

**UJI EFEKTIFITAS FLAVONOID EKSTRAK BUAH MAHKOTA DEWA (*Phaleria macrocarpa*) TERHADAP PENGHAMBATAN PEMBENTUKAN BIOFILM PADA *Escherechia coli* SECARA IN VITRO**

**TUGAS AKHIR**

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



**Disusun Oleh :**

**RIZKY DWI SAFITRI**

**NIM. 165070100111061**

**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

**2019**

**HALAMAN PENGESAHAN**

**TUGAS AKHIR**

**UJI EFEKTIFITAS FLAVONOID EKSTRAK BUAH MAHKOTA DEWA (*Phaleria macrocarpa*) TERHADAP PENGHAMBATAN PEMBENTUKAN BIOFILM PADA *Escherechia coli* SECARA IN VITRO**

Oleh :

Rizky Dwi Safitri

NIM. 165070100111061

Telah diuji pada

Hari : Jumat

Tanggal : 6 Desember 2019

Dan dinyatakan lulus oleh :

Penguji I

dr. Dhany Prafita Ekasari, Sp.KK  
NIP. 198506152018032001

Pembimbing I/Penguji II,

Pembimbing II/Penguji III,

Dr. dr. Dwi Yuni Nurhidayati, M.kes  
NIP. 196603231997032001

dr. Etty Fitria Ruliana, Sp.MK(K)  
NIP. 197809192006012011

Mengetahui,

Ketua Program Studi Pendidikan Dokter

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

**PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Rizky Dwi Safitri

NIM : 165070100111061

Program Studi : Sarjana Kedokteran Fakultas Kedokteran  
Universitas Brawijaya

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini adalah hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya sendiri. Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil plagiat, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 6 Desember 2019

Yang membuat pernyataan,

Rizky Dwi Safitri

NIM. 165070100111061

**KATA PENGANTAR**

Segala Puji bagi Allah SWT yang telah memberikan petunjuk dan hidayah-

Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir dengan judul “Uji Efektivitas Ekstrak Flavonoid Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*)

Terhadap Penghambatan Pembentukan Biofilm Pada *Escherichia coli* secara In Vitro” Tugas Akhir ini disusun untuk mendapatkan gelar Sarjana Kedokteran dari Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Tugas Akhir ini dapat diselesaikan karena bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, oleh karena itu penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr.dr. Wisnu Barlianto, M,Si, Med., Sp.A(K)., Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah memberikan kesempatan menuntut ilmu di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
2. dr. Triwahju Astuti, M.Kes., Sp.P(K)., Ketua Program Studi Pendidikan Dokter yang telah membimbing penulis menuntut ilmu di PS Kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
3. Dr.dr. Dwi Yuni Nur Hidayati, M.Kes., sebagai pembimbing pertama yang senantiasa memberikan bimbingan penulisan dan analisis data, serta saran sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir ini.
4. dr. Etty Fitria Ruliana, Sp.MK(K)., sebagai pembimbing kedua yang dengan sabar meluangkan waktu dan memberikan semangat sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir ini.
5. dr. Dhany Prafita Ekasari, Sp.KK., sebagai penguji saya yang telah meluangkan waktu untuk menguji tugas akhir ini dan memberikan banyak masukan hingga tugas akhir ini terselesaikan

6. Bu Soeyati Poejiani, S.Si., selaku analis Mikrobiologi yang membantu penulis dalam penelitian dan memberikan solusi dalam masalah yang dihadapi peneliti dalam menyelesaikan Tugas Akhir.

7. Yang tercinta kedua orang tua **Setiadjid** dan **Sutin Indah**, kakak saya **Laily**, adik saya **Rama**, **Mocca**, **Molly**, dan **Bobona** atas seluruh kasih sayang, semangat dan doa dalam menyelesaikan Tugas Akhir ini.

8. Teman-teman propolis **Andra**, **Ica**, dan **Risa** yang selalu memberi semangat guna menyelesaikan Tugas Akhir ini.

9. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang telah memberikan bantuan atas terselesaikannya tugas akhir ini.

Dalam penulisan tugas akhir ini, penulis menyadari masih terdapat banyak kekurangan dalam penulisannya. Oleh karena itu, kritik dan saran yang bersifat membangun selalu penulis harapkan.

Akhir kata semoga Tugas Akhir ini dapat bermanfaat bagi pembaca umumnya dan perkembangan ilmu pengetahuan khususnya.

Malang, 6 Desember 2019

Penulis

## ABSTRACT

Safitri, Rizky Dwi. 2019. **Effectiveness Test of Mahkota Dewa's (Phaleria macrocarpa) Fruit Extract Flavonoid as Inhibitor of Biofilm Formation in Escherichia coli In vitro.** Final Assignment, Medical Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: (1) Dr. dr. Dwi Yuni Nur Hidayati, M.Kes., (2) dr. Etty Fitria Ruliana, Sp.MK(K).

*Escherichia coli* is a gram-negative rod bacterium in the intestine called *Enterobacteriaceae*. This bacterium can form biofilms. Biofilms from these bacteria can cause urinary tract infections (UTIs) and also play a role in the resistance mechanism of antibiotics. Increased resistance to antibiotics makes a significant problem with the treatment given. So that the need for alternative therapies such as mahkota dewa. Mahkota dewa has a flavonoid that can act as an antibiofilm. The purpose of this study was to determine the antibacterial effects of flavonoid extract of mahkota dewa's fruit (*Phaleria macrocarpa*) on the inhibition of the formation of *Escherichia coli* biofilms. This study uses a tube method to detect biofilm formation. With the concentration of flavonoids used were 0%, 0.8375%, 1.675%, 3.125%, and 6.25% with six repetitions. The results of the study will show thinning of the *Escherichia coli* bacterial biofilm ring in the area of the fluid border on the inner wall of the tube. Next, the results are photographed and quantified into Mean Gray Value (MGV) in the Adobe Photoshop application. The result of this research was that the concentration of mahkota dewa extract's flavonoid was positively correlated to the Mean Gray Value. The result of Pearson's chorea statistical test showed that there was a very strong relationship (Pearson correlation,  $p = 0.973$ ). The conclusion obtained from this study is that the extract of mahkota dewa of flavonoids can inhibit the formation of biofilms in *Escherichia coli* bacteria in vitro

**Keyword:** *Escherichia coli*, biofilm, antibiofilm, mahkota dewa extract's flavonoid

## ABSTRAK

Safitri, Rizky Dwi. 2019. **Uji Efektivitas Flavonoid Ekstrak Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) Terhadap Penghambatan Pembentukan Biofilm Pada *Escherichia coli* Secara *In vitro***. Tugas Akhir, Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Pembimbing : (1) Dr. dr. Dwi Yuni Nur Hidayati, M.Kes., (2) dr. Etty Fitria Ruliana, Sp.MK(K)

*Escherichia coli* merupakan bakteri batang gram negatif yang berada di usus disebut dengan *Enterobacteriaceae*. Bakteri ini memiliki kemampuan untuk membentuk biofilm. Biofilm dari bakteri ini dapat menyebabkan Infeksi Saluran Kemih (ISK) dan juga berperan dalam mekanisme resistensi dari antibiotik. Meningkatnya resistensi terhadap antibiotik membuat permasalahan yang signifikan terhadap tatalaksana yang diberikan. Sehingga perlunya terapi alternatif yang diberikan seperti buah mahkota dewa. Buah mahkota dewa memiliki kandungan flavonoid yang dapat berperan sebagai antibiofilm. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efek flavonoid ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) terhadap penghambatan pembentukan biofilm pada *Escherichia coli*. Penelitian ini menggunakan metode tabung untuk mendeteksi pembentukan biofilm. Konsentrasi flavonoid yang digunakan adalah 0%, 0.8375%, 1.675%, 3.125%, dan 6.25% dengan enam kali pengulangan. Hasil penelitian akan tampak penipisan cincin biofilm bakteri *Escherichia coli* pada area *air fluid border* pada dinding bagian dalam tabung. Selanjutnya, hasil difoto dan dikuantifikasi menjadi nilai *Mean Gray Value* (MGV) pada aplikasi Adobe Photoshop. Hasil penelitian ini didapatkan bahwa besar konsentrasi flavonoid ekstrak buah mahkota dewa berkorelasi positif terhadap nilai *Mean Gray Value*. Hasil uji statistik korelasi pearson menunjukkan terdapat hubungan yang sangat kuat (korelasi pearson,  $p=0.973$ ). Kesimpulan dari penelitian ini adalah flavonoid ekstrak buah mahkota dewa dapat menghambat pembentukan biofilm pada bakteri *Escherichia coli* secara *in vitro*.

**Kata kunci:** *Escherichia coli*, biofilm, antibiofilm, flavonoid ekstrak buah mahkota dewa

DAFTAR ISI

Halaman

Judul.....	i
Halaman Pengesahan.....	ii
Pernyataan Keaslian Tulisan.....	iii
Kata Pengantar.....	iv
Abstrak.....	vi
Abstract.....	vii
Daftar Isi.....	viii
Daftar Tabel.....	xii
Daftar Gambar.....	xiii
Daftar Singkatan.....	xiv
Daftar Lampiran.....	xv
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.3.1 Tujuan Umum.....	4
1.3.2 Tujuan Khusus.....	4
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
1.4.1 Manfaat Akademis.....	4
1.4.2 Manfaat Praktis.....	5
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 <i>Escherichia coli</i> .....	6
2.1.1 Taksonomi.....	7





2.1.2 Sifat Biakan dan Pertumbuhan .....	7
2.1.3 Struktur Antigen.....	8
2.1.4 Patogenesis.....	9
2.1.5 Patologi .....	9
2.1.6 Uji Diagnostic Laboratorium.....	9
2.1.6.1 Spesimen.....	9
2.1.6.2 Biakan .....	10
2.1.6.3 Uji Oksidase .....	10
2.1.6.4 Pewarnaan Gram.....	10
2.1.7 Resistensi terhadap Antibiotik.....	11
2.1.8 Epidemiologi.....	11
2.2 Biofilm <i>Escherichia coli</i> .....	12
2.2.1 Definisi .....	12
2.2.2 Struktur.....	12
2.2.3 Pembentukan Biofilm.....	13
2.2.4 Quorum Sensing .....	13
2.2.5 Biofilm pada Alat Medis.....	14
2.2.6 Tes Pembentukan Biofilm.....	14
2.2.6.1 Metode Tabung.....	14
2.2.6.2 Metode Congo Red Agar.....	15
2.2.6.3 Metode Tissue Culture Plate.....	15
2.3 Mahkota Dewa.....	16
2.3.1 Taksonomi.....	16
2.3.2 Morfologi.....	17
2.3.3 Khasiat.....	17



2.3.4 Kandungan Zat Aktif Mahkota Dewa ( *Phaleria macrocarpa*)

18

**BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN**

3.1 Kerangka Konsep Penelitian ..... 19

3.2 Penjelasan Kerangka Konsep Penelitian..... 20

3.3 Hipotesis Penelitian..... 20

**BAB IV METODE PENELITIAN**

4.1 Rancangan Penelitian ..... 21

4.2. Sampel Penelitian ..... 21

4.3 Variabel Penelitian ..... 22

4.3.1 Variabel Terikat ..... 22

4.3.2 Variabel Bebas ..... 22

4.4 Tempat dan Waktu Penelitian ..... 22

4.5 Definisi Operasional ..... 22

4.6 Instrumen penelitian..... 23

4.6.1 Alat dan bahan ..... 23

4.7 Operasional Penelitian ..... 24

4.7.1 Pembuatan Ekstrak Buah Mahkota Dewa ..... 24

4.7.1.1 Tahap Pengeringan ..... 24

4.7.1.2 Tahap Ekstraksi ..... 24

4.7.1.3 Tahap Evaporasi..... 25

4.7.2 Pemisahan Senyawa Flavonoid..... 25

4.7.2.1 Partisipasi Senyawa n-heksana..... 25

4.7.2.2 Sentrifugasi..... 25

4.7.3 Idenifikasi *Escherichia coli*..... 26



4.7.4 Pembuatan Pembenuhan Cair Bakteri.....	27
4.7.5 Uji Deteksi Pembentukan Biofilm (Metode Tabung).....	28
4.7.5 Uji Hambat Pembentukan Biofilm pada <i>Eschcherichia coli</i> ... ..	28
4.7.7 Pengukuran <i>Mean Gray Value</i> .....	30
4.8 Analisis Data.....	30
4.9 Alur Penelitian.....	31

**BAB V HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA**

5.1 Hasil Penelitian .....	32
5.1.1 Hasil Identifikasi Bakteri.....	32
5.1.2 Hasil Flavonoid Ektrak Buah Mahkota Dewa ( <i>Phaleria macrocarpa</i> ).....	33
5.1.3 Hasil Uji Hambat Pembentukan Biofilm .....	34
5.2 Analisis Data .....	37
5.2.1 Uji Normalitas dan Homogenitas .....	38
5.2.2 Uji <i>One-Way Anova</i> .....	38
5.2.3 Uji <i>Post Hoc Tukey</i> .....	38
5.2.4 Uji <i>Korelasi Pearson</i> .....	39

**BAB VI PEMBAHASAN..... 41**

**BAB VII PENUTUP**

7.1 Kesimpulan .....	44
7.2 Saran .....	44

**DAFTAR PUSTAKA..... 45**



DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 5.1	Hasil Pengukuran Mean Gray Value dengan Aplikasi Adobe Photoshop CS6.....	36
Tabel 5.2	Hasil Uji Normalitas dan Homogenitas.....	38



