

**UJI EFEKTIVITAS EKSTRAK DAUN PUTRI MALU (*Mimosa pudica* Linn)
TERHADAP PENGHAMBATAN BIOFILM PADA *Pseudomonas aeruginosa*
SECARA IN VITRO**

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran**



OLEH:

Nadia Noorbertha Ayunani

NIM. 155070100111031

**PROGRAM STUDI S1 KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG**

2018

DAFTAR ISI

Judul.....	i
Halaman Pengesahan	ii
Pernyataan Keaslian Tulisan	iii
Kata Pengantar	iv
Abstrak	vi
Abstract	vii
Daftar Isi	1
Daftar Tabel	4
Daftar Gambar	5
Daftar Lampiran	7
Daftar Singkatan	8
BAB 1 Pendahuluan	9
1.1 Latar Belakang	9
1.2 Rumusan Masalah	11
1.3 Tujuan Penelitian	12
1.3.1 Tujuan Umum	12
1.3.2 Tujuan Khusus	12
1.4 Manfaat Penelitian	13
1.4.1 Pengembangan Ilmu Pengetahuan	13
1.4.2 Manfaat Klinis.....	13
BAB 2 Tinjauan Pustaka	14
2.1 Pseudomonas aeruginosa	14
2.1.1 Epidemiology P. aeruginosa	15
2.1.2 Taksonomi P.aeruginosa	17
2.1.3 Morfologi dan Identifikasi	17
2.1.4 Patogenesis.....	18
2.1.5 Stabilitas dan Viabilitas.....	19
2.2 Biofilm	21
2.2.1 Pembentukan Biofilm	22
2.3 Metode Tube Test.....	23
2.4 Mimosa Pudica Linn.....	24

2.4.1 Taksonomi dan Morfologi.....	25
2.4.2 Kandungan Daun Putri Malu.....	27
2.4.2.1 Flavonoid.....	27
2.4.2.2 Tannin.....	28
2.4.2.3 Saponin.....	29
2.5 Bahan Anti Mikroba.....	30
BAB 3 Kerangka Konsep dan Hipotesis Penelitian	33
3.1 Deskripsi Konsep Penelitian.	34
3.2 Hipotesis Penelitian	34
BAB 4 Metode Penelitian	35
4.1 Rancangan Penelitian	35
4.2 Sampel Penelitian	35
4.2.1 Populasi dan Sampel.....	35
4.3 Variabel Penelitian	36
4.3.1 Variabel Bebas.....	36
4.3.2 Variabel Tergantung.....	36
4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian	37
4.5 Alat dan Bahan	37
4.5.1 Pembuatan Ekstrak Daun Putri Malu.....	37
4.5.2 Identifikasi Bakteri.....	38
4.5.3 Deteksi Biofilm.....	38
4.6 Definisi Operasional.....	39
4.7 Prosedur Penelitian	40
4.7.1 Persiapan Daun Putri Malu.....	40
4.7.1.1 Ekstraksi dan Evaporasi.....	40
4.7.2 Persiapan Identifikasi Bakteri.....	41
4.7.2.1 Pemeriksaan Mikroskopis.....	41
4.7.2.2 Perbenihan pada MacConkey Agar	42
4.7.2.3 Uji Biokimia.....	43
4.7.3 Pembuatan Perbenihan Cair Bakteri	43
4.7.4 Uji Deteksi Bakteri (Metode Tube Test).....	43
4.7.5 Uji Hambat Pembentukan Biofilm P.aeruginosa.....	44
4.7.6 Pengukuran Mean Gray Value.....	45

4.8 Analisa Data.....	46
4.9 Rencana Operasional Penelitian.....	47
BAB 5 Hasil Penelitian dan Analisis Data	48
5.1 Hasil Penelitian	48
5.1.1 Hasil Ekstraksi Daun Beluntas (<i>Pluchea indica</i> L.)	48
5.1.2 Hasil Identifikasi Bakteri Uji	48
5.1.3 Hasil Uji Hambat Pembentukan Biofilm	50
5.2 Analisis Data	57
5.2.1 Uji Normalitas dan Homogenitas	57
5.2.2 Uji One Way ANOVA	58
5.2.3 Uji Post-Hoc Tukey.....	59
5.2.4 Uji Korelasi Pearson.....	62
5.2.5 Uji Regresi.....	63
BAB 6 Pembahasan	65
BAB 7 Kesimpulan dan Saran	69
7.1 Kesimpulan	69
7.2 Saran	69
Daftar Pustaka	71
Lampiran	77



HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

UJI EFEKTIVITAS EKSTRAK DAUN PUTRI MALU (*Mimosa pudica*
Linn) TERHADAP PENGHAMBATAN BIOFILM PADA *Pseudomonas*
aeruginosa SECARA IN VITRO

Oleh :

Nadia Noorbertha Ayunani
155070100111031

Telah diuji pada

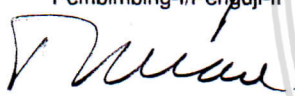
Hari : Kamis
Tanggal : 15 November 2018

Dan dinyatakan lulus oleh :

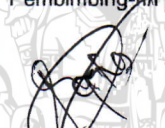
Penguji-I


dr. Achmad Bayhaqi Nasir Aslam, Sp.Rad(K)
NIK. 2013098402041001


Pembimbing-I/Penguji-II

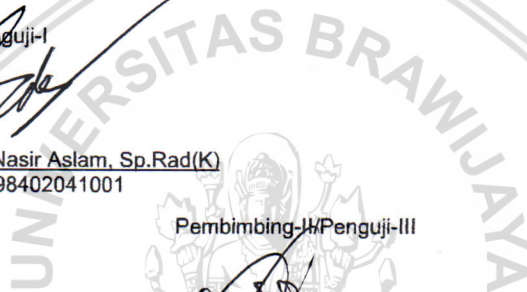

Prof. Dr. dr. Sanarto Santoso, DTM&H, Sp.MK(K)
NIP. 194812201980021002

Pembimbing-II/Penguji-III


dr. Winda Vrieda Vierlia, Sp.M
NIK. 2016098309232001

Mengetahui,
Ketua Program Studi Kedokteran


dr. Triwahyu Astuti, M.Kes, Sp.P
NIP. 196310221996012001



ABSTRAK

Ayunani, Nadia Noorbertha. 2018. *Uji Efektivitas Ekstrak Daun Putri Malu (Mimosa pudica Linn) Terhadap Penghambatan Biofilm Pada Pseudomonas aeruginosa Secara In Vitro*. Tugas Akhir. Program Studi Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Prof. Dr. dr. Sanarto Santoso, DTM&H, Sp.MK(K) (2) dr. Wino Vrieda Vierlia, SpM

Pseudomonas aeruginosa adalah bakteri gram negatif yang menyebabkan infeksi nosokomial. Salah satu faktor peningkatan risiko terjadinya infeksi nosokomial adalah resistensi bakteri terhadap antibiotik dan diperkuat oleh kemampuan bakteri membentuk biofilm sehingga perlu alternatif lain yang memiliki efek menghambat biofilm pada *Pseudomonas aeruginosa*, salah satunya daun putri malu (*Mimosa pudica Linn*). Daun Putri Malu positif mengandung senyawa flavonoid, tannin, saponin yang memiliki peranan menghambat pertumbuhan bakteri berdasarkan mekanisme kerjanya masing-masing. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan bahwa ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica Linn.*) memiliki efek menghambat pembentukan biofilm pada *Pseudomonas aeruginosa* secara *in vitro*. Konsentrasi ekstrak daun putri malu yang digunakan adalah 7,5%, 10%, 12,5%, 15%, 17,5% dan 20%. Tiap perlakuan dilakukan dengan pengulangan sebanyak empat kali. Uji hambat pembentukan biofilm dilihat melalui pengamatan visual dan kuantitatif. Pada penelitian pendahuluan dan pengulangan, biofilm mulai tidak terbentuk pada konsentrasi 20% secara visual. Pengamatan secara kuantitatif diukur melalui *Mean Gray Value* menggunakan Adobe Photoshop CS6 dan didapatkan Kadar Hambat Minimal (KHBM) dari penelitian ini adalah konsentrasi 15%. Analisa data dengan *One-Way ANOVA* menunjukkan terdapat perbedaan *Mean Gray Value* yang signifikan antar konsentrasi ekstrak daun putri malu dalam menghambat terbentuknya biofilm ($p < 0,05$). Uji korelasi *Pearson* menunjukkan tanda angka korelasi positif (+) atau arah korelasi berbanding lurus. Artinya semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun putri malu, maka semakin tinggi *Mean Gray Value* yang diperoleh, atau cincin biofilm yang terbentuk semakin tipis.

Berdasarkan penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica Linn*) dapat menghambat pembentukan biofilm bakteri *Pseudomonas aeruginosa* secara *in vitro*.

Kata Kunci : *Pseudomonas aeruginosa*, biofilm, daun putri malu (*Mimosa pudica Linn*), *Mean Grey Value* (MGV), KHBM

ABSTRACT

Ayunani, Nadia Noorbertha. 2018. *Effectivity Test Of Mimosa Leaves (Mimosa pudica Linn) Extract Towards Biofilm Inhibition On Pseudomonas aeruginosa In Vitro*. Final Assigment. Medical Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisor: (1) Prof. Dr. dr. Sanarto Santoso, DTM&H, Sp.MK(K) (2) dr. Wino Vrieda Vierlia, SpM

One of the factors increasing the risk of nosocomial infection is bacteria resistance to antibiotics strengthened by its ability to form biofilm. Therefore, it needs alternatives to inhibit biofilm on *Pseudomonas aeruginosa*, one of which is Mimosa Leaves (*Mimosa pudica Linn*). Mimosa Leaves positively contains flavonoid, tannin, saponin. Each has mechanism to inhibit bacteria growth. The purpose of this research is to prove that Mimosa Leaves (*Mimosa pudica Linn.*) extract has effect to inhibit biofilm forming on *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. Mimosa Leaves extract concentration used in this study are 7,5%, 10%, 12,5%, 15%, 17,5% and 20%. Every treatment is done with four-time repetitions. Inhibition forming test is seen through visual and quantitative observation. Biofilm starts to deform visually at 20% concentration on preliminary and repetition research. Quantitative observation measured by *Mean Gray Value* used Adobe Photoshop CS6 and this research gets 15% of Concentration of Inhibition Minimum Rate. One-Way ANOVA data analysis shows significant *Mean Grey Value* difference between Mimosa Leaves extract concentration in inhibit biofilm forming ($p < 0,05$). Pearson Correlation Test shows positive correlation sign score (+) or linear correlation direction. Which means the more Mimosa Leaves extract concentration the more *Mean Gray Value* is got, or the thinner biofilm ring is formed.

Based on this research, it concludes that Mimosa leaves extract (*Mimosa pudica Linn.*) can inhibit the biofilm forming of *Pseudomonas aeruginosa* bacteria in vitro.

Keywords : *Pseudomonas aeruginosa*, Biofilm, Mimosa Leaves (*Mimosa pudica Linn*), *Mean Grey Value* (MGV), Concentration of Inhibition Minimum Rate

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pseudomonas aeruginosa adalah bakteri gram negatif, aerob obligat, berkapsul, mempunyai flagella polar sehingga bakteri ini bersifat motil, tidak menghasilkan spora, dan tidak dapat memfermentasikan karbohidrat (Strohl *et al.*, 2001 ; Madigan *et al.*, 2008). *Pseudomonas aeruginosa* merupakan salah satu bakteri penyebab infeksi nosokomial. Infeksi nosokomial merupakan infeksi yang diperoleh pasien setelah \pm 72 jam berada di rumah sakit (Karen dan Janet, 2003 ; Steven *et al.*, 2007). *Pseudomonas aeruginosa* dalam menginfeksi manusia membutuhkan mekanisme *survival* atau daya pertahanan hidup salah satunya yaitu dengan pembentukan biofilm. Biofilm merupakan kumpulan sel mikroorganisme, khususnya bakteri, yang melekat di suatu permukaan substrat atau medium dan diselimuti oleh pelekat karbohidrat yang dikeluarkan oleh bakteri. Peran biofilm pada bakteri dalam menginfeksi manusia adalah sebagai pertahanan terhadap gaya fisik yang menyapu sel bakteri, fagositosis sel imun, penetrasi antibiotik yang bersifat racun bagi bakteri. Selain itu, peran biofilm pada bakteri adalah kolonisasi guna komunikasi antar sel dan pertukaran materi genetik, serta cara alami bakteri dalam memenuhi nutrisi pada kondisi yang kurang menguntungkan sehingga harapannya adalah dapat menyerap nutrisi lebih banyak (Madigan *et al.*, 2006).

Angka kejadian infeksi nosokomial di Asia Tenggara tergolong masih tinggi. Terbukti pada data WHO (2002), regio Eropa, Mediterania Timur, Asia Tenggara, dan *Western Pacific* rata-rata 8,7% pasien rumah sakit

mengalami nosokomial infeksi. Lebih dari 1,4 juta orang di seluruh dunia menderita komplikasi infeksi yang diakibatkannya di rumah sakit. Frekuensi tertinggi infeksi nosokomial dilaporkan yaitu rumah sakit di Kawasan Mediterania Timur dan Asia Tenggara (masing-masing 11,8 dan 10,0%). *Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri penyebab infeksi nosokomial salah satunya yaitu HAP (Hospital Acquired Pneumonia). Menurut panel di negara Asia, patogen yang paling sering ditemui pada HAP adalah *Pseudomonas aeruginosa* (18%), diikuti dengan *S. aureus* (16%), *A. baumannii* (16%), *Klebsiella spp* (14%), *Enterobacteriaceae spp* (8%), dan *E. coli* (6%) (Chawla, 2008). Dalam hal ini, maka dapat disimpulkan bahwa *Pseudomonas aeruginosa* merupakan patogen penyebab HAP terbanyak di negara Asia.

Salah satu faktor peningkatan risiko terjadinya infeksi nosokomial adalah resistensi bakteri terhadap antibiotik. Mekanisme resistensi antibiotik yaitu inaktivasi enzimatis antibiotik untuk β -laktam dan aminoglikosida. Di antara β -laktamase, spektrum-spektrum-laktamase (ESBL) dan karbapenemase (terutama metallo- β -laktamase) telah menyebar luas dalam tahun-tahun belakangan ini (Weldhagen GF *et al*, 2003). Resistensi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* terhadap antibiotik diperkuat lagi oleh kemampuan bakteri ini dalam membentuk biofilm. Biofilm terbungkus dalam matriks ekstrapolimer yang dapat menghambat difusi dan mengikat antibiotika. Difusi yang lambat dapat memberikan kesempatan bagi enzim-enzim seperti beta-laktamase untuk menghancurkan antibiotika (Mah dan O'Toole, 2001). Melihat fenomena ini, perlu adanya penelitian lebih lanjut bahan-bahan yang memiliki efek anti mikroba khususnya menghambat biofilm pada *Pseudomonas aeruginosa* yang bersifat aman, murah, dan berkhasiat.

Tanaman herbal saat ini masih menjadi andalan masyarakat Indonesia. Tanaman herbal pun banyak yang memiliki kandungan sebagai anti mikroba salah satunya daun putri malu (*Mimosa pudica* Linn.). Putri malu mengandung $\geq 9\%$ senyawa aktif, 3 dengan konsentrasi terbesar terdapat pada bagian daun (Zhang *et al.*, 2011). Berdasarkan skrining fitokimia, bagian daun dari tanaman putri malu positif mengandung berbagai senyawa polifenol seperti alkaloid, flavonoid, terpenoid, sterol, tannin, dan saponin (Paul *et al.*, 2012; Rohela *et al.*, 2011; Tamilarasi dan Ananthi, 2012; Gandhiraja *et al.*, 2009; Sharma MC dan Sharma S, 2010). Flavonoid, tannin, dan saponin memiliki mekanisme kerja yaitu mengganggu pertumbuhan bakteri berdasarkan mekanismenya masing-masing. Pada penelitian sebelumnya, yaitu efek anti mikroba ekstrak daun putri malu terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dan *Proteus stuarti* menunjukkan adanya potensi dalam penghambatan bakteri secara in vitro (Mehingko L *et al.*, 2010). Efek ekstrak daun putri malu terhadap penghambatan biofilm pada *Staphylococcus aureus* pada penelitian sebelumnya juga telah menunjukkan bahwa ekstrak ini mampu menghambat pembentukan biofilm pada bakteri *Staphylococcus aureus* secara in vitro (Mutmainnah Bq *et al.*, 2018).

