var. *assamica*)
SEBAGAI PENGHAMBAT PEMBENTUKAN BIOFILM *Klebsiella pneumoniae*
SECARA *IN VITRO***

Oleh:
DENNIS KORESY
155070101111081

Telah diuji pada
Hari: Rabu
Tanggal: 31 Oktober 2018
dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji-I,



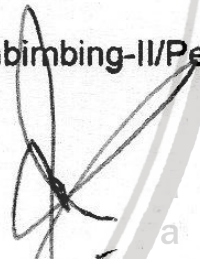
dr. Aulia Abdul Hamid Abdullah, M. Biomed. Sc., Sp. M
NIP. 197706012003121005

Pembimbing-I/Penguji-II,



Prof. Dr. dr. Noorhamdani AS, DMM, Sp. MK(K)
NIP. 195011101980021001

Pembimbing-II/Penguji-III,



dr. Iriana Maharani, Sp. THT-KL(K)
NIP. 198004062014042001

Mengetahui,
Ketua Program Studi Pendidikan Dokter,



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

ABSTRAK

Koresy, Dennis. 2018. ***Efek Ekstrak Etanol Teh Hijau (Camellia sinensis var. assamica) Sebagai Penghambat Pembentukan Biofilm Klebsiella pneumoniae Secara In Vitro***. Tugas Akhir, Program Studi Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing : (1) Prof. Dr. dr. Noorhamdani AS, DMM, Sp. MK(K) (2) dr. Iriana Maharani, Sp. THT-KL (K)

Klebsiella pneumoniae merupakan bakteri patogen yang banyak ditemukan pada kasus *Ventilator Associated Pneumonia* (VAP). Bakteri ini mampu membentuk biofilm sehingga penyakit pasien semakin parah. Teh hijau merupakan salah satu tumbuhan yang banyak digunakan dan digemari masyarakat Indonesia. Tujuan penelitian ini untuk membuktikan efektivitas ekstrak etanol teh hijau sebagai penghambat pembentukan biofilm pada bakteri *K. pneumoniae* secara *in vitro*. Metode yang digunakan adalah metode dilusi tabung. Hasil pengamatan difoto dan dikuantifikasi menggunakan *Adobe Photoshop CS6* menjadi nilai *mean gray value*. Hasil penelitian membuktikan bahwa peningkatan konsentrasi ekstrak berkorelasi positif dengan peningkatan nilai *mean gray value*, diikuti dengan tipisnya cincin biofilm yang terbentuk pada area *airfluid border* di tabung. Hasil ini juga sesuai dengan uji statistik penelitian, dimana terdapat korelasi yang kuat antara konsentrasi ekstrak dan nilai *mean gray value* (korelasi Pearson, $p = 0,761$). Kesimpulan penelitian ini adalah ekstrak etanol teh hijau dapat menghambat pembentukan biofilm *Klebsiella pneumoniae* secara *in vitro* secara signifikan.

Kata kunci: ekstrak etanol teh hijau, antimikroba, *Klebsiella pneumoniae*, biofilm.

ABSTRACT

Koresy, Dennis. 2018. ***Effect of Green Tea (Camellia sinensis var. assamica) Ethanol Extract as Inhibitor of Biofilm Formation in Klebsiella pneumoniae In Vitro***. Final Assignment, Medical Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University, Pembimbing : (1) Prof. Dr. dr. Noorhamdani AS, DMM, Sp. MK(K) (2) dr. Iriana Maharani, Sp. THT-KL (K)

Klebsiella pneumoniae is a common pathogenic bacteria found in patients with *Ventilator Associated Pneumonia* (VAP). These bacteria can produce biofilm which exacerbate the disease of patient with VAP. Green tea is a kind of most used dan liked herb by Indonesians. This study was aimed to prove the effectivity of green tea ethanol extract as inhibitor of biofilm formation in *K. pneumoniae* in vitro. The method used is tube dilution method. The result is photographed and be quantified to be mean gray value using Adobe Photoshop CS6. The results showed that the enhancement of extract concentration have positive correlation with the escalation of mean gray value, as well as depletion of biofilm ring on the airfluid border area of the tube. Final results of the study are also appropriate with the statistic test, there is a strong correlation between extraxt concentration and mean gray value (Pearson correlation, $p = 0,761$). This study concludes that green tea ethanol extract can significantly inhibit the formation of biofilm in *Klebsiella pneumoniae* in vitro.

Keywords: green tea ethanol extract, antimicrobial, *Klebsiella pneumoniae*, biofilm.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit infeksi adalah salah satu masalah serius di bidang kesehatan yang banyak terjadi di Indonesia. Salah satu penyebab infeksi adalah bakteri (Noorhamdani *et al.*, 2015). Bakteri membentuk biofilm sebagai bentuk pertahanan diri. Biofilm adalah lapisan yang dibentuk oleh bakteri, dimana sel-sel bakteri saling menempel satu sama lain pada permukaan hidup maupun tak hidup dan terbentuk dari matriks polimer ekstraseluler (Jamal *et al.*, 2015). Salah satu bakteri yang membentuk biofilm adalah *Klebsiella pneumoniae*. Bakteri ini dapat membentuk biofilm pada penggunaan ventilator di rumah sakit sebagai penyebab Ventilator Associated Pneumonia (VAP). Berdasarkan data rekam medis Laboratorium Mikrobiologi RSAB Harapan Kita Jakarta periode Januari hingga Juni 2010, ditemukan 5,2% biakan positif *Klebsiella pneumoniae* pada pasien VAP (Widyaningsih dan Buntaran, 2012).

Klebsiella pneumoniae adalah bakteri batang Gram negatif dari famili *Enterobacteriaceae*, mampu memfermentasikan laktosa, nonmotil, dan memiliki kapsul yang tebal (Tsay *et al.*, 2002). *Klebsiella pneumoniae* merupakan bakteri patogen bagi manusia. Bakteri ini akan menimbulkan infeksi apabila fungsi kekebalan tubuh hospes menurun. Oleh karena itu, *Klebsiella pneumoniae* disebut sebagai bakteri patogen oportunistik yang memanfaatkan penurunan fungsi kekebalan tubuh untuk menginfeksi hospes (Gannik dan Guassora, 2011). Bakteri ini dapat menyebabkan *primary community-acquired pneumonia*, infeksi saluran kemih, infeksi pada luka, bakteremia, meningitis, dan pneumonia nosokomial pada

alkoholisme, *chronic bronchopulmonary disease* atau diabetes melitus (Noorhamdani et al., 2015).

Biofilm pada *Klebsiella pneumoniae* terbentuk dari matriks eksopolisakarida yang dapat melemahkan sistem pertahanan hospes.

Pembentukan biofilm ini diperantarai oleh mekanisme komunikasi antibakteri, yaitu *Quorum Sensing* (QS). Bakteri saling berkomunikasi dengan sinyal kimia sehingga dapat membentuk suatu populasi yang besar. Bakteri *Klebsiella pneumoniae* menggunakan sinyal kimia *autoinducer* LuxS yang akan berikatan dengan reseptor LuxP/Q dan menyebabkan aktivasi pembentukan multimer kompleks LM21- Δ luxS. Kompleks ini yang berperan sebagai protein regulator pada sistem *quorum sensing* (Balestrino et al., 2005). Setelah terbentuknya biofilm, bakteri dapat bertahan dari sistem imunitas hospes dan menyebabkan terjadinya resistensi antibiotik sehingga menurunkan keberhasilan terapi pada infeksi *Klebsiella pneumoniae* (Stewart dan Costerton, 2001).

Solusi yang harus ditemukan saat ini adalah upaya mencegah terbentuknya lapisan biofilm akibat infeksi bakteri khususnya *Klebsiella pneumoniae*. Salah satunya adalah dengan pemanfaatan tanaman yang potensial untuk mencegah terbentuknya biofilm dari bakteri patogen. Kandungan ekstrak tanaman yang dapat digunakan antara lain tanin dan katekin yang dapat ditemukan pada daun teh (*Camellia sinensis*). Klasifikasi tanaman teh terdiri atas teh hitam, teh putih, teh hijau, teh kuning, dan oolong. Teh hijau memiliki kandungan tanin dan katekin yang lebih tinggi dibandingkan jenis teh lainnya (Wang et al., 2000; Bastos et al., 2006). Salah satu kandungan yang terdapat pada teh hijau adalah *Epigallocatechin-gallate* (EGCg) yang memiliki efek antibakteri yang dapat menghambat *autoinducer* pada sistem *Quorum Sensing* (QS) (Roccaro et al., 2004).

Berdasarkan pemaparan di atas dan memperhatikan sukarnya terapi akibat biofilm yang terbentuk dari infeksi bakteri *Klebsiella pneumoniae*, maka perlu dilakukan penelitian terkait efektifitas kandungan tanin dan katekin yang terkandung di ekstrak teh hijau (*Camellia sinensis* var. *assamica*) dalam menghambat pembentukan biofilm oleh bakteri *Klebsiella pneumoniae*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas, maka penelitian ini ditujukan untuk menjawab rumusan masalah sebagai berikut :

Apakah ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis* var. *assamica*) memiliki efek sebagai penghambat pembentukan biofilm pada *Klebsiella pneumoniae* secara *in vitro*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan bahwa ekstrak teh hijau (*Camellia sinensis* var. *assamica*) memiliki efek antibakteri sebagai penghambat pembentukan biofilm pada *Klebsiella pneumoniae* secara *in vitro*.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengetahui perbedaan hasil dari pemberian masing-masing konsentrasi ekstrak teh hijau (*Camellia sinensis* var. *assamica*) dalam menghambat pembentukan biofilm pada bakteri *Klebsiella pneumoniae* secara *in vitro*.

2. Mengetahui Kadar Hambat Minimal (KHM) dari ekstrak teh hijau (*Camellia sinensis* var. *assamica*) yang dapat menghambat pembentukan biofilm (MBIC = *Minimal Biofilm Inhibitory Concentration*) pada bakteri *Klebsiella pneumoniae* secara *in vitro*.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademis

1. Dapat digunakan sebagai dasar teori untuk menambah ilmu pengetahuan dalam bidang kesehatan mengenai manfaat ekstrak teh hijau (*Camellia sinensis* var. *assamica*) sebagai penghambat pembentukan biofilm pada bakteri *Klebsiella pneumoniae*.
2. Dapat menambah ilmu yang dapat dikembangkan dalam melakukan terapi terhadap biofilm yang dibentuk oleh *Klebsiella pneumoniae*.

1.4.2 Manfaat Praktis

1. Dapat digunakan sebagai terapi tambahan untuk pengobatan pasien dengan infeksi *Klebsiella pneumoniae*.
2. Dapat meningkatkan pemanfaatan teh hijau sebagai antibiofilm.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae adalah bakteri batang Gram negatif, memiliki kapsul, non motil, dan dapat memfermentasikan laktosa. Berdasarkan kebutuhannya akan oksigen, *Klebsiella pneumoniae* merupakan bakteri fakultatif anaerob (Elfidasari et al., 2013). Menurut Pelczar & Chan (1988), bakteri ini dapat tumbuh optimum pada suhu 35-37°C. Pada pertumbuhannya, bakteri ini menggunakan amonia sebagai sumber nitrogen, dan sitrat dan glukosa sebagai sumber karbon.

Klebsiella pneumoniae membentuk biofilm untuk membantu kelangsungan hidupnya, terutama saat membentuk koloni pada inang. Koloni yang dibentuk halus bulat dan berwarna merah muda. Biofilm yang dibentuk melindungi bakteri terhadap proses opsonisasi dan fagositosis sehingga bakteri dapat terus berkembang dengan baik (Anderl et al., 2000).

Beberapa strain *Klebsiella pneumoniae* dapat menghasilkan lendir ekstraseluler kental, yang kemudian dapat membentuk koloni mukoid. Koloni mukoid ini berasal dari produksi berlebih pada matriks eksopolisakarida *Klebsiella pneumoniae* kemudian akan menghasilkan matriks agar bakteri dapat hidup dalam biofilm. Lapisan membran ini dapat menghambat penetrasi antibiotik dalam membunuh bakteri sehingga meningkatkan resistensi antibiotik (Anderl et al., 2000).

www.idimages.org
© 2008 IDSA



Gambar 2.1 Bakteri *Klebsiella pneumoniae* secara Mikroskopis pada Pengecatan Gram (Todar, 2012)

2.1.1 Taksonomi *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae termasuk dalam genus *Klebsiella*, yang ditentukan oleh Cowan pada tahun 1974. Golongan yang termasuk dalam genus tersebut adalah bakteri Gram negatif, nonmotil, dan memiliki kapsul yang tebal. Berikut adalah taksonomi dari bakteri *K. pneumoniae* : (Barr, 1977)

Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Proteobacteria
Class	: Gammaproteobacteria
Order	: Enterobacteriales
Famili	: Enterobacteriaceae
Genus	: <i>Klebsiella</i>
Spesies	: <i>Klebsiella pneumoniae</i>

2.1.2 Karakteristik Bakteri

Klebsiella pneumoniae merupakan bakteri Gram negatif, berbentuk batang, dan tidak membentuk spora. *Klebsiella pneumoniae* tumbuh baik pada suhu 37°C. Bakteri ini berukuran kecil (0,5 x 3,0 µm). *Klebsiella pneumoniae* dapat dibedakan dengan bakteri *Enterobacteriaceae* yang lain karena bersifat non-motil (Noorhamdani et al., 2015).

Klebsiella pneumoniae tampak sebagai *lactose-fermenting colonies* pada media diferensial. Bakteri ini memiliki kapsul yang tebal. Adanya kapsul tersebut menyebabkan koloni *Klebsiella pneumoniae* yang tumbuh pada media pembenihan tampak besar, basah, dan mukoid (Noorhamdani et al., 2015).

Klebsiella pneumoniae tumbuh baik pada suhu 37°C. Bakteri ini bersifat anaerob fakultatif. Jika ditumbuhkan dalam keadaan anaerob, bakteri dapat meragikan karbohidrat. Jika ditumbuhkan dalam keadaan aerob, bakteri akan menggunakan siklus asam trikarboksilat dan sistem transport elektron untuk memperoleh energi. *Klebsiella pneumoniae* dapat mereduksi nitrat menjadi nitrit, tidak dapat mencairkan alginat, tes oksidasenya negatif, dan meragikan glukosa menggunakan *butanediol fermentative pathway* (Maisonneuve, 2017).

Klebsiella memiliki antigen O dan K. Antigen polisakarida K adalah antigen yang paling berguna untuk penggolongan secara serologis (*serotype typing*).

Terdapat 77 antigen K yang diketahui dan tidak satupun dari serotipe tampak lebih cenderung menyebabkan penyakit tertentu atau lebih virulen dari serotipe lainnya.

Antigen K pada *Klebsiella pneumoniae* merupakan kapsul polisakarida yang tampak dengan jelas seperti pada pneumokokus. Antigen K merupakan antigen

yang bertanggung jawab atas pembentukan biofilm pada koloni *Klebsiella pneumoniae* (Cescutti et al., 2016).