DAFTAR GAMBAR

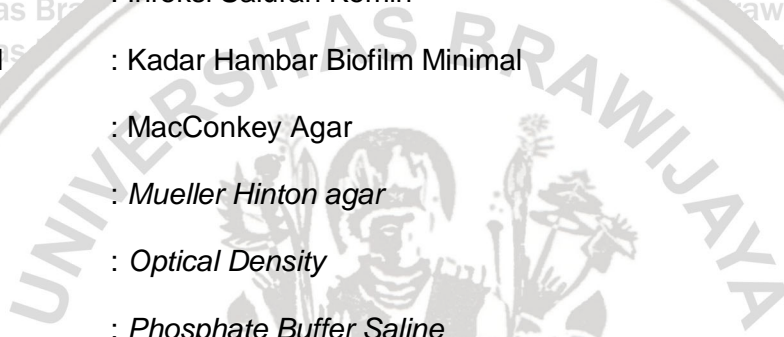
Halaman

Gambar 2.1 Pewarnaan Gram <i>Escherichia coli</i> .....	6
Gambar 2.2 Kultur <i>Escherichia coli</i> pada <i>Eosin Methylene Blue</i> .....	8
Gambar 2.3 Struktur Biofilm <i>Escherichia coli</i> .....	12
Gambar 2.4 Proses Pembentukan Biofilm .....	13
Gambar 2.5 Perbedaan warna koloni bakteri pada media Congo Red Agar ..	15
Gambar 2.6 Perbedaan bakteri yang pembentuk biofilm dan bakteri yang Tidak membentuk biofilm pada metode <i>tissue culture plate</i> .....	16
Gambar 2.7 Buah Mahkota Dewa .....	17
Gambar 5.1 Hasil Kultur Bakteri <i>E.coli</i> pada media EMB .....	32
Gambar 5.2 Hasil Pewarnaan Gram .....	33
Gambar 5.3 Hasil Uji Oksidase .....	33
Gambar 5.4 Hasil Flavonoid Ekstrak Buah Mahkota Dewa .....	34
Gambar 5.5 Hasil Penelitian Pendahuluan.....	35
Gambar 5.6 Hasil Penelitian Sesungguhnya.....	35
Gambar 5.7 Grafik pengukuran <i>Mean Gray Value</i> .....	37



**DAFTAR SINGKATAN**

- BA** : *Blood Agar*
- CRA** : *Congo Red Agar*
- EMB** : *Eosin Methyelene Blue*
- EPS** : *Extracellular Polymeric Substance*
- ISK** : *Infeksi Saluran Kemih*
- KHBM** : *Kadar Hambar Biofilm Minimal*
- MCA** : *MacConkey Agar*
- MHA** : *Mueller Hinton agar*
- OD** : *Optical Density*
- PBS** : *Phosphate Buffer Saline*
- TSBglu** : *Tryptic Soy Broth dengan glucose*
- TSB** : *Tryptic Soy Broth*
- SPSS** : *Statistical Product of Service Solution*



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Hasil Uji <i>One-way Anova</i> .....	49
Lampiran 2 Hasil Uji <i>Post Hoc Tukey</i> .....	49
Lampiran 3 Hasil Korelasi <i>Pearson</i> .....	50



**HALAMAN PENGESAHAN**  
**TUGAS AKHIR**  
**UJI EFEKTIFITAS FLAVONOID EKSTRAK BUAH MAHKOTA DEWA (*Phaleria macrocarpa*) TERHADAP PENGHAMBATAN PEMBENTUKAN BIOFILM**  
**PADA *Escherechia coli* SECARA IN VITRO**

Oleh :

Rizky Dwi Safitri

NIM. 165070100111061


Telah diuji pada

Hari : Jumat

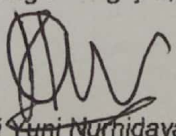
Tanggal : 6 Desember 2019

Dan dinyatakan lulus oleh :

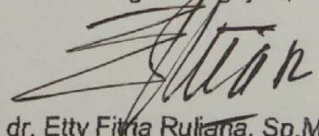
Penguji I

  
dr. Dhany Prafita Ekasari, Sp.KK  
NIP. 198506152018032001

Pembimbing I/Penguji II,

  
Dr. dr. Dwi Yuni Nurhidayati, M.kes  
NIP. 196603231997032001

Pembimbing II/Penguji III,

  
dr. Etty Fitria Ruliana, Sp.MK(K)  
NIP. 197809192006012011

Mengetahui,

Ketua Program Studi Pendidikan Dokter



dr. Triwahyu Astuti, M.Kes, Sp.P(K)  
NIP. 196810221996012001



**ABSTRACT**

Safitri, Rizky Dwi. 2019. ***Effectiveness Test of Mahkota Dewa's (Phaleria macrocarpa) Fruit Extract Flavonoid as Inhibitor of Biofilm Formation in Escherichia coli In vitro***. Final Assignment, Medical Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: (1) Dr. dr. Dwi Yuni Nur Hidayati, M.Kes., (2) dr.Etty Fitria Ruliana, Sp.MK(K).

*Escherichia coli* is a gram-negative rod bacterium in the intestine called *Enterobacteriaceae*. This bacterium can form biofilms. Biofilms from these bacteria can cause urinary tract infections (UTIs) and also play a role in the resistance mechanism of antibiotics. Increased resistance to antibiotics makes a significant problem with the treatment given. So that the need for alternative therapies such as mahkota dewa. Mahkota dewa has a flavonoid that can act as an antibiofilm. The purpose of this study was to determine the antibacterial effects of flavonoid extract of mahkota dewa's fruit (*Phaleria macrocarpa*) on the inhibition of the formation of *Escherichia coli* biofilms. This study uses a tube method to detect biofilm formation. With the concentration of flavonoids used were 0%, 0.8375%, 1.675%, 3.125%, and 6.25% with six repetitions. The results of the study will show thinning of the *Escherichia coli* bacterial biofilm ring in the area of the fluid border on the inner wall of the tube. Next, the results are photographed and quantified into Mean Gray Value (MGV) in the Adobe Photoshop application. The result of this research was that the concentration of mahkota dewa extract's flavonoid was positively correlated to the Mean Gray Value. The result of Pearson's chorea statistical test showed that there was a very strong relationship (Pearson correlation,  $p = 0.973$ ). The conclusion obtained from this study is that the extract of mahkota dewa of flavonoids can inhibit the formation of biofilms in *Escherichia coli* bacteria in vitro

**Keyword:** *Escherichia coli*, biofilm, antibiofilm, mahkota dewa extract's flavonoid

## ABSTRAK

Safitri, Rizky Dwi. 2019. **Uji Efektivitas Flavonoid Ekstrak Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) Terhadap Penghambatan Pembentukan Biofilm Pada *Escherichia coli* Secara *In vitro***. Tugas Akhir, Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Pembimbing : (1) Dr. dr. Dwi Yuni Nur Hidayati, M.Kes., (2) dr. Etty Fitria Ruliana, Sp.MK(K)

*Escherichia coli* merupakan bakteri batang gram negatif yang berada di usus disebut dengan *Enterobacteriaceae*. Bakteri ini memiliki kemampuan untuk membentuk biofilm. Biofilm dari bakteri ini dapat menyebabkan Infeksi Saluran Kemih (ISK) dan juga berperan dalam mekanisme resistensi dari antibiotik. Meningkatnya resistensi terhadap antibiotik membuat permasalahan yang signifikan terhadap tatalaksana yang diberikan. Sehingga perlunya terapi alternatif yang diberikan seperti buah mahkota dewa. Buah mahkota dewa memiliki kandungan flavonoid yang dapat berperan sebagai antibiofilm. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efek flavonoid ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) terhadap penghambatan pembentukan biofilm pada *Escherichia coli*. Penelitian ini menggunakan metode tabung untuk mendeteksi pembentukan biofilm. Konsentrasi flavonoid yang digunakan adalah 0%, 0.8375%, 1.675%, 3.125%, dan 6.25% dengan enam kali pengulangan. Hasil penelitian akan tampak penipisan cincin biofilm bakteri *Escherichia coli* pada area *air fluid border* pada dinding bagian dalam tabung. Selanjutnya, hasil difoto dan dikuantifikasi menjadi nilai *Mean Gray Value* (MGV) pada aplikasi Adobe Photoshop. Hasil penelitian ini didapatkan bahwa besar konsentrasi flavonoid ekstrak buah mahkota dewa berkorelasi positif terhadap nilai *Mean Gray Value*. Hasil uji statistik korelasi pearson menunjukkan terdapat hubungan yang sangat kuat (korelasi pearson,  $p=0.973$ ). Kesimpulan dari penelitian ini adalah flavonoid ekstrak buah mahkota dewa dapat menghambat pembentukan biofilm pada bakteri *Escherichia coli* secara *in vitro*.

**Kata kunci:** *Escherichia coli*, biofilm, antibiofilm, flavonoid ekstrak buah mahkota dewa

## BAB 1

## PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang

Infeksi Saluran Kemih (ISK) adalah infeksi saluran kemih yang banyak menyerang wanita, karena ukuran uretra wanita yang pendek dan kebiasaan menunda berkemih. Insiden ISK pada remaja sebanyak 1% dan pada wanita dewasa sebanyak 4%. Insiden pada wanita akan meningkat dengan peningkatan aktivitas seksual dan riwayat melahirkan. Pada wanita, sekitar 25-30% usia 20-40 tahun akan terinfeksi ISK (Hotchandani R & Agrawal KK, 2012). Infeksi saluran kemih dapat menyebabkan morbiditas dan secara signifikan akan menjadi mortalitas (Seputra *et al.*, 2015). Di Amerika Serikat ISK bertanggung jawab atas 10 juta kunjungan dokter tiap tahunnya (National Kidney Foundation, 2010).

Gejala ISK yang muncul pada orang dewasa adalah sensasi terbakar saat buang air kecil, nyeri pada perut bagian bawah, urin berwarna keruh dan berdarah, serta urin berbau busuk. Apabila infeksi telah menyebar ke ginjal maka akan muncul gejala nyeri pada punggung bawah, mual dan muntah, serta demam. Pada anak usia 4-8 tahun gejala yang muncul seperti demam ringan, sering buang air kecil, nyeri dan sensasi terbakar saat buang air kecil, nyeri di sekitar umbilikus, urin berbau busuk, urin berwarna keruh dan berdarah. Apabila infeksi telah menyebar ke ginjal maka akan muncul gejala demam tinggi, nyeri punggung, dan muntah (National Kidney Foundation, 2010).

Sekitar 80-90% ISK disebabkan oleh satu jenis bakteri (National Kidney Foundation, 2010). Bakteri penyebab ISK 90% tersering adalah *Escherichia coli* (Jawetz, 2016). Menurut penelitian yang telah dilakukan menggunakan

data rekam medis dari hasil biakan urin di Rumah Sakit Mohammad Hoesin, Palembang menunjukkan bahwa bakteri penyebab ISK terbanyak adalah *Escherichia coli*, selanjutnya diikuti dengan bakteri *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Acinetobacter calcoacetius* (Indri Seta *et al.*, 2015). *Escherichia coli* memiliki mekanisme proteksi melalui pembentukan biofilm. Biofilm merupakan kumpulan dari sel bakteri yang melekat secara irreversible pada suatu permukaan hidup maupun tak hidup dan terlindungi oleh *Extracellular Polymeric Substance* (EPS) (Marlina D *et al.*, 2018). Biofilm dapat melekat pada peralatan medis seperti *prostetic graft* dan sendi, *shunt* uretra dan intravascular kateter, sedangkan penyebab infeksi nosocomial tersering pada saluran kemih adalah akibat adanya formasi biofilm *Escherichia coli* pada kateter urin (Sharma *et al.*, 2016). Sehingga melalui mekanisme pembentukan biofilm bakteri relatif sulit untuk dieradikasi (Antunes *et al.*, 2011).

Sensitifitas bakteri *E.coli* terhadap antibiotik di Rumah Sakit Pertamina Bintang Amin, Lampung menunjukkan bahwa pada gentamicin (100%) dan cirprofloxacin (60%) sedangkan terhadap cefixim dan ampicillin (0%) (Arivo dan Dwiningtyas., 2017) sehingga dapat dikatakan *E.coli* resisten terhadap cefixim dan ampicillin. Peningkatan resistensi bakteri terhadap antibiotik dapat menyebabkan masalah yang signifikan terhadap tatalaksana penyakit akibat mikroorganisme yang membentuk biofilm. Sehingga pencarian terapi alternatif menjadi sangat penting. Dengan konteks tersebut bahan alternatif dapat diperoleh dari tanaman Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) yang secara tradisional dapat digunakan sebagai minuman herbal (Mahzir *et al.*, 2018) dan dapat mengobati penyakit degeneratif seperti hipertensi, diabetes mellitus, ginjal, serta infeksi bakteri patogen (Nikham, 2012).

Mahkota dewa adalah tanaman asli Indonesia yang berasal dari Papua dengan tinggi sekitar 5-18 meter di atas permukaan laut, terdiri dari batang, daun, bunga, dan buah. Menurut penelitian Soeksmanto (2007) kandungan antioksidan pada tumbuhan mahkota dewa adalah biji tua 15,47%, daun 38,46%, kulit batang 46,34%, ranting 48,10%, buah muda 71.21%, dan buah tua 79,03%. Di dalam buah mahkota dewa terdapat kandungan senyawa saponin, alkaloid, polifenol, dan flavonoid (Rohyami, 2008).

Flavonoid dapat digunakan sebagai antifungi antiviral dan antibakteri (Pandey *et al.*, 2016). Flavonoid merupakan kelompok fenol dan mempunyai kecenderungan untuk menghambat aktivitas enzim mikroba sehingga dapat digunakan sebagai antibiofilm. Mekanisme menghambat pembentukan biofilm dengan cara menghancurkan stabilitas biofilm (Marcin Rozalski *et al.*, 2013) dan menghambat enzim pembentuk polisakarida yang merupakan bahan utama matriks ekstraseluler biofilm (Zhi Ren *et al.*, 2016). Flavonoid didapatkan pada buah-buahan seperti, apel (20%), pisang (3,5%), dan buah mahkota dewa (30%) (Kesarkar S *et al.*, 2009). Pada mahkota dewa, tanaman dapat tumbuh dengan baik di dataran rendah dan dapat diperbanyak melalui vegetatif maupun generatif (Soeksmanto, 2007).