Berdasarkan uraian diatas, peneliti tertarik untuk melihat apakah kandungan ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica* Linn.) yang memiliki potensi sebagai anti mikroba berpotensi pula sebagai penghambat pembentukan biofilm pada *Pseudomonas aeruginosa*. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan alternatif lain dalam penatalaksanaan infeksi nosokomial terutama pada HAP (Hospital Acquired Pneumonia)

yang disebabkan oleh resistensi antibiotik khususnya pada *Pseudomonas aeruginosa*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasar latar belakang di atas dapat disusun suatu rumusan masalah utama sebagai berikut:

Apakah ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica Linn.*) memiliki efek penghambat pertumbuhan biofilm pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* secara in-vitro ?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan bahwa ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica Linn.*) memiliki efek antimikroba sebagai penghambat pembentukan biofilm pada *Pseudomonas aeruginosa* secara *in vitro*

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Untuk mengetahui perbedaan hasil dari pemberian masing-masing konsentrasi ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica Linn.*) dalam menghambat pembentukan biofilm pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* secara *in vitro*.
2. Untuk mengetahui Kadar Hambat Biofilm Minimal dari ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica Linn.*) yang dapat menghambat pembentukan biofilm pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* secara *in vitro*.

1.4 Manfaat penelitian

1.4.1 Pengembangan ilmu pengetahuan

Mengetahui efek ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica* Linn.) sebagai penghambat aktifitas biofilm terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

1.4.2 Manfaat klinis

Sebagai dasar penelitian lanjutan tentang pemberian ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica* Linn.) sebagai salah satu alternatif pilihan terapi terhadap infeksi oleh karena bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

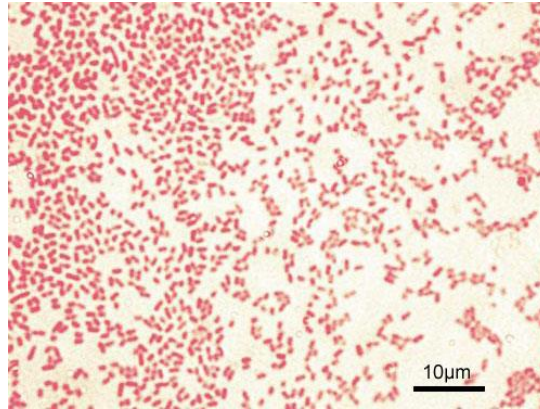


BAB II

TINJAUAN PUSAKA

2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa adalah bakteri gram negatif aerob obligat, berkapsul, mempunyai flagella polar sehingga bakteri ini bersifat motil, berukuran sekitar 0,5-1,0 μm (Strohl *et al.*,2001; Madigan *et al.*,2008; Boyd, 1995). Bakteri gram negatif adalah bakteri yang tidak mempertahankan zat warna kristal violet sewaktu proses pewarnaan Gram sehingga akan berwarna merah bila diamati dengan mikroskop (Madigan *et al.*, 2006). Bakteri ini tidak menghasilkan spora dan tidak dapat menfermentasikan karbohidrat (Strohl *et al.*,2001; Madigan *et al.*,2008). Pada uji biokimia, bakteri ini menghasilkan dampak positif pada uji indol, Merah Metil, dan Voges-Proskauer (Madigan *et al.*,2008). Bakteri ini secara luas dapat ditemukan di alam, contohnya di tanah, air, tanaman, dan hewan. *Pseudomonas aeruginosa* adalah patogen oportunistik. Bakteri ini merupakan penyebab utama infeksi pneumonia nosokomial (Strohl *et al.*, 2001).



Gambar 2.1 Bakteri Gram Negatif *Pseudomonas aeruginosa* Berbentuk Batang Berwarna Merah Muda pada Pewarnaan Gram (American Type Culture Collection, 2005)



Gambar 2.2 Pemiakan *Pseudomonas aeruginosa* pada MacConkey Agar Plate (https://www.researchgate.net/figure/Colonies-of-Pseudomonas-aeruginosa-on-Mac-Conkey-agar_fig1_319283395)

2.1.1 Epidemiologi

P.aeruginosa merupakan patogen nosokomial. Menurut CDC, di USA *P.aeruginosa* merupakan bakteri patogen nosokomial nomor empat yang paling banyak diisolasi dari semua infeksi yang didapat di rumah sakit (hospital-acquired infection). Di rumah sakit, infeksi *P.aeruginosa* menyebabkan masalah kesehatan yang besar bagi penderita yang menderita kanker, bakteremia pneumonia, fibrosis kistik, meningitis dan

luka terbakar, karena menyebabkan angka kematian yang tinggi pada penderita-penderita ini. Di rumah sakit dimana sering terjadi infeksi yang berat, *P.aeruginosa* dapat ditularkan melalui tangan petugas kesehatan atau melalui perlengkapan rumah sakit yang tercemar bakteri ini (Soedarto, 2016). Dilaporkan juga di Amerika Serikat, dari 414 pasien yang menjalani prosedur bronkoskopi ditemukan infeksi nosokomial sebesar 9,4% infeksi saluran nafas atas dan bawah serta infeksi aliran darah, dan pada 66,7% infeksi tersebut diperoleh *Pseudomonas aeruginosa* sebagai penyebab infeksi (Todar,2004). Berdasarkan penelitian di RSUP M. Djamil pada tahun 2000, didapatkan bahwa *Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri penyebab infeksi nosokomial ketiga setelah *Staphylococcus* dan *E. Coli* dengan angka prevalensi sebesar 11,7% (Rasyid, 2011). Data terakhir yang didapatkan di Laboratorium Mikrobiologi RSUP M. Djamil Padang dari bulan Juli hingga Desember 2012, pasien yang mengalami infeksi akibat kuman *Pseudomonas aeruginosa* ini adalah sebanyak 80 pasien dari 683 pasien infeksi nosokomial, dimana dari bahan pus sebanyak 27 pasien, sputum 27 pasien, urin 6 pasien, cairan 8 pasien, swab tenggorokan 8 pasien, darah 3 pasien, dan feses sebanyak 1 pasien. Dalam beberapa dekade terakhir banyak dilaporkan terjadinya infeksi organisme MDR (*Multi Drug Resistance*) di unit perawatan intensif. Dari penelitian di Turki didapatkan peningkatan strain MDR *Pseudomonas aeruginosa* meningkat dari 1,5% menjadi 22% (Akçay *et al.*, 2014).

2.1.2 Taksonomi

Urutan taksonomi dari bakteri *Pseudomonas aeruginosa* diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom: Bacteria

Filum: Proteobacteria

Kelas: Gamma Proteobacteria

Ordo: Pseudomonadales

Famili: Pseudomonadaceae

Genus: Pseudomonas

Spesies: Pseudomonas aeruginosa

2.1.3 Morfologi dan Identifikasi

Pseudomonas aeruginosa adalah bakteri gram negatif, berbentuk batang, asporogen, dan monoflagel yang memiliki fleksibilitas nutrisi yang luar biasa. Ini adalah batang sekitar 1-5 μm panjang dan lebar 0,5-1,0 μm . *Pseudomonas aeruginosa* adalah respirator obligat, menggunakan respirasi aerobik (dengan oksigen) sebagai metabolisme optimal meskipun juga dapat bernafas secara anaerob pada akseptor nitrat atau akseptor elektron alternatif lainnya. *Pseudomonas aeruginosa* dapat mengkatalisis berbagai molekul organik, termasuk senyawa organik seperti benzoat. Hal ini membuat mikrobiologi *Pseudomonas aeruginosa* sangat umum, karena telah ditemukan di lingkungan seperti tanah, air, manusia, hewan, tumbuhan, limbah, dan rumah sakit (Lederberg, *et al.*, 2000). Identifikasi pada bakteri ini yaitu, Koloni besar, datar dan kehijauan (berdiameter 2-4 mm) dengan tepi yang tidak beraturan dan kilauan metalik yang khas. Warnanya paling terlihat misalnya pada TS-agar. Terkadang, zona hemolisis yang jelas

diperoleh pada *blood agar*. Memiliki bau khas (karamel, stroberi atau soda raspberry). Beberapa strain menghasilkan pigmen neon hijau, pyoverdine. Beberapa strain juga bisa menghasilkan pigmen biru, pyocyanin (Gilardi, 1985). *Pseudomonas aeruginosa* mempunyai pili. Pili (fimbriae) menjulur dari permukaan sel dan membantu perlekatan pada sel epitel inang. Lipopolisakarida yang terdapat dalam banyak imunitip merupakan salah satu faktor virulensi dan juga melindungi sel dari pertahanan tubuh inang. *Pseudomonas aeruginosa* dapat digolongkan berdasarkan imunitipe polisakarida dan kepekaannya terhadap piosin (bakteriosin). Produk ekstraseluler yang dihasilkan berupa enzim-enzim, yaitu elastase, protease dan dua hemolisin, fosfolipase C yang tidak tahan panas, dan rhamnolipid (FKUI SP, 2010; Todar, 2012; Madigan *et al.*, 2006).

2.1.4 Patogenesis

Penyakit yang disebabkan oleh *Pseudomonas aeruginosa* jarang menyebabkan penyakit pada orang sehat. Sebagian besar infeksi dengan organisme ini terjadi pada host yang disusupi. Contoh kondisi kompromi meliputi hambatan fisik yang terganggu terhadap invasi bakteri (misalnya luka bakar, jalur intravena, kateter urin, kateter dialisis, tabung endotrakea) dan mekanisme kekebalan disfungsi, seperti yang terjadi pada neonatus dan pada individu dengan cystic fibrosis (CF), acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), neutropenia, defisiensi komplemen, hypogammaglobulinemia, dan imunosupresi iatrogenic (Bendiak dan Ratjen, 2009). Infeksi Pseudomonal yang dijelaskan oleh Pollack, terjadi dalam 3 tahap: (1) keterikatan bakteri dan kolonisasi, diikuti oleh (2) invasi lokal dan (3) diseminasi dan penyakit sistemik (Pollack, 1984). Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* adalah penyebab paling umum infeksi luka bakar dan telinga luar

(otitis externa), dan merupakan penjajah alat medis yang paling sering (misalnya kateter). *Pseudomonas* dapat disebarkan dengan peralatan yang terkontaminasi dan tidak dibersihkan dengan benar atau di tangan petugas layanan kesehatan (CDC, 2014). *Pseudomonas* dapat menyebabkan pneumonia terkait ventilator yang menjadi salah satu agen paling umum yang diisolasi dalam beberapa penelitian (Diekema *et al.*, 1999). Pyocyanin adalah faktor virulensi bakteri dan telah diketahui menyebabkan kematian pada *C. elegans* oleh stres oksidatif. Namun, asam salisilat dapat menghambat produksi pyocyanin (Prithiviraj *et al.*, 2005). Satu dari sepuluh infeksi yang didapat di rumah sakit berasal dari *Pseudomonas*. Pasien *cystic fibrosis* juga cenderung terinfeksi *Pseudomonas aeruginosa* pada paru-paru. *Pseudomonas aeruginosa* mungkin juga menjadi penyebab umum "ruam bak panas" (dermatitis) yang disebabkan oleh kurangnya perhatian periodik terhadap kualitas air secara tepat. Karena bakteri ini seperti lingkungan lembab, seperti bak air panas dan kolam renang, mereka dapat menyebabkan ruam kulit atau telinga perenang (CDC, 2014). *Pseudomonas* juga merupakan penyebab umum infeksi pasca operasi. Organisme ini juga terkait dengan lesi kulit *ecthyma gangrenosum*. *Pseudomonas aeruginosa* juga sering dikaitkan dengan osteomielitis yang melibatkan luka tusukan kaki, yang diyakini berasal dari inokulasi langsung dengan *Pseudomonas aeruginosa* melalui bantalan busa yang ditemukan pada sepatu. Pasien diabetes juga memiliki risiko yang lebih tinggi.

2.1.5 Stabilitas dan Viabilitas

P. aeruginosa selain dapat menghasilkan enzim beta laktamase yang dapat menghidrolisis cincin beta laktam juga memiliki kemampuan untuk

mengeluarkan antibiotik dari dalam sel dengan cara efflux pump yang dapat menyebabkan bakteri ini resisten terhadap beberapa golongan antibiotik. Pada saat ini hampir disuluruh dunia yang menjadi masalah utama pada bakteri *P. aeruginosa* ini adalah berkembangnya mikroorganisme yang resisten terhadap berbagai jenis antibiotika (MDRPA) (Nazhifah, et al., 2013). Multi Drug Resistant *P. aeruginosa* (MDRPA) adalah kondisi dimana bakteri resisten terhadap tiga atau lebih kelas antibiotik seperti penisilin, sefalosporin, monobaktam, karbapenem, aminoglikosida, fluorokuinolon, dan lain lain (Kalaivani, et al., 2013). Selanjutnya pada *Pseudomonas aeruginosa* dilakukan uji resistensi terhadap beberapa antibiotik. Jumlah antibiotik yang digunakan 25 jenis. Tabel 1 memperlihatkan 14 jenis antibiotik (nomor urut 1-14) didapatkan t50% spesimen telah resisten. Antibiotik yang paling resisten adalah ampicilin, eritromisin, amoksisilin, sefurosim, seftriason, gentamicin, tetrasiklin, sefadroksil, piperasilin, trimetoprim, tobramisin, kotrimoksazol, nalidixid, sulfonamidkompleks. Sementara 11 jenis antibiotik sebagian besar (t50%) masih sensitif yaitu dari urutan kloremfenikol sampai meropenem. Adapun untuk golongan sefalosporin, sebagian besar spesimen masih sensitif mulai dari antibiotik yang paling sensitif, berturut-turut adalah meropenem, klindamisin, amikasin, norfloksasin, siprofloksasin, ofloksasin, fosfomisin, seftazidim, netilmisin, dan kanamisin (Prambudi dan Reni, 2013).

Tabel 2.1 Hasil uji resistensi *Pseudomonas aeruginosa* terhadap beberapa antibiotik

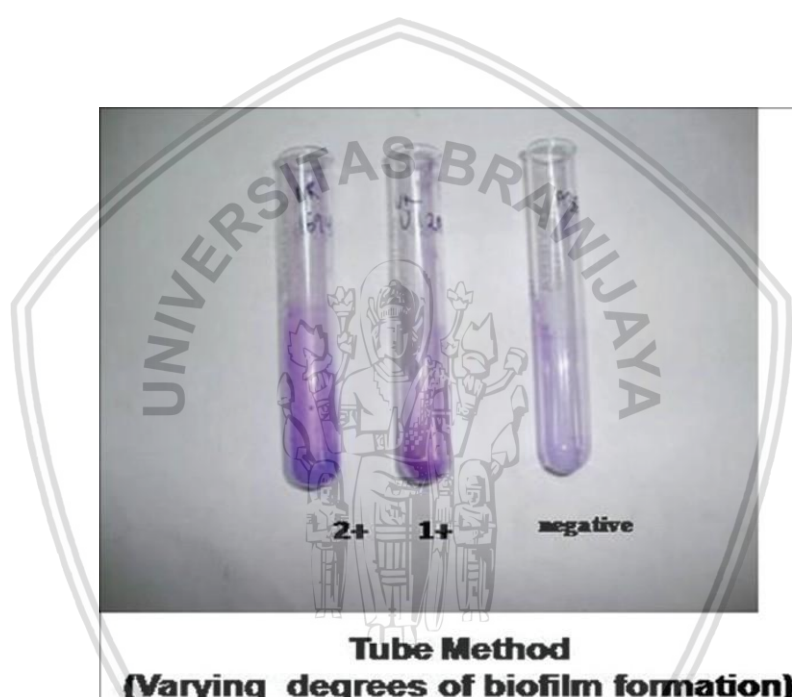
Antibiotik	Persentase	
	Resisten	Sensitif
Ampisilin	84,6	15,4
Eritromisin	82,7	15,4
Amoksisilin	80,8	19,2
Sefuroksim	76,9	23,1
Seftriakson	71,2	28,8
Gentamisin	71,2	28,8
Tetrasiklin	71,2	26,9
Sefadroksil	67,3	30,8
Piperasilin	63,5	36,5
Trimetroprim	63,5	34,6
Tobramisin	59,6	38,5
Kotrimoksazol	51,9	48,1
Nalidiksida	50,0	48,1
Sulfonamid-kompleks	50,0	46,2
Kloramfenikol	44,2	55,8
Kanamisin	36,5	61,5
Netilmisin	34,6	65,4
Seftazidim	32,7	59,6
Fosfomisin	32,7	61,5
Ofloksasin	30,8	69,2
Siprofloksasin	28,8	71,2
Norfloksasin	26,9	73,1
Amikasin	23,1	76,9
Klindamisin	21,2	73,1
Meropenem	19,2	73,1

(Prambudi dan Reni, 2013)

2.2 Biofilm

Biofilm adalah kumpulan sel mikroorganisme, khususnya bakteri, yang melekat di suatu permukaan dan diselubungi oleh pelekat karbohidrat yang dikeluarkan oleh bakteri (Madigan *et al.*, 2006). Biofilm terbentuk karena mikroorganisme cenderung menciptakan lingkungan mikro dan relung (*niche*) mereka sendiri (Prescott *et al.*, 2002). Biofilm

memerangkap nutrisi untuk pertumbuhan populasi mikroorganisme dan membantu mencegah lepasnya sel-sel dari permukaan pada sistem yang mengalir. Permukaan sendiri adalah habitat yang penting bagi mikroorganisme karena nutrisi dapat terserap pada permukaan sehingga kandungan nutrisinya dapat lebih tinggi daripada di dalam larutan (Madigan *et al.*, 2006). Konsekuensinya, jumlah dan aktivitas mikroba pada permukaan biasanya lebih tinggi daripada di air.