2.1.3 Identifikasi Karakteristik *Klebsiella pneumoniae*

2.1.3.1 Pewarnaan Gram

Bakteri adalah mikroorganisme yang hanya dapat diamati dengan menggunakan mikroskop. Karena ukuran bakteri yang sangat kecil dan morfologinya yang tidak berwarna, diperlukan suatu pewarnaan agar bakteri tersebut dapat diidentifikasi. Salah satu cara pewarnaan pada bakteri yang telah dimatikan adalah pewarnaan diferensial. Pewarnaan diferensial yang digunakan salah satunya adalah pewarnaan Gram yang dapat membedakan bakteri berdasarkan struktur dinding selnya. Setelah dilakukan pewarnaan, warna akhir bakteri Gram positif akan tampak berwarna ungu dan bakteri Gram negatif akan tampak berwarna merah. Selanjutnya, bentuk bakteri dapat ditentukan dengan menggunakan mikroskop (Tortora et al., 2004). *Klebsiella pneumoniae* berukuran sangat kecil dan berbentuk basil (Derakhshan et al., 2008).

2.1.3.2 Uji Biokimia

Reaksi biokimia dipakai untuk melihat perbedaan metabolisme bakteri. Setiap bakteri membutuhkan energi untuk bertahan hidup. Secara khusus, famili *Enterobacteriaceae* dapat meragikan glukosa, mereduksi nitrat menjadi nitrit, tetapi tidak dapat mencairkan alginat. Bakteri *Klebsiella pneumoniae* dapat meragikan laktosa. Untuk mengetahui ada atau tidaknya fermentasi laktosa, dilakukan uji pada agar MacConkey. Apabila terjadi fermentasi laktosa, warna agar akan berubah menjadi merah (Hansen et al., 2004).

Pada famili *Enterobacteriaceae*, identifikasi spesies dapat dilakukan dengan uji biokimia (Abdullah *et al.*, 2015). Secara khusus, bakteri *Klebsiella pneumoniae* dapat diidentifikasi menggunakan *Microbact*. Identifikasi dengan *Microbact* dilakukan berdasarkan perbedaan pH. Terdapat dua varian strip *Microbact*, yaitu 12A dan 12B. Masing-masing varian strip menguji 12 variasi biokimia yang berbeda. Strip 12A digunakan untuk identifikasi bakteri dengan oksidase negatif dan hasil fermentasi glukosa-nitrat positif. Sedangkan pada strip 12B digunakan untuk identifikasi bakteri dengan oksidase positif dan hasil fermentasi glukosa-nitrat negatif. Pada bakteri *Klebsiella pneumoniae* digunakan varian strip *Microbact* 12A dengan jenis uji biokimia yang akan diuji, yaitu *Lysine*, *Ornithine*, H_2S , *Glucose*, *Mannitol*, *Xylose*, *ONPG*, *Indole*, *Urease*, *VP*, *Citrate*, dan *TDA*. Pada bakteri *Klebsiella pneumoniae* didapatkan hasil positif pada uji *Lysine*, *Glucose*, *Mannitol*, *Xylose*, *ONPG*, *Urease*, *VP*, dan *Citrate* (O'hara, 2005).

2.2 Biofilm

Biofilm merupakan suatu agregat dari interaksi bakteri yang menempel pada permukaan padat dan berada pada suatu matriks eksopolisakarida (Kumar *et al.*, 2017). Biofilm membentuk suatu lapisan lendir pada permukaan padat dan terbentuk secara alami. Satu spesies bakteri atau lebih dari satu spesies dapat membentuk suatu biofilm. Setelah biofilm terbentuk, molekul *quorum sensing* yang dihasilkan oleh bakteri akan terakumulasi dan mampu mengubah aktivitas metabolik pada bakteri (Brooks *et al.*, 2015).

Biofilm secara umum tersusun atas sel mikroba dan EPS. EPS merupakan komponen penyusun 50% hingga 90% pada karbon organik biofilm sehingga menjadikannya sebagai komponen utama pada biofilm. Produksi EPS bergantung

pada status nutrient pada medium pertumbuhan; keberadaan karbon yang melimpah dan sedikitnya kadar nitrogen, kalium, atau fosfat (Donlan, 2002).

Bakteri yang berada pada matriks eksopolisakarida (EPS) dapat terlindungi dari sistem imun hospes. Matriks ini juga berperan sebagai sawar difusi terhadap antimikroba. Beberapa bakteri yang menghasilkan biofilm menunjukkan adanya resistensi terhadap antimikroba dibandingkan bakteri yang tumbuh bebas tanpa adanya biofilm. Hal ini menyebabkan infeksi akibat bakteri yang menghasilkan biofilm, sukar untuk diterapi (Brooks *et al.*, 2015).

2.2.1 Mekanisme Pembentukan Biofilm

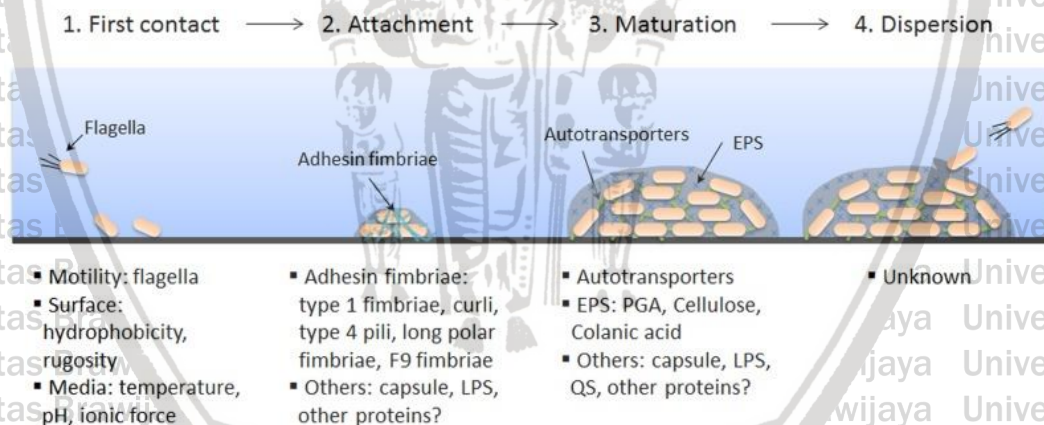
Bakteri membentuk biofilm pada beberapa tahap. Tahap pertama diawali ketika sel-sel bakteri berkumpul dan menempel pada suatu permukaan benda mati atau jaringan hospes. Bakteri akan menghasilkan lebih banyak faktor adhesif terutama untuk menempel pada hospes. Proses penempelan bakteri ini terpengaruh oleh gaya *van der Waals*. Bakteri yang hidup bebas (sel planktonik) akan memperbanyak diri dan membentuk satu lapisan tipis (*monolayer*) biofilm. Pada tahap ini sel planktonik banyak berubah menjadi sel biofilm yang perlekatanannya masih bersifat sementara (Donlan, 2002).

Selanjutnya, sel-sel bakteri akan menempel secara permanen akibat terbentuknya matriks EPS. Matriks ini akan merekatkan bakteri pada permukaan dan membentuk suatu *linking film* yang menjadi tempat sel bakteri melekat dan membentuk mikrokoloni. Pada tahap mikrokoloni, biofilm bakteri akan terbentuk semakin tebal dan membentuk suatu struktur tiga dimensi yang memiliki sel-sel terselubung namun saling terhubung (Solano *et al.*, 2014).

Pada akhirnya, terjadi dispersi sel biofilm sehingga sel-sel tersebut akan berpindah dan membentuk biofilm baru. Pada biofilm baru ini, proses pembelahan sel jarang terjadi. Selanjutnya, sel akan membentuk eksopolisakarida dengan menggunakan sebagian besar energi guna memberikan nutrisi bagi bakteri selama berada dalam lapisan biofilm tersebut (Kumar *et al.*, 2017).

2.2.2 Pembentukan Biofilm pada *Klebsiella pneumoniae*

Proses pembentukan biofilm pada *Klebsiella pneumoniae* pada umumnya sama dengan proses pembentukan biofilm pada bakteri Gram negatif lainnya. Secara umum, bakteri akan menghasilkan sinyal kimia berupa *autoinducer* untuk saling berkomunikasi. Sinyal tersebut berperan dalam proses *quorum sensing* untuk koordinasi aktivitas dan maturasi biofilm.



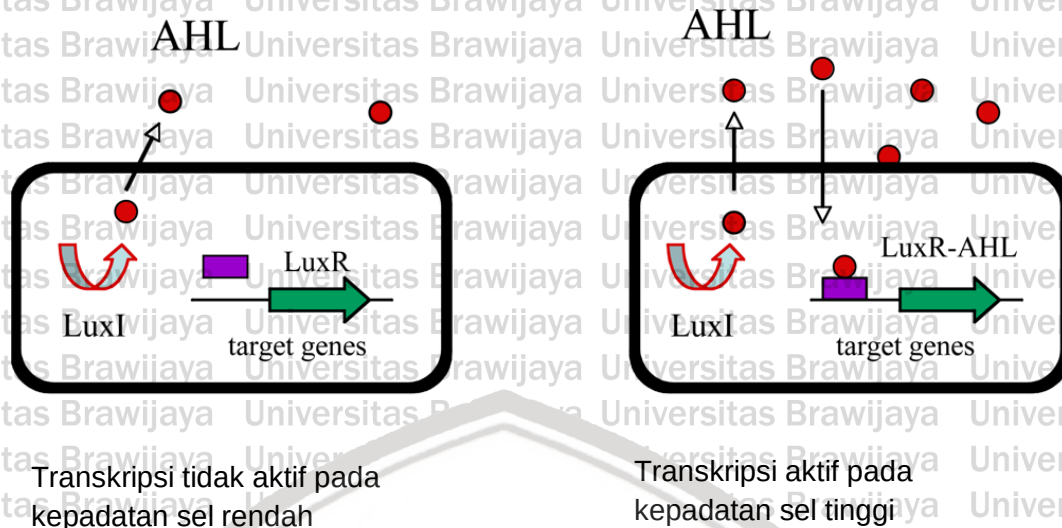
Gambar 2.2 Pembentukan Biofilm (Li dan Wang, 2011)

Sel-sel bakteri, khususnya *Klebsiella pneumoniae* menggunakan mekanisme *quorum sensing* untuk saling berkolaborasi dalam suatu mikrokoloni (De Araujo *et al.*, 2010). Selain itu, mikrokoloni yang telah terbentuk akan berupaya membentuk jaringan sel kompleks yang menopang kehidupan secara kolektif.

Jaringan sel kompleks tersebut terdiri atas saluran penghubung guna mengirimkan air dan nutrisi ke setiap bagian sel dan sekaligus membantu ekskresi zat-zat sisa metabolisme. Hal inilah yang semakin memperkuat daya resistensi biofilm terhadap antibiotik (Høiby *et al.*, 2010).

2.2.3 Quorum Sensing

Quorum sensing adalah mekanisme yang digunakan bakteri untuk dapat berkomunikasi satu sama lain. Mekanisme ini dapat menghasilkan perilaku kolektif dengan menggunakan sinyal kimia berupa *autoinducer* untuk saling berkomunikasi. Masing-masing bakteri menggunakan molekul yang berbeda untuk saling berkomunikasi. Pada bakteri Gram positif menggunakan *autoinducer* berbasis peptida, sedangkan bakteri Gram negatif menggunakan *autoinducer* berupa senyawa *N-acyl homoserine lactone* (AHL) yang mengatur fungsi biologis, seperti sifat patogen dan pembentukan biofilm. *N-acyl homoserine lactone* (AHL) disintesis oleh kelompok protein homolog LuxI. Jika konsentrasi AHL telah mencapai batas tertentu, *autoinducer* ini akan berikatan dengan molekul reseptor (LuxR) yang mengaktifkan pembentukan dimer atau multimer kompleks LuxRAHL. Kompleks tersebut berperan dalam regulasi transkripsi gen target sistem *quorum sensing* (Turan *et al.* 2017).



Gambar 2.3 Quorum Sensing pada Bakteri Gram Negatif (Li dan Tian, 2016)

Quorum sensing merupakan mekanisme regulasi genetik pada bakteri, baik Gram positif maupun negatif sebagai respon terhadap perubahan densitas populasi mikroorganisme dan ekspresi gen tertentu. Respon kolektif akan terjadi jika densitas populasi mikroorganisme mencapai jumlah yang cukup. Densitas populasi ini diatur oleh level sinyal molekul yang diperantarai oleh mekanisme quorum sensing. Mekanisme quorum sensing juga berperan bagi bakteri patogen untuk menghindari dari sistem kekebalan tubuh dengan menunda bertemunya sinyal molekul dan reseptor sampai bakteri mencapai jumlah yang cukup untuk membentuk biofilm dan memulai proses infeksi (Delle Side *et al.*, 2015).

2.2.3.1 Quorum Sensing (QS) pada *K. pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae bersifat patogen dan dapat menyebabkan *primary community-acquired pneumonia* dan pneumonia nosokomial. Keadaan ini biasanya terjadi pada penderita usia pertengahan dan usia tua dengan latar belakang alkoholisme, *chronic bronchopulmonary disease* atau diabetes mellitus

(Noorhamdani et al., 2015). Ketika menyerang sel inang, bakteri saling berkomunikasi melalui mekanisme *quorum sensing* dan akan membentuk lapisan biofilm. Mekanisme *quorum sensing* yang terjadi berupa proses transmisi sinyal antara molekul dan reseptor melalui *N-acyl homoserine lactones* (AHLs) dan *auto inducer-2* (AI-2). AHLs berperan dalam mengatur kepadatan populasi pada sistem QS. AI-2 berperan dalam komunikasi interspesies (Asfour, 2017).

AHLs adalah mekanisme standar yang terdapat pada bakteri Gram negatif dalam proses kerja *quorum sensing*. Sistem protein LuxI dan LuxR mengontrol tipe komunikasi pada AHLs. Protein LuxI mensintesis suatu molekul *acylated homoserine-lactone* (HSL) yang memulai proses sirkuit *quorum sensing*. Sementara protein LuxR berperan untuk mengaktifasi gen target ketika konsentrasi *auto inducer* yang disintesis telah mencapai ambang batas (Turan et al., 2017).

Pada bakteri Gram negatif, seperti *Klebsiella pneumoniae*, proses pembentukan biofilm juga melibatkan *autoinducer*, salah satunya adalah AI-2 (Jass, 2003). AI-2 dikenal sebagai *furanosylborate diester* yang disintesis oleh famili protein LuxS. AI yang diproduksi akan berdifusi secara bebas keluar dari sel. Ketika konsentrasi AI telah mencapai ambang batas, akan terjadi umpan balik positif yang meningkatkan jumlah *auto inducer*. AI yang terbentuk baru ini akan berikatan dengan reseptor dan membentuk *auto inducer-receptor complex* yang akan mempengaruhi regulasi gen pada *quorum sensing*. Konsentrasi AI akan meningkat secara proporsional seiring dengan pertumbuhan populasi bakteri dan akan mempengaruhi transkripsi gen sehingga dapat menghasilkan biofilm (Asfour, 2017).