Berdasarkan uraian diatas maka diperlukan penelitian tentang pemberian flavonoid ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) terhadap pembentukan biofilm pada bakteri *Escherichia coli*. Karena masih belum ada penelitian sebelumnya yang menguji efek flavonoid ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) terhadap pembentukan biofilm pada bakteri *Escherichia coli*, sehingga diharapkan ada pengobatan tambahan alami.

## 1.2 Rumusan Masalah

Apakah pemberian flavonoid ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) dapat menghambat pembentukan biofilm pada *Escherechia coli* secara *in vitro*?

## 1.3 Tujuan Penelitian

### 1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan bahwa flavonoid ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) memiliki efek sebagai penghambat pembentukan biofilm pada *Escherechia coli* secara *in vitro*.

### 1.3.2 Tujuan Khusus

- a. Untuk mengetahui perbedaan dari hasil pemberian berbagai konsentrasi flavonoid ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) dalam menghambat pembentukan biofilm pada bakteri *Escherechia coli* secara *in vitro*.
- b. Untuk mengetahui besar kadar hambat biofilm minimal dari flavonoid ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) terhadap bakteri *Escherechia coli* secara *in vitro*.

## 1.4 Manfaat penelitian

### 1.4.1 Manfaat Akademis

- a. Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi dasar teori untuk menambah informasi dalam bidang kesehatan mengenai manfaat dari flavonoid ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) dalam penghambat pembentukan biofilm *Escherechia coli*.
- b. Dapat menambah informasi yang dapat dikembangkan dalam melakukan terapi terhadap biofilm yang dibentuk oleh *Escherechia coli*

### 1.4.2. Manfaat Praktis

- a. Memberikan terapi antibakteri tambahan terhadap infeksi *Escherechia coli* yang membentuk biofilm.
- b. Meningkatkan pengetahuan masyarakat tentang manfaat buah mahkota dewa sebagai antibiofilm.



## BAB 2

## TINJAUAN PUSTAKA

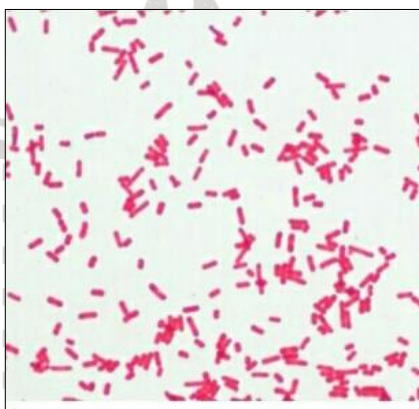
2.1 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* atau dikenal dengan *E. coli* ditemukan oleh Theodor Escherich, seorang dokter anak yang juga seorang mikrobiologis dari Jerman.

*Escherichia coli* merupakan bakteri bacill gram negatif yang tidak berbahaya, namun *Escherichia coli* juga dapat menjadi patogen yang menyebabkan penyakit seperti diare, dehidrasi, dan bahkan kematian (Thomas, 2017). Habitat dari *Escherichia coli* adalah di dalam saluran pencernaan pada manusia dan hewan berdarah hangat (Allocati *et al.*, 2013). Dengan menghasilkan kolisin yang dikendalikan oleh plasmid yang berfungsi sebagai bakterisidal sehingga dapat melindungi saluran pencernaan dari bakteri lain (Jawetz, 2016).

*Escherichia coli* dapat ditransmisikan melalui kegiatan tangan ke mulut atau dengan pemindahan pasif melalui makanan atau minuman (Melliawati, 2009).

*Escherichia coli* merupakan bakteri yang memiliki flagella, dan fili (fimbriae) (Jawetz, 2016).



Gambar 2.1 Pewarnaan Gram *Escherichia coli* (Jawetz, 2016)



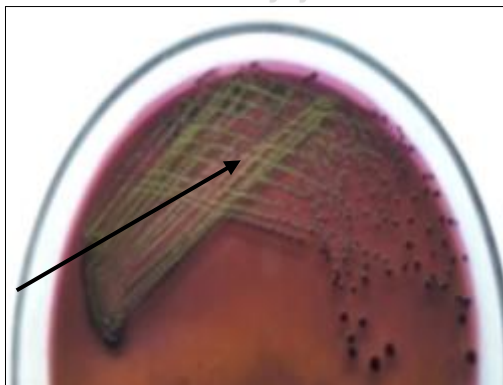
### 2.1.1 Taksonomi

Menurut ITIS (2018), taksonomi dari *Escherichia coli* adalah sebagai berikut:

Kingdom : *Bacteria*  
Phylum : *Proteobacteria*  
Kelas : *Gamma Proteobacteria*  
Ordo : *Enterobacteriales*  
Familia : *Enterobacteriaceae*  
Genus : *Escherichia*  
Spesies : *Escherichia coli*

### 2.1.2 Sifat Biakan dan Pertumbuhan

*Escherichia coli* dapat tumbuh dengan baik pada temperatur antara 8° - 46°C dan temperatur optimum 37°C. Bakteri yang dipelihara di bawah temperatur minimum atau sedikit di atas temperatur maksimum, tidak akan segera mati melainkan berada di dalam keadaan tidur atau dorman (Melliawati, 2009). Media yang dapat digunakan untuk menumbuhkan *Escherichia Coli* antara lain Nutrient agar (Noor *et al.*, 2013). Dapat juga tumbuh pada media Blood agar (BA), MacConkey agar (MCA), Mueller Hinton agar (MHA), Eosin Methylene Blue (EMB) (Aryal, 2017). Specimen dapat diambil dari sputum, urin, darah, serta feses (Noviana, 2004).



**Gambar 2.2** Kultur *Escherichia coli* pada *Eosin Methylene Blue* (Anthony C A, 2016)  
Tanda panah menunjukkan koloni bakteri *Escherichia coli* tampak berwarna metallic sheen

### 2.1.3 Struktur Antigen

*Escherichia coli* saat ini dianggap sebagai genus dengan satu species yang mempunyai beberapa ratus tipe antigenik. Tipe-tipe ini dicirikan menurut perbedaan kombinasi antigen yaitu (Melliawati, 2009):

1. Antigen O merupakan antigen somatik berupa lipopolisakarida yang terdapat pada dinding sel (Melliawati, 2009). Antigen O bersifat resisten panas dan alkohol atau *heat-stable*. Antibody dari antigen O predominan berupa IgM. Spesifik dari antigen O pada manusia dapat terkait dengan penyakit yang spesifik, seperti yang ditemukan pada diare dan infeksi saluran kemih (Jawetz, 2016).
2. Antigen K merupakan antigen kapsul berupa polisakarida yang dapat terkait dengan virulensi seperti pada neonatal meningitis, yaitu terjadi peningkatan produksi antigen K1 dari strain *Escherichia coli* (Jawetz, 2016).
3. Antigen H merupakan antigen flagel berupa protein yang akan mengalami denaturasi karena panas dan alcohol. Antibody dari antigen H predominan berupa IgG (Jawetz, 2016).

## 2.1.4 Patogenesis

Infeksi saluran kemih yang disebabkan oleh *Escherichia coli* dapat masuk melalui perineal, vaginal, dan periurethra menuju saluran kemih bagian bawah atau melalui rute ascending melewati uretra menuju kandung kemih dan berakhir di ginjal. Setelah itu bakteri akan menyebar secara hematogen. Di dalam kandung kemih *Escherichia coli* melekat pada jaringan uroepithelial host yang dimediasi oleh fimbriae sehingga akan memicu respon inflamasi. Pada tahap awal *Escherichia coli* akan menginfeksi bagian superfisial dari jaringan uroepithelial dan setelah itu akan berkembang biak dengan cepat di bagian dalam. Selanjutnya *Escherichia coli* akan berevolusi melalui beberapa tahapan yang berakhir dengan pembentukan struktur biofilm, sehingga membuat *Escherichia coli* dapat menghindari respon imun dari host (Kudinha, 2017).

## 2.1.5 Patologi

*Escherichia coli* dapat menjadi patogen ketika berada pada jaringan di luar usus. Tempat *Escherichia coli* di luar usus yang paling sering menimbulkan infeksi adalah saluran kemih, saluran empedu, dan tempat lain yang ada di rongga abdomen. Tempat lain dari *Escherichia coli* yang dapat menimbulkan penyakit adalah ketika berada di aliran darah, kelenjar prostat, paru-paru, tulang, dan lapisan menigen. Pada seseorang dengan imunitas lemah seperti orang tua atau bayi, seseorang dengan penyakit tahap terminal, serta penggunaan kateter uretra dapat terjadi infeksi karena bakteri masuk ke aliran darah dan dapat menyebabkan sepsis (Jawetz, 2016)

## 2.1.6 Uji Diagnostik Laboratorium

### 2.1.6.1 Spesimen

Specimen dapat diperoleh dari sputum, darah, feses, serta urin, sesuai lokasi terjadinya penyakit (Noviana, 2004).

### 2.1.6.2 Biakan

*Escherichia coli* dapat dibiakkan pada Blood Agar (BA), Mac Conkey (MC), Eosin Methylene Blue (EMB), dan dengan mikroskop akan ditemukan gambaran basil gram negatif (Jawetz, 2016). Spesimen diinkubasi pada 37°C selama 24 jam.

Pada Mac Conkey akan tampak koloni bakteri berwarna merah muda transparan karena memfermentasi laktosa. Pada Eosin Methylene Blue tampak koloni berwarna kehijauan dengan karakter logam mengkilap (*metallic sheen*).

Sedangkan pada Nutrien Agar tampak koloni yang bulat, halus dan tidak berwarna (Sharifuzzaman *et al.*, 2014).

### 2.1.6.3 Uji Oksidase

Tes oksidase menggunakan metode kertas oksidase. Dengan cara mengambil isolate *Escherichia coli* dan digoreskan pada kertas oksidase. Kemudian diamati perubahan warna yang muncul. Dikatakan positif apabila menunjukkan warna biru dan negatif bila tidak ada warna yang muncul. Pada *Escherichia coli* akan memberikan hasil negatif (Mandal *et al.*, 2015).

### 2.1.6.4 Pewarnaan Gram

Pewarnaan gram dilakukan untuk identifikasi bakteri karena bakteri merupakan mikroorganisme yang tidak berwarna dan transparan. Bakteri gram positif atau negatif dibedakan berdasarkan struktur dinding sel bakteri. Warna akhir pada tes pewarnaan gram untuk bakteri gram negatif adalah merah. Setelah diketahui jenis gram positif atau negatif, bakteri kemudian dilihat bentukannya menggunakan mikroskop (Burton dan Engelkrik, 2004). Pada *Escherichia coli* hasil dari pewarnaan gram akan menunjukkan gambaran bakteri berwarna merah yang berasal dari tinta safranin, hal tersebut dikarenakan *Escherichia coli* merupakan bakteri gram negatif (Noorhamdani *et al.*, 2015).

### 2.1.7 Resistensi Terhadap Antibiotik

Pada penelitian yang dilakukan oleh Epstein *et al* (2014) mengenai uji resistensi antibiotik terhadap strain *Escherichia coli* di India menunjukkan bahwa resistensi *Escherichia coli* terhadap ampicillin dan amoxicillin (13.3%), tetrasiklin (12.6%), cotrimoxazole (11.3%), streptomycin (8%), ciprofloxacin dan ofloxacin (6.6%) cefotaxime (5.3%), dan gentamicin, chloramphenicol, amoxyclave (4.6%) (Epstein, L. *et al.*, 2014). Sedangkan menurut penelitian Arivo (2017) menunjukkan bahwa sensitivitas antibiotic terhadap *E.coli* adalah gentamicin (100%), ciprofloxacin 60% cefixim (0%), ampicillin (0%) (Arivo dan Dwiningtyas, 2017). Tingginya tingkat resistensi terhadap antibiotik antara lain disebabkan akibat penggunaan antibiotik yang tidak sesuai dengan indikasi (Nurmala *et al.*, 2015), kemampuan bakteri untuk membentuk biofilm yang dapat menghambat penetrasi antibiotik, serta penggunaan antibiotik terlalu sering dan tidak rasional (Kementerian kesehatan RI, 2005).

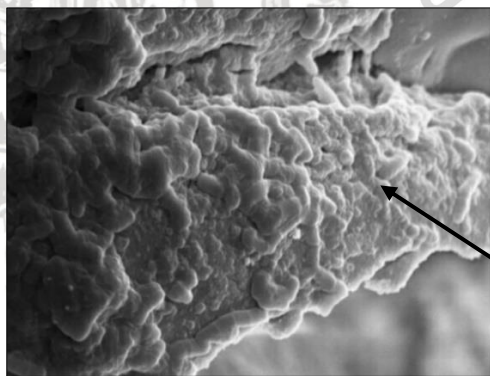
### 2.1.8 Epidemiologi

Infeksi oleh *Escherichia coli* dapat ditemukan di seluruh dunia. *Escherichia coli* merupakan normal flora pada saluran pencernaan manusia (National Kidney Foundation, 2010). Sebanyak 90% infeksi saluran kemih disebabkan oleh *Escherichia coli* (Jawetz, 2016). Di alam terbuka bakteri ini hidup dan tumbuh baik di dalam tanah, saat hujan bakteri akan terbawa masuk ke sungai (Sutiknowati, 2016). *Escherichia coli* ditransmisikan ke manusia melalui konsumsi minuman yang terkontaminasi, peralatan masak yang terkontaminasi, ataupun makanan yang terkontaminasi seperti daging mentah atau kurang matang (WHO, 2018).