Gambar 2.3 Pembentukan Biofilm Pada Tube Test Ditandai Dengan Adanya Cincin Berwarna Ungu Kebiruan yang Melekat Pada Dinding Tabung (Ira *et al.*, 2013)

2.2.1 Pembentukan Biofilm

Pada bakteri gram negatif seperti *Pseudomonas aeruginosa*, molekul sinyal yang utama adalah komponen yang disebut homoserin laktone yang berfungsi sebagai agen kemostatik untuk mengumpulkan sel-sel *Pseudomonas aeruginosa* yang berdekatan (melalui

mekanisme quorum sensing) dan membentuk biofilm (Madigan *et al.*, 2006).

Ada 5 tahap pembentukan biofilm yaitu:

1. Pelekatan awal: mikroba melekat pada permukaan suatu benda dan dapat diperantarai oleh pili (rambut halus sel) contohnya pada *Pseudomonas aeruginosa* (Kus *et al.*, 2004).
2. Pelekatan permanen: mikroba melekat dengan bantuan eksopolisakarida (EPS) (Monroe, 2007).
3. Maturasi I: proses pematangan biofilm tahap awal (Monroe, 2007).
4. Maturasi II: proses pematangan biofilm tahap akhir, mikroba siap untuk menyebar (Monroe, 2007).
5. Dispersi: Sebagian bakteri akan menyebar dan berkolonisasi di tempat lain (Monroe, 2007).

Pemicu pembentukan biofilm salah satunya adalah kondisi lingkungan yang kurang menguntungkan atau mencekam, contohnya adalah *Pseudomonas aeruginosa* saat ketersediaan nutrisi menipis (Wrangstadh *et al.*, 1990).

2.3 Metode Tube Test Biofilm

Tube method merupakan salah satu metode deteksi biofilm secara kualitatif. Mikroorganisme yang diuji diinokulasikan ke dalam Tryptic Soy Broth (TSB) dengan Glukosa 1% pada tabung reaksi. Tabung kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah diinkubasi, tabung dikosongkan dan dibilas dengan PBS (Phosphate Buffered Saline) dan kemudian dikeringkan. Pewarnaan kemudian dilakukan pada bagian dalam tabung dengan Crystal Violet (0,1 %), dan cat berlebih dibilas dengan

deionized water. Tabung kemudian dikeringkan dalam posisi terbalik. Pembentukan biofilm dinyatakan positif jika tampak lapisan pada dinding bagian dalam dan dasar tabung (Hassan, 2011). Studi Mathur (2006) menunjukkan bahwa sensitifitas dan spesifisitas Tube Method masing masing mencapai 77,9% dan 96,0%, sementara studi Hassan (2006) menunjukkan angka 73% dan 92,5%.

2.4 *Mimosa pudica* Linn

Mimosa pudica (Amador dan Dominguez, 2015) (dari bahasa Latin: pudica "malu, malu atau menyusut"; juga disebut tanaman sensitif, tanaman mengantuk, Dormilones, sentuhan-saya-tidak, atau tanaman pemalu) adalah ramuan tahunan atau abadi dari keluarga kacang polong Fabaceae sering tumbuh karena nilai keingintahuannya: senyawa daunnya terbungkuk ke dalam dan terkulai saat tersentuh atau terguncang, menahan diri dari bahaya, dan membuka kembali beberapa menit kemudian (Joanna, 2016). Spesies ini berasal dari Amerika Selatan dan Amerika Tengah, namun saat ini merupakan gulma pantropis (tumbuhan yang kehadirannya tidak diinginkan yang tersebar di seluruh wilayah tropis). Hal ini juga dapat ditemukan di Asia di negara-negara seperti Bangladesh, Thailand, India, Indonesia, Malaysia, Filipina, Vietnam, Kamboja, Laos, Jepang, Sri Lanka dan di seluruh bagian selatan Amerika Serikat. Sebagian besar tumbuh di daerah teduh yang tidak terganggu, di bawah pepohonan atau semak belukar. *Mimosa pudica* terkenal dengan gerakan tanamannya yang cepat. Seperti sejumlah spesies tumbuhan lainnya, ia mengalami perubahan orientasi daun yang disebut "tidur" atau gerakan nyibik (Raven *et al.*, 2005). Hal ini pertama kali dipelajari oleh ilmuwan Prancis Jean-Jacques d'Ortous

de Mairan. Secara tradisional *M. pudica* ini digunakan dalam pengobatan sakit kepala, migrain, insomnia, diare, disentri, demam, dll. Para ahli pengobatan Cina mengindikasikan putri malu untuk mengobati berbagai jenis penyakit seperti radang selaput mata akut (*konjungtivitis*), kencing batu (*urolitiasis*), demam tinggi pada anak-anak, cacangan, insomnia, peradangan saluran napas (*bronchitis*), dan herpes zoster. Sebuah penelitian terdahulu telah berhasil mengisolasi dan mengidentifikasi senyawa yang terkandung dalam putri malu, yaitu senyawa flavonoid golongan flavon dan flavanol dalam ekstrak methanol daunnya (Elvira, 2009; Wijayakusuma, 2008).

2.4.1 Taksonomi dan Morfologi

Menurut Miranti dan Etri (2015), urutan taksonomi dari *Mimosa pudica* Linn. diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom : *Plantae*

Sub-kingdom : *Tracheobionta*

Superdivisi : *Spermatophyta*

Divisi : *Magnoliophyta*

Class : *Magnoliopsida*

Sub-class : *Rosidae*

Ordo : *Fabales*

Famili : *Fabaceae / Leguminosae*

Genus : *Mimosa* L.

Spesies : *Mimosa pudica* Linn.

Tumbuhan ini memiliki ciri-ciri dimana terdapat duri pada batang, batangnya juga berbulu, daunnya kecil-kecil termasuk daun majemuk, termasuk suku polong-polongan, bunganya berbentuk bongkol. Daun putri malu atau sikejut berupa daun majemuk menyirip ganda dua yang sempurna. Jumlah anak

daun pada setiap sirip sekitar 5 - 26 pasang. Helaian anak daun berbentuk memanjang sampai lanset, ujung runcing, pangkal memundar, tepi rata. Jika diraba pada permukaan atas dan bawah daun terasa licin, panjang 6 - 16 mm, lebar 1-3 mm. daun berwarna hijau, akan tetapi pada tepi daun umumnya berwarna ungu. Jika daun tersentuh akan melipatkan diri, menyirip rangkap. Sirip terkumpul rapat dengan panjang 4-5,5 cm. Bagian tanaman putri malu yang berguna untuk mencegah terjadinya erosi adalah terletak pada akarnya. Putri malu memiliki akar yang sangat kuat yaitu akar pena. Akarnya yang kuat itulah yang dapat menahan tanah dari bahaya erosi atau terkikis habisnya tanah oleh air hujan yang turun dengan deras sehingga dapat membahayakan lingkungan bagi kehidupan manusia dan makhluk hidup lainnya (Petani hebat, 2017)



Gambar 2.4 Daun Putri Malu (*Mimosa pudica* Linn.) (myBageecha, 2017)



**Gambar 2.5 Daun yang Perlahan Menguncup Karena Tiupan Angin
(Hariadhi, 2007)**

2.4.2 Kandungan Daun Putri Malu (*Mimosa pudica* L.)

Putri malu mengandung $\geq 9\%$ senyawa aktif,³ dengan konsentrasi terbesar terdapat pada bagian daun (Zhang *et al.*, 2011). Berdasarkan skrining fitokimia, bagian daun dari tanaman putri malu positif mengandung berbagai senyawa polifenol seperti alkaloid, flavonoid, terpenoid, sterol, tannin, dan saponin (Paul *et al.*, 2012; Rohela *et al.*, 2011; Tamilarasi dan Ananthi, 2012; Gandhiraja *et al.*, 2009; Sharma MC dan Sharma S, 2010). Senyawa aktif tersebut merupakan metabolit sekunder yang dihasilkan oleh tanaman sebagai mekanisme pertahanan terhadap mikroorganisme lain, seperti insektisida dan herbivora, sehingga kandungannya dalam tanaman bervariasi tergantung keadaan lingkungan (Azmi *et al.*, 2011).

2.4.2.1 Flavonoid

Flavonoid merupakan salah satu kelompok senyawa metabolit sekunder yang paling banyak ditemukan di dalam jaringan tanaman (Rajalakshmi dan S. Narasimhan, 1985). Flavonoid termasuk dalam golongan senyawa phenolik dengan struktur kimia C₆-C₃-C₆ (White dan Y. Xing, 1951; Madhavi *et al.*,

1985; Maslarova, 2001). Tumbuhan yang mengandung flavonoid banyak dipakai dalam pengobatan tradisional. Hal tersebut disebabkan flavonoid mempunyai berbagai macam aktivitas terhadap macam-macam organisme (Robinson, 1995). Penelitian farmakologi terhadap senyawa flavonoid menunjukkan bahwa beberapa senyawa golongan flavonoid memperlihatkan aktivitas seperti antifungi, diuretik, antihistamin, antihipertensi, insektisida, bakterisida, antivirus dan menghambat kerja enzim (Geissman, 1962). Aktivitas flavonoid pada tumbuhan salah satunya sebagai bakterisida dapat dijadikan dasar lebih lanjut dalam meneliti peranan biologis flavonoid sebagai agen anti bakteri dengan indikator keefektifannya dalam menghambat biofilm pada bakteri.

2.4.2.2 Tannin

Tannin merupakan suatu senyawa polifenol yang berasal dari tumbuhan, berasa pahit dan kelat, yang bereaksi dengan dan menggumpalkan protein, atau berbagai senyawa organik lainnya termasuk asam amino dan alkaloid. Tanin (dari bahasa Inggris *tannin*; dari bahasa Jerman Hulu Kuno *tanna*, yang berarti "pohon ek" atau "pohon berangan") pada mulanya merujuk pada penggunaan bahan tanin nabati dari pohon ek untuk menyamak belulang (kulit mentah) hewan agar menjadi kulit masak yang awet dan lentur. Namun kini pengertian tanin meluas, mencakup aneka senyawa polifenol berukuran besar yang mengandung cukup banyak gugus hidroksil dan gugus lain yang sesuai (misalnya karboksil) untuk membentuk perikatan kompleks yang kuat dengan protein dan makromolekul yang lain. Senyawa-senyawa tanin ditemukan pada banyak jenis tumbuhan; berbagai senyawa ini berperan penting untuk melindungi tumbuhan dari pemangsa oleh herbivora dan hama, serta

dalam pengaturan pertumbuhan (Katie *et al.*, 2006). Tanin yang terkandung dalam buah muda menimbulkan rasa kelat (sepat) (McGee dan Harold, 2004). Perubahan-perubahan yang terjadi pada senyawa tanin bersama berjalannya waktu berperan penting dalam proses pemasakan buah. Tanin yang terkandung dalam minuman seperti teh, kopi, anggur, dan bir memberikan aroma dan rasa sedap yang khas. Bahan kunyahan seperti gambir (salah satu campuran makan sirih) memanfaatkan tanin yang terkandung di dalamnya untuk memberikan rasa kelat ketika makan sirih. Sifat pengelat atau pengerut (astringensia) itu sendiri menjadikan banyak tumbuhan yang mengandung tanin dijadikan sebagai bahan obat-obatan (Lemmens *et al.*, 1997) Tanin yang terkandung dalam teh memiliki korelasi yang positif antara kadar tanin pada teh dengan aktivitas antibakterinya terhadap penyakit diare yang disebabkan oleh Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) pada bayi (Hilyatuzzahroh, 2006). Hasil penelitian menunjukkan bahwa daun teh segar yang belum mengalami pengolahan lebih berpotensi sebagai senyawa antibakteri (Yulia, 2006).

2.4.2.3 Saponin

Saponin adalah suatu glikosida alamiah yang terikat dengan steroid atau triterpena. Saponin mempunyai aktifitas farmakologi yang cukup luas diantaranya meliputi: immunomodulator, anti tumor, anti inflamasi, antivirus, anti jamur, hipoglikemik, dan efek hypokholesterol. Saponin juga mempunyai sifat bermacam-macam, misalnya: terasa manis, ada yang pahit, dapat berbentuk buih, dapat menstabilkan emulsi, dapat menyebabkan hemolisis. Dalam pemakaiannya saponin bisa dipakai untuk banyak keperluan, misalnya dipakai untuk membuat minuman beralkohol, dalam industri pakaian,

kosmetik, membuat obat-obatan, dan dipakai sebagai obat tradisional (Hanafi, 2012). Walaupun saponin bisa diisolasi dari binatang tingkat rendah, sebenarnya saponin ditemukan terutama dalam tumbuh-tumbuhan (Hostettmann dan A. Marston, 1995; Liener, 1980).

2.5 Bahan Antimikroba

Antibakteri adalah zat yang dapat mengganggu pertumbuhan atau bahkan mematikan bakteri dengan cara mengganggu metabolisme mikroba yang merugikan (Madigan, 2005). Mikroorganisme dapat menyebabkan bahaya karena kemampuan menginfeksi dan menimbulkan penyakit serta merusak bahan pangan. Antibakteri termasuk kedalam antimikroba yang digunakan untuk menghambat pertumbuhan bakteri (Schunack *et al.*, 1990). Mekanisme kerja dari senyawa antibakteri diantaranya yaitu menghambat sintesis dinding sel, menghambat ketahanan permeabilitas dinding sel bakteri, menghambat kerja enzim, dan menghambat sintesis asam nukleat dan protein (Madigan, 2005; Jawetz *et al.*, 1996). Penjelasan mengenai mekanisme kerja dari senyawa antibakteri sebagai berikut:

(i) Penghambatan sintesis dinding sel bakteri:

Langkah pertama kerja obat berupa pengikatan obat pada reseptor sel (beberapa diantaranya adalah enzim transpeptida. Kemudian dilanjutkan dengan reaksi transpeptidase dan sintesis peptidoglikan terhambat. Mekanisme diakhiri dengan pembuangan atau penghentian aktivitas penghambat enzim autolisis pada dinding sel. Sebagai contoh antibakteri dengan mekanisme kerja di atas

adalah penisilin, sefalosporin, vankomisin, basitrasin, sikloserin, dan ampisilin (Jawetz *et al.*, 1996).

(ii) Penghambatan Keutuhan Permeabilitas Dinding Sel Bakteri:

Sitoplasma semua sel hidup dibatasi oleh selaput sitoplasma yang bekerja sebagai penghalang dengan permeabilitas selektif, melakukan fungsi pengangkutan aktif sehingga dapat mengendalikan susunan sel. Bila integritas fungsi selaput sitoplasma terganggu misalnya oleh zat bersifat surfaktan sehingga permeabilitas dinding sel berubah atau bahkan menjadi rusak, maka komponen penting, seperti protein, asam nukleat, nukleotida, dan lain-lain keluar dari sel dan sel berangsur-angsur mati. Amfoterisin B, kolistin, polimiksin, imidazol, dan polien menunjukkan mekanisme kerja tersebut (Jawetz *et al.*, 1996).

