

**UJI EFEKTIFITAS FLAVONOID EKSTRAK BUAH MAHKOTA DEWA
(*Phaleria macrocarpa*) SEBAGAI PENGHAMBAT PEMBENTUKAN BIOFILM
Pseudomonas aeruginosa SECARA *IN VITRO***

TUGAS AKHIR
Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran



Oleh:
Kevin Marcello Chandra
NIM: 165070100111036

PROGRAM STUDI S1 PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019

DAFTAR ISI

Halaman

JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	iii
KATA PENGANTAR	iv
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
DAFTAR SINGKATAN	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.3.1 Tujuan Umum	3
1.3.2 Tujuan Khusus	3
1.4 Manfaat Penelitian	3
1.4.1 Manfaat Akademis	3
1.4.2 Manfaat Praktis	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5
2.1.1 Taksonomi <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5
2.1.2 Morfologi <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5
2.2 Biofilm.....	7
2.2.1 Mekanisme Pembentukan Biofilm	8
2.3 Mahkota Dewa (<i>Phaleria macrocarpa</i>).....	9
2.3.1 Taksonomi Mahkota Dewa (<i>Phaleria macrocarpa</i>)... ..	9
2.3.2 Morfologi Mahkota Dewa (<i>Phaleria macrocarpa</i>).....	10
2.3.3 Kandungan Mahkota Dewa (<i>Phaleria macrocarpa</i>)	11
2.3.4 Mahkota Dewa sebagai Antibiofilm (<i>Phaleria macrocarpa</i>).....	12
2.3.4.1 Flavonoid	12
2.4 Metode Ekstraksi	13
2.4.1 Macam-Macam Metode Ekstraksi	13
2.4.1.1 Maserasi	13
2.4.1.2 Perkolasi	13
2.4.1.3 Refluks.....	13

2.4.1.4 Sokletasi	13
2.4.1.5 Infundasi	14
2.5 Pemisahan Senyawa (Kromatografi).....	14
2.5.1 Partisi Cair	14
2.5.2 Sentrifugasi	14
2.6 Uji Hambat Pembentukan Biofilm.....	15
2.6.1 Metode Dilusi Tabung	15
2.6.2 Metode <i>Congo Red Agar</i>	15

BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	17
3.1 Kerangka Konsep	17
3.2 Hipotesis Penelitian	18

BAB IV METODE PENELITIAN	19
4.1 Rancangan Penelitian	19
4.2 Sampel Penelitian	19
4.3 Variabel Penelitian	19
4.3.1 Variabel Terikat.....	19
4.3.2 Variabel Bebas.....	20
4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian	20
4.5 Definisi Operasional.....	20
4.6 Instrumen Penelitian	21
4.6.1 Alat	21
4.6.2 Bahan	22
4.7 Operasional Penelitian	22
4.7.1 Pembuatan Ekstrak Buah Mahkota Dewa	22
4.7.1.1 Tahap Pengeringan.....	22
4.7.1.2 Tahap Ekstraksi	22
4.7.1.3 Tahap Evaporasi.....	22
4.7.2 Pemisahan Senyawa Flavonoid	23
4.7.2.1 Partisi dengan n-heksana	23
4.7.3 Identifikasi <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	23
4.7.3.1 Identifikasi Koloni pada Nutrient Agar	23
4.7.3.2 Pewarnaan Gram.....	23
4.7.3.3 Uji Oksidase.....	24
4.7.3.4 Uji Fermentasi Laktosa	24
4.7.4 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji.....	24
4.7.5 Uji Hambat Pembentukan Biofilm <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
4.7.6 Pengukuran Mean Gray Value	27
4.8 Alur Kerja Penelitian	29
4.9 Analisis Data.....	30

BAB V HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA	31
5.1 Hasil Penelitian	31
5.1.1 Hasil Ekstraksi Flavonoid Mahkota Dewa.....	31

5.1.2 Hasil Identifikasi Bakteri Uji	31
5.1.3 Hasil Uji Hambat Pembentukan Biofilm	33
5.1.3.1 Uji Pendahuluan.....	33
5.1.3.2 Uji Hambat Pembentukan Biofilm.....	34
5.2 Analisis Data.....	36
5.2.1 Uji Normalitas dan Uji Homogenitas.....	36
5.2.2 Uji <i>Oneway ANOVA</i>	36
5.2.3 Uji <i>Post-Hoc Tukey</i>	37
5.2.4 Uji Korelasi <i>Pearson</i>	37
BAB VI PEMBAHASAN	38
6.1 Ekstraksi Buah Mahkota Dewa	38
6.2 Uji Hambat Pembentukan Biofilm.....	38
6.3 Implikasi Terhadap Bidang Kedokteran.....	40
6.4 Keterbatasan Penelitian.....	40
BAB VII KESIMPULAN	43
7.1 Kesimpulan	43
7.2 Saran	43
DAFTAR PUSTAKA	44
LAMPIRAN	47

**HALAMAN PENGESAHAN
TUGAS AKHIR**

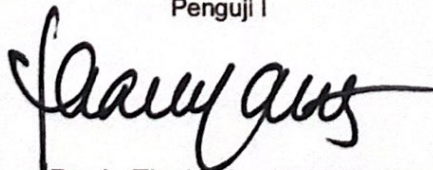
**UJI EFEKTIFITAS FLAVONOID EKSTRAK BUAH MAHKOTA DEWA
(*Phaleria macrocarpa*) SEBAGAI PENGHAMBAT PEMBENTUKAN
BIOFILM *Pseudomonas aeruginosa* SECARA *IN VITRO***

Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran

Oleh:
Kevin Marcello Chandra
NIM: 165070100111036

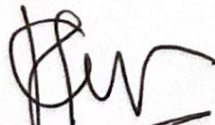
Telah diuji pada
Hari : Selasa
Tanggal : 10 Desember 2019
Dan dinyatakan lulus oleh :

Penguji I



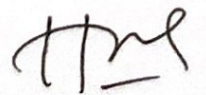
Dr. dr. Tita Hariyanti, M. Kes
NIP. 197310222003122002

Pembimbing I/Penguji II



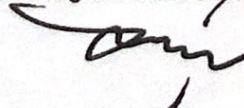
Dr. dr. Dwi Yuni Nur Hidayati, M. Kes
NIP. 196603231997032001

Pembimbing II/Penguji III



Dr. Husnul Khotimah, S.Si, M. Kes
NIP. 197511252005012001

Mengetahui,
Ketua Program Studi Pendidikan Dokter



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

ABSTRAK

Chandra, Kevin Marcello. 2019. *Uji Efektifitas Flavonoid Ekstrak Buah Mahkota Dewa (Phaleria macrocarpa) Sebagai Penghambat Pembentukan Biofilm Pseudomonas aeruginosa Secara In Vitro*. Tugas Akhir, Program Studi Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Pembimbing: (1) Dr. dr. Dwi Yuni Nur Hidayati, M.Kes. (2) Husnul Khotimah, S. Si, M.Kes.

Pseudomonas aeruginosa merupakan bakteri yang sering diasosiasikan dengan *Healthcare Associated Infection* (HAIs). *P. aeruginosa* dapat membentuk biofilm, sehingga memudahkan terjadinya resistensi bakteri terhadap berbagai jenis antimikroba. Sehingga perlu dikembangkan obat-obatan yang dapat menghambat pembentukan biofilm. Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) merupakan salah satu jenis herba yang memiliki potensi menghambat pembentukan biofilm. Salah satu kandungan buah Mahkota Dewa yang memiliki potensi menghambat pembentukan biofilm adalah flavonoid. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi flavonoid ekstrak buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) sebagai penghambat pembentukan biofilm *Pseudomonas aeruginosa* secara *in vitro* dengan metode *Mean Gray Value* (MGV). Konsentrasi ekstrak buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) yang digunakan adalah 6,25%, 3,125%, 1,675%, 0,8375%, dan 0% (v/v). Berdasarkan hasil penelitian, didapatkan MGV yang semakin meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak, yang menunjukkan adanya hambatan pembentukan biofilm dari *Pseudomonas aeruginosa*. Analisis statistik menggunakan *Oneway ANOVA* menunjukkan perbedaan yang signifikan pada setiap perubahan konsentrasi (flavonoid) ekstrak buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) terhadap nilai rata-rata MGV dari setiap tabung ($p=0,000$). Perhitungan Kadar Hambat Biofilm Minimal (KHBM) didapatkan pada konsentrasi 6,25% (v/v). Uji korelasi *Pearson* menunjukkan adanya hubungan positif dan signifikan ($r=0,948$, $p=0,000$). Berdasarkan penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa (flavonoid) ekstrak buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) dapat menghambat pembentukan biofilm *Pseudomonas aeruginosa* secara *in vitro* dengan KHBM 6,25% (v/v).