## 2.2 Biofilm *Escherichia coli*

### 2.2.1 Definisi

Biofilm merupakan kumpulan sel-sel bakteri yang melekat secara *irreversible* pada suatu permukaan benda dan terbungkus dalam matriks *Extracellular Polymeric Substance* (EPS), substansi EPS terutama terbentuk dari polisakarida. Biofilm dapat menempel pada permukaan hidup maupun tidak hidup (Jamal, 2015). Serta dapat mengkontaminasi berbagai peralatan medis seperti ventilator dan kateter sehingga menjadi sumber infeksi pada manusia (Marlina .D *et al.*, 2018). Pembentukan biofilm berperan dalam resistensi bakteri terhadap antibiotik karena menghambat proses transportasi antibiotik untuk melewati biofilm (Homenta H, 2016).



**Gambar 2.3 Struktur Biofilm *Escherichia coli* dilihat menggunakan Scanning Electron Microskop (SEM) (Marlina *et al.*, 2018)**

Tanda panah merupakan lapisan biofilm yang menyelimuti bakteri *Escherichia coli*

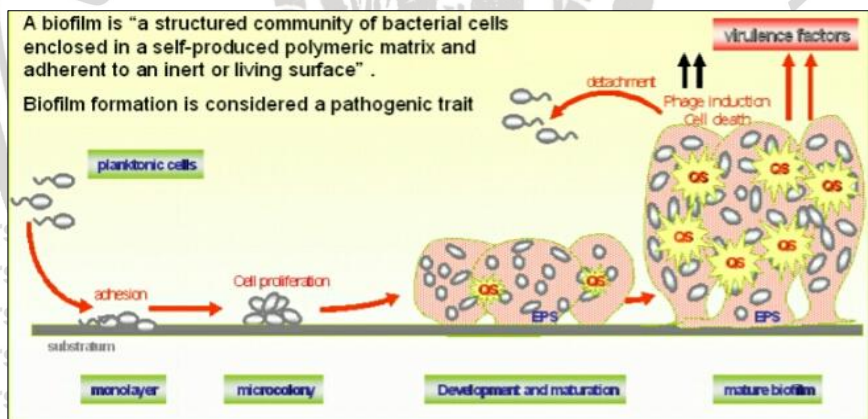
### 2.2.2 Struktur

Struktur biofilm bersifat sangat heterogen terdiri dari sel-sel mikrokoloni bakteri yang dibungkus dengan matriks *Extracellular Polymeric Substance* (EPS). Produksi EPS pada biofilm dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti jenis organisme, usia biofilm, nutrisi pada medium pertumbuhan, dan pertumbuhan bakteri (Homenta H, 2016)

### 2.2.3 Pembentukan Biofilm

Pembentukan biofilm dimulai ketika bakteri yang hidup bebas (*planktonic*) melekat pada suatu permukaan, selanjutnya akan memperbanyak diri dan membentuk satu lapisan tipis (*monolayer*) biofilm sel planktonic akan mengalami transisi menjadi sel dengan fenotip biofilm. Sel biofilm dan sel planktonic berbeda secara fisiologik dan metabolisme. Sel biofilm sejalan dengan pertumbuhannya akan menghasilkan EPS yang digunakan untuk melekatkan diri pada suatu permukaan dan melekatkan satu sama lain, maka terbentuk mikrokoloni. Sel akan tumbuh dan membentuk lapisan yang semakin tebal.

Dalam perkembangannya sel-sel bakteri akan memproduksi sinyal kimia yang berfungsi sebagai pembentukan karakteristik biofilm menjadi lebih matang. Biofilm merupakan suatu struktur dinamik dengan sel yang silih berganti masuk dan keluar meninggalkan komunitasnya (Donlan RM, 2002).



**Gambar 2.4 Proses Pembentukan Biofilm (Ciofu *at al.*, 2011)**

Proses pembentukan biofilm diawali dengan sel planktonik bakteri yang hidup bebas kemudian melekat dan membentuk monolayer selanjutnya akan mengalami proliferasi dan maturasi setelah matur maka akan melepaskan diri dan menjadi bebas begitu seterusnya (Donlan RM, 2002)

### 2.2.4 Quorum Sensing

*Quorum sensing* merupakan kemampuan bakteri berkomunikasi sehingga mencapai ambang batas yang cukup untuk menghasilkan sinyal yang dapat dideteksi oleh reseptor. Sinyal yang dihasilkan berupa senyawa kimia yang disebut

*autoinducer*. Dengan menggunakan *autoinducer* bakteri dapat mengirimkan informasi antara bakteri. Ketika *autoinducer* difusi ke medium sekitarnya, bakteri-bakteri lain akan mendekati sumber dan mulai menghasilkan *autoinducer*. Konsentrasi *inducer* akan meningkat seiring jumlah sel terinduksi yang meningkat (Tortora *et al.*, 2013 dan Kohli *et al.*, 2018).

Pada bakteri gram positif menggunakan *autoinducer* berupa peptide sedangkan pada bakteri gram negative berupa *N-acyl homoserine lactone* (AHL). (Turan *et al.*, 2017).

### 2.2.5 Biofilm Pada Alat Medis

*Escherichia coli* dapat membentuk biofilm yang matur sehingga akan mempersulit proses eradikasi bergai macam infeksi yang disebabkan oleh *Escherichia coli*. *Escherichia coli* dapat menjadi penyebab infeksi dari perangkat medis seperti *prostetic graft* dan sendi, shunt uretra dan intravascular kateter. Infeksi nosocomial paling sering adalah infeksi saluran kemih akibat adanya formasi biofilm *Escherichia coli* pada kateter urin. Hal ini menyebabkan resistensi antibiotik terhadap infeksi yang disebabkan oleh biofilm *Escherichia coli* semakin meningkat (Sharma *et al.*, 2016).

### 2.2.6 Tes Pembentukan Biofilm

#### 2.2.6.1 Metode Tabung

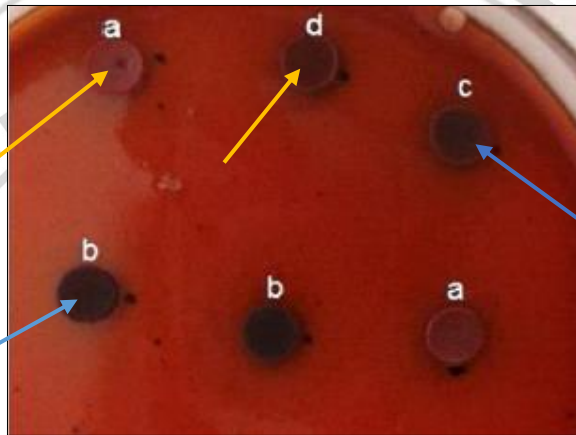
Ambil satu ose bakteri yang telah dikultur sebelumnya kemudian inokulasi bersama *Tryptic Soy Broth with glucose* (TSBglu) 10 milliliter dan glukosa 10 % selama 24 jam pada 37°C dalam tabung. Buang isi tabung dan cuci dengan *Phosphate Buffer Saline* (PBS). Setelah itu tabung diwarnai dengan kristal violet 0.1 % selama 30 menit. Kemudian kristal violet dibuang dan tabung dicuci dengan air dan tabung dikeringkan dengan posisi terbalik. Positif terbentuk biofilm apabila terdapat cincin biofilm melapisi airfluid border (batas antara medium cair dengan



udara dalam tabung). Metode ini juga dapat digunakan untuk mengevaluasi Kadar Hambat Biofilm Minimal (KHBM) (Triveda & Gomathi, 2016).

### 2.2.6.2 Metode Congo Red Agar

Metode ini menggunakan *brain heart infusion broth (BHI)* (37 g/l), sukrosa 5% dan pewarna Congo red (0.8 g/l) yang diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Bakteri dengan warna koloni hitam menunjukkan adanya produksi biofilm sehingga disebut bakteri produsen biofilm, sedangkan bakteri dengan koloni berwarna merah disebut bakteri non- produsen biofilm (Kaiser *et al.*, 2013).



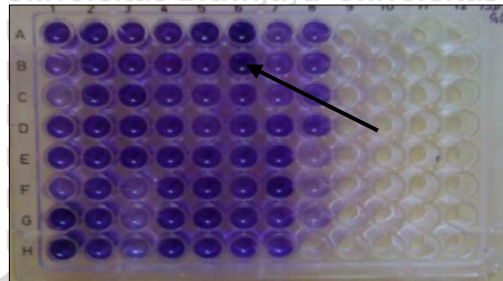
**Gambar 2.5 Perbedaan warna koloni bakteri produsen biofilm dan non-produsen biofilm pada media Congo Red Agar ( Kaiser *et al.*, 2013)**

Terlihat pada (a) dan (d) koloni berwarna merah dan merah tua yang menandakan bakteri non-produsen biofilm. Sedangkan pada (b) dan (c) koloni berwarna hitam dan coklat yang menandakan bakteri produsen biofilm.

### 2.2.6.3 Metode Tissue Culture Plate

Satu loop bakteri yang telah diinkubasi dari kultur semalam diinokulasi dalam 10 ml *Trypticase Soy Broth* dengan 1 % glukosa yang keencerannya 1:100 pada microfiter plate. Kemudian plate diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dengan kondisi aerob. Setelah diinkubasi, isi *well* dibuang dan dicuci sebanyak tiga kali dengan PBS. Kemudian dilakukan fiksasi selama 15 menit menggunakan etanol absolut. Setelah itu isi *well* dibuang dan diberi *crystal violet* selama 20 menit. Selanjutnya isi *well* dibuang dan dicuci dengan aquades steril. Terakhir tambahkan

asam asetat glasial 30% pada *well*. Untuk membaca *optical density* (OD) pada masing-masing *well* pada *microtiter plate* dapat menggunakan *automated ELISA plate reader* dengan panjang gelombang 500-600nm (Deka N, 2014).



**Gambar 2.6 Perbedaan bakteri yang pembentuk biofilm dan bakteri yang tidak membentuk biofilm pada metode *tissue culture plate* (Deka N, 2014)**

Tanda panah menunjukkan perubahan warna menjadi ungu tua pada *mikrotiter plate* yang menunjukkan adanya pembentukan biofilm oleh bakteri uji.

### 2.3 Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*)

Mahkota dewa merupakan tanaman herbal asal papua yang dapat dimanfaatkan untuk aplikasi medis (Morita *et al.*, 2014). Dapat tumbuh pada dataran rendah dan dapat diperbanyak melalui vegetatif maupun generatif (Soeksmanto, 2007).

#### 2.3.1 Taksonomi

Menurut Mahzir (2018), taksonomi mahkota dewa adalah sebagai berikut:

Divisi : *Spermatophyta*

Sub divisi : *Magnoliophyta*

Kelas : *Rosidae*

Ordo : *Mytales*

Famili : *Thymelaeaceae*

Genus : *Phaleria*

Spesies : *Phaleria macrocarpa*

### 2.3.2 Morfologi

*Phaleria macrocarpa*, merupakan tumbuhan lengkap yang memiliki batang, daun, bunga dan buah. Tinggi tanaman antara 1-18 m dengan akar 1 m lurus panjang mengeluarkan getah, kulit pohon kecoklatan dengan kayu berwarna putih.

Daun berwarna hijau dan meruncing dengan panjang dan lebar mulai dari 7-10 cm dan 3-5 cm masing-masing. Buahnya berwarna hijau saat mentah dan menjadi merah saat matang. Terdapat benih sebanyak 1-2 biji per buah dan berwarna coklat (Altaf *et al.*, 2013). Buah berbentuk bulat dengan diameter 3-5 cm, permukaan buah licin serta berwarna merah ketika sudah masak. Daging buah berwarna putih, berserat dan berair. Biji mahkota dewa bertekstur keras dan berwarna coklat. Akar mahkota dewa merupakan jenis akar tunggang (Dalimartha, 2008)



Gambar 2.7 Buah Mahkota Dewa Masak (Morita *et al.*, 2014)

### 2.3.3 Khasiat

Mahkota dewa memiliki kandungan antioksidan pada beberapa bagian seperti biji tua 15,47%, daun 38,46%, kulit batang 46,34%, ranting 48,10%, buah muda 71,21%, dan buah tua 79,03% (Soeksmento, 2007). Mahkota dewa dapat digunakan untuk kanker, tumor, diabetes, darah tinggi dan hepatitis (Harmanto, 2002). Selain itu dapat digunakan pula sebagai antidiare, dan antibakterial (Hending, 2009). Antimikroba dapat diklasifikasikan berdasarkan mikroorganisme yang dilawan yaitu antibakterial, antiparasit, antivirus, dan antifungal (Gillman *et*

*et al.*, 2013). Berdasarkan spektrumnya dapat digolongkan menjadi spektrum luas apabila sensitif terhadap banyak tipe mikroorganisme dan spektrum sempit apabila hanya sensitif terhadap spesies tertentu (Tortora *et al.*, 2013).

#### 2.3.4 Kandungan Zat Aktif Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*)

Pada mahkota dewa bagian buah dan kulit buahnya mengandung flavonoid, alkaloid, polifenol dan saponin (Sjahid, 2008). Flavonoid memiliki sifat biologis yang berspektrum luas seperti efek antibakteri, antiviral, antiinflamasi, dan juga anti-biofilm (Buenosilva *et al.*, 2013; Nijveldt *et al.*, 2001). Mekanisme kerja dari flavonoid sebagai antibiofilm adalah dengan cara menghancurkan stabilitas biofilm (Marcin Rozalski *et al.*, 2013) dan menghambat enzim pembentuk polisakarida yang merupakan bahan utama matriks ekstraseluler biofilm (Zhi Ren *et al.*, 2016).