(iii) Penghambatan sintesis Protein Sel Bakteri:

Umumnya senyawa penghambat ini akan menyebabkan bakteri salah membaca kode mRNA oleh tRNA (hambatan translasi dan transkripsibahan genetik). Kloramfenikol, eritromisin, linkomisin, tetrasiklin, dan aminoglikosida juga bersifat menghambat sintesis protein sel bakteri (Jawetz *et al.*, 1996).

(iv) Penghambatan Sintesis Asam Nukleat Sel Bakteri:

Senyawa antibakteri yang bekerja dengan senyawa ini, diharapkan mempunyai selektifitas yang tinggi, sehingga hanya sintesis asam nukleat bakteri saja yang dihambat. Umumnya senyawa penghambat akan berikatan dengan enzim atau salah satu komponen yang berperan dalam tahapan sintesis, sehingga akhirnya reaksi akan terhenti karena tidak ada substrat yang direaksikan dan asam nukleat tidak dapat terbentuk (Jawetz *et al.*, 1996).

Berdasarkan aktivitasnya zat antibakteri dibedakan menjadi dua jenis, yaitu bakteristatik dan bakteriosida:

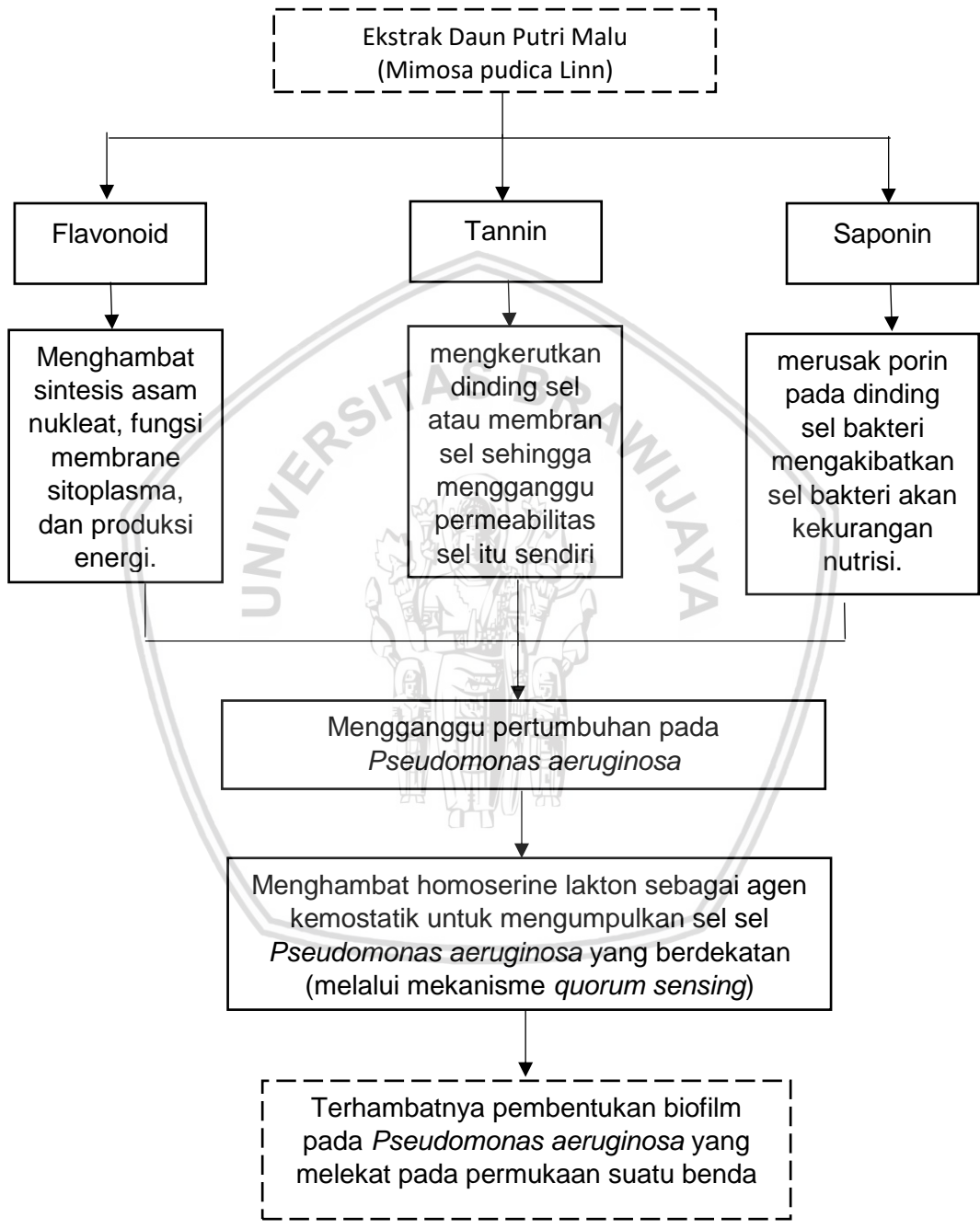
- (i) Bakteristatik, yaitu zat antibakteri yang memiliki aktivitas menghambat pertumbuhan bakteri (menghambat perbanyakan populasi bakteri), namun tidak mematikan (Madigan, 2005; Schunack *et al.*, 1990).
- (ii) Bakteriosida, yaitu zat antibakteri yang memiliki aktivitas membunuh bakteri (Madigan, 2005). Namun ada beberapa zat antibakteri yang bersifat bakteristatik pada konsentrasi rendah dan bersifat bakteriosida pada konsentrasi tinggi (Fardiaz *et al.*, 1987).


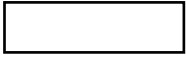


BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



 = Variabel yang diteliti
 = Variabel yang tidak diteliti



3.2 Deskripsi Konsep Penelitian

Bagian daun dari tanaman putri malu positif mengandung berbagai senyawa polifenol seperti alkaloid, flavonoid, terpenoid, sterol, tannin, dan saponin (Paul *et al.*, 2012; Rohela *et al.*, 2011; Tamilarasi dan Ananthi, 2012; Gandhiraja *et al.*, 2009; Sharma MC dan Sharma S, 2010). Senyawa-senyawa tersebut memiliki peranan menghambat pertumbuhan bakteri berdasarkan mekanisme kerjanya masing-masing. Flavonoid bekerja dengan menghambat sintesis asam nukleat, fungsi membrane sitoplasma, dan produksi energy pada bakteri (Juliantina, 2008). Tanin bekerja dengan mengkerutkan dinding sel atau membran sel sehingga mengganggu permeabilitas sel itu sendiri. Akibat terganggunya permeabilitas, sel tidak dapat melakukan aktivitas hidup sehingga pertumbuhannya terhambat dan mati (Ajizah, 2004). Saponin bekerja dengan merusak porin pada dinding sel bakteri mengakibatkan sel bakteri akan kekurangan nutrisi sehingga bakteri pertumbuhan bakteri akan terhambat atau mati (Rachmawati, 2009). Maka dari itu, jika senyawa-senyawa yang berperan sebagai anti bakteri tersebut mampu menghambat pertumbuhan bakteri, maka pembentukan biofilm oleh bakteri pun menjadi terhambat oleh karena terhambatnya homoserine lakton sebagai agen kemo-statik untuk mengumpulkan sel sel *Pseudomonas aeruginosa* yang berdekatan (melalui mekanisme *quorum sensing*).

3.3 Hipotesis Penelitian

Ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica L.*) efektif sebagai penghambat pembentukan biofilm terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan *true experimental posttest only control group design*, dengan fokus penelitian pada keadaan zona hambat biofilm pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* setelah perlakuan berupa pemberian ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica Linn.*) secara *in vitro*. Tujuan penelitian ini adalah membuktikan bahwa ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica Linn.*) efektif dalam menghambat pembentukan biofilm terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* secara *in vitro* yang dilakukan dengan metode *tube-test*.

4.2 Sampel penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Pseudomonas aeruginosa* yang didapat dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.2.1 Populasi dan Sampel

Penelitian ini menggunakan sampel *Pseudomonas aeruginosa* pembentuk biofilm. Sampel ini diperoleh dari isolat *Pseudomonas aeruginosa* pembentuk biofilm yang didapat dari stok kultur laboratorium mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Jumlah pengulangan penelitian dihitung dengan rumus sebagai berikut (Notobroto, 2005):

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

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

$$6n-6 \geq 15$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 3,5$$

$$n = 4$$

Keterangan:

n = jumlah pengulangan

p = jumlah perlakuan (dosis ekstrak daun putri malu): 0% (kontrol), 7,5%; 10%; 12,5%; 15%; 17,5%; 20%. Berdasarkan hasil penghitungan menggunakan rumus tersebut, minimal harus dilakukan 4 kali pengulangan pada penelitian ini.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian adalah konsentrasi ekstrak daun putri malu. Dalam penelitian ini digunakan konsentrasi 0% (kontrol), 7,5%; 10%; 12,5%; 15%; 17,5%; dan 20%.

4.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah bakteri *Pseudomonas aeruginosa* pembentuk biofilm pada metode *tube-test* yang diukur MGV nya menggunakan *Adobe Photoshop CS6*.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Maret-Juni 2018 di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Pembuatan ekstrak daun putri malu dilakukan di Materia Medica dan Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Daun Putri Malu

1. Daun putri malu (*Mimosa pudica* Linn.)

2. Etanol 96%

3. Timbangan analitik

4. Gelas kimia 250 ml

5. Sokhet

6. Cawan petri

7. Penjepit cawan petri

8. Desikator

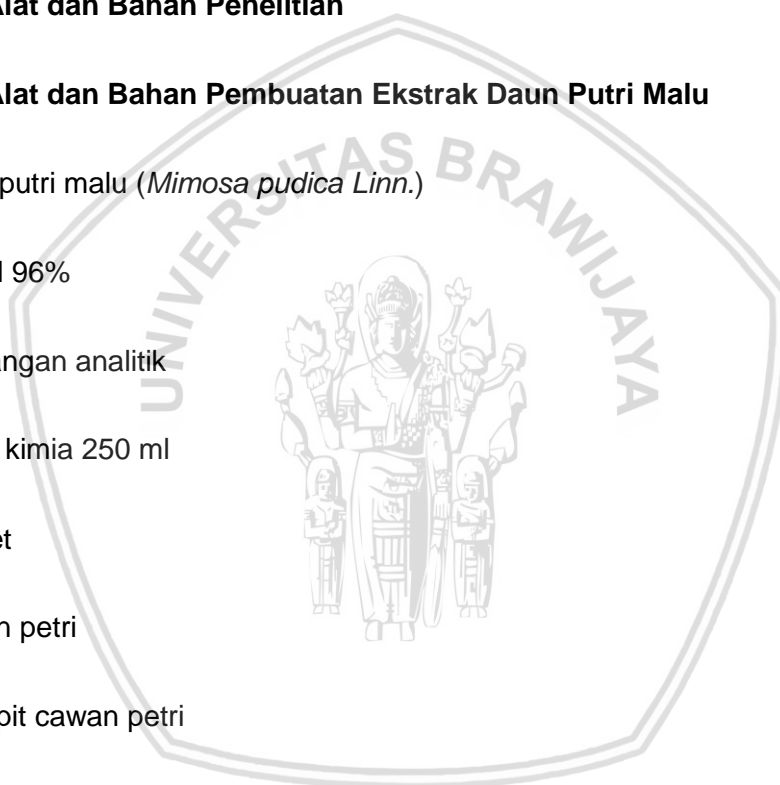
9. Spatula

10. Pemanas aquades

11. Kertas saring

12. Thimble

13. Oven

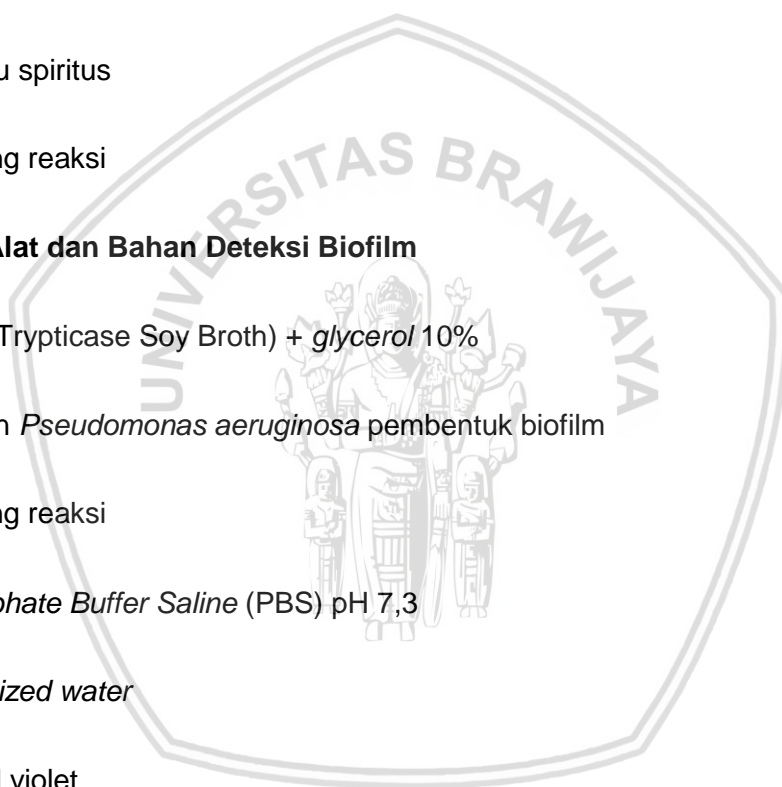


4.5.2 Alat dan Bahan Identifikasi Bakteri

1. Isolat *Pseudomonas aeruginosa*
2. Bahan pengecatan Gram: lugol, kristal violet, safranin, dan alkohol 96%
3. Minyak imersi, mikroskop, dan ose
4. Medium MacConkey Agar
5. Lampu spiritus
6. Tabung reaksi

4.5.3 Alat dan Bahan Deteksi Biofilm

1. TSB (Trypticase Soy Broth) + *glycerol* 10%
2. Biakan *Pseudomonas aeruginosa* pembentuk biofilm
3. Tabung reaksi
4. *Phosphate Buffer Saline* (PBS) pH 7,3
5. *Deionized water*
6. Kristal violet
7. Pipet
8. Ose
9. *Beaker glass*
10. Inkubator



4.6 Definisi Operasional

1. *Pseudomonas aeruginosa* adalah bakteri gram negatif penyebab tersering dari infeksi nosokomial salah satunya adalah HAP (Hospital Acquired Pneumonia). Sampel ini diperoleh dari isolat *Pseudomonas aeruginosa* pembentuk biofilm yang didapat dari stok kultur laboratorium mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

2. Biofilm adalah agregat multiseluler yang akan membentuk lapisan padat pada permukaan suatu substrat atau medium. Pada penelitian ini biofilm dibentuk oleh *Pseudomonas aeruginosa* dengan medium tabung.

3. Ekstrak daun putri malu adalah hasil ekstraksi cair daun putri malu dengan pelarut etanol. Ekstrak yang didapat dianggap memiliki kandungan ekstrak sebesar 100%. Daun putri malu yang digunakan berasal dari Materia Medika.

4. Metode tabung adalah metode deteksi biofilm dengan menggunakan tabung sebagai medium yang bersifat kualitatif.

5. *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC) adalah konsentrasi ekstrak daun putri malu terendah yang mampu menghambat pembentukan biofilm yang ditandai dengan terjadinya penipisan bentuk cincin dan lapisan ungu kebiruan yang terdapat pada dinding dan dasar tabung.

6. *Mean Gray Value* adalah acuan skala intensitas warna yang terdapat pada program *Adobe Photoshop CS6*. Skala berkisar antara 0-255. Angka mendekati 0 menunjukkan kepekatan warna yang tinggi. Sedangkan angka mendekati 255 menunjukkan kepekatan warna yang rendah (Andriyani, 2014).

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Persiapan Daun Putri Malu (*Mimosa pudica* Linn.)