Bakteri akan berusaha melindungi diri terhadap lingkungan luar yang dapat mengancam kelangsungan hidupnya dengan membentuk mikrokoloni yang kemudian berlanjut sebagai lapisan biofilm. *Klebsiella pneumoniae* menggunakan sistem QS dalam komunikasi dan proses pembentukan lapisan biofilm. Lapisan ini berperan sebagai pertahanan sel bakteri terhadap sistem imunitas tubuh sel inang dan meningkatkan resistensi antibiotik karena bakteri semakin sukar untuk dilisiskan (Turan *et al.*, 2017).

2.2.4 Uji Pembentukan Biofilm

2.2.4.1 Metode Tabung

Kultur bakteri yang telah dibiarkan semalam diinokulasi pada tabung kaca borosilikat yang mengandung 10 mL campuran antara TSB dan sukrosa 2%. Tabung kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam secara aerob. Selanjutnya, isi tabung dibuang dan dibersihkan dengan buffer saline fosfat pada pH 7,3 dan dikeringkan. Tabung kemudian diwarnai dengan 0,1% kristal violet selama 15 menit. Pewarnaan dibuang dan dibersihkan dengan air bersih dan dikeringkan pada posisi terbalik. Pembentukan biofilm positif jika tampak ada garis film yang melapisi bagian dinding dan dasar tabung. Jumlah biofilm dinilai sebagai 0 = tidak ada, 1 = lemah, 2 = sedang atau 3 = kuat. Metode ini mengukur MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) atau KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) dan MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*) atau KBM (Kadar Bunuh Minimum).

Pada KHM, akan didapatkan larutan uji agen antibakteri pada kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa pertumbuhan bakteri. Larutan-larutan yang tergolong sebagai KHM akan dikultur ulang pada media cair tanpa penambahan bakteri uji ataupun

agen antibakteri selama 24 jam. Pada KBM, media cair tetap terlihat jenih setelah diinkubasi (Ruchi *et al.*, 2015).

2.2.4.2 Metode Congo Red Agar

Metode Congo Red Agar (CRA) adalah metode yang sederhana dan dapat mendeteksi produksi biofilm secara kualitatif. Medium ini terdiri atas campuran *Brain Heart Infusion* (BHI) (37 g/L) yang dilengkapi dengan sukrosa (50 g/L), agar No 1 (10 g/L) dan Congo Red (0,8 g/L). Pewarnaan Congo Red disiapkan sebagai suatu larutan cair yang terkonsentrasi dan mengalami proses autoklaf (121°C selama 15 menit) agar dapat terpisah dengan medium konstituen lainnya. Selanjutnya, Congo Red akan ditambahkan pada agar BHI dan sukrosa pada suhu 55°C. Congo Red Agar akan diinokulasi pada organisme yang akan diuji dan dinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam secara aerob. Bakteri tergolong sebagai penghasil biofilm jika warna agar tampak hitam, kering, dan terdapat koloni kristalin (Ruchi *et al.*, 2015).

2.2.4.3 Metode Tissue Culture Plate

Kultur bakteri yang telah dibiarkan semalam diinokulasi pada *plate* yang mengandung 10 mL campuran antara *Trypticase soy* dan glukosa 1%, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. *Plate* kemudian diisi dengan 200 µL suspensi bakteri. Hanya campuran yang dijadikan sebagai kontrol dapat diuji sterilitas dan ikatan tidak spesifik terhadap medium. *Plate* diinokulasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian, isi dari *plate* dibuang lalu dibersihkan dengan 300 µL steril saline sebanyak 3 kali. Bakteri yang masih tersisa kemudian difiksasi dengan suhu panas 60°C selama 60 menit. Selanjutnya, diwarnai dengan menggunakan 150 µL kristal violet 2%, lalu dicuci melalui proses dekantasi.

Kemudian, diberikan 150 μ L 95% etanol dan dibiarkan selama 30 menit untuk melihat munculnya *optical densities* (OD) dari film bakteri yang telah diwarnai. Jika OD dapat terlihat dengan menggunakan *microtiter plate reader* pada 600 nm, bakteri tersebut menghasilkan biofilm (Ruchi et al., 2015).

2.3 Teh (*Camellia sinensis*)

Teh (*Camellia sinensis*) adalah salah satu tanaman herbal yang dikenal memiliki sifat sebagai antimikroba dan antiinflamasi. Teh sudah lama dikenal dan dikonsumsi oleh masyarakat sebagai minuman. Berdasarkan cara pengolahannya, teh dapat diklasifikasikan menjadi teh yang tidak terfermentasi (teh hijau atau *green tea*), teh yang terfermentasi (teh hitam atau *black tea*), teh yang semi terfermentasi (teh oolong), dan teh yang hanya dikeringkan (teh putih atau *white tea*) (Engelhardt, 2010).

2.3.1 Morfologi Teh (*Camellia sinensis*)

Daun teh berbau khas aromatik dengan rasa pahit. Daun teh memiliki ciri-ciri berupa helai-helai daun yang cukup tebal, kaku, berbentuk sudip memanjang, tepi daun bergerigi, dan agak tergulung ke bawah. Ukuran daun teh pada umumnya adalah kurang dari 5 cm. Daun teh bagian atas memiliki kenampakan mengkilat, sedangkan pada daun teh muda kenampakan bawahnya memiliki rambut. Pada daun teh yang telah tua, kenampakan bawah daun akan menjadi lebih licin. Daun teh (*Camellia sinensis*) memiliki dua varietas yang berbeda asal, yakni var. *sinensis* dari Cina dan var. *assamica* dari India. Varietas *sinensis* memiliki daun yang kecil dengan ujung yang menumpul. Varietas ini digunakan

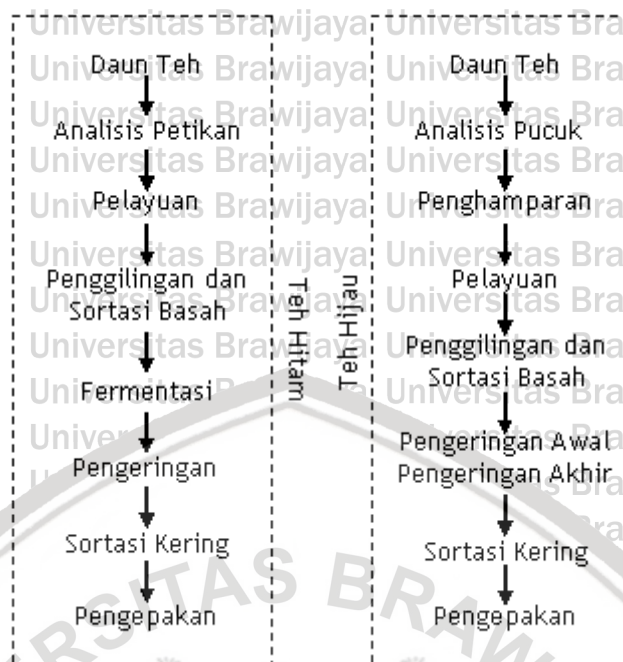
untuk memproduksi teh hitam. Varietas *assamica* memiliki daun yang lebih besar dengan ujung yang meruncing. Varietas ini digunakan untuk memproduksi teh hijau (Somantri, 2011).



Gambar 2.4 Dedaunan *Camellia sinensis* (Hartoyo, 2003)

2.3.2 Teh Hijau (*Camellia sinensis* var. *assamica*)

Teh hijau diperoleh tanpa melalui proses fermentasi dan dibuat dengan menginaktifkan enzim polifenol oksidase di dalam pucuk daun teh. Proses inaktivasi enzim ini terjadi melalui pemanasan sehingga oksidasi zat antioksidan, seperti katekin, dapat dicegah (Cabrera *et al.*, 2006). Proses pemanasan dapat dilakukan dengan udara kering (pemanggangan atau sangrai) dan pemanasan basah dengan uap (*steam*). Cara pemanggangan banyak ditemui pada produksi teh hijau di Cina. Sedangkan *steam* banyak ditemui pada produksi teh hijau Jepang (*sencha*) (Wang *et al.*, 2000).



Gambar 2.5 Diagram Alir Pengolahan Teh (Setyamidjaja, 2000)

2.3.3 Taksonomi Teh Hijau (*Camellia sinensis* var. *assamica*)

Taksonomi tanaman teh hijau (*Camellia sinensis* var. *assamica*) adalah sebagai berikut:

Kerajaan : Plantae

Divisi : Magnoliophyta

Kelas : Magnoliopsida

Ordo : Ericales

Famili : Theaceae

Genus : *Camellia*

Spesies : *Camellia sinensis*

Varietas : var. *assamica*

(Nazaruddin, 1993)

2.3.4 Teh Hijau sebagai Antibakteri

Teh dapat berperan sebagai antibakteri karena mengandung katekin. Katekin adalah prekursor pembentuk tanin. Tanin adalah kelompok polifenol yang menghambat fungsi membran sitoplasma dan mendenaturasi protein (Riedl dan Hagerman, 2001). Katekin berperan dalam degradasi membran lipid bilayer sehingga sel menjadi lisis (Ikigai *et al.*, 1993).

Beberapa senyawa katekin yang banyak ditemukan pada teh hijau adalah epigallocatekin dan epigallocatekin gallat. Kedua senyawa tersebut berperan dalam menghambat sintesis asam lemak bakteri. Bakteri membutuhkan asam lemak untuk membentuk membran selnya. Jika sintesis asam lemak dihambat, pembentukan membran sel bakteri dapat terganggu. Akibatnya, struktur dan fungsi membran sel bakteri menjadi rusak dan akhirnya sel bakteri akan lisis (Ikigai *et al.*, 1993).

Katekin mudah melekat pada protein dan toksin yang dihasilkan bakteri karena sifat katekin yang larut air dan lipofilik. Oleh karena itu, perlekatan katekin pada bakteri dapat menyebabkan hambatan perlekatan pada sel tubuh manusia (Taylor *et al.*, 2005). Proses pemanasan pada ekstraksi tidak berefek pada kerusakan bahan bioaktif teh hijau, sehingga dapat menghasilkan tanin dan katekin yang tinggi (Zia dan Shahid, 2017).

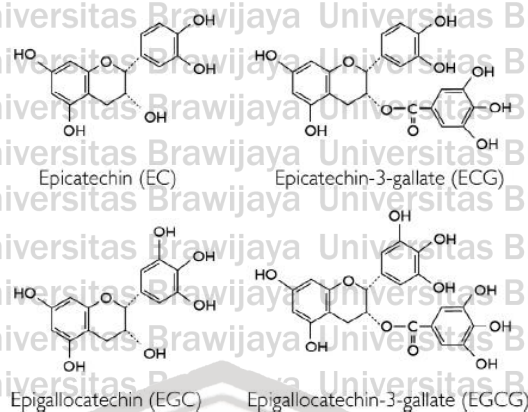
2.3.4.1 Tanin

Tanin adalah senyawa kimia yang termasuk dalam kelompok senyawa polifenol (Bravo, 1998). Tanin dapat mengendapkan protein karena dapat berikatan kuat dengan molekul protein sehingga dapat menghasilkan ikatan silang (Frazier *et al.*, 2003). Terdapat dua jenis tanin pada tanaman, yaitu tanin terkondensasi dan tanin terhidrolisis. Tanin terkondensasi atau proantosianidin adalah polimer dari katekin dan epikatekin. Tanin terhidrolisis memiliki struktur poliester yang dapat dihidrolisis oleh asam, mineral panas, dan enzim-enzim saluran cerna. Hasil hidrolisis ini berupa asam polifenolat dan gula sederhana (Khanbabaee dan van Ree, 2001).

2.3.4.2 Katekin (Polifenol)

Katekin atau polifenol teh adalah zat yang berbeda dengan jenis katekin yang terdapat pada tanaman lain. Katekin pada teh berpengaruh baik terhadap pencernaan makanan dan bersifat sebagai antimikroba, antioksidan, antiradiasi, dan menghambat pertumbuhan sel kanker. Katekin adalah kelompok utama yang terkandung dalam teh hijau (Cabrera *et al.*, 2006).

Katekin merupakan senyawa yang tidak berwarna, larut air, dan terkait dalam sifat produk-produk teh, baik dari segi rasa, warna, dan aroma. Kandungan katekin yang ditemukan pada teh hijau antara lain *epicatechin* (EC), *epicatechin-3-gallate* (ECG), *epigallocatechin* (EGC), dan *epigallocatechin-3-gallate* (EGCG) (Namal, 2013). EGCG adalah katekin yang terbanyak pada teh hijau dengan kadar mencapai 59% dari total katekin pada ekstrak daun teh hijau (Cabrera *et al.*, 2006).



Gambar 2.6 Susunan dari *Epicatechin*, *Epicatechin-3-gallate*, *Epigallocatechin*, dan *Epigallocatechin-3-gallate* (Namal, 2013)

2.3.5 Senyawa Penghambat Biofilm

2.3.5.1 Tanin

Sinyal pada mekanisme *quorum sensing* dapat dihambat oleh tanin. Tanin berikatan kuat dengan molekul protein sehingga terbentuk ikatan silang (Frazier *et al.*, 2003) walaupun efek tersebut tidak menunjukkan hasil yang berarti (Cooper dan Morré, 2005).

2.3.5.2 Katekin (Polifenol)

Senyawa katekin pada teh hijau terdiri dari *epicatechin* (EC), *epicatechin-3-gallate* (ECG), *epigallocatechin* (EGC), dan *epigallocatechin-3-gallate* (EGCG).

Senyawa EGCG dapat menghambat biofilm dengan menghambat *quorum sensing* dan menurunkan pertumbuhan sel bakteri pada dosis tinggi. EGCG dapat mengurangi intensitas sinyal *quorum sensing* bakteri hingga 50% pada konsentrasi tertentu (Persson *et al.*, 2005).