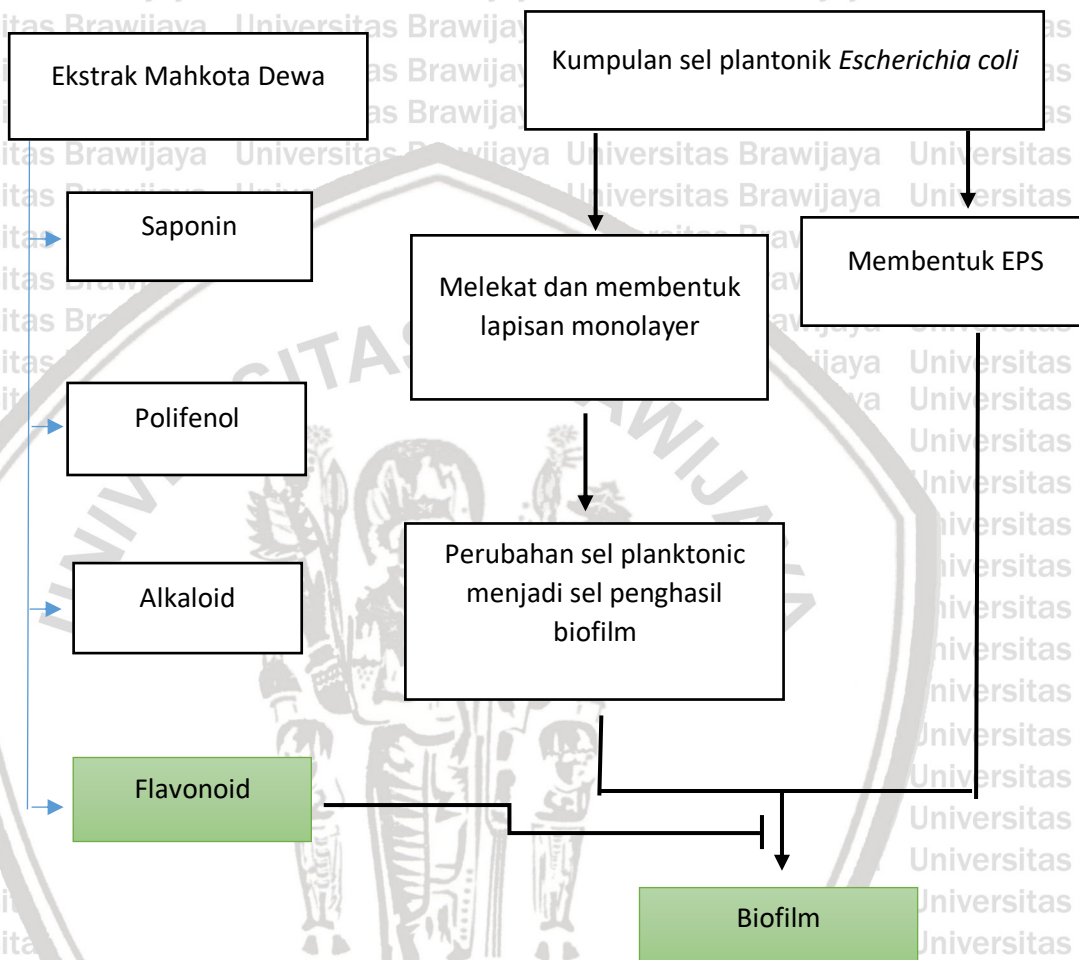
Alkaloid merupakan senyawa kimia yang penting untuk obat antibakteri seperti metronidazole dengan mekanisme mengganggu penyusunan komponen dinding sel sehingga lapisan peptidoglikan tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel (Masoudi dan Miraj, 2016). Saponin memiliki sifat khas yaitu mempunyai rasa pahit dan berbusa dalam air (Rachmawati, 2007) serta memiliki efek antimikroba dengan cara bereaksi dengan protein transmembran atau porin, sehingga porin rusak dan menyebabkan permeabilitas membrane sel terganggu, akibatnya pertumbuhan bakteri terhambat dan mati karena kekurangan nutrisi (Rachmawati, 2007).

Polifenol merupakan metabolit yang digunakan tanaman untuk mengusir serangga, fungi, dan bakteri. Pada penelitian yang dilakukan oleh Altaf polifenol dapat digunakan sebagai terapi kombinasi terhadap antibiotik sehingga dapat menurunkan dosis dan efek samping antibiotik serta meningkatkan efikasi antibiotik (Altaf *et al.*, 2013).

BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Keterangan:

■ : Variabel yang akan diuji

→ : Mengandung

→ : Pembentukan

⊥ : Penghambat pembentukan Biofilm

EPS : Extracelullar Polymeric Substances



### 3.2 Penjelasan Kerangka Konsep

Proses pembentukan biofilm dimulai dari bakteri yang hidup bebas (planktonik) melekat pada suatu permukaan, kemudian memperbanyak diri dan membentuk satu lapisan tipis (monolayer). Sel planktonik akan mengalami transisi menjadi sel dengan fenotip biofilm dan menghasilkan EPS yang digunakan untuk melekatkan diri pada suatu permukaan dan melekatkan satu sama lain sehingga terbentuklah mikrokoloni. Sel akan tumbuh dan membentuk lapisan yang semakin tebal. Dalam perkembangannya sel-sel bakteri akan memproduksi sinyal kimia yang berfungsi sebagai pembentukan karakteristik biofilm menjadi lebih matang. Biofilm merupakan suatu struktur dinamik dengan sel yang silih berganti meninggalkan komunitasnya (Donlan, 2002). Untuk menghambat pembentukan biofilm maka dibutuhkan antibiofilm yang salah satunya terkandung pada ekstrak buah mahkota dewa.

Pada buah ekstrak mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) terdapat kandungan saponin, polifenol, alkaloid dan flavonoid. Flavonoid memiliki sifat biologis yang berspektrum luas seperti efek antibakteri, antiviral, antiinflamasi, dan juga anti-biofilm (Buenosilva *et al.*, 2013; Nijveldt *et al.*, 2001). Mekanisme kerja dari flavonoid sebagai antibiofilm adalah dengan cara menghancurkan stabilitas biofilm (Marcin Rozalski *et al.*, 2013) dan menghambat enzim pembentuk polisakarida yang merupakan bahan utama matriks ekstraseluler biofilm (Zhi Ren *et al.*, 2016).

### 3.3 Hipotesis Penelitian

Ekstrak flavonoid buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) memiliki efek menghambat pertumbuhan pembentukan biofilm pada *Escherichia coli*.

## BAB 4

## METODE PENELITIAN

## 4.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini adalah *true experimental* untuk mengetahui pengaruh ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) terhadap pembentukan biofilm pada bakteri *Escherichia coli*.

## 4.2 Sampel Penelitian

Populasi dari penelitian ini adalah bakteri *Escherichia coli*. Sampel pada penelitian ini adalah bakteri *Escherichia coli* pembentuk biofilm kultur Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang. Jumlah pengulangan penelitian dihitung dengan rumus sebagai berikut (Gomes, 1996):

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

$$(5-1)(r-1) \geq 20$$

$$4r-4 \geq 20$$

$$4r \geq 24 \rightarrow r \geq 6$$

Keterangan:

r = jumlah *replication* atau pengulangan (6 kali pengulangan)

t = jumlah perlakuan

Berdasarkan hasil perhitungan menggunakan rumus tersebut, minimal harus dilakukan 6 kali pengulangan pada penelitian ini

### 4.3 Variabel Penelitian

Variable pada penelitian ini ada dua yaitu variabel tergantung dan variabel bebas :

#### 4.3.1 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah pembentukan biofilm oleh bakteri *Escherichia coli* yang diukur dengan metode tabung

#### 4.3.2 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian flavonoid ekstrak buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) dengan berbagai konsentrasi.

### 4.4 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Proses membuat *crude extract Phaleria macrocarpa* dilakukan di Materia Medica dan proses maserasi dan pengekstrakan senyawa flavonoid dilakukan di Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang. Lama penelitian selama 4 bulan. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April – Juli 2019.

### 4.5 Definisi Operasional.

1. Ekstrak Mahkota Dewa berupa dalam bentuk serbuk sebanyak 500 gram dari 2,5 kg buah mahkota dewa kemudian dimaserasi dengan pelarut etanol 96%. Lalu dipartisi untuk mendapat flavonoid ekstrak dalam bentuk pasta dengan menggunakan pelarut n-heksana dan etanol. Kemudian dioven agar mendapat ekstrak flavonoid murni dan didapatkan ekstrak flavonoid murni sebanyak 60 mL.
2. Isolat bakteri *Escherichia coli* yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Brawijaya.



3. Biofilm adalah suatu lapisan pada permukaan suatu benda ataupun jaringan makhluk hidup yang terdiri dari bahan utama yaitu bakteri pembentuk biofilm dan *Extracellular Polymeric Substance* (EPS). Pada penelitian ini, biofilm dibentuk oleh *Escherichia coli* dengan medium tabung.
4. Metode tabung adalah metode yang dapat digunakan untuk mendeteksi biofilm dan untuk mengetahui Kadar Hambat Biofilm Minimal (KHBM) dengan menggunakan tabung sebagai medium yang bersifat kualitatif.
5. Kadar Hambat Biofilm Minimal (KHBM) adalah konsentrasi ekstrak flavonoid buah mahkota dewa terendah yang mampu menghambat pembentukan biofilm yang ditandai dengan penipisan lapisan berbentuk cincin dan lapisan berwarna ungu kebiruan yang terdapat pada dinding bagian dalam tabung.
6. *Mean Gray Value* adalah acuan skala intensitas warna yang terdapat pada aplikasi *Adobe Photoshop*. Skala ini berkisar antara 0-255. Angka mendekati 0 menunjukkan bahwa warna tersebut memiliki kepekatan yang tinggi. Sementara angka mendekati 255 menunjukkan kepekatan warna yang rendah (Andriyani, 2014).

#### 4.6 Instrumen Penelitian

##### 4.6.1 Alat dan Bahan

1. Alat yang digunakan antara lain ose, kapas, tabung reaksi, rak tabung, inkubator, vortex, mikroskop, spektrofotometri dan cuvet, timbangan analitik, mikropipet, autoklaf, korek api, spiritus, dan objek glass. Bahan yang digunakan antara lain isolate *Escherichia coli*, media *Eosin Methylene Blue*, DMSO 10%, bahan untuk pengecatan gram (alkohol 96%, kristal

violet, lugol, safranin), minyak imersi, kertas penghisap, aquadest. Alat dan

bahan yang digunakan untuk deteksi biofilm antara lain *Tryptic Soy Broth*

(TSB) + glukosa 10 %, biakan *Escherichia coli*, tabung reaksi, *deionized*

*water*, pipet, ose, inkubator, *beaker glass*, kristal Violet 0.1 %, *phosphate*

*Buffer Saline* (PBS) pH 7.3.

#### 4.7 Operasional Penelitian

##### 4.7.1 Pembuatan Ekstrak Buah Mahkota Dewa

###### 4.7.1.1 Tahap Pengeringan

1. Mengumpulkan buah mahkota dewa yang sudah tua
2. Mencuci buah mahkota dewa untuk menghilangkan kotoran.
3. Menimbang buah mahkota dewa
4. Buah Mahkota Dewa dan kulitnya dipotong kecil-kecil agar proses pengeringan maksimal
5. Seluruh potongan dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 80°C untuk mempercepat pengeringan dan menghambat terjadinya proses enzimatik yang lain.
6. Setelah kering, mahkota dewa digiling untuk dijadikan serbuk, hal ini bertujuan agar menjadi lebih homogen dan mempermudah pelarut untuk masuk kedalam sel.

###### 4.7.1.2 Tahap Ekstraksi

1. Menimbang bubuk Mahkota Dewa
2. Bubuk Mahkota Dewa direndam dengan larutan etanol 70% dalam wadah plastik dan diaduk selama 30 menit. Kemudian didiamkan selama 5 x 24 jam sambil sesekali diaduk.

3. Setelah itu dilakukan penyaringan menggunakan corong buncher agar filtrat terpisah dengan residu.

#### 4.7.1.3 Tahap Evaporasi

1. Melakukan evaporasi menggunakan *rotary evaporator*.
2. Filtrat dimasukan kedalam labu alas bulat. Labu alas bulat kemudian diletakan diatas *waterbath*.
3. Mengatur suhu *waterbath* sesuai suhu pelarut
4. Setelah suhu tercapai, labu alas bulat yang telah ekstrak cair dipasang dengan kuat pada ujung rotor yang menghubungkan kondensor. Aliran air pendingin dan pompa vakum dijalankan, kemudian tombol rotor diputar dengan kecepatan tertentu (5-8putaran).
5. Sehingga dihasilkan esktrak etanol dengan komposisi etanol 50%

#### 4.7.2 Pemisahan Senyawa Flavonoid

##### 4.7.2.1 Partisi dengan n-heksana

1. Ekstrak entanol Mahkota dewa disuspensikan kedalam air
2. Kemudian dimasukan kedalam corong pisah
3. Ditambahkan larutan n-heksana sebanyak 1000 ml kedalam corong pisah
4. Mengocok corong pisah
5. Didiamkan hingga membentuk endapan etanol dan endapan n-heksana
6. Endapan etanol dan endapan n-heksana kemudian ditampung pada wadah yang terpisah
7. Endapan etanol diuapkan kembali dengan suhu  $\pm 45^{\circ}\text{C}$

##### 4.7.2.2 Sentrifugasi

1. Setelah itu disentrifugasi dengan kecepatan 3000rpm selama 10 menit.

2. Hasil endapan n-butanol yang didapatkan dipisah kemudian diuapkan dengan suhu  $\pm 60^{\circ}\text{C}$  sehingga didapatkan ekstrak flavonoid kental (berbentuk pasta).