4.7.1.1 Ekstraksi dan Evaporasi

1. Dilakukan penelitian pendahuluan digunakan untuk pencarian konsentrasi. Diawali dengan konsentrasi ekstrak 0%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100%. Setelah itu dilakukan perapatan konsentrasi berdasarkan hasil dari penelitian tersebut dan dilakukan pengulangan 4x pada rentang konsentrasi tertentu.
2. Daun putri malu (*Mimosa pudica* Linn) yang didapatkan dari Materia Medika dicuci dengan air bersih mengalir.
3. Daun putri malu yang telah bersih dikeringanginkan. Waktu untuk mengeringkan daun selama 7 hari.
4. Daun yang sudah kering kemudian digiling dengan menggunakan disc mill, sehingga didapat bentuk serbuk.
5. Kemudian dimaserasi di dalam pelarut (etanol) dengan perbandingan 1:10 (berat/volume) selama 48 jam dengan tujuan untuk menarik zat aktif pada bahan yang akan diekstraksi.
6. Filtrat diperoleh dengan penyaringan melalui 4 lapis kain kasa dilanjutkan dengan penyaringan menggunakan kertas saring Whatman No 1.
7. Filtrat yang diperoleh kemudian dievaporasi dengan menggunakan vaccum rotary evaporator pada suhu 40°C, sehingga diperoleh ekstrak (Pujiatining Sih, 2014).

4.7.2 Persiapan Identifikasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

4.7.2.1 Pemeriksaan Mikroskopis

Pembentukan sediaan slide

1. *Object glass* dibersihkan dahulu dengan kapas, dilanjutkan fiksasi dengan dilewatkan di atas api dan biarkan dingin sehingga *object glass* menjadi steril dari bahan pencemar lain. Kemudian pembuatan sediaan yang tidak terlalu tebal dan tidak terlalu tipis dengan cara:
2. Teteskan satu ose aquades steril pada gelas objek. Ambil sedikit biakan kuman menggunakan ose, kemudian suspensikan dengan aquades pada gelas objek dan ratakan. Khusus sediaan cair tidak perlu disuspensikan dengan aquades.
3. Biarkan sediaan kering di udara, kemudian lakukan fiksasi dengan cara melewatkan sediaan di atas api satu atau dua kali (Forbes *et al.*, 2007).

Pewarnaan Gram

1. Tuang sediaan pada gelas objek dengan kristal violet dengan durasi 1 menit. Buang sisa kristal violet dan bilas dengan air.
2. Tuang sediaan dengan lugol selama 1 menit. Buang sisa lugol dan bilas dengan air.
3. Tuang sediaan dengan alkohol 96% selama 5-10 detik atau sampai warna cat luntur. Buang sisa alkohol dan bilas lagi dengan air.
4. Tuang sediaan dengan safranin selama ½ menit. Buang sisa safranin dan bilas lagi dengan air.
5. Keringkan sediaan dengan kertas penghisap.

6. Lihat di bawah mikroskop dengan lensa objektif perbesaran 100x (Cahyani, 2013).

4.7.2.2 Perbenihan Pada MacConkey Agar

Pseudomonas aeruginosa yang ditanam pada medium MacConkey Agar, koloninya akan nampak berbentuk sedang, menghasilkan pigmen khas berwarna kehijauan yang didistribusikan ke dalam media perbenihan dalam media perbenihan disebut piosianin, tetapi tidak semua galur menghasilkan pigmen piosianin. Beberapa galur menghasilkan pigmen berwarna merah (Noorhamdani, 2015), keping, tepinya tidak rata, dan tidak menguraikan laktosa (Melnick, 2012).

Pembiakan Bakteri Pada Medium MacConkey Agar

1. Coretkan bakteri menggunakan metode *quadrant* pada medium MacConkey Agar
2. Sediaan diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam.
3. Koloni bakteri *Pseudomonas aeruginosa* pada medium MacConkey Agar menghasilkan gambaran koloni menghasilkan pigmen khas berwarna kehijauan yang disebut *pyocyanin* (Noorhamdani, 2015).

4.7.2.3 Uji Biokimia

Uji Produksi H₂S pada media TSIA (Triple Sugar Iron Agar) secara aseptis diinokulasikan biakan kuman dari media MacConkey ke media TSIA, biakan kuman ditanam dengan cara digoreskan pada lereng media dan ditusuk pada dasar media, inkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C. *Pseudomonas aeruginosa* pada TSIA tidak memfermentasikan karbohidrat dan tidak menghasilkan H₂S dan gas sehingga slant dan butt menghasilkan warna merah (Hardy Diagnostic, 2017)

4.7.3 Pembuatan Perbenihan Cair Bakteri

1. Beberapa koloni bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dipindahkan ke *broth* menggunakan ose, kemudian dilakukan *spektrofotometri* dengan panjang gelombang 625 nm untuk mengetahui nilai absorbansi dan suspensi.
2. Untuk mendapatkan suspensi bakteri uji dengan konsentrasi bakteri sebesar 10^8 /mL yang setara dengan OD = 0,1 maka dilakukan perhitungan sebagai berikut

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

Keterangan:

V1 = Volume bakteri yang akan ditambah pengencer

N1 = Nilai absorbansi suspensi (hasil *spektrofotometri*)

V2 = Volume suspensi bakteri uji (10 mL)

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

3. Sehingga diperoleh volume (mL) bakteri yang akan ditambah pengencer untuk mendapatkan bakteri dengan konsentrasi 10^8 /ml sebanyak 10 mL.
4. Setelah diperoleh suspensi bakteri dengan konsentrasi 10^8 /mL sebanyak 10 mL, dilakukan pengenceran sebanyak 100 kali dengan menggunakan NaCl dan *nutrient broth*, sehingga konsentrasi bakteri menjadi 10^8 /mL. Kini bakteri telah siap digunakan untuk penelitian

4.7.4 Uji Deteksi Pembentukan Biofilm (Metode *Tube-test*)

Pseudomonas aeruginosa yang sudah teridentifikasi disimpan dalam media TSB (Trypticase Soy Broth) + *glycerol* 10% dan diinkubasi pada suhu 37°C semalam. Mikroba kultur semalam selanjutnya dimasukkan ke tabung TSBglu (10 ml) dan diinkubasikan 37°C selama 24 jam. Selanjutnya tabung dicuci dengan PBS (Phosphate Buffer Saline) (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* hingga akhirnya tabung dikeringkan dan dilihat formasi biofilmnya. Formasi biofilm ini ditandai dengan adanya cincin berwarna ungu kebiruan yang melekat pada dinding tabung (Christensen *et al.*, 2000).

4.7.5 Uji Hambat Pembentukan Biofilm pada *Pseudomonas aeruginosa*

1. Menyiapkan perbenihan cair bakteri dengan konsentrasi bakteri 1×10^8 CFU/ml.
2. Membuat suspensi bakteri dalam medium TSB + *glycerol* 10% berdasarkan perhitungan OD dari spektrofotometri.
3. Mengisi tabung reaksi 1-6 dengan suspensi bakteri dalam medium TSB + *glycerol* 10% 2ml, dan satu tabung lain (kontrol) diisi 4ml.
4. Kemudian 2 ml dalam larutan ekstrak dalam tiap tabung kecil dicampurkan dalam tabung reaksi 1-6 sehingga didapatkan larutan sebanyak 4 ml dengan konsentrasi ekstrak daun putri malu pada masing-masing tabung sebagai berikut:

Tabung 1: 0% (kontrol)	Tabung 4: 12,5%
Tabung 2: 7,5%	Tabung 5: 15%
Tabung 3: 10%	Tabung 6: 17,5%
	Tabung 7: 20%
5. Seluruh tabung diinkubasikan selama 24 jam dengan suhu 37°C
6. Setelah 24 jam, tabung dikeluarkan dari inkubator dan dicuci dengan PBS (pH 7,3) dan dikeringkan airnya.
7. Tabung yang sudah dikeringkan diberi kristal violet (0,1%) 0,5 ml lalu kelebihan warna dibuang dan tabung dicuci dengan *deionized water*.
8. Tabung dikeringkan.

Segera amati dan catat biofilm yang terbentuk (Cahyani, 2013). Dapat terlihat sebuah film melapisi sisi dan dasar tabung. Hal ini diyakini sebagai indikasi

pembentukan biofilm. Jumlah biofilm dinilai sebagai 0 = tidak ada, 1 = lemah, 2 = sedang atau 3 = kuat (Praharaj *et al.*, 2013).

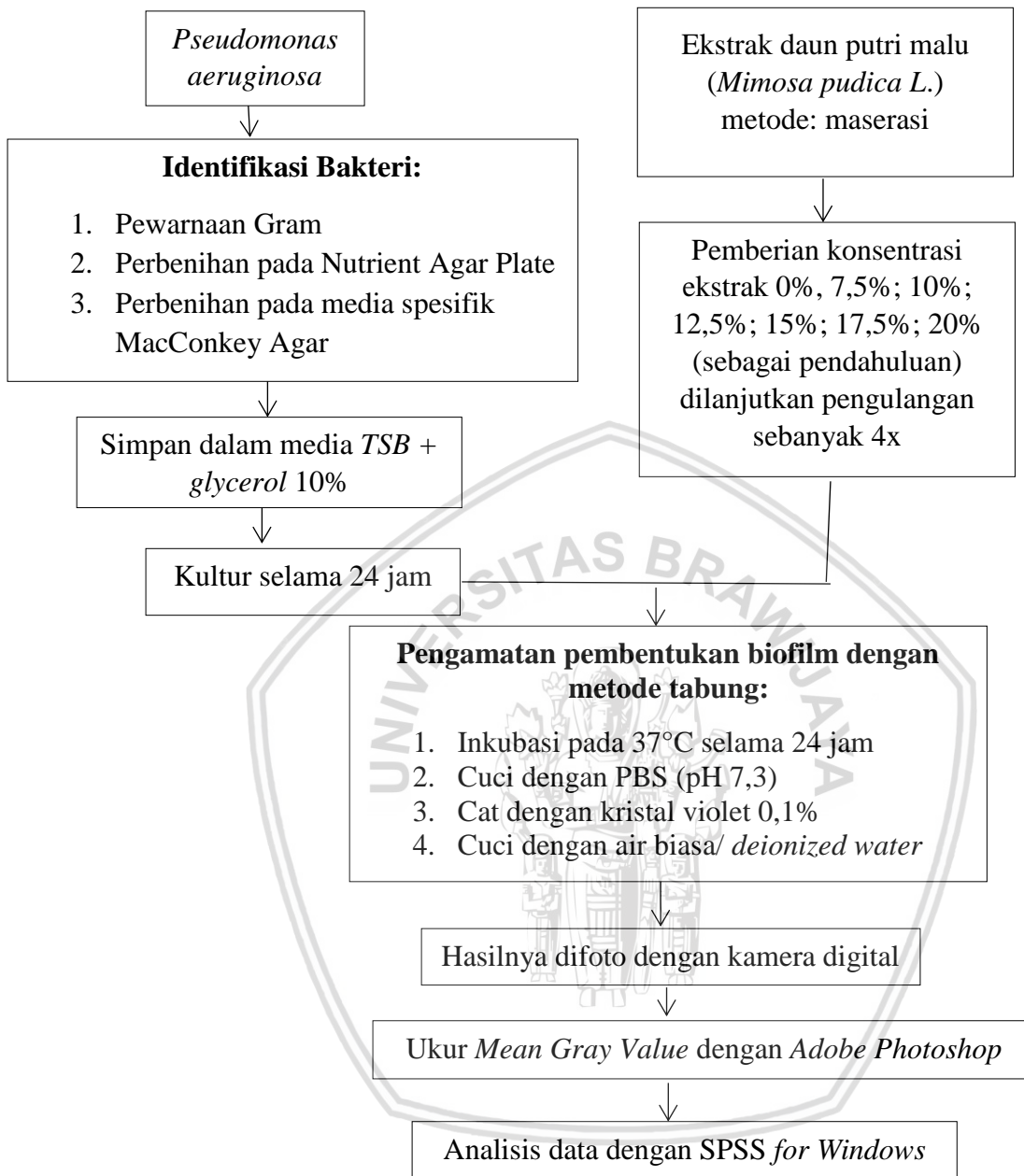
4.7.6 Pengukuran *Mean Gray Value*

Hasil pembentukan biofilm pada tabung kemudian difoto dengan menggunakan kamera digital. Untuk mengetahui intensitas warna pada area cincin dan dinding tabung pada masing-masing kelompok maka digunakan program aplikasi *Adobe Photoshop CS6* untuk mengetahui nilai *Mean Gray Value* pada biofilm yang terbentuk pada tabung dengan konsentrasinya masing-masing. Pengukuran intensitas warna biofilm menggunakan *Mean Gray Value* ini telah diulas dalam beberapa jurnal salah satunya yaitu "Heterotrophic Pioneers Facilitate Phototrophic Biofilm Development" *Department of Biotechnology, Delft University of Technology, Julianalaan 67, NL-2628 BC Delft, The Netherlands* yang mengulas bahwa intensitas warna biofilm yang terbentuk dapat dihitung secara kuantitatif melalui hasil foto biofilm dengan kamera digital dan ditentukan *mean* dan standar deviasi pada *gray value* melalui *measurement tool* (G. Roeselers *et al.*, 2007). Aplikasi *Adobe photoshop CS6* mampu mengukur *mean gray value* melalui *measurement tool*. *Mean Gray Value* 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 aplikasi *Adobe Photoshop CS6*, pilih *File* dan masukkan hasil fotonya. Selanjutnya pilih *tab Window* dan pilih *Measurement Log*, blok area yang akan dilihat intensitas warnanya dengan menggunakan *Rectangular Marquee Tool*, lalu klik *Record Measurements* maka akan didapatkan nilai *Mean Gray Value* yang merupakan rata-rata dari intensitas warna pengecatan tabung (Andriyani, 2014).

4.8 Analisis Data

Analisis hasil penelitian menggunakan analisis statistik SPSS versi 15.0 untuk *Windows*. Langkah pertama, hasil *Mean Gray Value* dianalisis dengan menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov. Uji ini merupakan bagian dari teknik pengujian normalitas suatu distribusi data. Uji normalitas data adalah hal yang lazim dilakukan sebelum sebuah metode statistik. Uji normalitas ini merupakan salah satu bagian dari uji persyaratan analisis data atau biasa disebut asumsi klasik. Tujuan uji normalitas adalah untuk mengetahui apakah distribusi sebuah data mengikuti atau mendekati distribusi normal, yakni distribusi data yang mempunyai pola seperti distribusi normal. Pada aplikasinya, uji ini guna mengetahui korelasi antara peningkatan konsentrasi ekstrak daun putri malu terhadap ketebalan yang terdeteksi melalui *Mean Gray Value*. Kemudian analisis data menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) versi 15.0 (Dahlan, 2009).

4.9 Rencana Operasional Penelitian



Bagan 4.1 Rancangan Operasional Penelitian

BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian

5.1.1 Hasil Ekstraksi Daun Putri Malu (*Mimosa pudica Linn*)

Daun putri malu dalam bentuk bubuk sebanyak 200 gram dimasukkan pada wadah berukuran satu liter. Setelah itu ditambahkan etanol sebagai pelarut sebanyak 800 ml. Setelah itu biarkan selama semalam sampai mengendap dan tabung kembali dikocok. Tahap tersebut diulang sebanyak tiga kali. Setelah mengendap, cairan bagian atas yang berupa campuran zat aktif dan pelarut diambil dan dituangkan pada labu untuk dievaporasi. *Water Bath* pada evaporator diisi dengan air dan diatur pada suhu 90 °C. Proses evaporasi akan berlangsung selama kurang lebih tiga jam. Pelarut akan terpisah dari bahan asalnya dan ekstrak akan menetap pada labu. Hasil ekstraksi dengan etanol menghasilkan 30 gram ekstrak yang digunakan sebagai ekstrak 100%. Hasil ekstraksi berwarna hijau kehitaman dengan konsistensi kental. Ekstrak diambil kemudian disimpan dalam *freezer* hingga saatnya digunakan.