Kata kunci : *Pseudomonas aeruginosa*, *Phaleria macrocarpa*, biofilm, KHBM, MGV

ABSTRACT

Chandra, Kevin Marcello. 2019. *The Effect of Flavonoid Extract of Mahkota Dewa Fruit (Phaleria macrocarpa) As Antibiofilm in Pseudomonas aeruginosa In Vitro*. Final Assignment, Medical Program, Faculty of medicine, Brawijaya University, Supervisors: (1) Dr. dr. Dwi Yuni Nur Hidayati, M.Kes. (2) Husnul Khotimah, S. Si, M.Kes.

Pseudomonas aeruginosa is often related to Healthcare Associated Infection (HAIs). *P. aeruginosa* is able to form a biofilm, which facilitate resistance in various antimicrobial drug. Hence, it is important to develop an antibiofilm drug, which able to inhibit the biofilm formation. Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) is a herb that has antibiofilm potency. Flavonoid substance in Mahkota Dewa's fruit is potential to inhibit biofilm formation in various mechanism. The objective of this research was to learn about the possibilities of antibiofilm effect in flavonoid, a metabolites in the extract of Mahkota Dewa fruit (*Phaleria macrocarpa*) in *Pseudomonas aeruginosa* by using Mean Gray Value (MGV) measurement in *vitro*. The concentration of Mahkota Dewa fruit (*Phaleria macrocarpa*) that being used were 6,25%, 3,125%, 1,675%, 0,8375%, and 0% in *biofilm-producing Pseudomonas aeruginosa*. It was shown that MGV value was increasing along with increasing doses, showing inhibition of biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. Statistical analysis by Oneway ANOVA shows significant difference in flavonoid extract concentration changes of Mahkota Dewa fruit (*Phaleria macrocarpa*) toward MGV value in every tube ($p=0,000$). Minimum Biofilm Inhibition Concentration (MBIC) was gained in 6,25% (v/v) concentration. Pearson correlation test showed positive and significant relationship ($r=0,948$, $p=0,000$). It can be concluded that flavonoid extract of Mahkota Dewa fruit (*Phaleria macrocarpa*) can inhibit biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* in *vitro* with MBIC present in 6,25% (v/v) concentration.

Keywords : *Pseudomonas aeruginosa*, *Phaleria macrocarpa*, biofilm, MBIC, MGV

ABSTRAK

Chandra, Kevin Marcello. 2019. *Uji Efektifitas Flavonoid Ekstrak Buah Mahkota Dewa (Phaleria macrocarpa) Sebagai Penghambat Pembentukan Biofilm Pseudomonas aeruginosa Secara In Vitro*. Tugas Akhir, Program Studi Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Pembimbing: (1) Dr. dr. Dwi Yuni Nur Hidayati, M.Kes. (2) Husnul Khotimah, S. Si, M.Kes.

Pseudomonas aeruginosa merupakan bakteri yang sering diasosiasikan dengan *Healthcare Associated Infection* (HAIs). *P. aeruginosa* dapat membentuk biofilm, sehingga memudahkan terjadinya resistensi bakteri terhadap berbagai jenis antimikroba. Sehingga perlu dikembangkan obat-obatan yang dapat menghambat pembentukan biofilm. Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) merupakan salah satu jenis herba yang memiliki potensi menghambat pembentukan biofilm. Salah satu kandungan buah Mahkota Dewa yang memiliki potensi menghambat pembentukan biofilm adalah flavonoid. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi flavonoid ekstrak buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) sebagai penghambat pembentukan biofilm *Pseudomonas aeruginosa* secara *in vitro* dengan metode *Mean Gray Value* (MGV). Konsentrasi ekstrak buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) yang digunakan adalah 6,25%, 3,125%, 1,675%, 0,8375%, dan 0% (v/v). Berdasarkan hasil penelitian, didapatkan MGV yang semakin meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak, yang menunjukkan adanya hambatan pembentukan biofilm dari *Pseudomonas aeruginosa*. Analisis statistik menggunakan *Oneway ANOVA* menunjukkan perbedaan yang signifikan pada setiap perubahan konsentrasi (flavonoid) ekstrak buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) terhadap nilai rata-rata MGV dari setiap tabung ($p=0,000$). Perhitungan Kadar Hambat Biofilm Minimal (KHBM) didapatkan pada konsentrasi 6,25% (v/v). Uji korelasi *Pearson* menunjukkan adanya hubungan positif dan signifikan ($r=0,948$, $p=0,000$). Berdasarkan penelitian ini, dapat disimpulkan bahwa (flavonoid) ekstrak buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) dapat menghambat pembentukan biofilm *Pseudomonas aeruginosa* secara *in vitro* dengan KHBM 6,25% (v/v).

Kata kunci : *Pseudomonas aeruginosa*, *Phaleria macrocarpa*, biofilm, KHBM, MGV

ABSTRACT

Chandra, Kevin Marcello. 2019. *The Effect of Flavonoid Extract of Mahkota Dewa Fruit (Phaleria macrocarpa) As Antibiofilm in Pseudomonas aeruginosa In Vitro*. Final Assignment, Medical Program, Faculty of medicine, Brawijaya University, Supervisors: (1) Dr. dr. Dwi Yuni Nur Hidayati, M.Kes. (2) Husnul Khotimah, S. Si, M.Kes.

Pseudomonas aeruginosa is often related to Healthcare Associated Infection (HAIs). *P. aeruginosa* is able to form a biofilm, which facilitate resistance in various antimicrobial drug. Hence, it is important to develop an antibiofilm drug, which able to inhibit the biofilm formation. Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) is a herb that has antibiofilm potency. Flavonoid substance in Mahkota Dewa's fruit is potential to inhibit biofilm formation in various mechanism. The objective of this research was to learn about the possibilities of antibiofilm effect in flavonoid, a metabolites in the extract of Mahkota Dewa fruit (*Phaleria macrocarpa*) in *Pseudomonas aeruginosa* by using Mean Gray Value (MGV) measurement *in vitro*. The concentration of Mahkota Dewa fruit (*Phaleria macrocarpa*) that being used were 6,25%, 3,125%, 1,675%, 0,8375%, and 0% in *biofilm-producing Pseudomonas aeruginosa*. It was shown that MGV value was increasing along with increasing doses, showing inhibition of biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. Statistical analysis by Oneway ANOVA shows significant difference in flavonoid extract concentration changes of Mahkota Dewa fruit (*Phaleria macrocarpa*) toward MGV value in every tube ($p=0,000$). Minimum Biofilm Inhibition Concentration (MBIC) was gained in 6,25% (v/v) concentration. Pearson correlation test showed positive and significant relationship ($r=0,948$, $p=0,000$). It can be concluded that flavonoid extract of Mahkota Dewa fruit (*Phaleria macrocarpa*) can inhibit biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa in vitro* with MBIC present in 6,25% (v/v) concentration.

Keywords : *Pseudomonas aeruginosa*, *Phaleria macrocarpa*, biofilm, MBIC, MGV

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Rumah Sakit menjadi sarana penting dalam mengobati penyakit pasien. Namun Rumah Sakit juga dapat menyebabkan hal yang tidak terduga seperti infeksi nosokomial. Angka kejadian infeksi nosokomial di Rumah Sakit berkisar antara 3% sampai 21% (Ningsih, 2013). Infeksi nosokomial bisa terjadi akibat penularan dari pasien ke pasien, pasien ke pengunjung, atau petugas ke pasien. Penularan bisa terjadi melalui udara, pada saat bersin atau batuk (Sugeng *et. al.*, 2015). Bentuk infeksi nosokomial paling sering meliputi *Central Line-associated Bloodstream Infections* (CLABSI), *Catether Associated Urinary Tract Infections* (CAUTI), *Surgical Site Infections* (SSI), dan *Ventilator Associated Pneumonia* (VAP) (Khan *et. al.*, 2017). *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) adalah bakteri yang sering diasosiasikan dengan infeksi nosokomial. *P. aeruginosa* memiliki kemampuan adaptasi terhadap perubahan keadaan sekitarnya. Hal ini dikarenakan genom yang sangat besar, membuat *P. aeruginosa* lebih mudah membentuk resistensi terhadap berbagai jenis antimikroba (Meletis and Bagkeri, 2013).

Salah satu mekanisme pembentukan resistensi *P. aeruginosa* terhadap berbagai jenis antimikroba adalah pembentukan biofilm. Biofilm dimulai dengan bakteri tunggal bernukleasi pada suatu permukaan diikuti pembelahan dan pembentukan komunitas dari keturunan bakteri tersebut. Lambat laun terbentuk *glycocalyx* untuk melindungi diri dari lingkungan luar. Bakteri dalam biofilm membentuk molekul kecil seperti *homoserine lactones* yang digunakan oleh

bakteri yang berdekatan sebagai sistem komunikasi (*Quorum Sensing*). *Pseudomonas aeruginosa* cenderung membentuk biofilm pada lumen kateter dan paru - paru pasien cystic fibrosis dan sangat berpengaruh pada virulensi bakteri (Jawetz *et al*, 2015).