#### 4.7.3 Identifikasi *Escherichia coli*

##### A. Identifikasi Koloni pada Eosin Methylene Blue (EMB)

1. Coretkan isolate *Escherichia coli* dengan metode *quadrant streak* pada medium *Eosin Methylene Blue* (EMB)
2. Kemudian diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 16-24 jam
3. Diamati bentuk koloni nya pada *Escherichia coli* koloni akan tampak berwarna hijau metalik

##### B. Pewarnaan Gram

1. *Object glass* dibersihkan dengan kapas, kemudian dilewatkan di atas api dan dibiarkan menjadi dingin
2. Mengambil aquades menggunakan oase yang telah dipanaskan dan membuat hapusan pada *object glass*
3. Mengambil isolate *Escherichia coli* dari eosin methylene blue menggunakan oase dengan oase yang telah dipanaskan
4. Membuat hapusan *Escherichia coli* pada *object glass*
5. Memfiksasi *object glass* di atas api Bunsen.
6. Meneteskan kristal violet di atas hapusan selama 1 menit. Bilas dengan aquades
7. Meneteskan lugol di atas hapusan selama 1 menit. Bilas dengan aquades
8. Meneteskan alkohol 96% di atas hapusan selama 5-10 detik. Bilas dengan aquades

9. Meneteskan safranin di atas hapusan selama 30 detik. Bilas dengan aquades

10. Mengeringkan *object glass* menggunakan tisu secara perlahan

11. Melihat preparat dibawah mikroskop dengan perbesaran total

40x,100x, dan 1000x (menggunakan minyak emersi)

12. Akan diperoleh hasil gram positif yang ditandai dengan koloni

bakteri berwarna ungu atau bakteri gram negatif yang ditandai

dengan koloni bakteri berwarna merah. Pada bakteri *Escherichia*

*coli* akan tampak warna merah.

### C. Uji Oksidase

1. Coretkan isolate *Escherichia coli* pada ujung kertas oksidase

2. Kemudian amati perubahan warna yang terjadi pada kertas oksidase

3. Oksidase positif ditandai dengan perubahan warna kertas menjadi kebiruan sedangkan oksidase negatif ditandai dengan tidak adanya perubahan warna pada kertas oksidase. Pada bakteri *Escherichia coli* akan tampak tidak ada perubahan warna pada kertas oksidase.

#### 4.7.4 Pembuatan Pembenuhan Cair Bakteri

1. Menyiapkan bakteri *Escherichia coli* pada medium nutrient agar plate yang sudah dikonfirmasi bakterinya.

2. Melakukan penilaian kepadatan perbenihan cairan bakteri dengan spektrofotometer pada gelombang cahaya 625 nm

3. Mendapatkan konsentrasi bakteri sebesar  $10^8$  CFU/mL setara dengan

*Optical Density* (OD) sebesar 0,1, kemudian perhitungan dilakukan menggunakan rumus :

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

Keterangan:

$N_1$  = OD bakteri hasil spektrofotometri

$N_2$  = OD bakteri dengan kepadatan  $1 \times 10^8$  bakteri/ml

$V_1$  = volume bakteri dengan pengencer

$V_2$  = volume suspensi bakteri (10 mL)

#### 4.7.5 Uji Deteksi Pembentukan Biofilm (Metode Tabung)

Ambil satu loop bakteri yang telah dikultur sebelumnya kemudian inokulasi bersama *Tryptic Soy Broth with glucose* (TSBglu) 10 milliliter dan glukosa 10% selama 24 jam pada  $37^\circ\text{C}$  dalam *test tube*. Buang isi tabung dan cuci dengan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) (pH 7.3) lalu keringkan. Tabung yang telah kering diwarnai dengan kristal violet 0.1 % selama 15 menit. Kemudian pewarna dibuang dan tabung dicuci dengan *deionized water* dan dikeringkan dengan posisi terbalik. Positif terbentuk biofilm apabila suatu lapisan film melapisi dinding dan dasar tube. Periksa tube dan jumlah terbentuknya biofilm dan dinilai dengan skor 0-tidak ada, 1-lemah, 2-sedang, atau 3-kuat. (Mathur *et al.*, 2006; Ruchi *et al.*, 2015).

#### 4.7.6 Uji Hambat Pembentukan Biofilm pada *Escherichia coli*

1. Menyiapkan perbenihan cair bakteri dengan konsentrasi  $10^8$  bakteri/mL.
2. Membuat suspensi bakteri dalam medium TSB + glukosa 10% berdasarkan perhitungan OD dari spektrofotometri.

3. Mengisi tabung reaksi nomor 2-5 dengan suspensi bakteri dalam medium

TSBglu sebanyak 2mL, dan tabung nomor 1 sebagai kontrol diisi 4mL.

4. Mengambil 6 mL flavonoid ekstrak buah mahkota dewa dan dilarutkan dalam larutan DMSO 10% sebanyak 6 mL.

5. Untuk mendapatkan jumlah konsentrasi yang diinginkan maka dihitung menggunakan rumus  $N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$

6. Kemudian 2 mL larutan flavonoid dicampurkan dalam tabung reaksi nomor 2-5 sedangkan tabung nomor 1 tanpa pemberian ekstrak flavonoid sehingga didapatkan larutan sebanyak 4mL untuk semua tabung dengan konsentrasi ekstrak flavonoid buah mahkota dewa pada masing-masing tabung sebagai berikut:

Tabung 1: 0% (kontrol)

Tabung 4: 3.125%

Tabung 2: 0.8375%

Tabung 5: 6.25%

Tabung 3: 1.675%

7. Seluruh tabung diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C.
8. Setelah 24 jam, tabung dikeluarkan dari inkubator dan dicuci dengan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) yang memiliki pH 7,3, kemudian dikeringkan.

9. Tabung yang telah kering diberi kristal violet (0,1%) lalu ditunggu 15 menit kemudian pewarna dibuang dan tabung dibilas dengan menggunakan *deionized water* dengan sedikit dikocok agar ekstrak flavonoid yang menempel juga ikut terbang.

10. Tabung dikeringkan dan diamati.

Amati dan catat biobfilm yang terbentuk berupa adanya lapisan film yang melapisi dinding tube (Ruchi *et al.*, 2015)

#### 4.7.7 Pengukuran Mean Gray Value

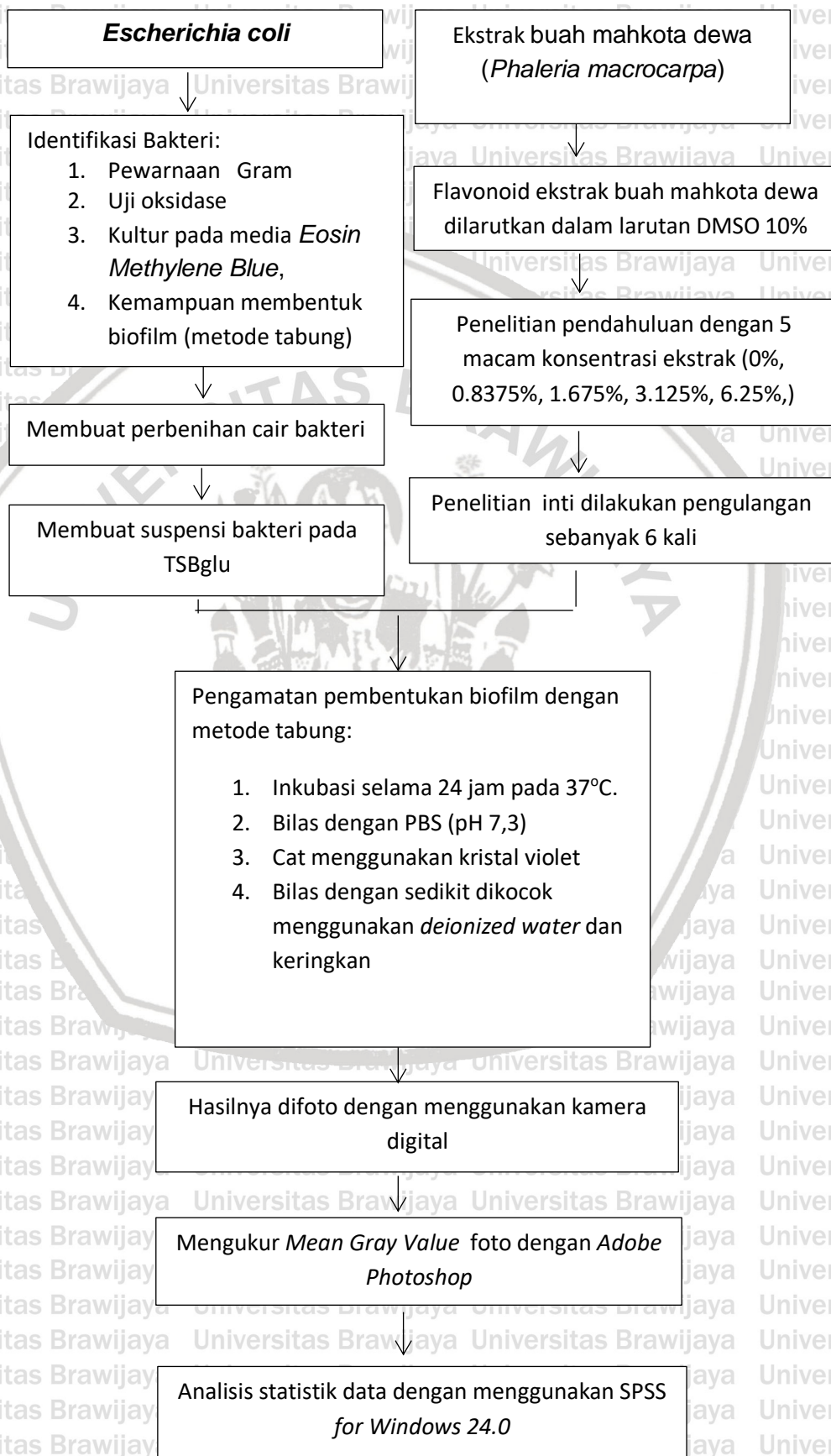
Hasil pembentukan biofilm kemudian difoto dengan kamera. Foto yang didapat dibandingkan ketebalan biofilmnya dengan melihat intensitas kepekatan warnanya menggunakan aplikasi *Adobe Photoshop* dengan opsi *Mean Gray Value*. *Mean Gray Value* dapat membedakan intensitas kepekatan warna dari skala 0 (kepekatan tertinggi) – 255 (kepekatan terendah). Langkah-langkahnya dimulai dengan membuka aplikasi *Adobe Photoshop*, 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 kepekatan warna pada tabung (Andiyani, 2013)

#### 4.8 Analisis Data

Analisis hasil penelitian menggunakan analisis statistik SPSS versi 15.0 untuk *Windows*. Langkah pertama, hasil *Mean Gray Value* yang didapat akan dianalisis dengan menggunakan Uji *Shapiro Wilk*. Uji ini merupakan bagian dari metode pengujian normalitas suatu distribusi data. Uji normalitas data adalah hal yang perlu dilakukan sebelum sebuah metode statistik. 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 data ini berguna untuk mengetahui konsentrasi dari ekstrak buah mahkota dewa terhadap ketebalan yang dideteksi melalui *Mean Gray Value*. Kemudian analisis data menggunakan *One-Way ANOVA* dalam program SPSS (*Statistical Product of Service Solution* versi 13.0 (Dahlan, 2009))



4.9 Alur Penelitian Bagan 4.1 Rancangan Operasional



## BAB 5

### HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

#### 5.1 Hasil Penelitian

##### 5.1.1 Hasil Identifikasi Bakteri

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Escherichia coli*.

Identifikasi dimulai dengan penanaman pada media *Eosin Methylene Blue*

Agar, pewarnaan gram, dan uji oksidase. Perbenihan pada media EMB

menunjukkan hasil dengan koloni bakteri berwarna *green metallic sheen*, seperti

yang terlihat pada **Gambar 5.1** Sesuai dengan tinjauan pustaka yang telah

dilakukan bahwa bakteri *Escherichia coli* secara spesifik tumbuh dengan warna

*green metallic sheen* pada EMB. Pewarnaan Gram untuk bakteri *Escherichia coli*

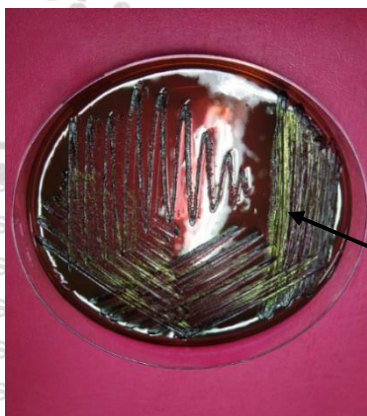
menunjukkan hasil gram negatif dengan bentuk batang, hasil dapat dilihat pada

**Gambar 5.2**. Uji oksidase yang telah dilakukan menunjukkan bahwa hapusan

bakteri *Escherichia coli* pada kertas oksidase tidak mengalami perubahan warna

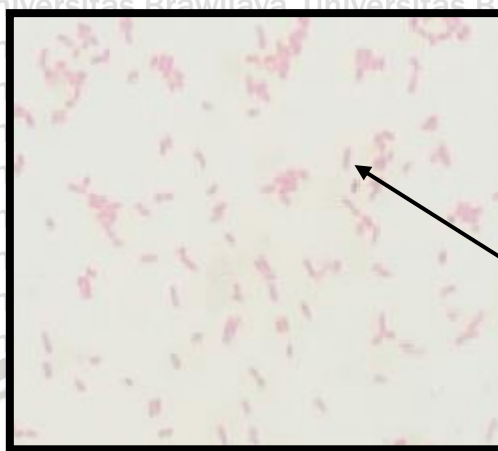
yang artinya uji oksidase untuk *Escherichia coli* adalah negatif. Hasil dapat dilihat

pada **Gambar 5.3**



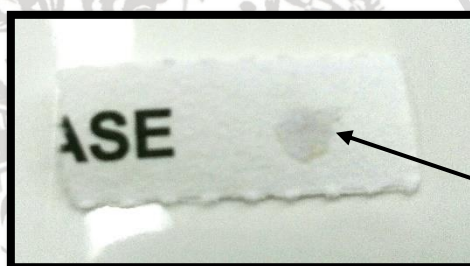
**Gambar 5.1 Hasil Kultur Bakteri *E.coli* pada media EMB**