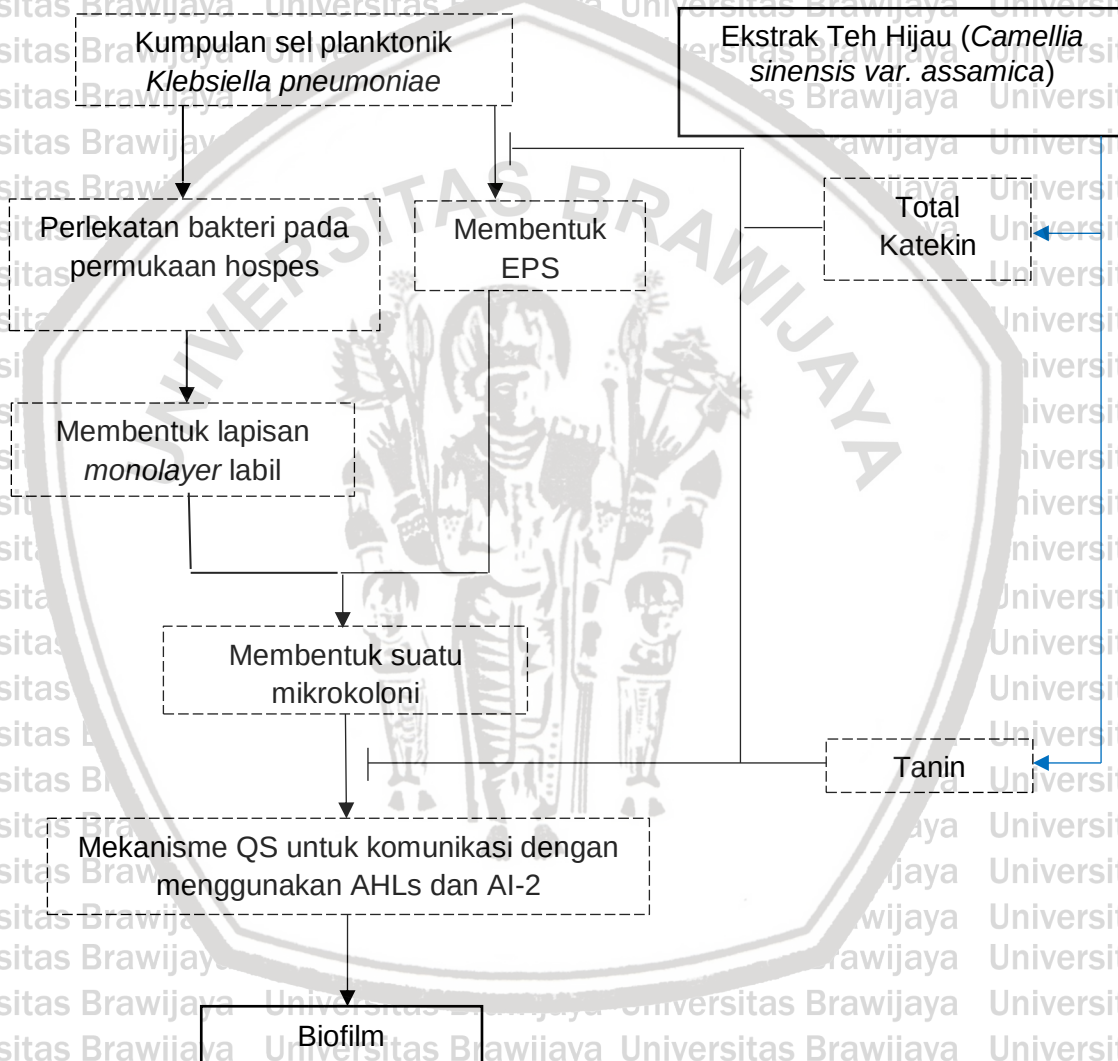
Daya motilitas dan ketebalan biofilm bakteri dapat dikurangi secara signifikan oleh *epigallocatechin-3-gallate*, sekaligus dapat merusak biofilm yang dihasilkan oleh bakteri (Kocielek, 2009). *Epigallocatechin-3-gallate* merusak biofilm dengan langkah-langkah yang terdiri dari penempelan di koloni bakteri, pendegradasian eksopolisakarida, dan perusakan membran bakteri (Evensen dan Braun, 2009). *Epigallocatechin-3-gallate* dapat menghambat polisakarida pembentuk *glycocalix*, dan menghambat interaksi antar sel sehingga mengurangi jumlah produksi lendir untuk perlekatan koloni bakteri. Selain itu, *epigallocatechin-3-gallate* dapat mengikat peptidoglikan dan merusak kekuatan dinding sel bakteri. Akibatnya, terjadi hambatan interaksi hidrofobik antara dinding sel bakteri dan permukaan yang akan terkolonisasi yang merupakan fase awal pembentukan biofilm. Oleh karena itu, *epigallocatechin-3-gallate* dapat menghambat pembentukan biofilm (Kocielek, 2009).



BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep

Keterangan :



: Variabel yang akan diteliti

: Pembentukan

: Mengandung



: Penghambat pembentukan biofilm

AHL : *N-acyl Homoserine Lactones*

EPS : *Extracellular Polymeric Substances*

AI-2 : *Auto Inducer-2*

QS : *Quorum Sensing*

Pada saat bakteri *Klebsiella pneumoniae* membentuk suatu koloni yang dapat menyebabkan infeksi, sel bebas *K. pneumoniae* akan membentuk biofilm.

Pembentukan ini diawali dari sel planktonik menjadi sel pembentuk biofilm.

Selanjutnya, perlekatan bakteri pada permukaan hospes akan membentuk lapisan *monolayer* yang bersifat sementara. Agar perlekatan menjadi permanen, bakteri

membentuk matriks EPS yang bertujuan untuk melekatkan bakteri pada permukaan.

Setelah melekat secara permanen, selanjutnya akan terjadi pengembangan dan maturasi biofilm *K. pneumoniae* melalui mekanisme *quorum sensing* (De Araujo et al., 2010).

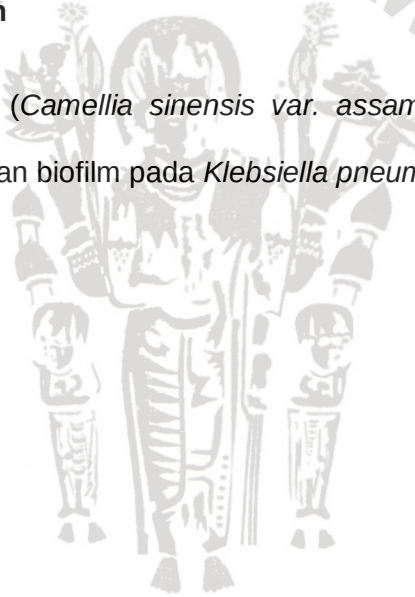
Quorum sensing terjadi karena adanya transmisi sinyal antara molekul dan reseptor melalui *N-acyl Homoserine Lactones* (AHL) dan *Auto Inducer-2* (AI-2).

Mekanisme AHLs yang dikontrol oleh sistem protein LuxI dan LuxR, masing-masing berperan sebagai regulator sirkuit *quorum sensing* dan aktivator gen target (Turan et al., 2017). Mekanisme AI-2 melalui kontrol sistem protein LuxS akan membentuk *auto inducer-receptor complex* yang akan mempengaruhi transkripsi gen pada *Klebsiella pneumoniae* sehingga akan terbentuk biofilm (Asfour, 2017).

Senyawa yang terkandung pada ekstrak teh hijau (*Camellia sinensis* var. *assamica*) seperti tanin dan katekin terlibat dalam mekanisme penghambatan sintesis biofilm. Katekin mampu mendegradasi matriks EPS bakteri *K. pneumoniae* dengan merusak kekuatan dinding sel bakteri (Ikigai *et al.*, 1993). Tanin dan katekin menghambat sinyal *quorum sensing* terutama pada proses transmisi sinyal AHLs dan AI-2 sehingga komunikasi antarsel terganggu (Asfour, 2017). Akibatnya, pembentukan biofilm bakteri *K. pneumoniae* dapat dihambat.

3.2 Hipotesis Penelitian

Ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis* var. *assamica*) memiliki efek sebagai penghambat pembentukan biofilm pada *Klebsiella pneumoniae* secara *in vitro*.



BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Dalam penelitian ini metode yang digunakan adalah *true eksperimental Klebsiella pneumoniae* dengan design *post-test only control group design* dan metode tabung. Kelompok kontrol adalah kelompok yang tidak mendapat perlakuan berupa pemberian ekstrak. Kelompok perlakuan adalah kelompok yang mendapat perlakuan berupa pemberian ekstrak. Penelitian pendahuluan dilakukan dengan konsentrasi 3,125%, 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, dan 100%. Penelitian inti dilakukan dengan konsentrasi 0%, 7,5%, 10%, 12,5%, 15%, 17,5%, dan 20%.

4.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Ekstraksi bahan penelitian dilakukan di Politeknik Negeri Malang pada bulan Maret 2018 dan penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada rentang waktu Februari – April 2018.

4.3 Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan ekstrak daun *Camellia sinensis var. assamica* dan sampel bakteri uji yang digunakan pada penelitian adalah *Klebsiella pneumoniae* pembentuk biofilm yang diambil dari stok kultur milik Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.4 Pengulangan

Jumlah pengulangan yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan rumus Federer sebagai berikut (Särndal *et al.*, 2003).

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

$$(7-1)(n-1) \geq 15$$

$$6n - 6 \geq 15$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 3,5$$

$$n \approx 4$$

Keterangan:

n = jumlah pengulangan tiap perlakuan

p = jumlah perlakuan (dosis ekstrak teh hijau): 0 (kontrol), 7,5%, 10%, 12,5%, 15%, 17,5%, dan 20% = 7 perlakuan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka besar sampel atau pengulangan yang diperlukan dalam penelitian ini paling sedikit adalah 4.

4.5 Variabel Penelitian

4.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas adalah variabel yang disengaja atau ditentukan, dan dipelajari pengaruhnya terhadap variabel terikat. Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis* var. *assamica*) dengan konsentrasi 0%, 7,5%, 10%, 12,5%, 15%, 17,5%, dan 20% (Matthew, 2016).

4.5.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung adalah variabel yang dipikirkan sebagai akibat atau keadaannya tergantung dari variabel-variabel lain. Variabel tergantung pada

penelitian ini adalah ketebalan biofilm bakteri *Klebsiella pneumoniae* pembentuk biofilm untuk menentukan Kadar Hambat Biofilm Minimal (KHBM).

4.6 Definisi Operasional

1. *Klebsiella pneumoniae* adalah bakteri batang Gram negatif yang dapat menyebabkan *primary community-acquired pneumonia* serta pneumonia nosokomial. Sampel ini diperoleh dari isolat *Klebsiella pneumoniae* pembentuk biofilm yang didapat dari swab beku Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
2. Biofilm adalah agregat multiseluler yang membentuk lapisan padat pada permukaan suatu substrat atau medium. Pada penelitian ini biofilm dibentuk oleh *Klebsiella pneumoniae* di medium tabung.
3. Ekstrak *Camellia sinensis* var. *assamica* adalah hasil ekstraksi cair daun teh hijau dengan pelarut etanol. Ekstrak yang didapat dianggap memiliki kandungan ekstrak sebesar 100%. Teh hijau yang digunakan adalah tanaman teh hijau yang didapat dari Kebun Teh Wonosari, Lawang.
4. *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC) adalah konsentrasi ekstrak *Camellia sinensis* var. *assamica* terendah yang dapat menghambat pembentukan biofilm *Klebsiella pneumoniae*. Hal ini ditandai dengan tidak tampaknya bentukan cincin dan lapisan ungu kebiruan pada area *airfluid border*. MBIC ditentukan jika nilai *Mean Gray Value* pada kelompok uji lebih rendah 10% dari nilai *Mean Gray Value* dinding tabung yang masih baru (Macià et al., 2014).

5. Kontrol bahan adalah ekstrak daun *Camellia sinensis* var. *assamica* murni yang tidak dicampur bakteri *Klebsiella pneumoniae* dan digunakan untuk mengetahui apakah bahan yang digunakan steril dimana nilai kontrol bahan adalah 0 (tidak terdapat pertumbuhan bakteri jenis apapun).
6. Kontrol bakteri adalah biakan bakteri murni yang tidak dicampur dengan ekstrak daun *Camellia sinensis* var. *assamica* sebagai pembanding pertumbuhan bakteri jika tidak diberikan ekstrak. Kontrol kuman berlaku sebagai kontrol positif.
7. Derajat pembentukan biofilm merupakan intensitas ketegasan warna cincin biofilm, yang dikuantifikasi dengan *Mean Gray Value*. Semakin tegas warna cincin biofilm yang terbentuk, semakin rendah nilai *Mean Gray Value*.
8. Konsentrasi yang digunakan pada penelitian ini adalah 7,5%, 10%, 12,5%, 15%, 17,5%, dan 20%.
9. *Mean Gray Value* adalah skala intensitas warna pada program Adobe Photoshop CS6. Kisaran skala antara 0-255. Angka mendekati 0 berarti kepekatan warna tinggi. Sedangkan angka mendekati 255 berarti kepekatan warna rendah.
10. Nilai *Mean Gray Value* tabung kosong merupakan nilai yang didapat dari pengukuran *Mean Gray Value* pada dinding tabung yang tidak terbentuk cincin atau tidak terdapat perlakuan, yang digunakan sebagai pembanding (Windya, 2015).

4.7 Alat dan Bahan Penelitian

4.7.1 Alat dan Bahan untuk Pembuatan Ekstrak Daun Teh Hijau

1. Teh hijau
2. Pelarut etanol 96%
3. Timbangan analitik
4. Gelas kimia 250 ml
5. Labu penampung
6. Cawan petri
7. Penjepit cawan petri
8. Desikator
9. Spatula
10. Pemanas aquades
11. Kertas saring
12. Rotary evaporator
13. Oven

4.7.2 Alat dan Bahan untuk Kultur dan Identifikasi Bakteri

1. Alat
 - a. Tabung reaksi
 - b. Ose
 - c. Lampu spiritus dan Bunsen
 - d. Inkubator
 - e. Spektrofotometer
 - f. Korek api
 - g. Label

h. Obyek glass dan kaca penutup

i. Mikroskop

2. Bahan

a. Biakan *Klebsiella pneumoniae* penghasil biofilm

b. Medium MacConkey

c. Bahan pewarnaan Gram : kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin

d. Akuades steril

e. Kertas penghisap atau tisu

f. Minyak imersi

4.7.3 Alat dan Bahan Deteksi Biofilm

1. *Trypticase Soy Broth* (TSB) dengan 1% glukosa (TSBglu)

2. Biakan *Klebsiella pneumoniae* pembentuk biofilm

3. Tabung reaksi

4. *Phosphate Buffer Saline* (PBS) pH 7,3

5. Kristal violet

6. *Deionized water*

7. Ose

8. Pipet

9. *Beaker glass*

10. Inkubator

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Identifikasi Bakteri

a. Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram bertujuan untuk mengetahui *Klebsiella pneumoniae*

termasuk bakteri Gram positif atau Gram negatif. Prosedur pewarnaan Gram, yaitu:

1. Mengambil koloni *Klebsiella pneumoniae* dengan lidi kapas dari *Nutrient Agar* ke kaca benda yang sebelumnya sudah diberi lingkaran dengan spidol permanen
2. Menunggu sediaan sampai kering, lalu difiksasi di atas api bunsen, dengan mengayunkan sebanyak 3-5 kali
3. Meneteskan kristal violet di atas kaca benda, lalu ditunggu selama 1 menit, bilas dengan akuades
4. Meneteskan lugol di atas kaca benda, lalu ditunggu selama 1 menit, bilas dengan akuades
5. Meneteskan alkohol 96% di atas kaca benda, lalu ditunggu 5-10 detik, bilas dengan akuades
6. Meneteskan safranin di atas kaca benda, lalu ditunggu selama 30 detik, bilas dengan akuades
7. Mengeringkan sediaan dengan kertas penghisap
8. Mengamati sediaan dibawah mikroskop dengan perbesaran total dari terkecil yaitu 100x, 400x, dan terbesar 1000x menggunakan minyak imersi
9. Mengamati adanya bakteri dengan bentuk batang dan bewarna merah yang menandakan bahwa *Klebsiella pneumoniae* termasuk bakteri batang Gram negatif (Noorhamdani et al., 2015).

b. Perbenihan pada Agar MacConkey

Bakteri *Klebsiella pneumoniae* diinokulasi pada medium agar MacConkey dan diinkubasi pada incubator dengan suhu 37°C selama 18-24 jam.

Selanjutnya, diamati apakah terjadi perubahan warna pada media agar.