5.1.2 Hasil Identifikasi Ulang Bakteri Uji

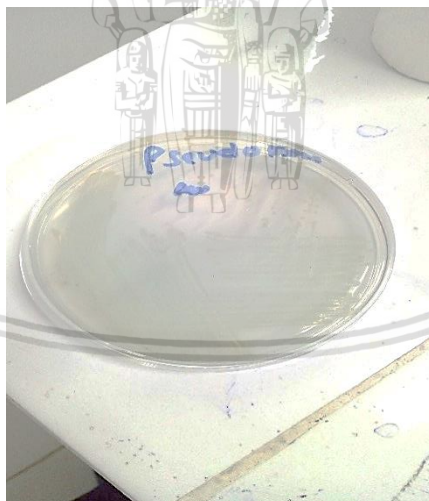
Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang digunakan berasal dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Bakteri tersebut kemudian diidentifikasi dengan melakukan pewarnaan Gram, perbenihan pada media Nutrient Agar Plate, dan media spesifik MacConkey Agar.

Hasil pada pewarnaan Gram yang diamati pada perbesaran 100 kali didapatkan bakteri batang berwarna merah yang menandakan bakteri tersebut merupakan Gram negative (Gambar 5.1) . Pemiakan pada media Nutrient Agar Plate didapatkan koloni tampak warna medium kehijauan akibat pigmen piosianin

yang didifusikan ke dalam medium (Gambar 5.2). Pemiakan pada media MacConkey Agar menunjukkan koloni tidak berwarna sehingga menunjukkan bahwa koloni tidak menguraikan laktosa (Gambar 5.3).



Gambar 5.1 Pseudomonas aeruginosa pada Pengecatan Gram Menunjukkan Bakteri Batang Berwarna Merah yang Artinya Bakteri merupakan Gram Negatif



Gambar 5.2 Pseudomonas aeruginosa pada Media Nutrient Agar Plate Didapatkan Koloni Bakteri Menghasilkan Warna Kebiruan



Gambar 5.3 Pseudomonas aeruginosa pada Media MacConkey Agar Didapatkan Koloni Tidak Berwarna sehingga Menunjukkan bahwa Koloni Tidak Memfermentasikan Laktosa

5.1.3 Hasil Uji Hambat Pembentukan Biofilm

Sebelum menentukan konsentrasi yang digunakan dalam penelitian inti, dilakukan uji pendahuluan dengan konsentrasi 7,5%; 10%; 12,5%; 15%; 17,5%; 20%. Hasil penelitian pendahuluan digunakan sebagai dasar pemilihan konsentrasi untuk uji penelitian inti. Hasil penelitian pendahuluan dapat diamati pada Gambar 5.4. Berdasarkan uji pendahuluan tersebut dilakukan pengulangan dengan konsentrasi 7,5%; 10%; 12,5%; 15%; 17,5%; 20%.



Gambar 5.4 Hasil Uji Pendahuluan yang Memiliki Daya Hambat pada Konsentrasi 20% Secara Visual

Penelitian pendahuluan menunjukkan adanya hambatan pembentukan biofilm secara visual pada konsentrasi 20%. Kemudian dilakukan uji hambat biofilm *Pseudomonas aeruginosa* dengan konsentrasi 7,5%; 10%; 12,5%; 15%; 17,5%; 20%; dan 0% sebagai kontrol. Pengamatan hasil penelitian dilakukan secara visual dengan menilai tebal tipisnya biofilm yang terbentuk, kemudian dilanjutkan dengan pengamatan kuantitatif menggunakan *Mean Grey Value*.



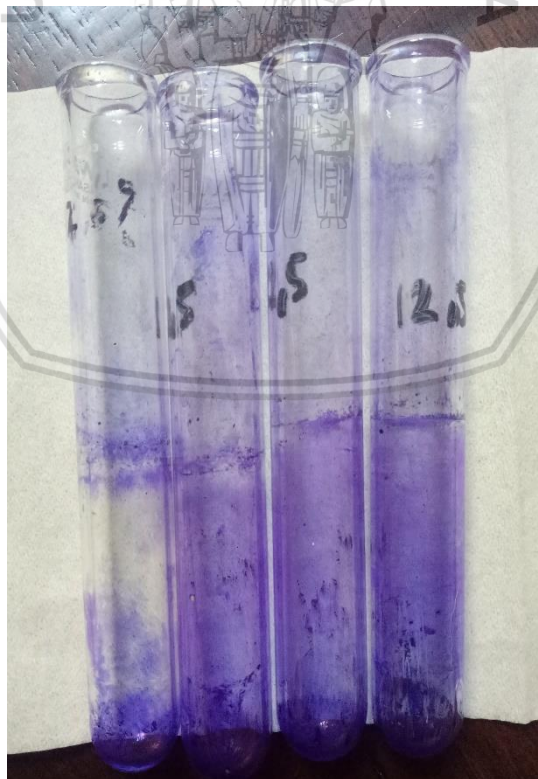
Gambar 5.5 Hasil Penelitian Inti Uji Hambat Pembentukan Biofilm pada Konsentrasi 0%



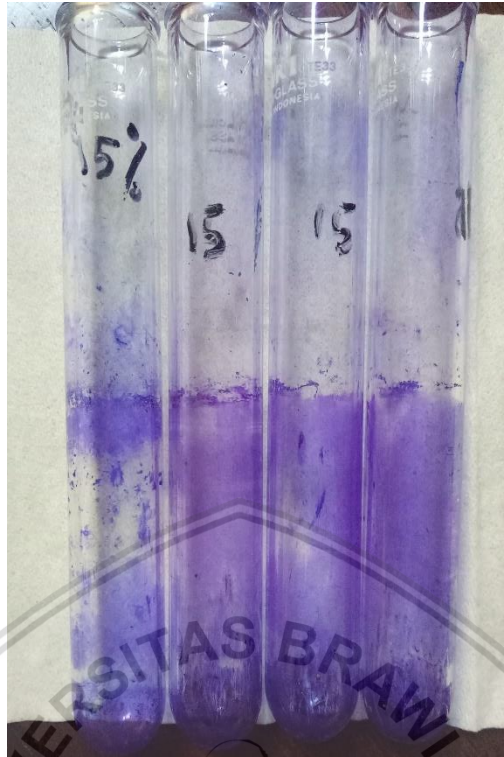
Gambar 5.6 Hasil Penelitian Inti Uji Hambat Pembentukan Biofilm pada Konsentrasi 7,5%



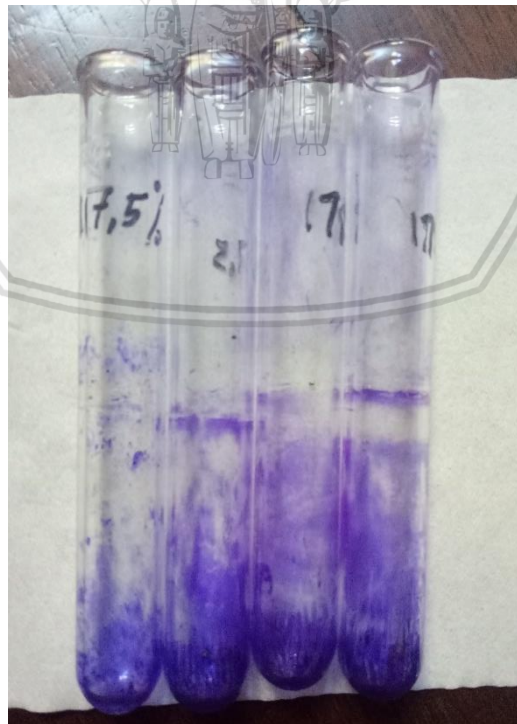
Gambar 5.7 Hasil Penelitian Inti Uji Hambat Pembentukan Biofilm pada Konsentrasi 10%



Gambar 5.8 Hasil Penelitian Inti Uji Hambat Pembentukan Biofilm pada Konsentrasi 12,5%



Gambar 5.9 Hasil Penelitian Inti Uji Hambat Pembentukan Biofilm pada Konsentrasi 15%



Gambar 5.10 Hasil Penelitian Inti Uji Hambat Pembentukan Biofilm pada Konsentrasi 17,5%



Gambar 5.11 Hasil Penelitian Inti Uji Hambat Pembentukan Biofilm pada Konsentrasi 20%

Tabel 5.1 Hasil Pengamatan Visual Uji Hambat Pembentukan Biofilm

Pengulangan	Konsentrasi						
	0%	7,5%	10%	12,5%	15%	17,5%	20%
1	+++	+++	++	+	+	-	-
2	+++	++	+	+	+	+	-
3	+++	++	+	+	+	-	-
4	+++	++	+	+	+	+	-

Keterangan:

- = tidak terlihat

- + = intensitas warna rendah
- ++ = intensitas warna sedang
- +++ = intensitas warna tinggi

Pengamatan visual dilanjutkan dengan pengamatan secara kuantitatif untuk menilai intensitas warna pada masing-masing tabung yang terbentuk biofilm. Pengukuran dilakukan dengan menggunakan program aplikasi *Adobe Photoshop CS6* dengan mencari *Mean Gray Value* yang dinyatakan dalam skala 0 – 255. Hasil pengukuran dapat dilihat pada Tabel 5.2, 5.3 dan Gambar 5.12.

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

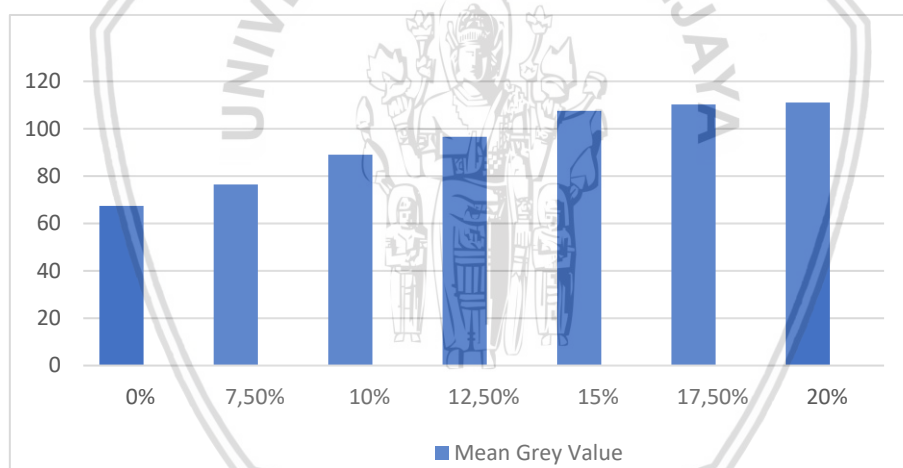
Konsentrasi	0%	7,5%	10%	12,5%	15%	17,5%	20%	Kontrol tabung
MGV	23,85	23,83	55,83	72,24	75,86	104,53	132,95	154,01

Tabel 5.3 Hasil Pengukuran Intensitas Warna Biofilm (*Mean Gray Value*) Penelitian Inti

Konsentrasi	Penelitian				Mean ± SD
	I	II	III	IV	
0%	68,53	67,65	68,08	65,45	67,42 ± 1,36
7,5%	75,76	71,17	81,15	78,06	76,53 ± 4,20
10%	86,71	82,20	96,70	90,60	89,05 ± 6,14

12,5%	88,41	99,23	96,21	102,45	96,57 ± 6,01
15%	94,93	103,08	112,19	119,79	107,49 ± 10,81
17,5%	107,08	104,07	116,83	113,07	110,26 ± 5,75
20%	126,42	107,77	105,39	104,80	111,09 ± 10,29
Kontrol					114,33 ± 3,29
Tabung					

Ket *) Kadar Hambat Biofilm Minimal



Gambar 5.12 Grafik hasil pengukuran *Mean Gray Value* penelitian inti

5.2 Analisis Data

5.2.1 Uji Normalitas dan Homogenitas

Uji normalitas dan homogenitas diperlukan sebagai syarat untuk melakukan Uji *One Way ANOVA*. Dari hasil *Test Normality* menunjukkan nilai signifikansi untuk *Mean Gray Value* adalah 0.200 (uji Kolmogorov-Smirnov, $p > 0.05$), yang

artinya data terdistribusi normal. Hasil *Test of Homogeneity of Variance* menggunakan menunjukkan nilai signifikansi 0.70 (syarat terpenuhi bila $p > 0.05$), yang artinya data tersebut memiliki varian sama (homogen).

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
MGV	.114	28	.200*	.958	28	.319

*. This is a lower bound of the true significance.
a. Lilliefors Significance Correction

HASIL HOMOGENITAS

Test of Homogeneity of Variances

MGV

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.331	6	21	.070

5.2.2 Uji One Way ANOVA

Uji *One Way ANOVA* diperlukan untuk mengevaluasi apakah terdapat perbedaan *Mean Gray Value* yang signifikan antar kelompok. Dari hasil uji tersebut didapatkan nilai signifikansi 0 ($p < 0.05$), menunjukkan terdapat adanya perbedaan *Mean Gray Value* yang signifikan antar konsentrasi.

ANOVA

MGV

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7124.378	6	1187.396	23.783	.000
Within Groups	1048.453	21	49.926		
Total	8172.831	27			



5.2.3 Uji *Post Hoc*

Analisis mengenai perbedaan dari masing-masing kelompok data dapat diketahui dalam *Post Hoc Multiple Comparison Test* dengan metode Uji *Tukey HSD*. Pada uji tersebut, suatu data dikatakan berbeda secara signifikan apabila nilai signifikansi $< 0,05$ pada interval kepercayaan 95%. Adapun penjelasan hasil dari *Post Hoc Multiple Comparison Test* dapat diamati pada Tabel 5.4.

- Kelompok data yang pertama adalah perlakuan dengan konsentrasi 0% didapatkan hasil *Mean Gray Value* terdapat korelasi yang signifikan terhadap konsentrasi 10%, 12,5%, 15 %, 17,5 % dan 20% ($p < 0.05$), namun tidak ditemukan perbedaan yang signifikan terhadap konsentrasi 7,5%
- Kelompok data kedua, yaitu dengan konsentrasi 7,5%. Hasil menunjukkan terdapatnya perbedaan yang signifikan terhadap konsentrasi 12,5%, 15%, 17,5% dan 20%, tetapi tidak ada perbedaan yang signifikan terhadap konsentrasi 0% dan 10%
- Kelompok data ketiga, yaitu perlakuan dengan konsentrasi 10%. Terdapat perbedaan yang signifikan terhadap konsentrasi 0% dan 20%, namun tidak ada perbedaan signifikan terhadap konsentrasi 7,5%, 12,5 %, 15%, dan 17,5%
- Pada kelompok data keempat, yaitu perlakuan dengan konsentrasi 12,5%, didapat hasil yang signifikan terhadap konsentrasi 0% tetapi tidak ada perbedaan signifikan terhadap konsentrasi lainnya
- Pada kelompok data kelima, yaitu perlakuan dengan konsentrasi 15% menunjukkan perbedaan signifikan terhadap konsentrasi 0% dan 7,5% tetapi tidak ada perbedaan signifikan terhadap konsentrasi 10%, 12,5%, 17,5%, dan 20%

- Pada kelompok data keenam, yaitu perlakuan dengan konsentrasi 17,5%, menunjukkan perbedaan signifikan terhadap konsentrasi 0% dan 7,5% tetapi tidak ada perbedaan signifikan terhadap konsentrasi 10%, 12,5%, 15%, dan 20%
- Pada kelompok data ketujuh, yaitu perlakuan dengan konsentrasi 20%, menunjukkan perbedaan signifikan terhadap konsentrasi 0%, 7,5%, dan 10%, tetapi tidak ada perbedaan signifikan terhadap konsentrasi 12,5%, 15%, dan 17,5%.



Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: MGV
Tukey HSD

(I) Konsentrasi	(J) Konsentrasi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
1.00	2.00	-9.10750 [*]	4.99632	.548	-25.3494	7.1344
	3.00	-21.62500 [*]	4.99632	.005	-37.8669	-5.3831
	4.00	-29.14750 [*]	4.99632	.000	-45.3894	-12.9056
	5.00	-40.07000 [*]	4.99632	.000	-56.3119	-23.8281
	6.00	-42.83500 [*]	4.99632	.000	-59.0769	-26.5931
	7.00	-43.66750 [*]	4.99632	.000	-59.9094	-27.4256
2.00	1.00	9.10750	4.99632	.548	-7.1344	25.3494
	3.00	-12.51750	4.99632	.207	-28.7594	3.7244
	4.00	-20.04000 [*]	4.99632	.010	-36.2819	-3.7981
	5.00	-30.96250 [*]	4.99632	.000	-47.2044	-14.7206
	6.00	-33.72750 [*]	4.99632	.000	-49.9694	-17.4856
	7.00	-34.56000 [*]	4.99632	.000	-50.8019	-18.3181
3.00	1.00	21.62500 [*]	4.99632	.005	5.3831	37.8669
	2.00	12.51750	4.99632	.207	-3.7244	28.7594
	4.00	-7.52250	4.99632	.739	-23.7644	8.7194
	5.00	-18.44500 [*]	4.99632	.019	-34.6869	-2.2031
	6.00	-21.21000 [*]	4.99632	.006	-37.4519	-4.9681
	7.00	-22.04250 [*]	4.99632	.004	-38.2844	-5.8006
4.00	1.00	29.14750	4.99632	.000	12.9056	45.3894
	2.00	20.04000 [*]	4.99632	.010	3.7981	36.2819
	3.00	7.52250	4.99632	.739	-8.7194	23.7644
	5.00	-10.92250	4.99632	.343	-27.1644	5.3194
	6.00	-13.68750	4.99632	.137	-29.9294	2.5544
	7.00	-14.52000	4.99632	.100	-30.7619	1.7219
5.00	1.00	40.07000 [*]	4.99632	.000	23.8281	56.3119
	2.00	30.96250 [*]	4.99632	.000	14.7206	47.2044
	3.00	18.44500 [*]	4.99632	.019	2.2031	34.6869
	4.00	10.92250	4.99632	.343	-5.3194	27.1644
	6.00	-2.76500	4.99632	.998	-19.0069	13.4769
	7.00	-3.59750	4.99632	.990	-19.8394	12.6444
6.00	1.00	42.83500 [*]	4.99632	.000	26.5931	59.0769
	2.00	33.72750 [*]	4.99632	.000	17.4856	49.9694
	3.00	21.21000 [*]	4.99632	.006	4.9681	37.4519
	4.00	13.68750	4.99632	.137	-2.5544	29.9294
	5.00	2.76500	4.99632	.998	-13.4769	19.0069
	7.00	-.83250	4.99632	1.000	-17.0744	15.4094
7.00	1.00	43.66750 [*]	4.99632	.000	27.4256	59.9094
	2.00	34.56000 [*]	4.99632	.000	18.3181	50.8019
	3.00	22.04250 [*]	4.99632	.004	5.8006	38.2844
	4.00	14.52000	4.99632	.100	-1.7219	30.7619
	5.00	3.59750	4.99632	.990	-12.6444	19.8394
	6.00	.83250	4.99632	1.000	-15.4094	17.0744

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

Tabel 5.4 Hasil *Post Hoc Multiple Comparison Test*

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

Keterangan:

+ : signifikan ($p < 0.05$)

- : tidak signifikan ($p > 0.05$)

5.2.4 Uji Korelasi *Pearson*

Derajat hubungan antara peningkatan konsentrasi ekstrak daun putri malu dan *Mean Gray Value* dapat dihitung dengan Uji Korelasi *Pearson*. Untuk menginterpretasi nilai korelasi maka digunakan klasifikasi sebagai berikut. Batasan nilai korelasi adalah -1 hingga +1. Tanda negatif (-) menunjukkan arah hubungan antara dua variabel adalah berbanding terbalik, yang artinya semakin naiknya nilai variabel independen, maka nilai variabel dependen semakin turun. Sementara tanda positif (+) menyatakan arah hubungan antara dua variabel berbanding lurus, yakni kenaikan nilai variabel independen juga diikuti dengan kenaikan nilai variabel dependen.

Tabel 5.5 Koefisien Korelasi

Nilai Korelasi	Tingkat Hubungan
0.00 – 0.199	Sangat rendah

0.20 – 0.399	Rendah
0.40 – 0.599	Sedang
0.60 – 0.799	Kuat
0.80 – 1.00	Sangat kuat

(Sugiyono, 2008)

Dari Uji Korelasi *Pearson* didapatkan hasil sebagai berikut:

1. Angka korelasi (r) = 0.907, yang artinya terdapat korelasi sangat kuat antara konsentrasi ekstrak daun putri malu dengan *Mean Gray Value*.
2. Tanda angka korelasi positif (+) atau arah korelasi berbanding lurus. Artinya semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun putri malu, maka semakin tinggi pula *Mean Gray Value* yang diperoleh, atau dengan kata lain cincin biofilm yang terbentuk semakin tipis.
3. Diperoleh nilai signifikansi 0.00, sehingga terdapat korelasi yang signifikan ($p < 0.05$) antara konsentrasi ekstrak daun putri malu dengan *Mean Gray Value*.

Correlations

		MGV	Konsentrasi
Pearson Correlation	MGV	1.000	.907
	Konsentrasi	.907	1.000
Sig. (1-tailed)	MGV	.	.000
	Konsentrasi	.000	.
N	MGV	28	28
	Konsentrasi	28	28

5.2.5 Uji Regresi

Uji regresi digunakan untuk mengetahui seberapa besar pengaruh dari variabel bebas (independen) terhadap variabel terikat (dependen). Untuk mengetahui hal tersebut, diperlukan nilai koefisien determinasi (R^2 atau *R square*).

Syarat dalam penggunaan nilai *R square* adalah hasil uji F bernilai signifikan ($p < 0.05$). Dari hasil analisis yang terdapat pada Lampiran 1, maka persamaan regresinya adalah:

$$Y = 64.37 + 2.49X$$

Keterangan:

Y : *Mean Gray Value*

X : Konsentrasi

Uji Regresi menunjukkan $p < 0.001$ dan nilai *R square* 0.822 yang menunjukkan terdapat kemungkinan sebanyak 82,2 % penghambatan pembentukan biofilm disebabkan oleh pemberian perlakuan, yaitu ekstrak daun putri malu, sedangkan sisanya yaitu 17,8 % dipengaruhi oleh *confounding factor*. Hubungan antara konsentrasi dan *mean grey value* yang artinya antar kedua variable (variable x dan y) berhubungan positif karena nilai *R square* diatas 0 dan memiliki hubungan positif yang kuat karena nilai mendekati 1. Semakin banyak konsentrasi maka nilai MGV akan semakin meningkat secara signifikan. Perhitungan lengkap dapat dilihat pada Lampiran 1

Tabel 5.6 Hasil Uji Regresi

Model Summary				
Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.907 ^a	.822	.816	7.47271

a. Predictors: (Constant), Konsentrasi

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk membuktikan efek ekstrak Daun putri malu (*Mimosa pudica Linn*) dalam menghambat pembentukan biofilm *Pseudomonas aeruginosa*. Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang digunakan berasal dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Daun putri malu (*Mimosa pudica Linn*) termasuk tanaman yang mudah ditemui dan memiliki banyak manfaat yang telah diteliti pada penelitian sebelumnya. Kandungan dalam daun putri malu yang diduga dapat menghambat pembentukan biofilm adalah flavonoid, tanin, dan saponin. Daun putri malu (*Mimosa pudica Linn*) didapatkan dalam bentuk simplisia di Materia Medika Batu dan di ekstraksi di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dengan metode maserasi.

Uji hambat pembentukan biofilm pada penelitian ini dilakukan dengan metode dilusi tabung. Hasil penelitian diamati secara visual dan didokumentasikan untuk pengukuran dengan *Mean Grey Value* dengan menggunakan Adobe Photoshop CS6. Cara tersebut dipilih karena pengukuran *Mean Grey Value* dapat melihat ketebalan biofilm secara kuantitatif.

Sebelum dilakukan penelitian ini, dilakukan penelitian pendahuluan untuk mengetahui konsentrasi yang akan digunakan, yaitu 7,5%; 10%; 12,5%; 15%; 17,5%; dan 20%. Penelitian pendahuluan menunjukkan bahwa cincin biofilm bakteri *Pseudomonas aeruginosa* tidak terbentuk pada konsentrasi ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica Linn*) 20%. Berdasarkan hasil tersebut dilakukan pengulangan menggunakan konsentrasi 7,5%; 10%; 12,5%; 15%; 17,5%; dan 20% untuk meningkatkan ketepatan percobaan dalam menentukan konsentrasi yang mampu menghambat pembentukan biofilm. Hasil penelitian ini secara visual

menunjukkan bahwa cincin biofilm sudah mulai menghilang pada konsentrasi 20%. Selanjutnya hasil tersebut didokumentasikan dan dilakukan pengukuran *Mean Grey Value* dengan menggunakan *Adobe Photoshop CS6*. Didapatkan hasil *MGV* rata-rata pada konsentrasi 7,5% sebesar 76,53, konsentrasi 10% sebesar 89,05, konsentrasi 12,5% sebesar 96,57, konsentrasi 15% sebesar 107,49, konsentrasi 17,5% sebesar 110,26, dan konsentrasi 20% sebesar 111,09. Pada konsentrasi 0% (kontrol bakteri) didapatkan *MGV* sebesar 67,42 dan kontrol tabung sebesar 114,33. Rata-rata hasil *Mean Grey Value* setiap konsentrasi akan dibandingkan dengan rata-rata *Mean Grey Value* tabung yang kosong. Kadar Hambat Biofilm Minimal (KHBM) dicapai apabila hasil *Mean Grey Value* 10% dibawah *Mean Grey Value* yang kosong. Dari hasil analisis data yang didapat, dapat diambil kesimpulan bahwa ekstrak daun putri malu dapat menghambat pembentukan biofilm bakteri *Pseudomonas aeruginosa* pada konsentrasi 15%. Sehingga dapat disimpulkan Kadar Hambat Biofilm Minimal dari penelitian ini adalah 15%, karena pada dosis ini didapatkan *Mean Gray Value* lebih dari 102,897 (*MGV* kontrol tabung dikurangi 10% dari *MGV* kontrol tabung). Hasil pengukuran *Mean Grey Value* menunjukkan bahwa rata-rata *Mean Grey Value* naik seiring peningkatan konsentrasi ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica Linn*). Hal tersebut membuktikan bahwa cincin biofilm yang terbentuk semakin tipis yang menandakan pembentukan biofilm *Pseudomonas aeruginosa* terhambat.

Hasil dari penelitian ini membuktikan bahwa peningkatan konsentrasi ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica Linn*) mampu untuk menghambat pembentukan biofilm pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Efek hambatan ini meningkat dengan kenaikan konsentrasi ekstrak yang digunakan. Seperti yang telah diketahui bahwa bagian daun dari tanaman putri malu positif mengandung berbagai senyawa polifenol seperti alkaloid, flavonoid, terpenoid, sterol, tannin, dan saponin (Paul *et al.*, 2012; Rohela *et al.*, 2011; Tamlarasi

dan Ananthi, 2012; Gandhiraja *et al.*, 2009; Sharma MC dan Sharma S, 2010). Senyawa-senyawa tersebut memiliki peranan menghambat pertumbuhan bakteri berdasarkan mekanisme kerjanya masing-masing. Flavonoid bekerja dengan menghambat sintesis asam nukleat, fungsi membrane sitoplasma, dan produksi energy pada bakteri (Juliantina, 2008). Tanin bekerja dengan mengkerutkan dinding sel atau membran sel sehingga mengganggu permeabilitas sel itu sendiri. Akibat terganggunya permeabilitas, sel tidak dapat melakukan aktivitas hidup sehingga pertumbuhannya terhambat dan mati (Ajizah, 2004). Saponin bekerja dengan merusak porin pada dinding sel bakteri mengakibatkan sel bakteri akan kekurangan nutrisi sehingga bakteri pertumbuhan bakteri akan terhambat atau mati (Rachmawati, 2009). Seperti yang telah diketahui bahwa biofilm merupakan kumpulan [sel mikroorganisme](#), khususnya [bakteri](#), yang melekat di suatu permukaan substrat atau medium dan diselimuti oleh pelekat [karbohidrat](#) yang dikeluarkan oleh bakteri (Madigan *et al.*, 2006). Maka dari itu, jika senyawa-senyawa yang berperan sebagai anti bakteri tersebut mampu menghambat pertumbuhan bakteri, maka pembentukan biofilm oleh bakteri pun menjadi terhambat.

Manfaat klinis yang dapat dikembangkan dari hasil penelitian ini adalah adanya potensi penggunaan ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica* Linn) sebagai alternatif terapi pada infeksi oleh karena *Pseudomonas aeruginosa*. Pencegahan pembentukan biofilm diharapkan dapat mengurangi morbiditas dan mortalitas pada pasien dengan infeksi oleh karena *Pseudomonas aeruginosa* selain mengurangi kemungkinan timbulnya resistensi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* terhadap antibiotik.

Confounding factor dalam penelitian ini diantaranya adalah ekstrak daun putri malu yang terlalu kental dan keruh sehingga pengamatan bentukan biofilm setelah dilakukan pengecatan menjadi sulit dilakukan pada setiap peningkatan konsentrasi. Dampak yang ditimbulkan pada ekstrak yang terlalu kental dan keruh yaitu sulit dilakukan percobaan pada konsentrasi yang lebih tinggi lagi sehingga hal ini mempengaruhi penentuan konsentrasi pada penelitian pendahuluan. Disamping itu intensitas *crystal violet* yang digunakan juga dapat mempengaruhi hasil dalam penelitian ini. Walaupun penelitian ini sudah menggunakan *crystal violet* dengan konsentrasi 0,1%, tetapi masih ada tabung yang warnanya lebih pekat dari yang lain. Teknik pembilasan pada tabung dengan konsentrasi ekstrak yang lebih tinggi sulit dilakukan oleh karena ekstrak melekat erat pada dinding tabung sehingga hal ini mempengaruhi biofilm yang melekat pada tabung. Media pertumbuhan bakteri berupa Nutrient Agar Plate juga mempengaruhi hasil dalam penelitian ini yaitu jumlah bakteri yang berkembang yang nantinya akan membentuk biofilm. Disamping itu, zat aktif yang dapat menghambat proses pembentukan biofilm belum bisa ditentukan secara spesifik karena proses ekstraksi tidak bisa memisahkan zat aktif secara khusus.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica* Linn.) dapat menghambat pembentukan biofilm bakteri *Pseudomonas aeruginosa* secara *in vitro*.

Kesimpulan khusus yang dapat diperoleh pada penelitian ini adalah:

1. Kadar Hambat Biofilm Minimal (KHBM) dari ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica* Linn.) terhadap pembentukan biofilm bakteri *Pseudomonas aeruginosa* secara *in vitro* ada pada konsentrasi 15%
2. Hubungan antara konsentrasi ekstrak dengan pembentukan biofilm adalah berbanding terbalik. Dengan kata lain, kenaikan konsentrasi ekstrak yang diberikan akan menurunkan pembentukan biofilm

7.2 Saran

Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai:

1. Penentuan dosis yang lebih berjenjang untuk bisa mengetahui dosis minimal dan maksimal oleh karena sediaan ekstrak yang terlalu pekat
2. Percobaan pembentukan biofilm dengan metode lain yang tidak dipengaruhi oleh sifat ekstrak yang pekat, sehingga dapat dinilai pembentukan biofilm pada konsentrasi yang lebih tinggi
3. Teknik pembilasan tabung yang lebih baik, sehingga sisa pembilasan adalah benar-benar biofilm yang melekat pada dinding tabung tanpa adanya keterlibatan ekstrak
4. Penentuan terhadap zat aktif mana yang paling berpengaruh terhadap penghambatan biofilm bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

5. Efek lama penyimpanan ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica* Linn.) terhadap potensi penghambatan pembentukan biofilm
6. Uji potensi ekstrak daun putri malu terhadap penghambatan pembentukan biofilm bakteri *Pseudomonas aeruginosa* secara *in vivo*.