Proses pembentukan biofilm bakteri *P. aeruginosa* secara *in vitro* terdiri dari beberapa tahap, antara lain: penempelan reversibel, penempelan ireversibel, maturasi-1, maturasi-2, dan dispersi. Tahapan ini dapat dilalui dalam waktu kurang lebih 12 hari. Tahap pertama, bakteri mulai kontak dengan cawan petri dan mulai terfiksasi dan bersifat reversibel, dilanjutkan dengan pembentukan kluster sel. Tahap selanjutnya, maturasi-1 terlihat ketika kluster sel mulai membentuk lapisan - lapisan pelindung, kemudian kluster mengalami perubahan struktur karena dispersi (Rasamiravaka *et al.*, 2015).

Sebagai upaya pencegahan pembentukan biofilm bakteri *P. aeruginosa*, mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) menjadi salah satu jenis tanaman yang berpotensi sebagai antibiofilm. Tidak hanya dikenal sebagai tanaman hias, tanaman yang asli dari Indonesia ini sudah dikenal dari dulu sebagai obat tradisional. Buah Mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) memiliki zat aktif seperti alkaloid untuk detoksifikasi racun dalam tubuh, saponin sebagai antibakteri, flavonoid sebagai antibakteri dan antiinflamasi serta polifenol sebagai antialergi (Astriyai *et al.*, 2017). Zat aktif flavonoid dapat berperan sebagai antibiofilm dengan menghambat mekanisme *Quorum Sensing* pada fase awal pembentukan biofilm (Vasavi *et al.*, 2014).

Berdasarkan pemaparan di atas, dibutuhkan penelitian tentang efektivitas ekstrak flavonoid buah mahkota dewa terhadap biofilm bakteri *P. aeruginosa*. Karena sebelumnya belum pernah dilakukan uji efektivitas ekstrak flavonoid

buah mahkota dewa terhadap biofilm bakteri *P. aeruginosa* dengan metode dilusi tabung, maka diharapkan ada alternatif pengobatan *P. aeruginosa* baru yang alami.

1.1 Rumusan Masalah

Apakah flavonoid ekstrak buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) dapat menghambat pembentukan biofilm *Pseudomonas aeruginosa* secara *in vitro*?

1.2 Tujuan Penelitian

1.2.1 Tujuan Umum

Membuktikan bahwa flavonoid ekstrak buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) memiliki efek menghambat pembentukan biofilm *Pseudomonas aeruginosa* secara *in vitro*.

1.2.2. Tujuan Khusus

Untuk mengetahui Kadar Hambat Biofilm Minimal (KHBM) dari flavonoid ekstrak buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) yang dapat menghambat pembentukan biofilm pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* secara *in vitro*.

1.3 Manfaat Penelitian

1.3.1 Manfaat Akademis

- a) Memberikan informasi tentang kemampuan flavonoid dari ekstrak buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) dalam menghambat pembentukan biofilm *Pseudomonas aeruginosa*.
- b) Memberikan informasi tentang kemampuan flavonoid dari ekstrak buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) sebagai referensi untuk penelitian lanjutan dari penyakit lainnya.

1.3.2 Manfaat Praktis

- a) Memberikan terapi tambahan antibiofilm untuk pengobatan pasien dengan infeksi nosokomial.
- b) Meningkatkan pemanfaatan buah Mahkota Dewa sebagai antibiofilm.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa banyak tersebar di perairan dan daratan. *P. aeruginosa* merupakan patogen utama yang berada di tubuh manusia jika dibandingkan dengan *Pseudomonas* lainnya. *P. aeruginosa* bersifat invasif dan toksigenik, menyebabkan infeksi di pasien dengan sistem imun yang abnormal dan sering menyebabkan infeksi nosokomial (Jawetz *et. al.*, 2015).

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

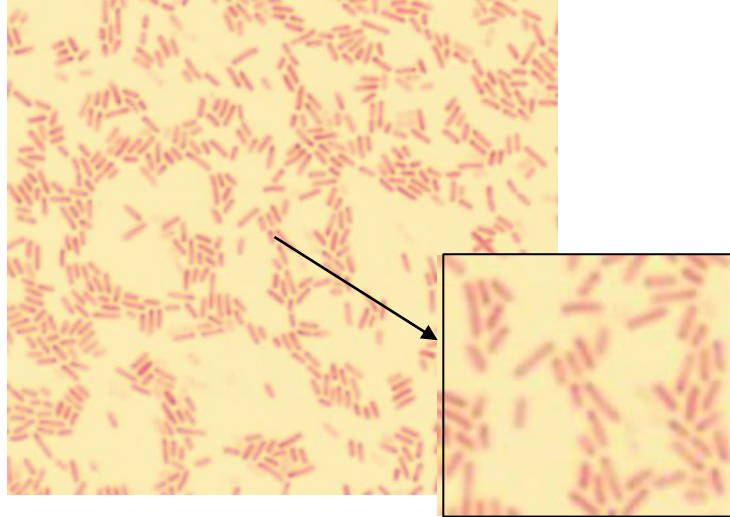
2.1.1 Taksonomi

Kingdom : Bacteria
Phylum : Proteobacteria
Class : Gammaproteobacteria
Order : Pseudomonadales
Family : Pseudomonadaceae
Genus : *Pseudomonas*
Spesies : *Pseudomonas aeruginosa*

2.1.2 Morfologi *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa merupakan bakteri gram negatif, berbentuk batang, dan mempunyai flagella tunggal seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.1. Panjang dari bakteri ini sekitar 1-5 μm dan mempunyai lebar sekitar 0.5-1 μm . *P. aeruginosa* bersifat aerob dan bisa memecah banyak molekul organik seperti

benzoat, hal ini yang menyebabkan *P. aeruginosa* dapat ditemukan dimana-mana seperti di daratan, perairan, manusia, hewan, tumbuhan, selokan, dan rumah sakit (Lederberg, 2010).



Gambar 2.1 *Pseudomonas aeruginosa* secara mikroskopis pada pengecatan Gram dengan perbesaran 1000x (Jawetz et.al., 2015)
Tampak bakteri berbentuk batang berwarna merah

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

P. aeruginosa terkadang berbau manis atau seperti anggur atau seperti jagung. Beberapa strainnya menghemolisa darah. *P. aeruginosa* membentuk koloni bulat dan halus dengan warna hijau fluoresens. Seringkali bakteri ini menghasilkan pigment pyocyanin berwarna biru yang tidak fluoresens. Beberapa strain dari *P. aeruginosa* juga memberikan pigmen fluoresens pyoverdin yang berwarna hijau, beberapa strain lainnya menghasilkan pigmen pyorubin yang

bewarna merah gelap dan pigmen pyomelanin yang bewarna hitam (Jawetz *et al.*, 2015).

2.2 Biofilm

Biofilm adalah kumpulan dari sel - sel bakteri yang menempel pada suatu permukaan secara irreversibel dan dilapisi oleh matriks EPS (*Extra Polymeric Substance*) yang terdiri dari polisakarida. Partikel non seluler seperti komponen darah, kristal mineral, dan partikel korosif juga dapat ditemukan dalam matriks EPS, tergantung pada lingkungan dimana biofilm terbentuk (Hall-stoodley & Stoodley, 2009; Vu *et al.*, 2009). Biofilm dapat terbentuk pada berbagai macam permukaan seperti jaringan organisme dan alat kesehatan. Antarmuka padat dan cair antara permukaan padat dan medium cair seperti air, cairan tubuh, dan darah menyediakan lingkungan ideal untuk penempelan dan pertumbuhan mikroorganisme (Khatoon *et al.*, 2018).

Pada biofilm, EPS dapat menyusun sekitar 50-90% dari total muatan organik. Pada bakteri Gram negatif, polisakarida penyusun EPS dapat bersifat netral atau polianionik, sementara pada bakteri Gram positif, polisakarida dapat berbeda karena bersifat kationik. Komponen EPS yang berbeda membuat mikroorganisme mampu menempel pada permukaan hidrofilik dan hidrofobik. Selain mengandung polisakarida, biofilm juga dapat terdiri dari protein, asam nukleat, dan lemak. Biofilm dapat menetralkan pengaruh lingkungan yang buruk seperti temperatur ekstrim, pH ekstrim, lingkungan yang kering, serta keadaan nutrisi yang buruk (Vu *et al.*, 2009). Pengaruh biofilm tersebut diperankan oleh EPS, komponen terpenting dalam biofilm. Intervensi terhadap EPS dapat menghambat pembentukan biofilm dan menjadi alternatif terapi baru terhadap penyakit infeksi (Flemming & Wingender, 2010) . Penempelan biofilm yang

bersifat irreversibel menyebabkan terjadinya infeksi kronis dan resistensi antimikrobal yang sulit ditangani (Bjarnsholt, 2013; Hirsch & Tam, 2010).