Bila terjadi perubahan warna menjadi merah, artinya bakteri memfermentasikan laktosa (Samra et al., 2008).

c. *Microbact* 12A

Uji biokimia menggunakan *Microbact* 12A meliputi beberapa prosedur uji antara lain:

1. Satu koloni bakteri yang telah diinkubasi selama 18-24 jam diambil dengan menggunakan ose kemudian dilarutkan ke dalam 3-5 ml garam fisiologis dalam tabung reaksi steril hingga homogen.
2. Larutan bakteri yang telah homogen dimasukkan ke dalam sumur *Microbact* 12A sebanyak 100µL atau 4 tetes. Untuk sumur lysin, ornitin dan H₂S ditambahkan larutan *mineral oil* sebanyak 1-2 tetes. Setelah itu, *Microbact* 12A diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
3. *Microbact* 12A yang telah diinkubasi kemudian diberikan *reagent* pada sumur nomor 8 dengan *indol kovact* sebanyak 2 tetes, sumur nomor 10 dengan VP I dan VP II masing-masing 1 tetes, dan sumur nomor 12 dengan TDA sebanyak 1 tetes.
4. Evaluasi hasil dilihat melalui sumur-sumur *Microbact* 12A apakah positif atau negatif dengan cara membandingkan dengan tabel warna dan hasilnya ditulis pada formulir *Patent Record*.

5. Angka-angka oktaf didapatkan dari penjumlahan reaksi positif dari tiap-tiap kelompok (3 sumur didapatkan 1 angka oktaf).

6. Nama bakteri dilihat dengan komputer berdasarkan angka oktaf yang keluar (O'hara,2005).

d. Pembuatan Perbenihan Cair Bakteri Kepadatan 10^6 CFU/ml

1. *Klebsiella pneumoniae* yang sudah diidentifikasi kemudian dikultur dalam media *nutrient broth* selama 24 jam dalam inkubator 37°C .

2. Suspensi bakteri *Klebsiella pneumoniae* pada *nutrient broth* dilakukan pengukuran panjang gelombang (λ) 625 nm.

3. Dari nilai absorbansi dapat diperkirakan jumlah bakteri pada perbenihan cair dengan kalibrasi yang sudah diketahui yaitu absorbansi 0,1 setara dengan setara dengan kepadatan bakteri 10^8 CFU/ml.

4. Untuk mendapatkan kepadatan bakteri sebesar 10^8 CFU/ml. Maka menggunakan perhitungan :

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

Keterangan:

N_1 = Nilai absorbansi suspensi (hasil spektrofotometri)

V_1 = Volume bakteri yang ditambah pengencer

N_2 = Optical Density (0,1 = setara dengan 10^8 CFU/mL)

V_2 = Volume suspensi bakteri (10mL)

5. Dari hasil perhitungan tersebut diperoleh volume bakteri yang ditambah pengencer untuk mendapat kepadatan 10^8 CFU/ml sebanyak 10ml.

6. Untuk mendapatkan kepadatan 10^6 CFU/ml. Maka dari kepadatan

bakteri 10^8 CFU/ml dikurangi menjadi 10^6 CFU/ml dengan cara :

a. 10 ml bakteri dengan kepadatan 10^8 CFU/ml diambil 1 ml larutan

kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang telah terisi 9 ml

larutan NaCl, aduk rata sampai larutan homogen. Dengan demikian

kepadatan bakteri berkurang menjadi 10^7 CFU/ml.

b. Selanjutnya dari bakteri dengan kepadatan 10^7 CFU/ml tersebut

diambil 1 ml larutan kemudian dimasukkan ke dalam tabung yang

telah diisi 9 ml larutan NaCl, aduk rata sampai larutan homogen,

sehingga didapatkan kepadatan bakteri menjadi 10^6 CFU/ml (Ruchi

et al., 2015).

e. Uji Deteksi Pembentukan Biofilm

Klebsiella pneumoniae yang sudah teridentifikasi disimpan dalam media

TSB + *glycerol* 10% dan diinkubasi pada suhu 37°C selama satu malam.

Mikroba kultur semalam selanjutnya dimasukkan ke tabung TSBglu (10 ml)

dan diinkubasikan 37°C selama 24 jam. Selanjutnya, tabung dicuci dengan

Phosphate Buffer Saline (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*. Kemudian, tabung

dikeringkan kembali dan diamati formasi biofilmnya yang ditandai dengan

adanya cincin berwarna ungu kebiruan yang melekat pada dinding tabung

(Christensen *et al.*, 2000).

f. Uji Hambat Pembentukan Biofilm

1. Menyiapkan perbenihan cair bakteri dengan kepadatan 10^6

CFU/ml.

2. Membuat suspensi bakteri dalam medium TSB + *glycerol* 10% berdasarkan perhitungan OD dari spektrofotometri.
3. Mengisi tabung reaksi 2-7 dengan suspensi bakteri dalam medium TSB + *glycerol* 10% 2 ml, dan tabung kontrol diisi 4 ml.
4. Mencampurkan 2 ml larutan ekstrak dalam tiap tabung kecil ke dalam tabung reaksi 2-7 sehingga didapatkan larutan sebanyak 4 ml dengan konsentrasi ekstrak daun teh hijau pada masing-masing tabung sebagai berikut:

Tabung 1: 0% (kontrol)	Tabung 4: 12,5%	Tabung 7 : 100%
Tabung 2: 3,125%	Tabung 5: 25%	
Tabung 3: 6,25%	Tabung 6: 50%	

5. Mengisi tabung reaksi 2 – 7 dengan suspensi bakteri dari medium TSBglu dan ekstrak.
6. Menginkubasi keenam tabung selama 24 jam dengan suhu 37°C.
7. Mengeluarkan tabung dari inkubator setelah 24 jam dan mencuci dengan PBS (pH 7,3) serta mengeringkan airnya.
8. Memberikan kristal violet (0,1%) 0,5 ml. Kemudian, membuang kelebihan warna dan mencuci tabung dengan *deionized water*.
9. Mengeringkan tabung.

Biofilm yang terbentuk dapat diamati sebagai sebuah film yang melapisi sisi dan dasar tabung. Jumlah biofilm yang terbentuk kemudian dinilai sebagai 1 = tidak ada atau lemah, 2 = sedang atau 3 = kuat (Ruchi *et al.*, 2015).

g. Penelitian Inti

1. Ekstrak teh hijau (*Camellia sinensis* var. *assamica*) yang kental diambil sebanyak 1 gram dan dicampur dengan NaCl sebanyak 1 ml, sehingga didapatkan ekstrak teh hijau dengan konsentrasi 50%.
2. Menyiapkan perbenihan cair bakteri dengan kepadatan 10^6 CFU/ml.
3. Membuat suspensi bakteri dalam medium TSBglu berdasarkan OD dari spektrofotometri.
4. Menyiapkan tujuh tabung steril yang diisi dengan bakteri dan konsentrasi ekstrak yang ditentukan setelah uji pendahuluan, yaitu 0% (kontrol); 7,5%; 10%; 12,5%; 15%; 17,5%; 20%.
5. Mengisi tabung reaksi 2 – 7 dengan suspensi bakteri dari medium TSBglu dan ekstrak etanol daun teh hijau. Pada tabung reaksi 1 diisi dengan 4 ml suspensi bakter dari medium TSBglu.
6. Kemudian keenam tabung tersebut diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C.
7. Setelah 24 jam, keenam tabung tersebut dicuci dengan larutan PBS (pH 7,3), lalu dikeringkan.
8. Setelah kering, seluruh tabung dicat dengan kristal violet 0,1% sebanyak 4 ml atau hingga larutan kristal violet mengisi lebih tinggi dari batas larutan yang telah dibentuk pada masing – masing tabung. Diamkan selama 15 menit, kemudian buang larutan kristal violet dan cuci dengan air, kemudian dikeringkan.
9. Semua buangan dari tabung dimasukkan ke dalam lisol.
10. Pembentukan biofilm dapat diamati pada area *airfluid border* (area antara medium cair dan udara) (Ruchi et al., 2015).

h. Pengukuran Mean Gray Value

Hasil pembentukan biofilm pada tabung kemudian difoto dengan kamera digital. Untuk mengetahui intensitas warna pada area cincin dan dinding tabung pada masing-masing kelompok maka digunakan program aplikasi *Adobe Photoshop CS6*. *Mean Gray Value* yang dinyatakan dalam skala 0 – 255. Semakin rendah nilai *Mean Gray Value* menunjukkan intensitas warna yang semakin tebal, sementara semakin tinggi nilai *Mean Gray Value* menunjukkan intensitas warna yang semakin tipis. Langkah-langkah dimulai dengan membuka *Adobe Photoshop CS6*, pilih *File* dan masukkan hasil foto kamera digital. Selanjutnya, pilih *tab Window* dan pilih *Measurement Log*, blok area yang dilihat intensitas warnanya dengan menggunakan *Rectangular Marquee Tool* lalu klik *Record Measurements* maka didapatkan nilai *Mean Gray Value* yang merupakan rata-rata dari intensitas warna pengecatan tabung (Abouelela *et al.*, 2005).

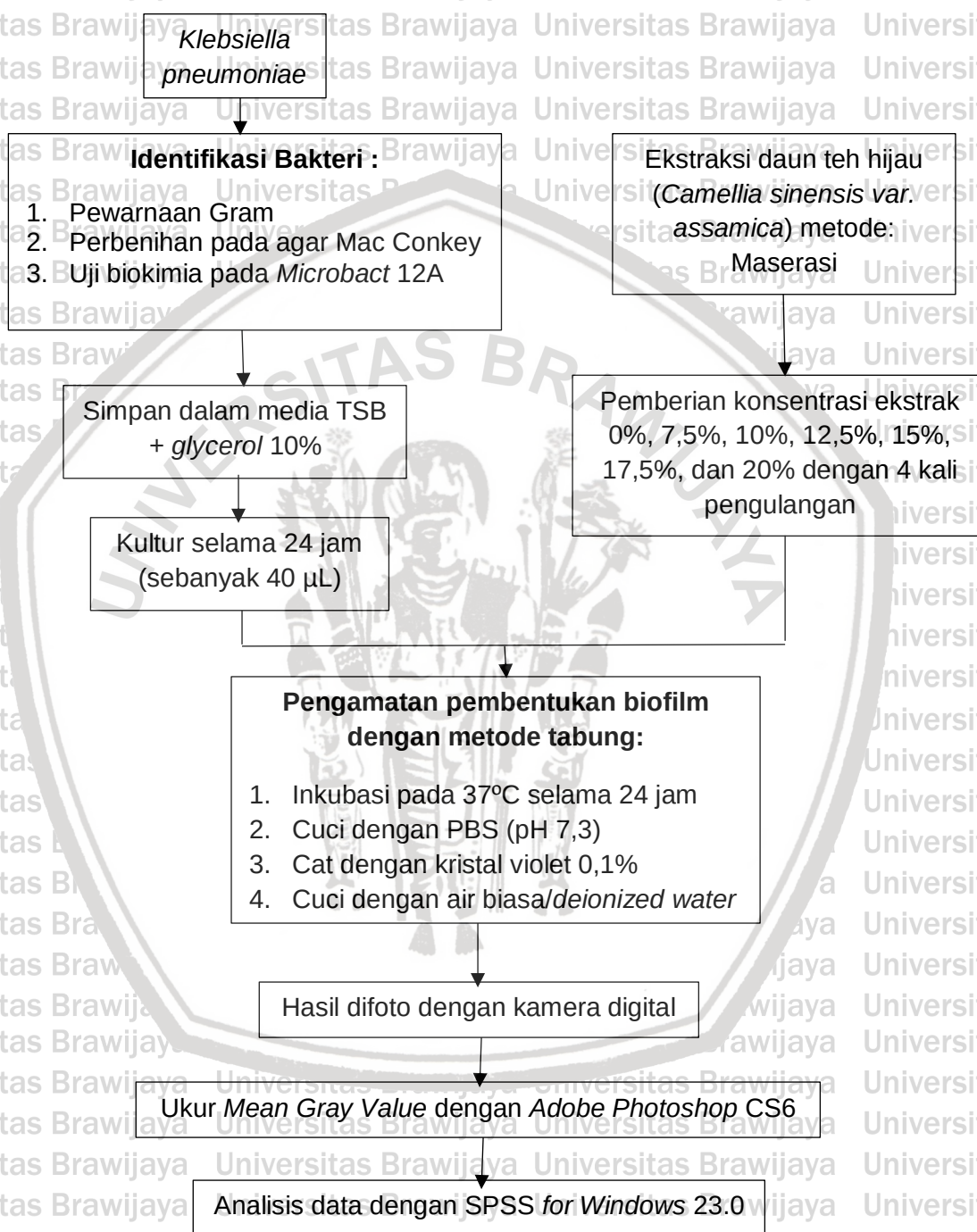
4.8.2 Pembuatan Ekstrak Daun Teh Hijau

4.8.2.1 Ekstraksi dan Evaporasi

1. Menggunakan 100 gram daun kering teh hijau (*Camellia sinensis* var. *assamica*) dicuci bersih dan dikeringkan, kemudian di oven dengan suhu 40°-60° sehingga kandungan airnya berkurang.
2. Kemudian, daun teh hijau yang kering tersebut di-blender menjadi sediaan bubuk, kemudian dimasukkan kedalam gelas Erlenmeyer ukuran 1L lalu direndam dengan etanol 96% sampai volume 1L, kemudian dikocok sampai benar – benar tercampur, kurang lebih 30 menit dan diamkan satu malam sampai mengendap.

3. Setelah satu malam, diambil lapisan atas campuran etanol 96% dengan zat aktif yang sudah terambil, proses ini dilakukan sampai sebanyak 3 kali dan dilanjutkan dengan proses evaporasi.
4. Memasang *evaporator set* pada tiang permanen agar dapat digantung dengan kemiringan 30° - 40° terhadap meja dengan susunan dari bawah ke atas, alat pemanas air, labu penampung hasil evaporasi, *rotatory evaporator* dan tabung pendingin.
5. Kemudian air dingin yang terhubung dengan bak penampung air dingin melalui selang plastik.
6. Hasil maserasi dimasukkan dalam labu evaporasi sedangkan *rotatory evaporator*, alat pompa sirkulasi air dingin dan alat pompa vakum dinyalakan.
7. Pemanas aquades juga dinyalakan sehingga hasil ekstraksi dalam tabung penampung evaporasi mendidih sampai dengan suhu 78°C (sesuai titik didih etanol 96%) dan etanol 96% mulai menguap.
8. Hasil penguapan etanol 96% dikondensasikan menuju labu penampung etanol 96% menuju labu penampung etanol 96% sehingga tidak tercampur hasil evaporasi dan uap lain tersedot pompa vakum.
9. Proses evaporasi dilakukan hingga volume hasil ekstraksi berkurang dan menjadi kental. Setelah kental evaporasi dihentikan dan hasil evaporasi diambil. Hasil evaporasi ditampung dalam cawan penguap kemudian di oven selama kurang lebih 1,5 sampai 2 jam untuk menguapkan pelarut yang tersisa. Setelah itu kita dapatkan hasil ekstraksi sebanyak 15 mL.
(Sudarmadji et al., 2003).