DAFTAR PUSTAKA

- Agoes, A. 2010. *Tanaman Obat Indonesia*. Jakarta: Salemba Medika.
- Ajizah, A. 2004. *Sensitivitas Salmonella Typhimurium Terhadap Ekstrak Daun Psidium Guajava L.* Universitas Lambung Mangkurat (<http://www.webng.com/bioscientiae>).
- Akcay SS, Inan A, et al. *Gram-negative bacilli causing infections in an intensive care unit of 157 a tertiary care hospital in Istanbul, Turkey*. Journal of Infection in Developing Countries. 2014; 8(5): 597-604.
- Amador-Vegas, Dominguez. 2014. *Leaf-folding response of a sensitive plant shows context-dependent behavioral plasticity*. Plant Ecology.
- Andriyani DZP. 2014. *Efek Ekstrak rimpang Jahe Merah (Zingiber officinale var. Rubra) Sebagai Penghambat Pembentukan Biofilm pada Staphylococcus aureus Secara In Vitro*. Tugas Akhir. Tidak dipublikasikan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
- Azmi L, Singh MK, Akhtar AK. Pharmacological and Biological Overview on Mimosa pudica. Int J of Pharm & Life Sci. 2011; 2(11): 1226-1234.
- Bendiak GN and Ratjen F. *The Approach to Pseudomonas aeruginosa in Cystic Fibrosis*. Semin Respir Crit Care Med. 2009 Oct. 30(5): 587-95.
- Boyd R.F. 1995. Basic Medical Microbiology. USA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Cahyani DP. 2013. *Pengaruh Ekstrak Etanol Kulit Jeruk Nipis (Citrus aurantifolia) Terhadap Perbaikan Sel Epitel Gingiva Tikus Putih Galur Wistar (Rattus Novergicus) yang diinduksi Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Tugas Akhir. Tidak dipublikasikan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
- Center for Disease Control and Prevention. 2014. *Healthcare-Associated Infection: Pseudomonas aeruginosa in Healthcare Settings*.
- Chawla Rajesh. Epidemiology, etiology, and diagnosis of hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia in Asian countries. *American Journal of Infection Control*. 2008. Vol. 36 No.4 Supplement 2. p. 96.
- Christensen, Gordon D, Simpson W, Anglen, Jeffrey O, Gainor, Barry J. 2000. *Handbook of Bacterial Adhesion*. New Jersey: Humana Press Inc.
- Committee on Identifying Priority Areas for Quality Improvement, Karen Adams, and Janet M. Corrigan. 2003. *Priority Areas for National Action: Transforming Health Care Quality*. National Academies Press. p. 79-80.
- Dahlan MS. 2009. *Statistik untuk Kedokteran Kesehatan*. Jakarta: Salemba Medika.
- Diekema DJ, Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Winokur PL, Gales AC, et al. 1999. *Survey of bloodstream infections due to gram-negative bacilli: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United*

- States, Canada, and Latin America for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997. *Clinical Infectious Diseases*. 29(3): 595–607.
- Elvira R. Wetland di daerah tungkaran. [homepage on the Internet]. Nodate [cited 28 April 2009]. Available from URL: <http://ochasblog.blogspot.com/2009/03/wetland-di-daerah-tungkaran.html>
- Fardiaz S, Suliantri, Dewanti R. 1987. *Senyawa Antimikrob*. p. 2. Bogor: PAU.
- FKUI SP. 2010. *Buku Ajar: Mikrobiologi Kedokteran, Edisi Revisi*. Jakarta: Bina Rupa Aksara.
- Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. 2007. *Baley and Scott's Diagnostic Microbiology, 12th ed*. St. Louis: Mosby Company.
- G. Roeselers, M. C. M. van Loosdrecht and G. Muyzer. 2007. Heterotrophic Pioneers Facilitate Phototrophic Biofilm Development. Department of Biotechnology, Delft University of Technology, Julianalaan 67, NL-2628 BC Delft, The Netherlands.
- Gandhiraja N, Sriram S, Meenaa V, Srilakshmi KJ, Sashikumar C, Rajeswari R. *Phytochemical Screening and Antimicrobial Activity of The Plant Extracts of Mimosa pudica Linn. Against Selected Microbes*. *Ethnobotanical Leaflets*. 2009; 13: 618-624.
- Geissman, T.A. 1962. *The Chemistry of Flavonoid Compounds*. The Mac Millan Company, New York. p. 41-60.
- Gilardi, G. *Cultural and Biochemical Aspects for Identification of Glucose-Nonfermenting Gram-Negative Rods*. *Nonfermenting Gram-Negative Rods*. 1985. p.17-24.
- Hanafi, M. 2012. *Saponin (Saponins)*. p. 1. <https://mhanafi123.files.wordpress.com/2012/11/saponin-makalah.pdf>.
- Hardy Diagnostc. 2017. *Triple Sugar Iron (TSI) Agar*. https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/Content/hugo/TripleSugarIronTSIAgar.htm.
- Hilyatuzzahroh. 2006. *Korelasi Kadar Tanin pada Produk Teh Komersial dengan Aktivasnya Sebagai Antibakteri epec K1-1*. <http://repository.ipb.ac.id/handle/123456789/48316>.
- Hostettmann, K.; A. Marston. 1995g. *Saponins*. Cambridge: Cambridge University Press. p. 3ff.
- Praharaj, Ira., Sistla, Sujatha., Parija, S.C. 2013. *Original Article: Virulence factors in clinical and commensal isolates of Enterococcus species*. Department of Microbiology, Jawaharlal Institute of Postgraduate Medical Education and Research, Puducherry, India. p. 24-30.
- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 1996L. *Mikrobiologi Kedokteran*. Ed ke-20. p. 46-50. Nugroho E, Maulany RF, Penerjemah. Jakarta : Buku Kedokteran EGC.

- Juliantina, F., D.A. Citra, B. Nirwani. 2008. *Manfaat Sirih Merah (Piper crocatum) Sebagai Agen Anti Bakterial Terhadap Bakteri Gram Positif dan Gram Negatif*. UII. Yogyakarta (<http://journal.uui.ac.id>)
- Kalaivani R, Shashikala P, Sheela D, Prashanth K, and Saranathan R. 2013. *Phenotypic assays for detection of ESBL and MBL producers among the clinical isolates of multidrug resistant Pseudomonas aeruginosa from a tertiary care hospital*. Int. J. Cur. Res. Rev., 5, 17, 28-35.
- Katie E. Ferrell; Thorington, Richard W. (2006). *Squirrels: the animal answer guide*. Baltimore: Johns Hopkins University Press. p. 91.
- Klein, Joanna. 2016. *Plants Remember You if You Mess With Them Enough*. A version of this article appears in print on March 29, 2016, on Page D6 of the New York edition with the headline: Learning Curve; Plants Either Remember or Forget.
- Kus JV, Tullis E, Cvitkovitch DG, Burrows LL. 2004. *Significant differences in type IV pilin allele distribution among Pseudomonas aeruginosa isolates from cystic fibrosis (CF) versus non-CF patients*. Microbiology 150:1315-1326.
- Lederberg, Joshua et al. *Pseudomonas*. Encyclopedia of Microbiology. Second Edition. Volume 3. San Diego, 2000. p. 876-891.
- Lemmens, R.M.H.J., N. Wulijarni-Soetjipto, R.P. Van Der Zwan and M. Parren. 1997. Pendahuluan dalam R.M.H.J. Lemmens dan N. Wulijarni-Soetjipto (Eds). *Tumbuh-tumbuhan Penghasil Pewarna dan Tanin*. Sumberdaya Nabati Asia Tenggara (PROSEA) 3: 15-38. Balai Pustaka, Jakarta.
- Liener, Irvin E. 1980. *Toxic constituents of plant foodstuffs*. New York City: Academic Press. p. 161.
- Madhavi, D.L., R.S. Singhal, P.R. Kulkarni. 1985. *Technological Aspects of Food Antioxidants dalam D.L. Madhavi, S.S. Deshpande dan D.K. Salunkhe: Food Antioxidant, Technological, Toxicological and Health Perspectives*. Marcel Dekker Inc., Hongkong: 161-265.
- Madigan M. 2005. *Brock Biology of Microorganism*. p.753. London: PrenticeHall.
- Madigan M.T, Martinko J.M, Dunlap P.V, and Clark D.P. 2008c. *Biology of Microorganisms* 12th edition. San Francisco: Pearson.
- Madigan M.T. and Martinko J.M. Brock. 2006. *Biology of Microorganisms 11th Edition*. New Jersey, USA: Pearson Prentice Hall.
- Madigan MT, Martinko JM, Brock TD. 2006. *Brock Biology of Microorganisms*. 11th Ed. New Jersey: Pearson Prentice Hall. p. 617-619.
- Mah Thien-fah C and O'Toole George A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *TRENDS in Microbiology*. 2001. Vol. 9 No. 1. p. 38.
- Maslarova, N.V. Yanishlieva. 2001. *Inhibiting oxidation dalam Jan Pokorny, Nedyalka Yanislieva dan Michael Gordon: Antioxidants in food, Practical applications*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge: 22-70.

- McGee, Harold. 2004. *On food and cooking: the science and lore of the kitchen*. New York: Scribner. p. 714.
- Miranti dan Etri Dian, K. 2015. Tugas 1 Teknologi Herbal. <https://www.scribd.com/doc/256893306/Putri-Malu>. Diakses pada 25 Februari 2015.
- Monroe D. 2007. *Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms*. *PLoS Biol* 5(11): 307.
- Nazhifah, Rustini, dan Deswinar D. 2013. *Uji sensitivitas isolat bakteri dari pasien luka bakar di bangsal luka bakar RSUP DR. M. Djamil Padang*. Prosiding Seminar Nasional Perkembangan Terkini Sains Farmasi dan Klinik II, 212-220.
- Noorhamdani, Santoso S, Sumarno, Dzen SM, Roekistiningsih, Winarsih S, et al. 2015. *Bakteriologi Medik, Edisi Kedua*. Malang: Laboratorium Mikrobiologi FKUB. p. 225.
- Notobroto BH. 2005. *Penelitian Eksperimental dalam Materi Praktikum Teknik Sampling dan Penghitungan Besar Sampel Angkatan III*. Surabaya: Lembaga Penelitian Universitas Airlangga.
- Paul S, Saha D, Chowdury, S. *Pharmacognostic Studies on Aerial Part of Mimosa pudica*. *Asian J Pharm Tech*. 2012; 2(3): 101-103.
- Paul S, Saha D, Chowdury, S. *Pharmacognostic Studies on Aerial Part of Mimosa pudica*. *Asian J Pharm Tech*. 2012; 2(3): 101-103.
- Petani Hebat. 2017. Klasifikasi dan Morfologi Putri Malu. <http://www.petanihebat.com/2014/03/klasifikasi-dan-morfologi-putri-malu.html>.
- Pollack M. The Virulence of Pseudomonas Aeruginosa. *Rev Inf Dis*. 1984. 6:S617-26.
- Praharaj AK, Tandel K, Kumar S. 2013. *Differences in Vancomycin MC among MRSA Isolates by Agar Dilution and E Test Method*. *Indian Journal of Medical Microbiology* vol.30(4): 453-455.
- Prescott LM, Harley JP, Klein DA. 2002e. *Microbiology*. Boston: McGraw-Hill. Hal: 620-622.
- Prithviraj B, Bais HP, Weir T, Suresh B, Najarro EH, Dayakar BV, et al. 2005. *Down regulation of virulence factors of Pseudomonas aeruginosa by salicylic acid attenuates its virulence on Arabidopsis thaliana and Caenorhabditis elegans*. *Infection and Immunity*. 73(9): 5319-28.
- Pujiatiningsih, Agatha S. 2014. *Tesis: Pemberian Ekstrak Daun Putri Malu (Mimosa pudica Linn) Secara Oral Menurunkan Kadar Gula Darah Post Prandial pada Tikus (Rattus Norvegicus) Jantan Galur Wistar Prediabetes*. Universitas Udayana, Denpasar.

- Rachmawati, F., M.C. Nuria, Suamntri. 2010. *Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Kloroform Ekstrak Etanol Pegagan (Centella asiatica (L) Urb) serta Identifikasi Senyawa Aktifnya*. Universitas Wahid Hasyim. Semarang.
- Rajalakshmi, D dan S. Narasimhan. 1985. *Food Antioxidants: Sources and Methods of Evaluation dalam D.L. Madhavi: Food Antioxidant, Technological, Toxicological and Health Perspectives*. Marcel Dekker Inc., Hongkong: 76-77.
- Raven, Peter H.; Evert, Ray F.; Eichhorn, Susan E. 2005. *Section 6. Physiology of Seed Plants: 29. Plant Nutrition and Soils*. Biology of Plants (7th ed.). New York: W. H. Freeman and Company. p. 639.
- Robinson, T.1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Obat Tinggi*. diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata. edisi IV. 191 – 193, 196 – 198, 213 – 215. Penerbit ITB, Bandung.
- Rohela GK, Saini K, Surekha M, Christopher T. *Screening of Secondary Metabolites and Antimicrobial Activity of Mimosa pudica*. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Science. 2011; 2(3): 474-9.
- Rohela GK, Saini K, Surekha M, Christopher T. *Screening of Secondary Metabolites and Antimicrobial Activity of Mimosa pudica*. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Science. 2011; 2(3): 474-9.
- Rukmono Pambudi dan Reni Zuraida. 2013. *Uji Kepekaan Antibiotik terhadap Pseudomonas aeruginosa Penyebab Sepsis Neonatorum*. Sari Pediatri. Vol 14 No 5, 333-334.
- Saputra, Edy. 2009. *UJI ANTIBAKTERI EKSTRAK TANAMAN PUTRI MALU (Mimosa pudica) TERHADAP PERTUMBUHAN Shigella dysenteriae*. Skripsi thesis, Universitas Muhammadiyah Surakarta .
- Schunack W, Mayer K, Haake M. 1990. *Senyawa Obat*. p. 27. Edisi ke-2. Wattimenna JR, Subito, penerjemah. Yogyakarta: UGM Press.
- Sharma MC, Sharma S. *Phytochemical and Pharmacological Screening of Combined Mimosa pudica Linn and Tridax procumbens for In Vitro Antimicrobial Activity*. International Journal of Microbiological Research. 2010; 1(3): 171-174
- Sharma MC, Sharma S. *Phytochemical and Pharmacological Screening of Combined Mimosa pudica Linn and Tridax procumbens for In Vitro Antimicrobial Activity*. International Journal of Microbiological Research. 2010; 1(3): 171-174.
- Soedarto. 2016. *Infeksi Nosokomial di Rumah Sakit*. Edisi I cetakan I. Jakarta: CV. Sagung Seto
- Strohl W.A, Rouse H, and Fisher, B.D. 2001e. Microbiology. USA: *Lippincott Williams & Wilkins*.

- Tamilarasi T, Ananthi T. *Phytochemical Analysis and Antimicrobial Activity of Mimosa pudica*Linn. Research Journal of Chemical Sciences. 2012; 2(2): 72-4.
- Tamilarasi T, Ananthi T. *Phytochemical Analysis and Antimicrobial Activity of Mimosa pudica*Linn. Research Journal of Chemical Sciences. 2012; 2(2): 72-4.
- Todar K. *Nutrition and Growth of bacteria*. 2012:4.
- Todar, K. 2004. *Todar's Online Textbook of Bacteriology: Pseudomonas aeruginosa*. Department of Bacteriology, University of Wisconsin, Madison.
- Weldhagen G.F, Piorel Laurent, and Nordmann Patrice. Ambler Class A Extended-Spectrum β -Lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: Novel Developments and Clinical Impact. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy Article*. 2003. Vol. 47.
- White, P.J. and Y. Xing. 1954. *Antioxidants from Cereals and Legumes dalam Foreidoon Shahidi: Natural Antioxidants, Chemistry, Health Effect and Applications*. AOCS Press, Champaign, Illinois: 25-63.
- WHO. 2002. *Prevention of hospital-acquired infections, A practical guide*. 2nd edition. Department of Communicable disease, Surveillance and Response.
- Wijayakusuma HMH. *Bebas penyakit ginjal dan saluran kemih*. Cetakan Pertama. Jakarta: Pustaka Bunda, 2008. Hal.64.
- Wrangstadh M, Szewzyk U, Ostling J, Kjellenberg S. 1990. *Starvation specific formation of a peripheral exopolysaccharide by a marine Pseudomonas sp*. Appl Environ Microbiol 56, 2065-72.
- Yulia, Rita. 2006. *Kandungan Tanin dan Anti Streptococcus mutans Daun Teh Var. Assamica Pada Berbagai Tahap Pengolahan*. <http://repository.ipb.ac.id/handle/123456789/46288>.
- Zhang J, Yuan K, Zhou W, Zhou J, Yang P. *Studies on The Active Components and Antioxidant Activities of The Extracts of Mimosa pudica*Linn. from Southern China. Pharmacogn Mag. 2011; 7(25): 35-9.