2.2.1 Mekanisme Pembentukan Biofilm

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Rasamiravaka, *et. al.* (2002) yang menggunakan bakteri *P. aeruginosa*, proses pembentukan biofilm secara *in vitro* terdiri dari beberapa tahap, antara lain penempelan reversibel, penempelan ireversibel, maturasi-1, maturasi-2, dan dispersi. Tahapan ini dapat dilalui dalam waktu kurang lebih 12 hari. Tahap pertama, ujung - ujung bakteri (*cell pole*) mulai kontak dengan cawan petri dan mulai menjadi terifiksasi secara sementara. Tahap inisiasi ini bersifat reversibel, dikarenakan beberapa sel dapat terlihat kembali lepas atau hanya melekat sesaat. Flagela juga berperan dalam tahap ini, yaitu membuat sel senantiasa berputar di kutub mereka sambil memfiksasikan diri menempel di permukaan cawan petri.

Tahap kedua, yaitu penempelan ireversibel dimulai ketika pembentukan kluster sel mulai terjadi, ditandai dengan menempelnya sel satu dengan yang lain dan perlekatan erat dengan permukaan. Motilitas sel juga berkurang dibandingkan dengan sel pada tahap pertama. Lebih jauh lagi, pada tahap ini, sistem *Las quorum-sensing* mulai aktif, terlihat dengan munculnya aktivitas gen *Las-b* pada sel. Kluster - kluster sel yang sudah terbentuk pada fase ini akan tetap saling menempel pada permukaan hingga tahap terakhir.

Tahap ketiga, yaitu maturasi-1 terlihat ketika kluster sel mulai membentuk lapisan - lapisan pelindung. Kluster sel dianggap sudah membentuk lapisan apabila ketebalan kluster sel sudah melebihi 10 μm . Pada tahap ini juga ditemukan aktivasi sistem *Rhl quorum-sensing*, ditandai dengan munculnya aktivitas gen *rhl-A*. Maturasi terus berlanjut hingga tahap keempat (maturasi-2),

dimana ketebalan kluster sel mencapai 100 μm , tampak tersegregasi jelas, dan tampak nonmotil secara mikroskopis. Untuk mencapai tahap ini, kira - kira dibutuhkan waktu 6 hari paska pertumbuhan sel.

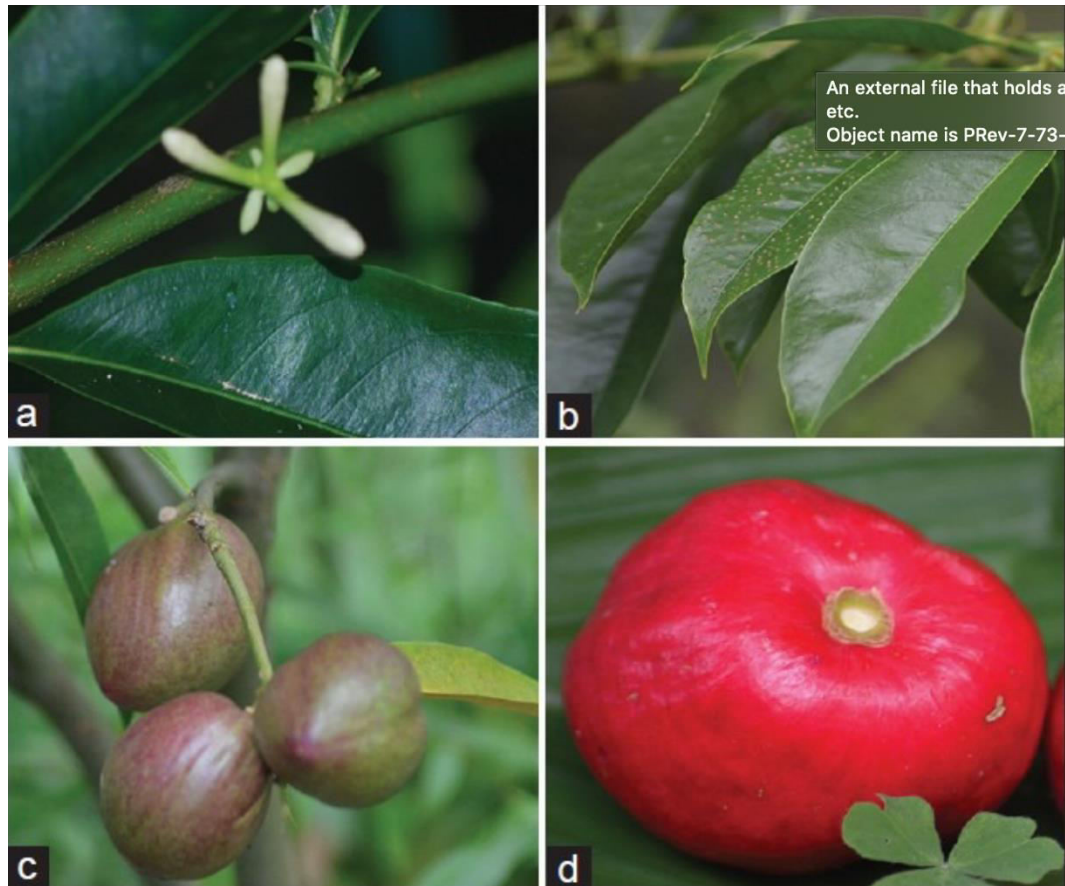
Tahap terakhir (dispersi), yaitu pada hari ke 9-12, kluster sel mulai mengalami perubahan struktur karena dispersi bakteri dari bagian dalam kluster sel. Sebagian bakteri kembali motil dan bergerak menjauhi bagian dalam kluster sel melalui bukaan kluster sel dan memasuki cairan disekitarnya. Bakteri lainnya tetap berada di dinding kluster sel dan bersifat nonmotil.

2.3 Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*)

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

2.3.1 Taksonomi

Kingdom : Plantae
Divisi : Spermatophyta
Sub Divisi : Dicotyledon
Kelas : Thymelaeales
Famili : Thymelaeaceae
Marga : Phaleria
Spesies : *Phaleria macrocarpa*



Gambar 2.2 Bagian tumbuhan Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) meliputi (a) tunas, (b) daun, (c) buah yang belum matang, (d) buah yang matang (Altaf, 2013)

2.3.2 Morfologi Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*)

Phaleria macrocarpa merupakan tanaman yang komplit, yaitu adanya batang, daun, bunga, dan buah. Tinggi dari *Phaleria macrocarpa* bervariasi antara 1 m sampai 18 m, dengan panjang akar 1 m. Warna batang dan akarnya coklat kehijauan. *Phaleria macrocarpa* tumbuh pada ketinggian 10 m sampai 1200 m di atas permukaan laut, dengan umur produktif dari 10 tahun sampai 20 tahun. Daunnya berwarna hijau dengan panjang 7-10 cm, lebarnya 3-5 cm. Bunganya berwarna hijau dan merah tua. Buahnya berwarna hijau ketika belum matang dan berwarna merah ketika matang seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.2. Terdapat 1-2 biji di dalam buah yang berwarna coklat dengan bentuk oval (Sufi, 2007).

2.3.3 Kandungan Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*)

Buah Mahkota Dewa kaya akan saponin, alkaloid, polifenol, flavonoid, dan tanin. Senyawa ini yang dapat membuat *Phaleria macrocarpa* berfungsi sebagai anti-oksidan, anti-bakteri, anti-inflamasi, dan sebagainya (Altaf, 2013).

a. Flavonoid

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

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

b. Alkaloid

Alkaloid dapat bekerja sebagai penghambat enzim dihidrofolat reduktase yang dapat menyebabkan mikroba menjadi tidak berkembang dan pada akhirnya mikroba akan mati (Cushnie & Lamb, 2014).

c. Polifenol

Polifenol bekerja sebagai perusak membran sitoplasma mikroba secara total dengan mengendapkan proten sel. Jika diberikan dalam konsentrasi rendah, polifenol akan merusak membrane sel yang menyebabkan kebocoran metabolit penting dan menginaktifkan bakteri. Selain itu polifenol juga dapat berfungsi sebagai antioksidan, penangkal radikal bebas (Andrade & Fasolo, 2014).

d. Saponin

Saponin merupakan molekul yang dapat bekerja sebagai agen pengubah *permeabilitas* membran, menyebabkan membran sel menjadi lisis dan mati. Selain itu saponin juga dapat sebagai stimulator imun, hypocholesterolemic, anti-karsinogenik, anti-inflamasi, anti-microbial, anti- protozoan, molluscicidal dan anti-oksidan. Saponin juga dapat mengganggu pencernaan protein, penyerapan vitamin dan mineral (Moses, 2014).

e. Tanin

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

2.3.4 Mahkota Dewa sebagai Antibiofilm

Kandungan dalam buah Mahkota Dewa yang berpotensi sebagai antibiofilm adalah flavonoid (Andarwulan *et al.*, 2010).

2.3.4.1 Flavonoid

Flavonoid merupakan pigmen utama yang memberi warna pada bunga, daun, buah, dan biji (Ferreyra *et al.*, 2012). Kata “flavonoid” sendiri secara umum digunakan untuk mendeskripsikan kumpulan senyawa natural yang mengandung rantai karbon C6-C3-C6 (Grotewold, 2006). Terdapat 9 kelas utama pada flavonoid, antara lain : chalcone, flavanone, flavone, flavonol, proanthocyanidin, anthocyanidin, flavandiol, aurone, dan isoflavone. Lebih dari 6000 senyawa flavonoid telah terdefiniskan dan memiliki fungsi berbeda, seperti perlindungan dari sinar UV, pewarnaan bunga, dan fertilitas (Ferreyra *et al.*, 2012). Berbagai penelitian menunjukkan bahwa flavonoid memiliki efek perlindungan terhadap

penyakit degeneratif dan kanker karena bersifat sebagai antioksidan (Kumar *et al.*, 2013; Pandey, 2013).