Keterangan: Tanda panah merupakan koloni bakteri *Escherichia coli* yang berwarna *green metallic sheen* pada media EM



**Gambar 5.2 Hasil Pewarnaan Gram pada Bakteri *Escherichia coli***

Keterangan: Tanda panah menunjukkan bakteri gram negatif dengan bentuk batang pendek dan berwarna merah



**Gambar 5.3 Hasil Uji Oksidase pada Bakteri *Escherichia coli***

Keterangan: Tanda panah menunjukkan hasil uji oksidase *Escherichia coli* pada kertas oksidase bakteri yang tidak ada perubahan warna

### 5.1.2 Hasil Flavonoid Ekstrak Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*)

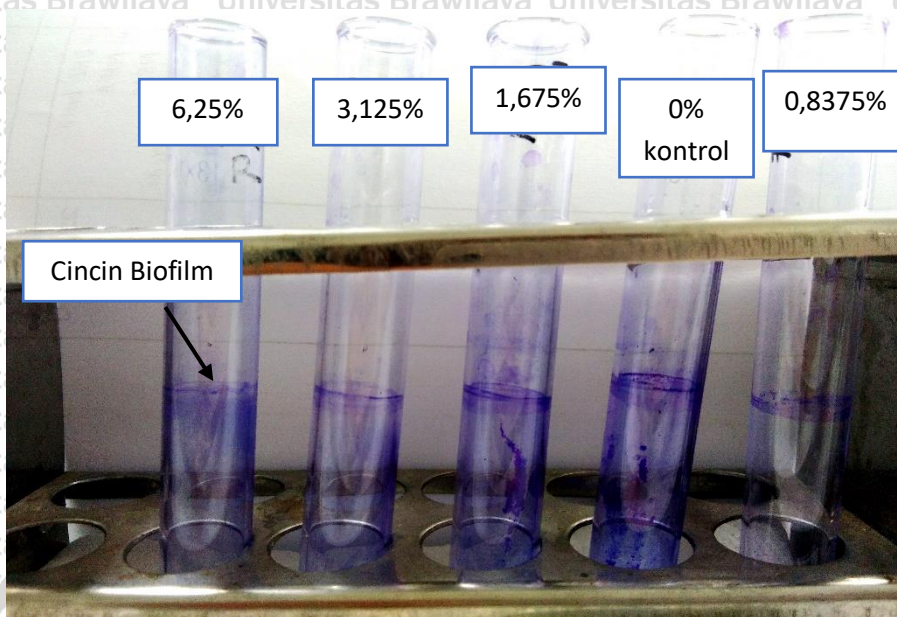
Pembuatan flavonoid ekstrak buah mahkota dewa menggunakan tahapan ekstraksi, evaporasi, pemisahan senyawa flavonoid menggunakan partisi dengan n-heksana, dan sentrifugasi sehingga didapatkan flavonoid ekstrak buah mahkota dewa yang kental seperti pasta dan berwarna kecoklatan.



**Gambar 5.4 Hasil Flavonoid Ekstrak Buah Mahkota Dewa (*Phaleria maacroparpa*)**

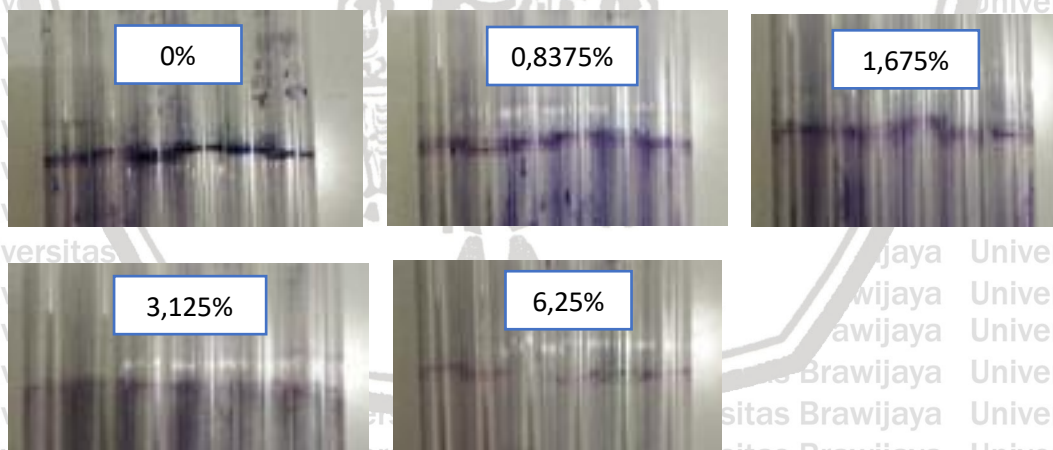
### 5.1.3 Hasil Uji Hambat Pembentukan Biofilm

Konsentrasi yang akan digunakan pada penelitian sesungguhnya berasal dari penelitian sebelumnya oleh Ng Yik Hean 2015 mengenai efek antibiofilm pada buah mahkota dewa terhadap *streptococcus mutans* dengan KHBM 3,91 mg/mL, maka selanjutnya dilakukan uji pendahuluan dengan konsentrasi 0%; 0.8375%; 1.675%; 3.125% dan 6.25%. Hasil dari uji pendahuluan menunjukkan bahwa sudah terdapat perbedaan ketebalan cincin biofilm pada area *airfluid border* dan cincin paling tipis pada konsentrasi 6.25%. Sehingga konsentrasi pada penelitian pendahuluan dapat digunakan pada penelitian sesungguhnya yaitu 0%; 0.8375%; 1.675%; 3.125% dan 6.25%. Dimana 0% merupakan kelompok kontrol tanpa pemberian flavonoid. Hasil penelitian pendahuluan seperti pada **Gambar 5.5**.



**Gambar 5.5 Hasil Penelitian Pendahuluan**

Pengamatan kerapatan warna ungu berbentuk cincin pada *airfluid border* dari hasil pengulangan penelitian sesungguhnya, hasil penelitian sesungguhnya dapat dilihat pada **Gambar 5.6**.



**Gambar 5.6 Hasil Penelitian Sesungguhnya**

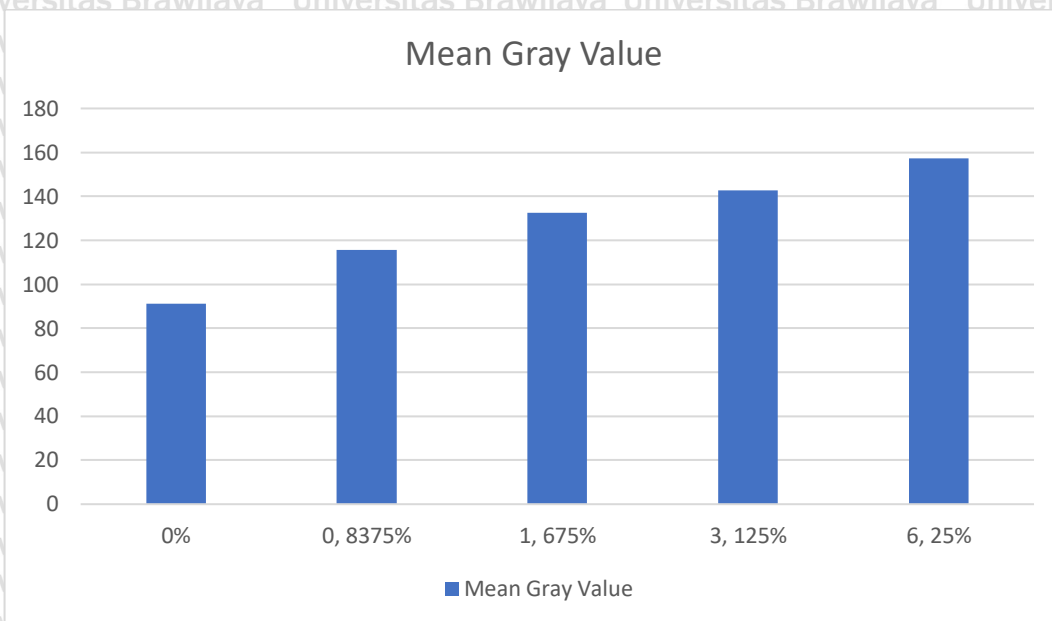
Gambaran cincin tersebut menandakan terbentuknya biofilm bakteri. Dari hasil foto diatas kemudian dilakukan penghitungan *Mean Gray Value* menggunakan aplikasi *Adobe Photoshop CS6* dan hasilnya dinyatakan dalam skala 0-225. Dimana skala 0 adalah kerapatan tertinggi dan skala 255 adalah kerapatan terendah. Untuk

menentukan Kadar Hambat Biofilm Minimal maka dilakukan penilaian *Mean Gray Value* pada tabung kosong yang masih baru. Nilai *Mean Gray Value* pada tabung kosong tersebut adalah 170,202 . Dari nilai *Mean Gray Value* tersebut maka dapat ditentukan nilai KHBM yaitu sebesar 153,18 (10% lebih kecil dari nilai *Mean Gray Value* tabung kosong 170,202). Nilai ini kemudian dibandingkan dengan *nilai Mean Gray Value* kelompok perlakuan, seperti terlihat pada **Tabel 5.1** serta grafik pengukuran *Mean Gray Value* pada **Gambar 5.7**

**Tabel 5.1 Hasil Pengukuran Mean Gray Value dengan Aplikasi Adobe Photoshop CS6**

Konsentrasi Flavonoid	Pengulangan						Mean ± SD
	I	II	III	IV	V	VI	
0%	81,78	87,98	96,31	92,48	96,89	92,41	91,31 ± 5,17
0, 8375%	112,13	112,46	113,42	119,26	117,53	118,42	115,53 ± 2,93
1, 675%	137,02	131,49	133,15	127,92	135,78	129,52	132,48 ± 3,22
3, 125%	141,13	143,786	144,58	147,43	139,60	139,47	142,65 ± 2,87
6, 25 %	154,28	156,04	151,92	166,97	159,66	155,21	157,35 ± 4,88
Mean Gray Value Tabung Kosong	170, 20						

Keterangan: Semakin kecil nilai *Mean Gray Value* menunjukkan biofilm lebih tebal. Begitu juga sebaliknya, nilai *Mean Gray Value* yang tinggi berarti cincin biofilm lebih tipis. Kadar hambatan biofilm minimal dicapai bila hasil rata-rata *Mean Gray Value* 10% lebih rendah dari *Mean Gray Value* tabung kosong, yaitu 153,18 (90% dari 170,20). Dapat dilihat bahwa KHBM penelitian ini adalah pada konsentrasi 6, 25% yang mempunyai rerata *Mean Gray Value* 157, 35.



**Gambar 5.7 Grafik pengukuran Mean Gray Value**

Keterangan: Semakin besar konsentrasi ekstrak maka semakin besar Mean Gray Value yang didapat. Hal ini menandakan bahwa semakin besar konsentrasi ekstrak, semakin tipis cincin biofilm yang terbentuk dan pembentukan biofilm makin terhambat

### 5.2 Analisis Data

Pada penelitian ini menggunakan analisa data dengan SPSS for Windows versi 24.0. Pertama, hasil dari MGV seperti pada **Table 5.2** dilakukan uji Normalitas dengan metode *Shapiro-Wilk*, dan Uji Homogenitas dengan *Levene test* untuk menentukan uji apa yang dapat digunakan selanjutnya. Setelah didapatkan bahwa data normal dan homogen dilanjutkan dengan uji komparatif menggunakan Uji *Oneway Anova* untuk mengetahui apakah ada perbedaan yang signifikan antar kelompok data. Selanjutnya dilakukan Uji *Post Hoc* menggunakan metode *Tukey* untuk melihat signifikansi suatu kelompok data dengan kelompok lainnya. Selanjutnya dilakukan Uji Korelasi *Pearson* untuk mengetahui hubungan antar variable dependen dan independen, yaitu hubungan konsentrasi flavonoid ekstrak Buah Mahkota Dewa yang diberikan terhadap ketebalan biofilm.

### 5.2.1 Uji Normalitas dan Homogenitas

Dilakukan dengan metode *Shapiro wilk* karena jumlah data kurang dari 50.

Dari hasil Uji Normalitas didapatkan  $p > 0,05$  pada semua konsentrasi dan pada

Uji Homogenitas juga didapatkan  $p > 0,05$  sehingga dapat dikatakan bahwa

persebaran data normal dan homogen (syarat untuk persebaran data normalitas

$p > 0,05$  dan syarat homogenitas  $p > 0,05$ ). Hasil menunjukkan data terdistribusi

secara normal dan homogen sehingga data selanjutnya dapat dilakukan Uji *One-*

*way ANOVA*.

**Tabel 5.2 Hasil Uji Normalitas dan Uji Homogenitas**

	0%	0,8375%	1,675%	3,125%	6,25%
<b>Normalitas (Shapiro Wilk)</b>	<b>0,407</b>	<b>0,153</b>	<b>0,838</b>	<b>0,474</b>	<b>0,298</b>
<b>Homogenitas (Levene)</b>	<b>0,602</b>				

Keterangan: Hasil *Mean Gray Value* pada Uji Normalitas dan Uji Homogenitas menunjukkan nilai  $p > 0,05$  yang artinya data terdistribusi normal dan homogen.

### 5.2.2 Uji *One-Way Anova*

Tujuan dari uji *One-way Anova* adalah untuk mengetahui adanya

perbedaan pemberian berbagai konsentrasi flavonoid ekstrak Buah Mahkota

Dewa terhadap nilai MGV. Dari hasil Uji *One-way ANOVA* diperoleh  $p = 0,000$

sehingga dapat disimpulkan bahwa data yang memiliki perbedaan MGV signifikan

(syarat  $p < 0,05$ ). Hasil lebih rinci terdapat pada **Lampiran 1**.