4.8.3 Alur Kerja Penelitian



Gambar 4.1 Alur kerja penelitian

4.9 Analisis Data

Analisis hasil penelitian menggunakan analisis statistik SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) versi 23.0 untuk Windows. Data dianggap signifikan jika $p < 0,05$. Langkah-langkah yang dilakukan adalah sebagai berikut:

1. Uji normalitas data dengan *Kolmogorov Smirnov Test* untuk menentukan apakah data tersebar normal atau tidak tersebar normal.
2. Uji komparasi dengan cara *one way ANOVA* > 2 kelompok dengan syarat sebaran data harus normal dan varian data harus homogen. Jika tidak homogen, digunakan metode *Kruskal Wallis*.
3. Uji Post Hoc *Multiple Comparison* untuk mengetahui signifikansi masing-masing kelompok data.
4. Uji korelasi untuk mengetahui hubungan antara variabel dependen dan variabel independen. Pada data parametrik digunakan uji korelasi Pearson, sedangkan pada data non parametrik diuji dengan uji korelasi Spearman. Uji korelasi untuk mengetahui tebal biofilm bakteri dengan perubahan kadar ekstrak yang diberikan dan bentuk hubungannya (Razali dan Wah, 2011).

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian

5.1.1 Hasil Ekstraksi Daun Teh Hijau (*Camellia sinensis* var. *assamica*)

Ekstrak yang akan digunakan dibuat dari daun teh hijau sebanyak 100 gram.

Daun teh hijau yang awalnya berbentuk kering dicuci terlebih dahulu hingga bersih.

Proses pengeringan dengan menggunakan oven pada suhu 80°C selama lebih kurang 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%. Setelah proses ekstraksi selesai, sisa pelarut

pada ekstrak dihilangkan dengan cara dioven pada suhu 70°-80°C hingga diperoleh hasil bobot konstan ekstrak.



Gambar 5.1 Hasil Ekstrak Etanol Daun Teh Hijau (*Camellia sinensis* var. *assamica*)

Keterangan : Tanda panah menunjukkan cairan ekstrak teh hijau berwarna hijau tua kehitaman dan pekat

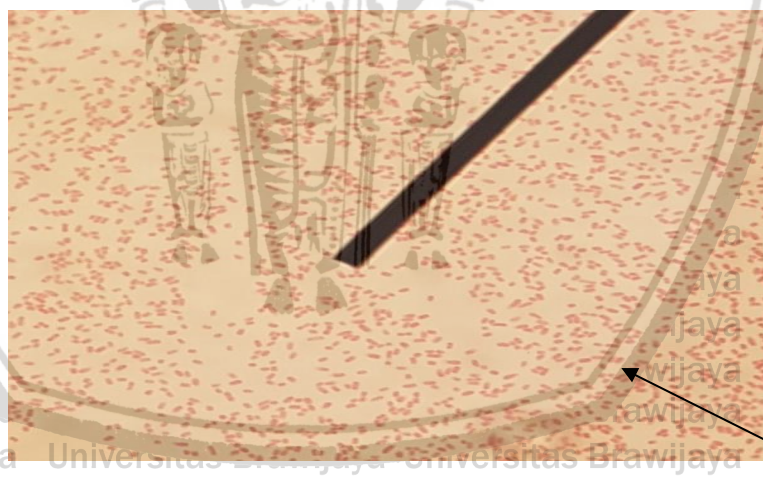
5.1.2 Hasil Identifikasi Bakteri

Identifikasi bakteri diawali dengan metode pewarnaan Gram, penanaman pada media MacConkey, dan *Microbact* 12A. Pewarnaan Gram menunjukkan hasil berupa bakteri Gram negatif dengan bentuk batang seperti pada Gambar 5.2.

Perbenihan pada media MacConkey menunjukkan pertumbuhan koloni bakteri berbentuk mukoid yang berwarna merah sesuai Gambar 5.3. Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa bakteri yang dibiakkan memfermentasikan laktosa.

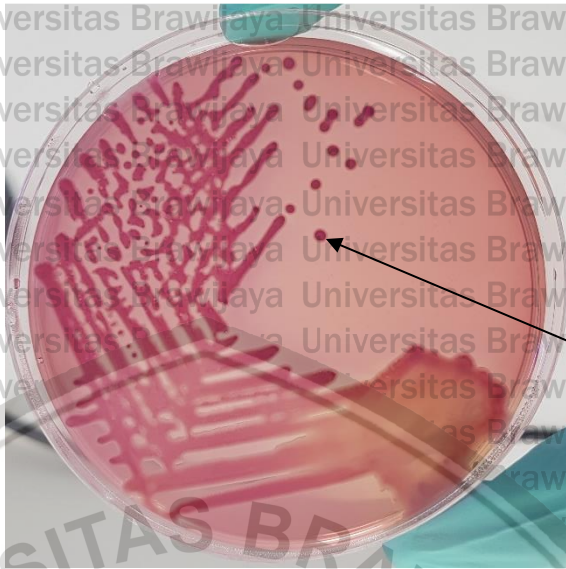
Uji biokimia dengan menggunakan *Microbact* 12A dilakukan untuk konfirmasi lebih lanjut dan didapatkan hasil 97,74% *Klebsiella pneumoniae*, sesuai pada Gambar

5.4. Hasil ini memperkuat kesimpulan bahwa bakteri biakan yang diteliti merupakan bakteri *Klebsiella pneumoniae*.



Gambar 5.2 Hasil Pewarnaan Gram

Keterangan : Tanda panah menunjukkan bentuk batang yang menandakan bahwa biakan ini merupakan bakteri batang Gram negatif (Perbesaran 1000x)



Gambar 5.3 Hasil Perbenihan Bakteri pada Media MacConkey

Keterangan : Tanda panah menunjukkan koloni berbentuk mukoid berwarna merah setelah ditanam pada media MacConkey yang menandakan bakteri memfermentasikan laktosa

OXOID		MICROBACT™ GNB 12A/B/E, 24E															
IDENTIFICATION KITS																	
		GNB 12A / 12E										GNB 12B					
		Oxidase	Motility	Nitrate	Lysine	Ornithine	H ₂ S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	V-P	Citrate	TDA	Gelatin
Result / Resultado / Ergebnis / Résultat / Risultato / Resultat / Αποτέλεσμα					+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	
		4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4
Sum / Suma / Somme / Somme / Somma / Sum / Summa / Soma / Απορροή					4			7			5				6		
Identification / Identificación / Identifikation / Identificazione / Identification / Identifizierung / Identificação / Ταυτοποίηση		Klebsiella pneumoniae 97,74%															

Gambar 5.4 Hasil Uji Microbact 12A pada Bakteri *Klebsiella pneumoniae*

Keterangan : Hasil uji identifikasi biokimia *Klebsiella pneumoniae* pada Microbact 12A sebesar 97,74%

5.1.3 Hasil Uji Hambat Pembentukan Biofilm

Sebelum dilakukan penelitian sesungguhnya, dilakukan uji pendahuluan untuk menentukan konsentrasi yang akan diteliti. Adapun konsentrasi pada uji pendahuluan antara lain 0%; 3,125%; 6,25%; 12,5%; 25%; 50%; dan 100%. Hasil uji pendahuluan menunjukkan bahwa pada konsentrasi 12,5% dan 25% sudah tidak ditemukan adanya pembentukan cincin biofilm pada area *airfluid* border. Berdasarkan hasil tersebut ditentukan konsentrasi yang akan digunakan pada penelitian sesungguhnya (penelitian inti) yaitu 0%; 7,5%; 10%; 12,5%; 15%; 17,5%; dan 20%. Perlakuan 0% merupakan kelompok kontrol bakteri yang menggunakan NaCl tanpa pemberian ekstrak.

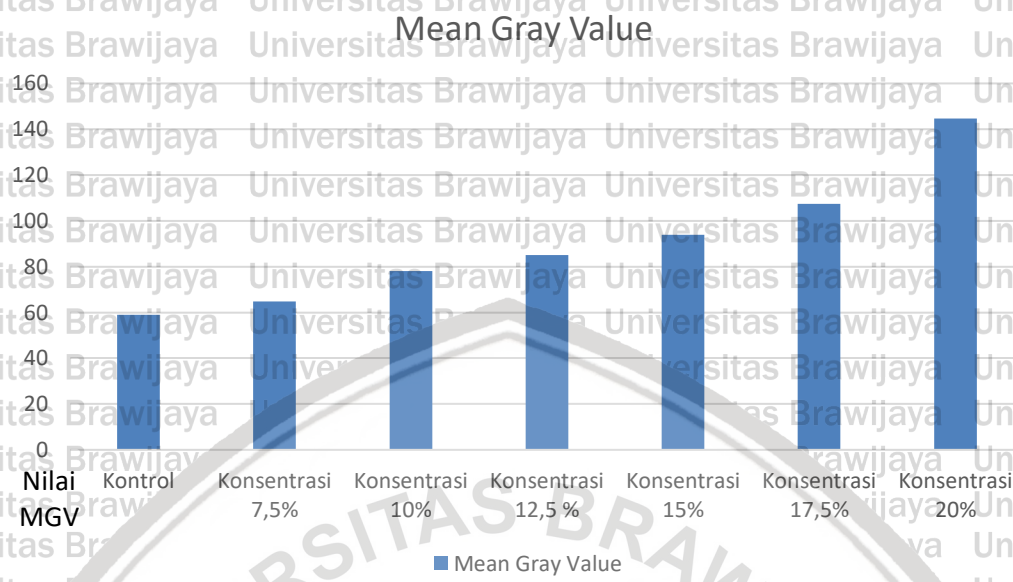
Pengamatan terhadap hasil penelitian inti dilakukan terhadap intensitas pembentukan cincin yang terbentuk pada *airfluid border* yang menandakan terbentuknya biofilm. Gambaran cincin tersebut difoto dengan kamera digital, lalu dilakukan kuantifikasi dengan melihat *Mean Gray Value* menggunakan aplikasi *Adobe Photoshop CS6* yang dinyatakan dalam skala 0 – 255. Pengukuran *Mean Gray Value* juga dilakukan pada tabung yang masih baru untuk melihat nilai awal *Mean Gray Value* tabung kosong untuk tabung yang digunakan. Apabila *Mean Gray Value* pada kelompok perlakuan lebih kecil 10% dari *Mean Gray Value* tabung kosong yang masih baru, maka konsentrasi pada kelompok tersebut merupakan Kadar Hambat Biofilm Minimal (KHBM). Penilaian pada tabung kosong menunjukkan nilai *Mean Gray Value* sebesar 160,12. Nilai ini kemudian dibandingkan dengan *nilai Mean Gray Value* kelompok perlakuan, seperti terlihat pada Tabel 5.1, Lampiran 2, dan Lampiran 3.

Tabel 5.1 Hasil Pengukuran *Mean Gray Value* dengan Aplikasi *Adobe*

Photoshop CS6

Konsentrasi	Pengulangan				Rerata ± SD
	I	II	III	IV	
0%	45,62	47,24	38,25	104,96	59,02 ± 30,88
7,5%	53,21	56,31	39,96	109,43	64,73 ± 30,63
10%	66,36	61,24	72,19	112,13	77,98 ± 23,20
12,5%	78,50	63,26	78,44	120,28	85,12 ± 24,51
15%	90,44	72,11	87,95	125,03	93,88 ± 22,30
17,5%	96,25	93,66	110,53	129,15	107,40 ± 16,29
20%	142,43	145,27	143,32	147,42	144,61 ± 2,22
<i>Mean Gray Value</i>	160,12				
Tabung Kosong					

Keterangan : KHBM berada pada konsentrasi 20%, karena rerata konsentrasi 20% berada pada rentang 10% nilai *Mean Gray Value* tabung kosong (144,108-160,12)



Gambar 5.5 Grafik Pengukuran *Mean Gray Value*

Keterangan : Berdasarkan hasil grafik, semakin tinggi konsentrasi ekstrak, semakin tinggi angka *Mean Gray Value* yang dihasilkan (bukti objektif cincin biofilm semakin tipis)

5.2 Analisis Data

Analisis dalam penelitian menggunakan aplikasi analisis statistik untuk *IBM SPSS Statistic* versi 23.0 untuk *Windows*. Langkah pertama adalah melakukan uji normalitas dan homogenitas dari hasil *Mean Gray Value* pada tabel 5.1. Selanjutnya, data dianalisis dengan uji *Kolmogorov-Smirnov* untuk mengetahui normalitas dan uji *Oneway ANOVA* dengan pilihan homogenitas. Kemudian dari hasil kedua uji tersebut, dilakukan uji komparasi dengan *Oneway ANOVA* untuk memastikan adanya perbedaan signifikan antar kelompok data. Selanjutnya, dilakukan uji *Post Hoc Test multiple comparison test* metode *Tukey* untuk melihat signifikansi suatu kelompok data terhadap masing-masing kelompok data lainnya. Setelah itu dilakukan uji korelasi

Pearson untuk mengetahui korelasi antara peningkatan konsentrasi ekstrak teh hijau terhadap *Mean Gray Value*.

5.2.1 Uji Normalitas dan Homogenitas

Suatu data dianggap tersebar normal jika hasil uji normalitas menunjukkan $p > 0,05$ dan dianggap homogen jika hasil uji homogenitas menunjukkan $p > 0,05$. Hasil uji normalitas *Kolmogorov Smirnov* menunjukkan nilai $p = 0,108$ (Lampiran 5), maka disimpulkan bahwa data berdistribusi normal. Kemudian dari hasil uji homogenitas *Levene*, didapatkan nilai $p = 0,294$ (Lampiran 6), maka disimpulkan bahwa data bervarian homogen. Berdasarkan hasil ini dapat dilakukan uji statistik parametrik.

5.2.2 Uji Oneway ANOVA

Uji *Oneway ANOVA* dilakukan untuk mengetahui tingkat perbedaan antara rerata tiap kelompok dalam keseluruhan data yang telah didapatkan. Data dianggap berbeda signifikan bila $p < 0,05$. Hasil uji menunjukkan nilai $p = 0,001$ (kurang dari 0,05), maka disimpulkan bahwa terdapat perbedaan antara rerata tiap kelompok yang signifikan (Lampiran 7).

5.2.3 Uji Post Hoc

Uji *Post Hoc Multiple Comparison* digunakan untuk mengetahui signifikansi masing-masing kelompok data satu dengan lainnya. Metode *Post Hoc* yang digunakan adalah uji *Tukey HSD*. Perbedaan dianggap signifikan jika nilai $p < 0,05$ pada masing-masing kelompok data. Adapun penjabaran dari hasil yang terlampir pada Lampiran 8 adalah sebagai berikut.

Kelompok data pertama adalah perlakuan tanpa pemberian ekstrak teh hijau (konsentrasi 0%) yang dalam penelitian ini kelompok tersebut disebut sebagai kontrol.