Dalam perannya sebagai antibiofilm, flavonoid mampu menghambat mekanisme QS dengan cara menghambat pembentukan, proteolisis, dan elastolisis dari pyocanin; serta mampu menghambat motilitas swarming pada fase awal pembentukan biofilm (Vasavi *et al.*, 2014).

2.4 Metode Ekstraksi

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

2.4.1 Macam-Macam Metode Ekstraksi

2.4.1.1 Maserasi

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

2.4.1.2 Perkolasi

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

2.4.1.3 Refluks

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

2.4.1.4 Sokletasi

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

2.4.1.5 Infundasi

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

2.5 Pemisahan Senyawa (Kromatografi)

Prinsip kromatografi adalah perbedaan partisi zat, yaitu pada fase diam dan fase gerak. Biasanya kromatografi digunakan untuk memurnikan suatu senyawa. Fase diam di sini adalah fase zat yang dalam keadaan *stationary* yaitu tetap pada tempatnya, sedangkan fase gerak adalah fase zat dalam keadaan *mobile* atau bergerak (Coskun, 2016). Untuk mendapatkan senyawa flavonoid murni, dibutuhkan partisi cair dan sentrifugasi.

2.5.1 Partisi Cair

Metode partisi cair atau metode corong pisah digunakan untuk memisahkan zat terlarut dari larutan dengan menggunakan pelarut tertentu. Di dalam metode ini akan terjadi perpindahan masa, yaitu dari pelarut pertama

menuju pelarut kedua atau dari media pembawa menuju media ekstraksi (Coskun, 2016).

2.5.2 Sentrifugasi

Sentrifugasi merupakan metode pemisahan senyawa dengan menggunakan gaya sentrifugal atau gaya putaran dengan kecepatan yang sangat tinggi. Metode ini menggunakan prinsip berat jenis molekul, dimana molekul yang lebih berat akan berada di bawah dan molekul yang lebih ringan akan berada di atas setelah diputar dengan kecepatan tinggi. Semakin besar ukuran partikel, dan semakin besar densitas partikel, maka akan semakin cepat partikel tersebut terpisah dari campurannya (Leung, 2008).

2.6 Uji Hambat Pembentukan Biofilm

Uji Hambat Pembentukan Biofilm merupakan uji yang dilakukan untuk melihat pengaruh suatu zat dengan konsentrasi tertentu dalam menghambat pembentukan biofilm. Metode yang dapat digunakan untuk mengetahui hambatan pembentukan biofilm antara lain metode dilusi pada tabung dan metode penanaman pada *Congo Red Agar* (CRA) (Hassan *et al.*, 2011).

2.6.1 Metode Dilusi Tabung

Sebuah perulangan organisme uji dari piring kultur semalam diinokulasi dalam tabung kaca borosilikat yang mengandung 10 ml kaldu kedelai Trypticase dengan glukosa 1%. Tabung kemudian diinkubasi pada suhu 37 ° C selama 24 jam secara aerob. Setelah inkubasi, tabung dituang dan dicuci dengan garam penyangga fosfat pada pH 7,3 dan dikeringkan. Tabung kemudian diwarnai dengan kristal violet (0,1%) selama 15 menit. Pewarnaan itu dituang dan tabung dicuci dengan air deionisasi dan dikeringkan dalam posisi terbalik. Pembentukan biofilm dianggap positif saat film yang terlihat melapisi dinding dan bagian bawah

tabung. Pembentukan lapisan bernoda pada antarmuka cairan-udara dianggap negatif untuk pembentukan biofilm (Ruchi *et al.*, 2015).

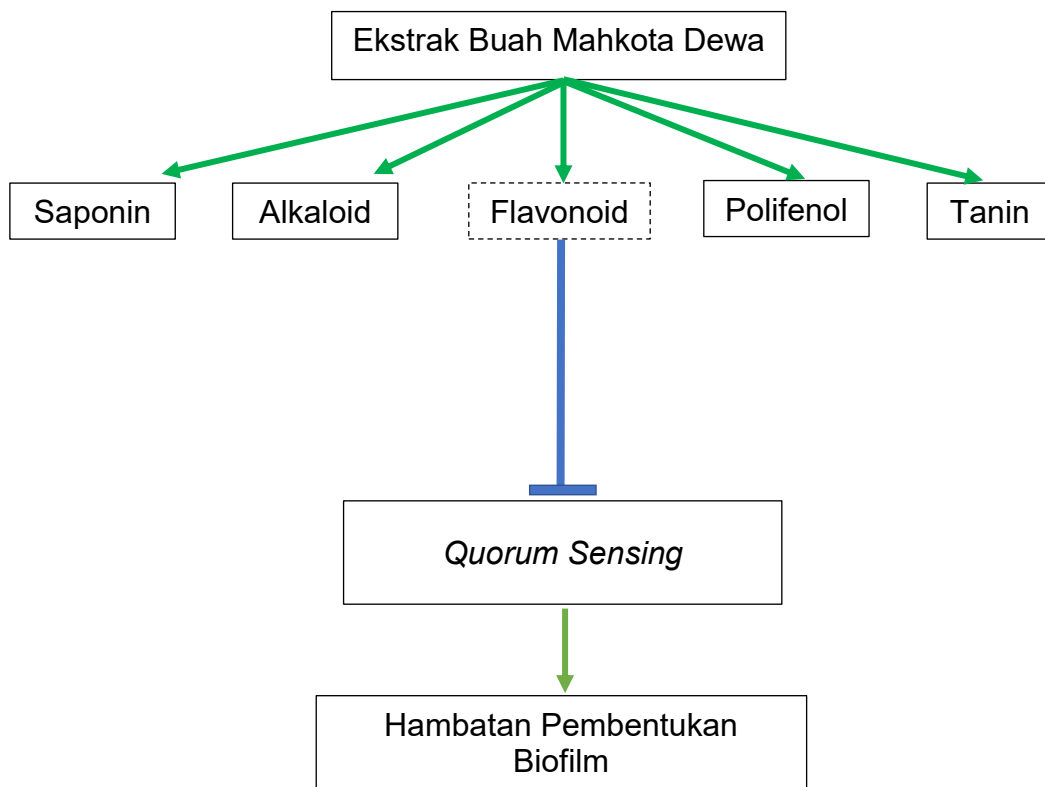
2.6.2 Metode Congo Red Agar

Metode Congo Red Agar (CRA) adalah metode penyaringan kualitatif sederhana untuk mendeteksi produksi biofilm. Media yang digunakan terdiri dari kaldu infus jantung otak (BHI) (37 g / l) ditambah sukrosa (50 g / l), agar No 1 (10g / l) dan Kongo merah (0,8 g / l). First Congo Red stain disiapkan sebagai larutan berair pekat dan diautoklaf (121°C selama 15 menit) secara terpisah dari unsur penyusun media lainnya. Kemudian ditambahkan ke agar infus jantung otak yang diautoklaf dengan sukrosa pada suhu 55°C. Pelat CRA diinokulasi dengan organisme uji dan diinkubasi pada suhu 37 ° C selama 24 jam secara aerob (Ruchi *et al.*, 2015).

BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan :



: variabel yang akan diteliti



: kandungan senyawa flavonoid ekstrak dari buah mahkota dewa



: flavonoid menghambat *Quorum Sensing* pada biofilm



: hasil dari pemberian flavonoid ekstrak dari buah mahkota dewa

Buah Mahkota Dewa mengandung flavonoid. Senyawa flavonoid bekerja dengan cara menghambat *Quorum Sensing*. *Quorum Sensing* adalah metode komunikasi antar sel yang bergantung pada produksi, deteksi, dan respon terhadap molekul sinyal ekstrasel yang disebut *autoinducer*. *Autoinducer* yang berikatan dengan reseptor akan mengaktifkan fungsi reseptor untuk mengikat DNA dan menghasilkan gen untuk pembentukan biofilm. Flavonoid menghambat *autoinducer-binding receptor* secara antagonis sehingga pembentukan matriks biofilm terhambat (Paczkowski *et. al*, 2017).

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang ada, maka hipotesis yang diajukan adalah : Pemberian flavonoid ekstrak buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) dapat menghambat pembentukan biofilm *Pseudomonas aeruginosa* secara *in vitro*.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

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

4.2 Sampel Penelitian

Sampel pada penelitian ini merupakan koloni *Pseudomonas aeruginosa* dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Dengan rumus Gomez, didapatkan hasil pengulangan sebagai berikut :

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

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

$$4r-4 \geq 20$$

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

Keterangan:

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

t = jumlah perlakuan perlakuan (5 terdiri dari 1 kontrol negatif, dan 4 perlakuan dengan konsentrasi berbeda)

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Terikat

Variabel terikat adalah variabel yang dipikirkan sebagai akibat atau keadaannya tergantung dari variabel-variabel lain. Variabel terikat pada penelitian ini adalah kadar hambat biofilm minimum *Pseudomonas aeruginosa* yang didapat dari nilai Optical Density.