### 5.2.3 Uji *Post Hoc Tukey*

Tujuan Uji *Post Hoc Tukey Test* untuk mengetahui perbandingan dua

sampel (antara kelompok konsentrasi dan kelompok kontrol serta antar kelompok

konsentrasi). Pada Homogenous Subsets yang terdapat pada hasil uji *Post*

*Hoc Tukey* didapatkan konsentrasi 0% dan 0.8375% berada pada *subset* pertama,



yang berarti kedua perlakuan tersebut tidak memiliki perbedaan yang signifikan.

Sedangkan konsentrasi 1.675% berada pada *subset* kedua, konsentrasi 3.125% berada pada *subset* ketiga, dan konsentrasi 6.25% berada pada *subset* keempat.

Nilai *Mean Grey Value* pada perlakuan dengan konsentrasi 1.675%, 3.125% dan 6.25% signifikan terhadap perlakuan dengan konsentrasi lainnya. Hasil lebih rinci terdapat pada **Lampiran 2**.

#### 5.2.4 Uji Korelasi Pearson

Uji Korelasi *Pearson* dilakukan untuk menilai hubungan antara peningkatan konsentrasi flavonoid ekstrak Buah Mahkota Dewa dengan MGV tabung perlakuan. Hasil signifikan ditunjukkan dengan  $p < 0,05$ . Adapun klasifikasi dari nilai korelasi *Pearson* sebagai berikut (Sugiyono, 2007):

Nilai Korelasi 0 – 0,199 = sangat rendah

Nilai Korelasi 0,200 – 0,399 = rendah

Nilai Korelasi 0,400 – 0,599 = sedang

Nilai Korelasi 0,600 – 0,799 = kuat

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

Berdasarkan uji yang telah dilakukan, didapatkan hasil nilai signifikansi 0,000 dan nilai korelasi 0,973. Dari hasil tersebut didapatkan kesimpulan sebagai berikut:

1. Nilai  $p = 0,000$ , menunjukkan korelasi yang signifikan antara konsentrasi flavonoid ekstrak buah mahkota dewa dengan Mean Gray Value.
2. Nilai korelasi ( $r$ ) = 0,973, berarti korelasi antara konsentrasi flavonoid ekstrak buah mahkota dewa dengan Mean Gray Value sangat kuat.

3. Nilai korelasi positif, jadi dapat disimpulkan semakin tinggi konsentrasi flavonoid ekstrak Buah Mahkota Dewa, semakin tinggi pula nilai *Mean Gray Value* yang menandakan semakin tipis cincin biofilm yang terbentuk.

Hasil lebih rinci terdapat pada **Lampiran 3**.



## BAB 6

## PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek yang ditimbulkan dari flavonoid ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) sebagai penghambat pembentukan biofilm pada *Escherichia coli* secara *in vitro* dengan menggunakan metode tabung. Bakteri yang akan digunakan ditanam pada media *Nutrient Agar Plate*. Sedangkan kandungan flavonoid ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) diproses melalui proses ekstraksi yaitu mulai dari maserasi dengan pelarut etanol 96% kemudian partisi dengan pelarut n-heksana (Hendra, 2011).

Berdasarkan penelitian oleh More *et al.* (2019), flavonoid mampu menghambat pembentukan biofilm. Mekanisme menghambat pembentukan biofilm dengan cara menghancurkan stabilitas biofilm (Marcin Rozalski *et al.*, 2013) dan menghambat enzim pembentuk polisakarida yang merupakan bahan utama matriks ekstraseluler biofilm (Zhi Ren *et al.*, 2016). Berdasarkan dasar teori tersebut, flavonoid ekstrak buah mahkota dewa dapat menghambat pembentukan biofilm bakteri.

Uji hambat pembentukan biofilm pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode tabung (*tube test*). Pengamatan pembentukan biofilm secara kualitatif dan Kadar Hambat Biofilm Minimal (KHBM) dapat diketahui dengan mengamati adanya bentukan cincin yang berwarna keunguan pada dinding tabung. Sedangkan pengamatan biofilm secara kuantitatif dilakukan dengan melakukan pengukuran pada intensitas warna yang dinyatakan dalam Mean Gray Value (MGV) dengan menggunakan *Adobe Photoshop CS6*. Pada Mean Gray Value akan didapatkan nilai, antara 0-255 dimana 0 merupakan

kepapatan tertinggi (Biofilm sedikit / tidak terhambat) dan 255 merupakan kepapatan terendah (Biofilm banyak terhambat).

Uji pendahuluan dilakukan terlebih dahulu untuk menentukan konsentrasi yang akan digunakan untuk penelitian sesungguhnya. Konsentrasi yang digunakan adalah 0%; 0,8375%; 1,672%; 3,125%, dan 6,25%. Hasil uji pendahuluan menunjukkan bahwa pada konsentrasi 6,25% telah terjadi penipisan cincin biofilm yang sangat terlihat pada area *airfluid border*. Berdasarkan uji pendahuluan tersebut, konsentrasi yang digunakan dalam penelitian sesungguhnya adalah 0% (kontrol); 0,8375%; 1,672%; 3,125%, dan 6,25%.

Penelitian inti dilakukan menggunakan metode tabung dengan enam kali pengulangan.

Untuk mencari besar Kadar Hambat Biofilm Minimal (KHBM) dan konsentrasi yang efektif untuk menghambat biofilm dengan analisa statistik. Hasil penelitian selanjutnya didokumentasikan dan dilakukan pengukuran MGV dengan *Adobe Photoshop CS6*. Hasil pengukuran MGV menunjukkan bahwa rata-rata MGV naik seiring dengan peningkatan konsentrasi flavonoid. Hal tersebut membuktikan bahwa biofilm yang terbentuk semakin tipis yang menandakan pembentukan biofilm *Escherichia coli* terhambat. Rata-rata MGV tiap konsentrasi akan dibandingkan dengan MGV tabung kosong. Kadar Hambat Biofilm Minimal (KHBM) dicapai apabila hasil MGV 10% dibawah MGV tabung kosong (Macia *et al.*, 2014). Dalam penelitian ini didapatkan KHBM yaitu 153,18 nilai tersebut dicapai pada konsentrasi flavonoid 6,25%.

Penelitian ini sesuai dengan penelitian lain yang diantaranya dilakukan oleh Ng Yik Hean *et al* (2015) mengenai efek antibiofilm dan antiadhesi dari ekstrak

*Phaleria macrocarpa* terhadap bakteri *Streptococcus mutans* dengan KHBM 3,91 mg/mL, sehingga dapat menghambat terbentuknya karies gigi.

Faktor *confounding* dalam penelitian ini diantaranya adalah penggunaan flavonoid yang dapat menyebabkan zat warna akan melekat pada tabung sehingga pembacaan *mean gray value* menjadi sulit. Keterbatasan lainnya adalah belum diketahuinya hubungan lama penyimpanan flavonoid terhadap efektivitas flavonoid ekstrak buah mahkota dewa sebagai penghambat pembentukan biofilm *Escherichia coli*, dan pengamatan biofilm yang hanya pada saat setelah inkubasi saja sehingga tidak diketahui proses terbentuknya biofilm.



## BAB 7

## PENUTUP

## 7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil pemberian flavonoid ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) terhadap pembentukan biofilm bakteri *Escherichia coli*, dapat disimpulkan bahwa:

- a. Flavonoid ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) memiliki efek menghambat pembentukan biofilm bakteri *Escherichia coli* secara *in vitro*.
- b. Semakin tinggi konsentrasi Flavonoid ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*), semakin besar daya hambat pembentukan biofilm bakteri *Escherichia coli*.
- c. Kadar Hambat Biofilm Minimum (KHBM) yang didapatkan dalam penelitian ini ialah pada konsentrasi 6,25%

## 7.2 Saran

Adapun saran yang dapat peneliti berikan dari penelitian ini adalah:

- a. Penelitian lebih lanjut mengenai zat aktif selain flavonoid yang terkandung dalam ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*), yang dapat berperan sebagai penghambat pembentukan biofilm.
- b. Penelitian lebih lanjut mengenai standarisasi waktu yang diperlukan untuk penyimpanan flavonoid ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*)
- c. Penelitian lebih lanjut mengenai uji toksisitas dari flavonoid ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*).

## DAFTAR PUSTAKA

Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M. F., & Di Ilio, C. 2013. Escherichia coli in Europe: an overview. *International journal of environmental research and public health*, 10(12), 6235-6254.

Altaf, R., Asmawi, M. Z. B., Dewa, A., Sadikun, A., & Umar, M. I. 2013. Phytochemistry and medicinal properties of Phaleria macrocarpa (Scheff.) Boerl. extracts. *Pharmacognosy reviews*, 7(13), 73.

Burton, G. R. W., & Engelkirk, P. G. 2004. Microbiology: The Science. *Microbiology for the Health Sciences*, 1-4.

Carroll, K. C., Butel, J., & Morse, S. 2016. *Jawetz Melnick and Adelbergs Medical Microbiology 27 E*. McGraw-Hill Education.

Deka, N. 2014. Comparison of Tissue Culture plate method, Tube Method and Congo Red Agar Method for the detection of biofilm formation by Coagulase Negative Staphylococcus isolated from Non-clinical Isolates. *International journal of current microbiology and applied sciences*, 3(10), 810-815.

Epstein, L., Hunter, J. C., Arwady, M. A., Tsai, V., Stein, L., Gribogiannis, M & Pacilli, M. 2014. New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-producing carbapenem-resistant Escherichia coli associated with exposure to duodenoscopes. *Jama*, 312(14), 1447-1455.

Homenta, H. 2016. Infeksi biofilm bakterial. *Jurnal e-Biomedik*, 4(1).

Hotchandani, R., & Aggarwal, K. K. 2012. Urinary Tract Infections in Women

Islam, M. M., Islam, M. N., Sharifuzzaman, F. M., Rahman, M. A., Sharifuzzaman,

J. U., Sarker, E. H., & Sharifuzzaman, M. M. 2014. Isolation and identification of *Escherichia coli* and *Salmonella* from poultry litter and feed. *Int J Nat Soc Sci*, 1(1), 1-7.

Kaiser, T. D. L., Pereira, E. M., dos Santos, K. R. N., Maciel, E. L. N., Schuenck,

R. P., & Nunes, A. P. F. 2013. Modification of the Congo red agar method to detect biofilm production by *Staphylococcus epidermidis*. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 75(3), 235-239.

Kesarkar, S., Bhandage, A., Deshmukh, S., Shevkar, K., & Abhyankar, M. 2009.

Flavonoids: an overview. *J. Pharm. Res*, 2(6), 1148-1154.

Kudinha, T. 2017. The pathogenesis of *Escherichia coli* urinary tract infection.

In *Escherichia coli-Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications*. IntechOpen

Marlina, D., Kurniati, M., Hamid, F., Larasathi, F., & Irnawita, F. 2018. Visualisasi

Matriks Biofilm *Escherichia coli* dengan Media Bacteriological Peptone, Sucrose dan Ethanol. *Jurnal Kesehatan*, 9(1), 26-32

Melliawati, R. 2009. *Escherichia coli* in human life. *Bio Trends*, 4(1), 10-14

Mohamed Mahzir, K., Abd Gani, S., Hasanah Zaidan, U., & Halmi, M. 2018.

Development of *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl Fruits using response surface methodology focused on phenolics, flavonoids and antioxidant properties. *Molecules*, 23(4), 724.



Noor, R., Islam, Z., Munshi, S. K., & Rahman, F. 2013. Influence of temperature

on *Escherichia coli* growth in different culture media. *J Pure Appl Microbiol*, 7(2), 899-904.

Noviana, H. 2004. Pola Kepekaan Antibiotika *Escherichia coli* yang Di isolasi dari Berbagai Spesimen Klinis. *Jurnal kedokteran trisakti*, 23(4), 122-126.

Z., Chen, L., Li, J., & Li, Y. 2016. Inhibition of *Streptococcus mutans* polysaccharide synthesis by molecules targeting glycosyltransferase activity. *Journal of oral microbiology*, 8(1), 31095.

Rozalski, M., Micota, B., Sadowska, B., Stochmal, A., Jedrejek, D., Wieckowska-

Szakiel, M., & Rozalska, B. 2013. Antiadherent and antibiofilm activity of *Humulus lupulus* L. derived products: new pharmacological properties. *BioMed research international*, 2013.

Seputra, K., Tarmono, N., Mochtar, C. A., Wahyudi, I., & Renaldo, J. 2015.

Guideline Penatalaksanaan Infeksi Saluran Kemih dan Genitalia Pria 2015. *Ikatan Ahli Urologi Indonesia*. Surabaya, 7-10.

Seta, I., & Rizka, R. 2015. Pola Kepekaan Bakteri Penyebab Infeksi Saluran

Kemih pada Anak Terhadap Antimikroba. *Majalah Kedokteran Sriwijaya*, 47(2), 85-90.

Tandari, A. D., Kuswandi, M., Yuliani, R., & St, M. B. (2016). *Pola Resistensi*

*Bakteri terhadap Antibiotik pada Penderita Infeksi Saluran Kemih (ISK) di RSUP Dr. Soeradji Tirtonegoro Klaten Periode Januari 2013-September 2015* (Doctoral dissertation, Universitas Muhammadiyah Surakarta).

Thomas, T. A. 2017. Theodor Schwann: A founding father of biology and

medicine. *Current Medical Issues*, 15(4), 299

Triveda, L., & Gomathi, S. 2016. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Enterococci: An evaluation of three different screening methods. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(3), 643-650.

Turan, N. B., Chormey, D. S., Büyükpınar, Ç., Engin, G. O., & Bakirdere, S. 2017. Quorum sensing: little talks for an effective bacterial coordination. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 91, 1-11.

Sharma, G., Sharma, S., Sharma, P., Chandola, D., Dang, S., Gupta, S., & Gabrani, R. 2016. Escherichia coli biofilm: development and therapeutic strategies. *Journal of applied microbiology*, 121(2), 309-319.