Hasilnya adalah didapatkan perbedaan *Mean Gray Value* yang tidak signifikan terhadap konsentrasi 7,5%, 10%, 12,5%, 15%, dan 17,5% ($p>0,05$). Pada konsentrasi 20% terdapat perbedaan yang signifikan ($p<0,05$). Kemudian hasil komparasi kelompok data kedua, yaitu perlakuan dengan konsentrasi ekstrak 7,5% didapatkan perbedaan *Mean Gray Value* yang tidak signifikan terhadap konsentrasi 0% (kontrol), 10%, 12,5%, 15%, dan 17,5% ($p>0,05$). Pada konsentrasi 20% terdapat perbedaan yang signifikan ($p<0,05$). Sedangkan pada kelompok data ketiga, yaitu konsentrasi ekstrak 10% didapatkan perbedaan *Mean Gray Value* yang tidak signifikan terhadap konsentrasi 0% (kontrol), 7,5%, 12,5%, 15%, dan 17,5% ($p>0,05$). Pada konsentrasi 20% terdapat perbedaan yang signifikan ($p<0,05$). Pada kelompok data keempat, yaitu konsentrasi ekstrak 12,5% didapatkan perbedaan *Mean Gray Value* yang tidak signifikan terhadap konsentrasi 0% (kontrol), 7,5%, 10%, 15%, dan 17,5% ($p>0,05$). Pada konsentrasi 20% terdapat perbedaan yang signifikan ($p<0,05$). Sedangkan pada kelompok data kelima dan keenam, yaitu masing-masing konsentrasi 15% dan 17,5% didapatkan perbedaan *Mean Gray Value* yang tidak signifikan terhadap semua konsentrasi. Dan pada kelompok data terakhir, yaitu konsentrasi ekstrak 20% didapatkan perbedaan *Mean Gray Value* yang signifikan terhadap konsentrasi 0% (kontrol), 7,5%, 10%, dan 12,5% ($p<0,05$). Sehingga dapat disimpulkan bahwa antar kelompok data yang berdekatan tidak terdapat signifikansi yang cukup. Namun, pada kelompok data dengan konsentrasi tertinggi terdapat perbedaan angka *Mean Gray Value* yang signifikan terhadap empat konsentrasi terendah.

Tabel 5.2 Nilai Signifikan Kelompok terhadap Kelompok Lainnya pada Uji *Post Hoc*

	0%	7,5%	10%	12,5%	15%	17,5%	20%
0%		1	0,904	0,693	0,379	0,94	0,001
7,5%		1	0,982	0,871	0,580	0,179	0,001
10%	0,904	0,982		0,999	0,956	0,571	0,009
12,5%	0,693	0,871	0,999		0,998	0,820	0,023
15%	0,379	0,580	0,956	0,998		0,980	0,071
17,5%	0,094	0,179	0,571	0,820	0,980		0,308
20%	0,001	0,001	0,009	0,023	0,071	0,308	

Tabel 5.3 Rangkuman Hasil Uji *Post Hoc*

	0%	7,5%	10%	12,5%	15%	17,5%	20%
0%		-	-	-	-	-	+
7,5%	-		-	-	-	-	+
10%	-	-		-	-	-	+
12,5%	-	-	-		-	-	+
15%	-	-	-	-		-	-
17,5%	-	-	-	-	-		-
20%	+	+	+	+	-	-	

Keterangan : (+) = $p < 0,05$ (-) = $p > 0,05$

5.2.4 Uji Korelasi *Pearson*

Uji korelasi dilakukan untuk mengetahui keeratan dan bentuk hubungan antara dua variabel yang dinyatakan dengan koefisien korelasi. Hubungan signifikan ditunjukkan dengan $p < 0,05$, sedangkan nilai $p > 0,05$ menunjukkan bahwa korelasi tidak signifikan.

Berdasarkan uji yang dilakukan, didapatkan hasil nilai $p = 0,000$ dengan nilai korelasi 0,761. Adapun klasifikasi nilai korelasi *Pearson* sebagai berikut : (Sugiyono, 2007)

Nilai Korelasi 0 – 0,199 = sangat rendah

Nilai Korelasi 0,200 – 0,399 = rendah

Nilai Korelasi 0,400 – 0,599 = sedang

Nilai Korelasi 0,600 – 0,799 = kuat

Nilai Korelasi 0,800 – 1,000 = sangat kuat

Korelasi dapat bertanda positif dan negatif. Korelasi positif menunjukkan arah yang searah antar variabel. Sedangkan korelasi negatif menunjukkan arah yang berlawanan.

Hasil uji korelasi Pearson pada penelitian ini menunjukkan hasil-hasil sebagai berikut:

1. Nilai $p = 0,000$, yang menandakan terdapat korelasi yang signifikan antara konsentrasi ekstrak teh hijau dengan *Mean Gray Value* (Lampiran 9).
2. Nilai korelasi (r) = 0,761, berarti terdapat korelasi yang kuat antara konsentrasi ekstrak daun teh hijau dan *Mean Gray Value* atau ketebalan biofilm.
3. Arah korelasi positif, sehingga disimpulkan semakin tinggi konsentrasi ekstrak teh hijau, semakin tinggi pula nilai *Mean Gray Value* yang menandakan semakin tipis cincin biofilm yang terbentuk.

BAB VI

PEMBAHASAN

Penelitian eksperimental ini menggunakan *Klebsiella pneumoniae* yang didapat dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan ditanam pada media *Nutrient Agar Plate*. Daun teh hijau (*Camellia sinensis* var. *assamica*) yang digunakan berasal dari Kebun Teh Wonosari Lawang, Malang. Jenis teh ini dipilih karena teh langsung dikeringkan di kebunnya dan tidak melalui proses yang terlalu panjang agar kandungan aktif yang berada dalam daun teh hijau masih cukup banyak. Daun teh hijau kering yang didapat kemudian diekstraksi dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% di Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang. Metode ini digunakan karena prosedur dan peralatannya lebih sederhana serta lebih sesuai agar mendapatkan bahan aktif dari tanaman. Pelarut akan menumbuk dinding sel yang mengandung zat aktif dalam sel dengan luar sel, sehingga larutan yang terpekat didesak keluar (Pratiwi, 2010).

Penelitian pendahuluan dilakukan terlebih dahulu untuk menentukan konsentrasi pada penelitian inti. Pada penelitian pendahuluan, secara visual dapat diketahui bahwa pada rentang konsentrasi ekstrak teh hijau 12,5% dan 25% pembentukan biofilm bakteri *Klebsiella pneumoniae* mulai dapat dihambat. Penelitian inti kemudian dilakukan pada 6 konsentrasi, yaitu 7,5%, 10%, 12,5%, 15%, 17,5%, dan 20%. Hasil penelitian inti menunjukkan bahwa konsentrasi ekstrak yang secara visual mampu menghambat pembentukan biofilm *Klebsiella pneumoniae* adalah konsentrasi 17,5% dan 20%. Hal ini dapat dilihat dengan tidak terbentuknya cincin pada area *airfluid border* pada tabung.

Hasil penelitian ini dalam dilusi tabung kemudian didokumentasi menggunakan kamera digital dan diolah menjadi data kuantitatif yang lebih akurat.

Pengamatan data secara kuantitatif dengan melihat intensitas warna cincin pada masing-masing tabung dengan aplikasi *Adobe Photoshop CS6*. Hasil pengamatan pada konsentrasi 0% hingga 20% menunjukkan adanya kenaikan rata-rata *Mean Gray*

Value yang berbanding lurus dengan kenaikan konsentrasi ekstrak etanol daun teh hijau. Semakin tinggi nilai *Mean Gray Value* menunjukkan semakin tipisnya intensitas

warna yang menandakan semakin tipisnya cincin yang terbentuk. Kadar Hambat

Biofilm Minimal (KHBM) dapat ditentukan jika rerata pengulangan berada dalam rentang 10% dari nilai *Mean Gray Value* tabung kosong (Macià *et al.*, 2014). Pada

penelitian ini nilai *Mean Gray Value* tabung kosong adalah 160,120, berarti rentang 10% ada pada kisaran 144,108 – 160,120. Rerata MGV yang berada pada kisaran

tersebut ada pada konsentrasi ekstrak 20%, dengan nilai MGV 144,610. Sehingga

KHBM dapat ditentukan, yaitu pada kadar 20%. Hasil penelitian ini membuktikan

bahwa ekstrak etanol daun teh hijau (*Camellia sinensis* var. *assamica*) terbukti

mampu menghambat pembentukan biofilm bakteri *Klebsiella pneumoniae*.

Penelitian guna menghambat pertumbuhan *Klebsiella pneumoniae* telah cukup banyak dilakukan. Dari penelitian yang dilakukan peneliti lain, ditemukan bahwa

daun kemangi (*Ocimum sanctum*) dapat menghambat pertumbuhan bakteri *K. pneumoniae* pada konsentrasi minimal 14% (Henry, 2015). Penelitian lain terkait

manfaat daun katuk (*Sauropus androgynus*) didapatkan bahwa dengan konsentrasi minimal 18%, pertumbuhan bakteri *K. pneumoniae* dapat dihambat (Ratna, 2014).

Perbedaan konsentrasi minimal pada masing-masing ekstrak tumbuhan

dimungkinkan terjadi karena kandungan zat aktif yang lebih banyak terkandung di dalamnya, seperti tanin, katekin, dan polifenol dibandingkan pada daun teh hijau.

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Ahmad (2017) mengenai efek ekstrak teh hijau (*Camellia sinensis* var. *assamica*) terhadap pembentukan biofilm bakteri *Burkholderia cepacia*, didapatkan hasil bahwa ekstrak teh hijau dapat menghambat pembentukan biofilm bakteri *Burkholderia cepacia* dengan KHBM pada konsentrasi minimal 60%. Penelitian tersebut mengindikasikan ekstrak daun teh hijau juga memiliki efek dalam menghambat pembentukan biofilm pada bakteri Gram negatif lainnya. Pada penelitian tersebut juga didapatkan semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun teh hijau maka cincin biofilm yang akan terbentuk pada dinding tabung akan semakin tipis.

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Maharani (2014) yang meneliti pengaruh ekstrak teh hijau (*Camellia sinensis* var. *assamica*) terhadap pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus* secara *in vitro* didapatkan hasil bahwa ekstrak teh hijau mempunyai efek dalam menghambat pembentukan biofilm bakteri *Staphylococcus aureus* dengan KHBM pada konsentrasi minimal 4,125%. Penelitian ini menandakan bahwa ekstrak daun teh hijau juga memiliki efek dalam menghambat pembentukan biofilm pada bakteri Gram positif.

Hasil pengukuran *Mean Gray Value* kemudian dengan menggunakan program *SPSS Statistic* versi 23.0 untuk *Windows*. Uji statistik yang digunakan adalah uji normalitas dan homogenitas untuk memenuhi persyaratan uji *One Way ANOVA*. Selain itu, dilakukan uji *One Way ANOVA* dan uji korelasi Pearson. Dari uji *One Way ANOVA* didapatkan nilai signifikansi $p = 0,001$ ($p < 0,005$). Hal ini menjelaskan bahwa terdapat perbedaan efek signifikan antara tiap pemberian konsentrasi ekstrak daun teh hijau. Pada hasil uji korelasi Pearson, didapatkan nilai $r = 0,761$ yang membuktikan adanya korelasi yang kuat antara kenaikan konsentrasi ekstrak teh hijau dan nilai *Mean Gray Value*. Hasil ini juga menunjukkan adanya korelasi positif dimana semakin

tinggi konsentrasi ekstrak daun teh hijau, semakin besar pula nilai *Mean Gray Value* yang menandakan semakin tipis cincin biofilm yang terbentuk. Hal ini membuktikan dasar teori bahwa kandungan pada teh hijau, utamanya tanin dan katekin mampu menghambat pembentukan biofilm. Kandungan tanin pada teh hijau (*Camellia sinensis var. assamica*) dapat menghambat sinyal pada mekanisme *quorum sensing* sehingga tidak terbentuk biofilm pada bakteri (Frazier *et al.*, 2003). Selain itu, tanaman teh hijau memiliki kandungan katekin yang cukup tinggi. Katekin yang terdiri dari komponen *epicatechin* (EC), *epicatechin-3-gallate* (ECG), *epigallocatechin* (EGC), dan *epigallocatechin-3-gallate* (EGCG). Senyawa EGCG dapat menghambat biofilm dengan menghambat *quorum sensing* dan menurunkan pertumbuhan sel bakteri pada dosis tinggi. EGCG dapat mengurangi intensitas sinyal *quorum sensing* bakteri (Persson *et al.*, 2005). Daya motilitas dan ketebalan biofilm bakteri dapat dikurangi secara signifikan oleh *epigallocatechin-3-gallate*, sekaligus dapat merusak biofilm yang dihasilkan oleh bakteri (Kociotek, 2009). Akibatnya, terjadi hambatan interaksi hidrofobik antara dinding sel bakteri dan permukaan yang akan terkolonisasi yang merupakan fase awal pembentukan biofilm (Kociotek, 2009). Berdasarkan uraian di atas, terbukti bahwa ekstrak etanol daun teh hijau (*Camellia sinensis var. assamica*) efektif sebagai antibiofilm untuk bakteri *Klebsiella pneumoniae* secara *in vitro*.

Keterbatasan pada penelitian ini adalah pengamatan yang hanya dilakukan setelah masa inkubasi selesai (24 jam), tidak dilakukan sepanjang waktu. Oleh karena itu belum dapat dilihat secara detail proses pembentukan biofilm secara langsung.

Keterbatasan lain adalah metode pembacaan hasil uji biokimia *Microbact 12A* yang masih dipengaruhi oleh penilaian warna setiap orang berbeda sehingga dapat mempengaruhi hasil *Microbact 12A*. Penggunaan dilusi tabung menjadi salah satu keterbatasan dalam penelitian ini karena tidak dapat menentukan apakah bakteri

pembentuk biofilm merupakan jenis bakteri pembentuk biofilm yang ringan, sedang, atau kuat. Dalam penelitian ini hanya mengamati apakah bakteri dapat membentuk biofilm, namun tidak menentukan kategori biofilm tersebut.



BAB VII

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil pemberian ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis* var. *assamica*) terhadap pembentukan biofilm *Klebsiella pneumoniae*, dapat disimpulkan bahwa :

1. Ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis* var. *assamica*) dapat menghambat pembentukan biofilm *Klebsiella pneumoniae* secara *in vitro*.
2. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis* var. *assamica*), semakin besar daya hambat pembentukan biofilm *Klebsiella pneumoniae* secara *in vitro*.
3. Kadar Hambat Minimum (KHM) dari ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis* var. *assamica*) terhadap pembentukan biofilm *Klebsiella pneumoniae* secara *in vitro* adalah pada konsentrasi 20%

7.2 Saran

Adapun saran yang dapat diberikan dari penelitian ini adalah :

1. Perlu dilakukan penemuan metode ekstraksi daun teh hijau yang dapat menghasilkan konsentrasi 100% bahan bioaktif daun teh hijau (*Camellia sinensis* var. *assamica*) serta tidak memiliki molekul besar agar tidak menempel pada dinding tabung.

2. Perlu dilakukan lebih lanjut penelitian tentang manfaat ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis* var. *assamica*) dalam menghambat pembentukan biofilm bakteri lainnya.
3. Perlu dilakukan penelitian dengan ekstrak yang berbeda pada *Klebsiella pneumoniae* dalam menghambat biofilm.
4. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang daun teh hijau (*Camellia sinensis* var. *assamica*) terhadap *Klebsiella pneumoniae* secara *in vivo* untuk mengetahui efek samping, dosis efektif serta toksisitasnya yang akan ditimbulkan.
5. Perlu dilakukan penelitian dengan metode *Congo Red Agar* dan *Tissue Culture Plate* untuk konfirmasi lebih lanjut pengaruh ekstrak etanol daun teh hijau (*Camellia sinensis* var. *assamica*) dalam menghambat pembentukan biofilm *Klebsiella pneumoniae*.