4.3.2 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian flavonoid ekstrak buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) dengan berbagai dosis konsentrasi yang akan ditentukan dari penelitian pendahuluan.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi penelitian ini berada di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, pengekstrakan senyawa flavonoid dilakukan di Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang. Penelitian ini membutuhkan waktu selama dua bulan. Penelitian pendahuluan dan penelitian inti dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi FKUB selama satu bulan. Proses ekstraksi flavonoid dilakukan di Laboratorium Kimia Politeknik Negeri Malang selama satu bulan. Proses ekstraksi pada awalnya memakan waktu dua minggu, namun menjadi satu bulan karena ada kendala alat di laboratorium yang bermasalah.

4.5 Definisi Operasional

1. *Pseudomonas aeruginosa* yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan isolat urin dari 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. Metode *true* eksperimental adalah metode yang menyelidiki hubungan sebab akibat (pengaruh flavonoid ekstrak buah mahkota dewa terhadap pembentukan biofilm *Pseudomonas aeruginosa*) dimana ada kelompok perlakuan dan kelompok kontrol, dan membandingkan hasil perlakuan dengan kontrol.

4. *Post-test only control design* adalah model rancangan dari metode *true* eksperimental. Kelompok perlakuan dan kelompok kontrol dibentuk dengan acak, sehingga keduanya dapat dianggap setara. Perlakuan diberikan dalam jangka waktu tertentu, dan kedua kelompok diukur kemudian dibandingkan perbedaannya.
5. Metode tabung adalah metode deteksi biofilm dengan menggunakan tabung sebagai medium. Medium tabung digunakan karena memiliki luas permukaan yang cukup dalam pengamatan ketebalan dari cincin biofilm.
6. Buah mahkota dewa yang digunakan adalah bagian buahnya yang disediakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dalam bentuk serbuk.
7. Flavonoid ekstrak mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari buah mahkota dewa yang disediakan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pelarut yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 96% dan metode maserasi dari buah mahkota dewa. Pertama-tama buah mahkota dewa diekstrak dengan etanol 96%, lalu dipisahkan sebanyak 2 tahap. Tahap pertama menggunakan n-heksana, tahap kedua menggunakan n-butanol untuk menarik senyawa flavonoid dari ekstrak total. Kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm untuk memisahkan senyawa berdasarkan berat molekul.
8. Kadar Hambat Biofilm Minimal (KHBM) adalah konsentrasi flavonoid ekstrak terendah yang mampu menghambat pembentukan biofilm yang ditandai dengan terjadinya penipisan bentuk cincin dan lapisan ungu kebiruan yang terdapat pada dinding dan dasar tabung.
9. *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. Angka mendekati 255 menunjukkan kepekatan warna yang rendah (Andriyani, 2014).

10. Kontrol positif atau konsentrasi 0% yaitu tabung tanpa flavonoid ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) dengan penambahan *Pseudomonas aeruginosa*.
11. Kontrol negatif yaitu tabung tanpa penambahan flavonoid ekstrak buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) maupun *Pseudomonas aeruginosa*.

4.6 Instrumen Penelitian

4.6.1 Alat

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

4.6.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain buah mahkota dewa, pelarut etanol 96%, air, *Phosphate Buffer Saline* (PBS) pH 7,3, *deionized water*, isolat *Pseudomonas aeruginosa*, media Nutrient Agar, alkohol 96%, kristal violet, lugol, safranin, aquades, n-heksana, n-butanol, minyak inersi, kertas penghisap, kapas, dan H₂O₂ 3%, serbuk Mg dan larutan HCl.

4.7 Operasional Penelitian

4.7.1 Pembuatan Ekstrak Buah Mahkota Dewa

4.7.1.1 Tahap Pengeringan

1. Buah Mahkota Dewa dicuci bersih, dikeringkan kemudian ditimbang.
2. Buah Mahkota Dewa dipotong jadi beberapa bagian.

3. Buah Mahkota Dewa yang sudah dipotong dimasukkan pada oven dengan suhu 80°C selama kurang lebih 2 hari agar tidak terdapat air pada buah.
4. Potongan buah Mahkota Dewa yang sudah di oven dihaluskan dengan blender atau mesin penyerbuk untuk dijadikan serbuk.

4.7.1.2 Tahap Ekstraksi

1. Serbuk buah Mahkota Dewa ditimbang.
2. Serbuk tersebut direndam dengan etanol 96% (dengan perbandingan 1 : 4, 1 kg bahan dengan 4 liter pelarut) lalu diaduk agar homogen.
3. Didapatkan filtrat dan residu yang berupa cairan agak pekat.
4. Filtrat yang didapat disaring dengan kertas saring Whattman no. 40.

4.7.1.3 Tahap Evaporasi

1. Filtrat dikeringkan menggunakan *rotary evaporator* dengan suhu 40°C sehingga diperoleh ekstrak yang terpisah dengan pelarut
2. Filtrat dimasukkan ke dalam labu di atas *waterbath*
3. Suhu dan kondensor *waterbath* diatur sesuai titik uap pelarutnya, hasilnya nanti akan diperoleh pelarut terpisah berbentuk cairan di labu berbeda.

4.7.2 Pemisahan Senyawa Flavonoid

4.7.2.1 Partisi dengan n-heksana

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

4.7.3 Identifikasi *Pseudomonas aeruginosa*

Tes yang akan dilakukan untuk mengidentifikasi koloni *Pseudomonas aeruginosa* antara lain adalah identifikasi koloni pada Nutrient Agar, pewarnaan

Gram, uji oksidase, dan uji fermentasi laktosa dengan penanaman pada MacConkey Agar.

4.7.3.1 Identifikasi Koloni pada Nutrient Agar

Isolat bakteri dari Laboratorium Mikrobiologi diambil satu koloni dengan menggunakan ose. Kemudian dibiakkan pada media *Nutrient Agar* sedemikian hingga dihasilkan koloni terpisah dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah itu diamati karakteristik koloni bakteri, yaitu adanya pigmen pyocyanin, pyoverdine dan pyorubin.

4.7.3.2 Pewarnaan Gram

- a. Koloni *Pseudomonas aeruginosa* diambil dengan lidi kapas dari *Nutrient Agar* ke kaca benda yang sebelumnya sudah diberi lingkaran dengan spidol permanen
- b. Sediaan ditunggu hingga kering, lalu difiksasi di atas api bunsen, dengan diayunkan sebanyak 3-5 kali
- c. Kristal violet diteteskan di atas kaca benda, lalu ditunggu selama 1 menit, kemudian dibilas dengan aquades
- d. Lugol diteteskan di atas kaca benda, lalu ditunggu selama 1 menit, kemudian dibilas dengan aquades
- e. Alkohol 96% diteteskan di atas kaca benda, lalu ditunggu 5-10 detik, kemudian dibilas dengan aquades
- f. Safranin diteteskan di atas kaca benda, lalu ditunggu selama 30 detik dan dibilas dengan aquades
- g. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap
- h. Sediaan diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran total dari terkecil yaitu 100x, 400x dan terbesar 1000x menggunakan minyak imersi

- i. Diamati adanya bakteri dengan bentuk batang dan bewarna merah

4.7.3.3 Uji Oksidase

- a. Koloni *Pseudomonas aeruginosa* diambil dengan ose kemudian ditaruh di *strip* oksidase
- b. Diamati apakah terjadi perubahan warna, positif jika terjadi perubahan warna ungu

4.7.3.4 Uji Fermentasi Laktosa

Dilakukan penggoresan bakteri pada MacConkey Agar dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Didapatkan medium tetap berwarna kuning kecoklatan yang menandakan fermentasi laktosa negatif.

4.7.4 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

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. Diperoleh volume (mL) bakteri yang akan ditambah pengencer untuk mendapatkan bakteri dengan konsentrasi $10^8/\text{ml}$ sebanyak 10 mL.
4. Setelah diperoleh suspensi bakteri dengan konsentrasi $10^8/\text{mL}$ sebanyak 10 mL, dilakukan pengenceran sebanyak 100 kali dengan menggunakan *NaCl* dan *nutrient broth*, sehingga konsentrasi bakteri menjadi $10^6/\text{mL}$. Kini bakteri telah siap digunakan untuk penelitian.

4.7.5 Uji Hambat Pembentukan Biofilm pada *Pseudomonas aeruginosa*

a. Uji Pendahuluan

1. Suspensi bakteri disiapkan dengan kepadatan 10^6 CFU/ml.
2. Suspensi bakteri dibuat dalam medium TSB + *glycerol* 10% berdasarkan perhitungan OD dari spektrofotometri.
3. Tabung reaksi 1-5 diisi dengan suspensi bakteri dalam medium TSB + *glycerol* 10% 2 ml, dan tabung kontrol diisi 4 ml.
4. 2 ml larutan ekstrak dicampurkan dalam tiap tabung kecil ke dalam tabung reaksi 1-5 sehingga didapatkan larutan sebanyak 4 ml dengan konsentrasi ekstrak 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%

5. Tabung reaksi 1 – 5 diisi dengan suspensi bakteri dari medium TSBglu dan ekstrak.
6. Keenam tabung diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C .
7. Tabung dikeluarkan dari inkubator setelah 24 jam dan dicuci dengan PBS (pH 7,3) serta airnya dikeringkan. Diberikan kristal

violet (0,1%) 0,5 ml. Kemudian, kelebihan warna dibuang dan tabung dicuci dengan *deionized water*.

8. Tabung dikeringkan. Biofilm yang terbentuk menyerupai cincin berwarna ungu pada dinding tabung diamati (Cahyani, 2013).

b. Penelitian Inti

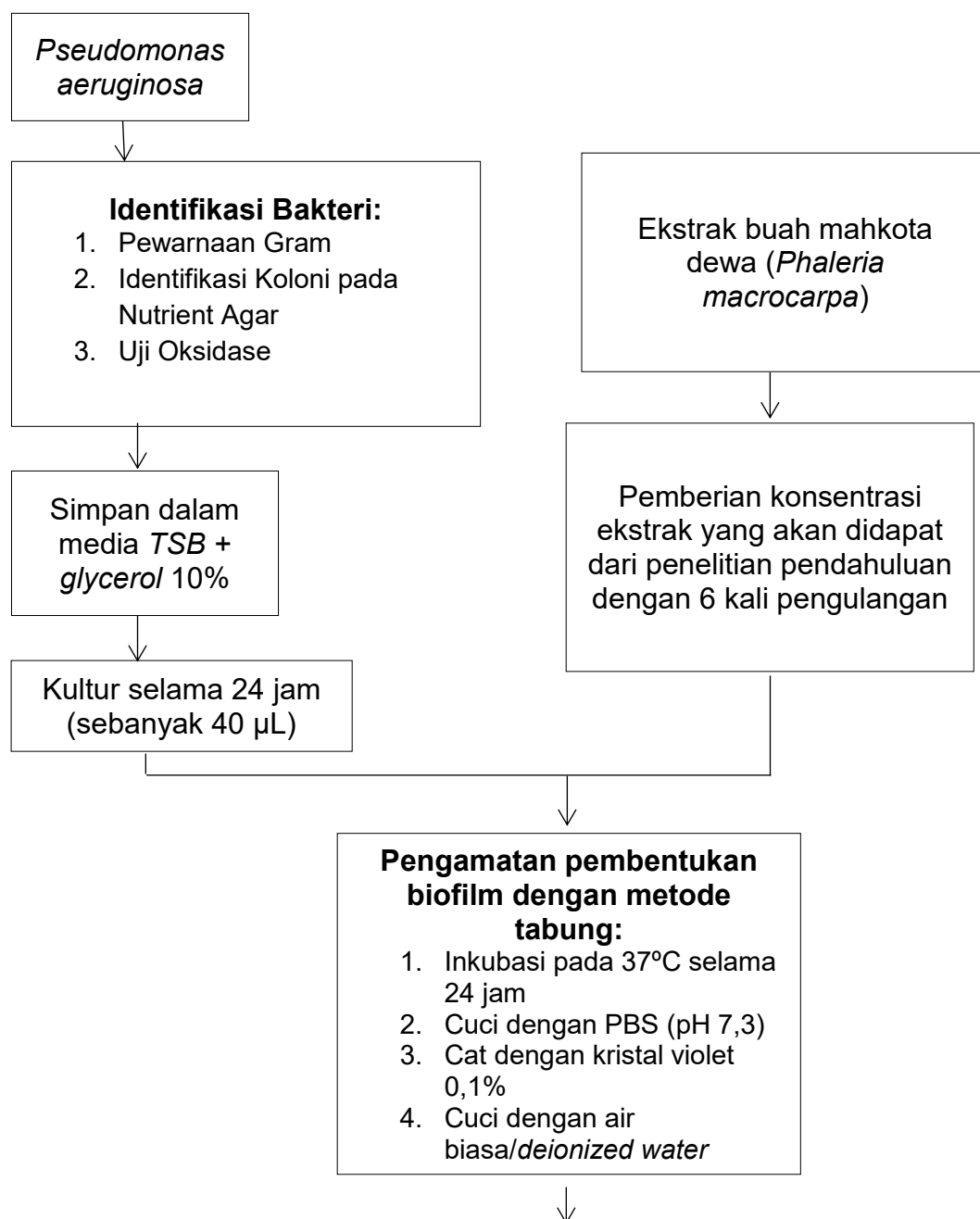
1. Ekstrak buah mahkota dewa diambil sebanyak 2 gr dan dicampur dengan *DMSO* 10% sebanyak 2 ml, sehingga didapatkan ekstrak buah mahkota dewa dengan konsentrasi 100%.
2. Suspensi bakteri disiapkan dengan kepadatan 10^6 CFU/ml.
3. Dibuat suspensi bakteri dalam medium *TSBglu* berdasarkan OD dari spektrofotometri.
4. Menyiapkan tujuh tabung steril yang akan diisi dengan bakteri dan konsentrasi ekstrak yang ditentukan setelah uji pendahuluan, yaitu 0% (kontrol); 0,8375%; 1,675%; 3,125%; 6,25%.
5. Mengisi tabung reaksi 1 – 5 dengan suspensi bakteri dari medium *TSBglu* dan ekstrak buah mahkota dewa.
6. Kemudian keenam tabung tersebut diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C.
7. Setelah 24 jam, keenam tabung tersebut dicuci dengan larutan PBS (pH 7,3), lalu dikeringkan.
8. Setelah kering, seluruh tabung dicat dengan kristal violet 0,1% sebanyak 4 ml atau hingga larutan kristal violet mengisi lebih tinggi dari batas larutan yang telah dibentuk pada masing – masing tabung. Diamkan selama 15 menit, kemudian buang larutan kristal violet dan cuci dengan air, kemudian dikeringkan.
9. Semua buangan dari tabung dimasukkan ke dalam lisol.

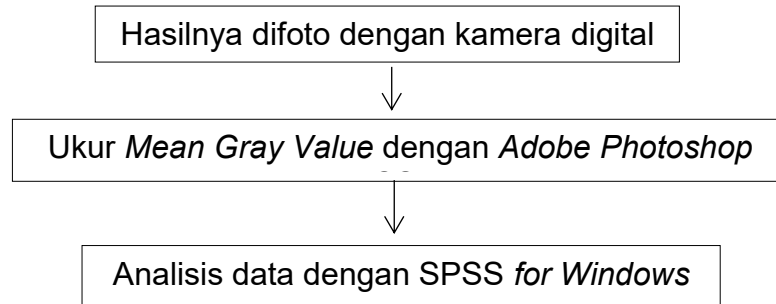
Pembentukan biofilm dapat diamati pada area *airfluid border* (area antara medium cair dan udara).

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*. *Mean Gray Value* yang dinyatakan dalam skala 0 – 255. Semakin rendah nilai *Mean Gray Value* menunjukkan intensitas warna yang semakin tebal, sementara semakin tinggi nilai *Mean Gray Value* menunjukkan intensitas warna yang semakin tipis. Langkah-langkah dimulai dengan membuka 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 (Andiyani, 2014).

4.8 Alur Kerja Penelitian





4.8 Analisis data

Analisis hasil penelitian menggunakan analisis statistik SPSS versi 25.0 untuk *Windows*. Langkah pertama, hasil *Mean Gray Value* dianalisis dengan menggunakan uji normalitas 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 mahkota dewa terhadap ketebalan yang terdeteksi melalui *Mean Gray Value*. Kemudian analisis data menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) versi 25.0 (Dahlan, 2016).

BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian

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

Dilakukan ekstraksi Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) dengan pelarut etanol dan partisi dengan n-heksana, sehingga didapatkan ekstrak berbentuk pasta dari Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang.