DAFTAR PUSTAKA

Abdullah A, Alam SSM, Sultana M, Hossain MA. 2015. *BioCluster: Tool for Identification and Clustering of Enterobacteriaceae Based on Biochemical Data*. Genomics, Proteomics and Bioinformatics. Beijing Institute of Genomics, Chinese Academy of Sciences and Genetics Society of China, 13(3), pp. 192–199. doi: 10.1016/j.gpb.2015.03.007.

Aboueleta A, Abbas HM, Eldeeb H, Wahdan AA, Nassar SM. 2005. *Automated vision system for localizing structural defects in textile fabrics*. (Online) (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167865504003794>, diakses pada tanggal 3 November 2017).

Ahmad S. 2017. *Efek Ekstrak Etanol Daun Teh Hijau sebagai Penghambat Pembentukan Biofilm pada Bakteri Burkholderia cepacia secara In Vitro*. Tugas Akhir. Tidak dipublikasikan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Anderl JN, Franklin MJ, Stewart PS. 2000. *Role of antibiotic penetration limitation in Klebsiella pneumoniae biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin*. (Online) (<http://aac.asm.org/content/44/7/1818.short> , diakses pada tanggal 17 September 2017).

Asfour HZ. 2017. *Antiquorum sensing natural compounds*. (Online) (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213879X16300797>, diakses pada tanggal 6 Oktober 2017).

Balestrino D, Haagensen JAJ, Rich C, Forestier C. 2005. *Characterization of Type 2 Quorum Sensing in Klebsiella pneumoniae and Relationship with Biofilm Formation*. (Online) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1070389/>, diakses pada tanggal 8 Oktober 2017).

Barr JG. 1977. *Klebsiella: Taxonomy, nomenclature, and communication*. (Online) (<http://icp.bmj.com/content/30/10/943.abstract> , diakses pada tanggal 12 September 2017).

Bastos DHM, Ishimoto EY, Marques MOM, Ferri AF, Torres EA. 2006. *Essential oil and antioxidant activity of green mate and mate tea (Ilex paraguariensis) infusions*. (Online) (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889157505000505> , diakses pada tanggal 12 September 2017).

Bravo L. 1998. *Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance*. (Online) (<https://academic.oup.com/nutritionreviews/article-abstract/56/11/317/1901722> , diakses pada tanggal 13 September 2017).

Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. 2015. *Jawetz Melnick & Adelbergs Medical Microbiology 27 E*. McGraw Hill Professional.

Cabrera C, Artacho R, Giménez R. 2006. *Beneficial Effects of Green Tea—A Review*. Journal of the American College of Nutrition, 25(2), pp. 79–99. doi: 10.1080/07315724.2006.10719518.

Cescutti P, De Benedetto G, Rizzo R. 2016. *Structural determination of the polysaccharide isolated from biofilms produced by a clinical strain of Klebsiella pneumoniae*. Carbohydrate Research. Elsevier Ltd, 430, pp. 29–35. doi: 10.1016/j.carres.2016.05.001.

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

Cooper R, Morré DJ, Morré DM. 2005. *Medicinal benefits of green tea: Part I. Review of noncancer health benefits*. Journal of Alternative & Complementary Medicine, 11(3), 521-528.

De Araujo C, Balestrino D, Roth L, Charbonnel N, Forestier C. 2010. *Quorum sensing affects biofilm formation through lipopolysaccharide synthesis in Klebsiella pneumoniae*. Research in Microbiology, 161(7), pp. 595–603. doi: 10.1016/j.resmic.2010.05.014.

Delle Side D, Giuffreda E, Tredici SM, Tala A, Pennetta C, Alifano P. 2015. *Quorum Sensing: Complexity in the bacterial world*. (Online) (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960077915001472> , diakses pada tanggal 5 Oktober 2017).

Derakhshan S, Sattari M, Bigdeli M. 2008. *Effect of subinhibitory concentrations of cumin (Cuminum cyminum L.) seed essential oil and alcoholic extract on the morphology, capsule expression and urease activity of Klebsiella pneumoniae*. International journal of antimicrobial agents, 32(5), 432-436.

Donlan RM. 2002. *Biofilms: Microbial life on surfaces*. Emerging Infectious Diseases, 8(9), pp. 881–890. doi: 10.3201/eid0809.020063.

Elfidasari D, et al. 2013. *Deteksi Bakteri Klebsiella pneumonia pada Beberapa jenis Rokok Konsumsi Masyarakat*. Al-Azhar Indonesia Seri Sains Dan Teknologi, 2(1), pp. 41–47.

Engelhardt UH. 2010. *Comprehensive Natural Products II*. Comprehensive Natural Products II, pp. 999–1032. doi: 10.1016/B978-008045382-8.00089-7.

Evensen NA, Braun PC. 2009. *The effects of tea polyphenols on Candida albicans: inhibition of biofilm formation and proteasome inactivation*. Canadian journal of microbiology, 55(9), 1033-1039.

Frazier RA, Papadopoulou A, Mueller-Harvey I, Kisson D, Green RJ. 2003. *Probing protein–tannin interactions by isothermal titration microcalorimetry*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(18), 5189–5195.

Gannik DE, Guassora AD. 2011. *Interaction between disease concepts and the organisation of health care*. (Online) (<http://europepmc.org/abstract/med/2102014>), diakses pada tanggal 21 September 2017).

Hansen DS, Aucken HM, Abiola T, Podschun R. 2004. *Recommended test panel for differentiation of Klebsiella species on the basis of a trilateral interlaboratory evaluation of 18 biochemical tests*. Journal of clinical microbiology, 42(8), 3665-3669.

Hartoyo, Arif. 2003. *Teh dan Khasiatnya bagi Kesehatan*. Yogyakarta: Kanisius.

Henry KK. 2015. *Uji Antimikroba Ekstrak Etanol Daun Kemangi (Ocimum sanctum) terhadap Bakteri Klebsiella pneumoniae secara In Vitro*. Tugas Akhir. Tidak dipublikasikan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. 2010. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35(4), pp. 322–332. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011.

Ikigai H, Nakae T, Hara Y, Shimamura T. 1993. *Bactericidal catechins damage the lipid bilayer*. (Online) (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000527369390323R>), diakses pada tanggal 15 September 2017).

Jamal M, Tasneem U, Hussain T, Andleeb S. 2015. *Bacterial Biofilm: Its Composition, Formation and Role in Human Infections*. (Online) (<http://www.rruij.com/open-access/bacterial-biofilm-its-compositionformation-and-role-in-human-infections.php?aid=61426>). , diakses pada tanggal 15 September 2017).

Jass, Jana. 2003. *Medical Biofilms : Detection, Prevention, and Control*. England: John Wiley and Sons Ltd.

Khanbabaee K, van Ree T. 2001. *Tannins: classification and definition*. *Natural product reports*, 18(6), 641-649.

Kociolek MG. 2009. *Quorum-sensing inhibitors and biofilms*. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Infective Agents)*, 8(4), 315-326.

Kumar A, Alam A, Rani M, Ehtesham NZ, Hasnain SE. 2017. *Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens*. *International Journal of Medical Microbiology*, (January). doi: 10.1016/j.ijmm.2017.09.016.

Li J, Wang N. 2011. *Genome-wide mutagenesis of xanthomonas axonopodis pv. citri reveals novel genetic determinants and regulation mechanisms of biofilm formation*. (Online) (<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0021804>), diakses pada tanggal 16 September 2017).

Li YH, Tian XL. 2016. *Quorum Sensing and Bacterial Social Interactions in Biofilms: Bacterial Cooperation and Competition*. Stress and Environmental Regulation of Gene Expression and Adaptation in Bacteria, 2, pp. 1197–1205. doi: 10.1002/9781119004813.ch116.

Macià MD, Rojo-Molinero E, Oliver A. 2014. *Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria*. Clinical Microbiology and Infection, 20(10), pp. 981–990. doi: 10.1111/1469-0691.12651.

Maharani P. 2014. *Efek Ekstrak Teh Hijau (Camellia sinensis var. assamica) sebagai Penghambat Pembentukan Biofilm pada Staphylococcus aureus secara In Vitro*. Tugas Akhir. Tidak dipublikasikan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Maisonneuve E, Cateau E, Delouche M, Quellard N, Rodier MH. 2017. *An observational study of phagocytes and Klebsiella pneumoniae relationships: different behaviors*. Microbes and Infection. Elsevier Masson SAS, 19(4–5), pp. 259–266. doi: 10.1016/j.micinf.2016.12.005.

Matthew J. 2016. *Efek Ekstrak Daun Teh Hijau (Camellia sinensis var. assamica) sebagai Penghambat Pembentukan Biofilm pada Aggregatibacter actinomycetemcomitans secara In Vitro*. Tugas Akhir. Tidak dipublikasikan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Namal Senanayake SPJ. 2013. *Green tea extract: Chemistry, antioxidant properties and food applications – A review*. Journal of Functional Foods. Elsevier Ltd, 5(4), pp. 1529–1541. doi: 10.1016/j.jff.2013.08.011.

Nazzarudin. 1993. *Teh Pembudidayaan dan Pengolahan*. Jakarta: Penerbit Penebar Swadaya.

Noorhamdani, Santoso S, Sumarno, Dzen SM, Roekistiningsih, Winarsih S, et al. 2015. *Bakteriologi Medik*, Edisi Kedua. Malang: Laboratorium Mikrobiologi FK UB.

O'hara CM. 2005 *Manual and Automated Instrumentation for Identification of Enterobacteriaceae and Other Aerobic Gram-Negative Bacilli*. Clinical Microbiology Reviews, 18(1), pp. 147–162. doi: 10.1128/CMR.18.1.147.

Pelczar MJ, Chan ECS. 1988. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia Press.

Persson T, Givskov M, Nielsen J. 2005. *Quorum sensing inhibition: targeting chemical communication in Gram negative bacteria*. Current medicinal chemistry, 12(26), 3103-3115.

Pratiwi E. 2010. *Perbandingan Metode Maserasi, Remaserasi, Perkolasi Dan Reperkolasi Dalam Ekstraksi Senyawa Aktif Andrographolide dari Tanaman Sambiloto (Andrographis paniculata)*. Tugas Akhir. Tidak dipublikasikan, Institut Pertanian Bogor.

Ratna D. 2014. *Uji Antimikroba Ekstrak Etanol Daun Katuk terhadap Klebsiella pneumoniae secara In Vitro*. Tugas Akhir. Tidak dipublikasikan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Razali NM, Wah YB. 2011. *Power comparisons of shapiro-wilk, kolmogorov-smirnov, lilliefors and anderson-darling tests*. Journal of statistical modeling and analytics, 2(1), 21-33.

Riedl KM, Hagerman AE. 2001. *Tannin-protein complexes as radical scavengers and radical sinks*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49(10), pp. 4917-4923. doi: 10.1021/jf010683h.

Roccaro AS, Blanco AR, Giuliano F, Rusciano D, Enea V. 2004. *Epigallocatechin-gallate enhances the activity of tetracycline in staphylococci by inhibiting its efflux from bacterial cells*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 48(6), pp. 1968-1973. doi: 10.1128/AAC.48.6.1968-1973.2004.

Ruchi T, Sujata B, Anuradha D. 2015. *Comparison of Phenotypic Methods for the Detection of Biofilm Production in Uro-Pathogens in a Tertiary Care Hospital in India*. 4(9), pp. 840-849.

Samra Z, Bahar J, Madar-Shapiro L, Aziz N, Israel S, Bishara J. 2008. *Evaluation of CHROMagar KPC for rapid detection of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae*. Journal of clinical microbiology, 46(9), 3110-3111.

Särndal C, Swensson B, Wretman J. 2003. *Model assisted survey sampling*. Berlin: Springer Science & Business Media.

Setyamidjaja D. 2000. *Teh: Budidaya dan Pengolahan Pascapanen*. Yogyakarta: Kanisius.

Solano C, Echeverz M, Lasa I. 2014. *Biofilm dispersion and quorum sensing*. *Current Opinion in Microbiology*, 18(1), pp. 96–104. doi: 10.1016/j.mib.2014.02.008.

Somantri, R. 2011. *Kisah dan Khasiat Teh*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama.

Stewart PS, Costerton JW. 2001. *Antibiotic resistance of bacteria in biofilms*. (Online) (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673601053211> , diakses pada tanggal 17 September 2017).

Sudarmadji S, Haryono B, Suhardi. 2003. *Analisa Bahan Makanan dan Pertanian*. Yogyakarta: Liberty.

Sugiyono. 2007. *Metode Penelitian Kuantitatif Kualitatif dan R&D*. Bandung: Alfabeta.

Taylor PW, Hamilton-Miller JM, Stapleton PD. 2005. *Antimicrobial properties of green tea catechins*. *Food science and technology bulletin*, 2, 71.

Todar K. 2004. *Klebsiella pneumoniae*. (Online) (<http://www.textbookofbacteriology.net/klebsiella.html> , diakses pada 16 September 2017).

Tortora GJ, Funke BR, Case CL, Johnson TR. 2004. *Microbiology: an introduction* (Vol. 9). San Francisco: Benjamin Cummings.

Tsay RW, Siu LK, Fung CP, Chang FY. 2002. *Characteristics of bacteremia between community-acquired and nosocomial Klebsiella pneumoniae infection: risk factor for mortality and the impact of capsular serotypes as a herald for community-acquired infection*. Archives of internal medicine, 162(9), 1021-1027.

Turan NB, Chormey DS, Buyukpinar C, Engin GO, Bakirdere S. 2017. *Quorum sensing: Little talks for an effective bacterial coordination*. TrAC - Trends in Analytical Chemistry. Elsevier B.V., 91, pp. 1-11. doi: 10.1016/j.trac.2017.03.007.

Wang H, Provan GJ, Helliwell K. 2000. *Tea flavonoids: their functions, utilisation and analysis*. Trends in Food Science & Technology, 11(4), 152-160.

Wang LF, Kim DM, Lee CY. 2000. *Effects of heat processing and storage on flavanols and sensory qualities of green tea beverage*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48(9), pp. 4227-4232. doi: 10.1021/jf0003597.

Widyaningsih R, Buntaran L. 2012. *Pola Kuman Penyebab Ventilator Associated Pneumonia (VAP) dan Sensitivitas Terhadap Antibiotik di RSAB Harapan Kita*. Sari Pediatri, 13(6), pp. 384-390.

Windya. 2015. *Efek Antimikroba Ekstrak Teh Hijau (Camellia sinensis var. assamica) sebagai Penghambat Pembentukan Biofilm Pseudomonas aeruginosa secara In Vitro*. Tugas Akhir. Tidak dipublikasikan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Zia N, Shahid M. 2017. *Determination of Bioactive Properties of Different Temperature Camellia sinensis (Green Tea)* (Online) (https://www.researchgate.net/publication/313837084_Determination_of_Bioactive_Properties_of_Different_Temperature_Camellia_sinensis_Green_Tea), diakses pada tanggal 1 November 2018).