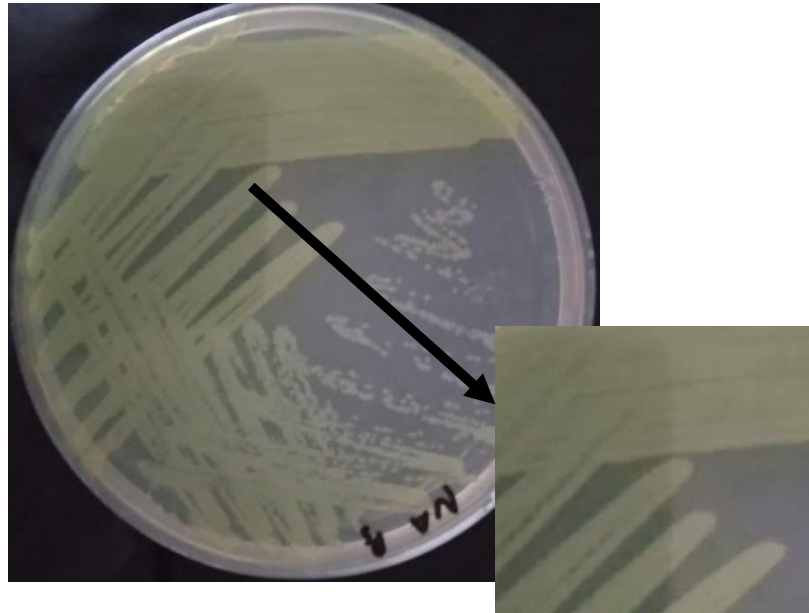
Gambar 5.1 Ekstrak Flavonoid berbentuk pasta kental

5.1.2 Hasil Identifikasi Bakteri Uji

Pembiakan pada medium Nutrient agar selama 24 jam menghasilkan pigmen pyoverdin yang dapat diamati pada **Gambar 5.2**. Kemudian tahap identifikasi dilanjutkan dengan melakukan uji oksidase, pewarnaan Gram, uji fermentasi laktosa dengan penanaman pada *MacConkey* agar. Uji oksidase dapat diamati pada **Gambar 5.5**, didapatkan strip berubah dari warna putih menjadi ungu, yang menandakan bahwa bakteri bersifat oksidase positif. Hasil pewarnaan gram yang diamati pada mikroskop, didapatkan koloni bakteri berbentuk batang berwarna merah yang menandakan bahwa bakteri tersebut

merupakan bakteri gram negatif. Uji fermentasi laktosa yang dilakukan dengan pembiakan

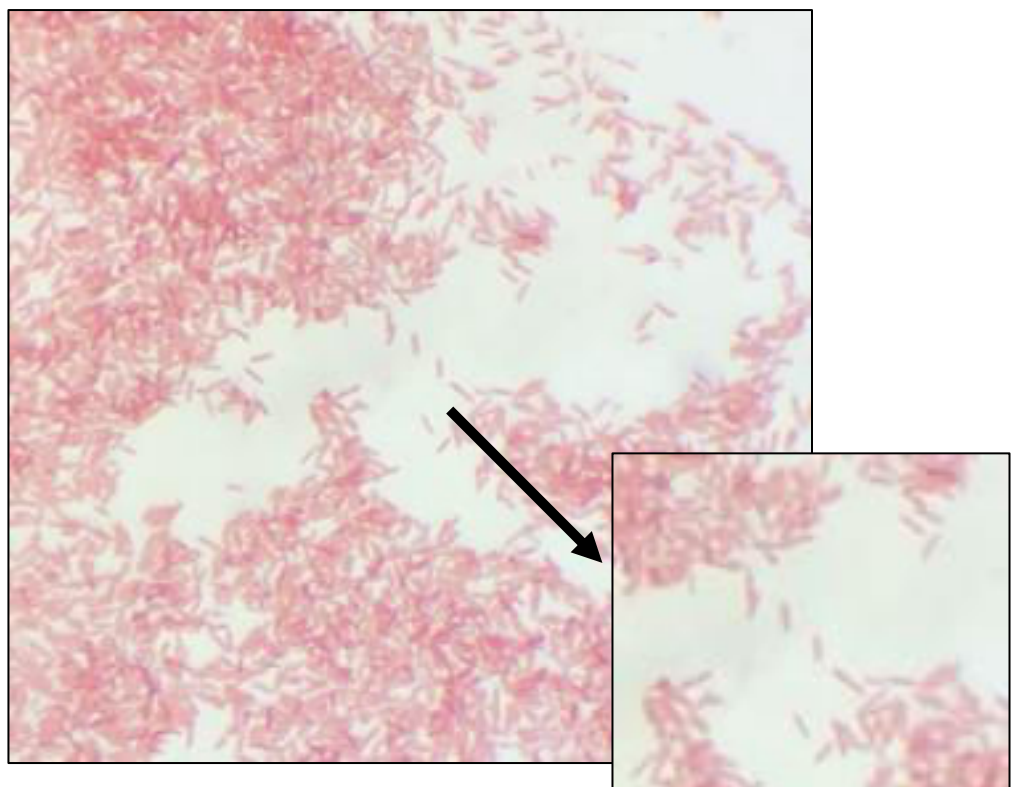
MacConkey agar memperlihatkan warna jernih yang menunjukkan bahwa bakteri



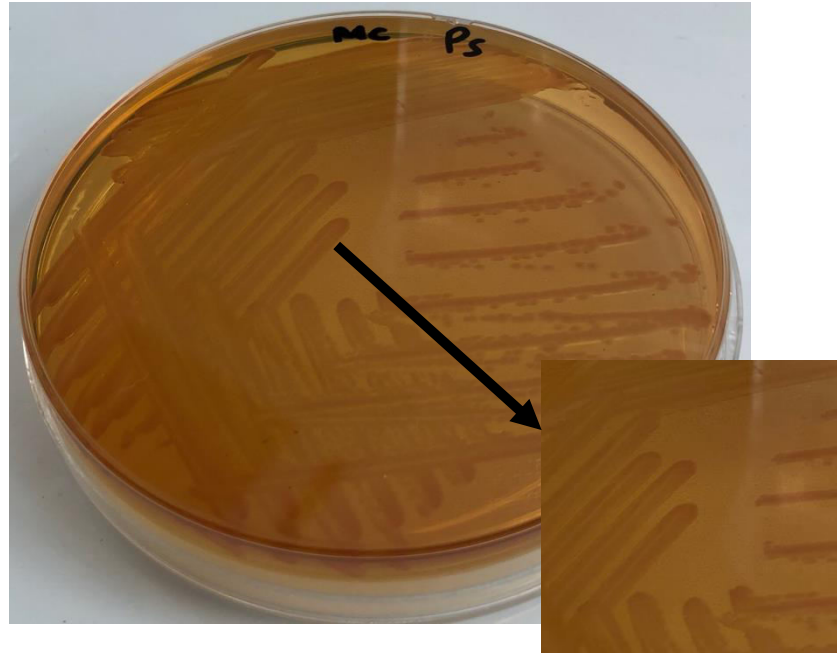
tidak memfermentasi laktosa.

Gambar 5.2 Hasil pembiakan *Pseudomonas aeruginosa* pada Nutrient Agar

*Terlihat pigmen pyoverdinin (warna kehijauan) setelah bakteri *P. aeruginosa* ditanam pada NAP diinkubasi selama 24 jam*

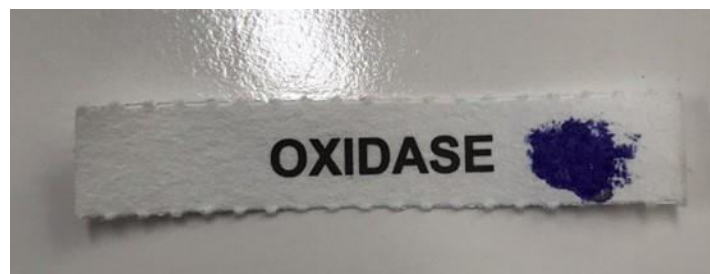


Gambar 5.3 Hasil pewarnaan Gram *Pseudomonas aeruginosa*
 Tampak bakteri berbentuk batang berwarna merah (Gram negatif) dengan perbesaran 1000x



Gambar 5.3 Penanaman *Pseudomonas aeruginosa* pada MacConkey agar

Tampak biakan *P. aeruginosa* pada MacConkey agar memperlihatkan warna jernih, menunjukkan hasil uji fermentasi laktosa negatif



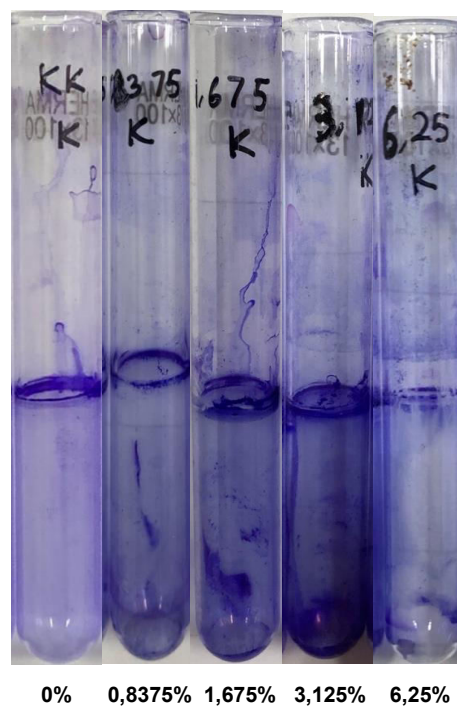
Gambar 5.5 Hasil Uji Oksidase *Pseudomonas aeruginosa*

Terlihat perubahan warna dari putih menjadi ungu yang menunjukkan oksidase positif dari *P. aeruginosa*

5.1.3 Hasil Uji Hambat Pembentukan Biofilm

5.1.3.1 Uji Pendahuluan

Sebelum menentukan konsentrasi ekstrak flavonoid pada penelitian inti, dilakukan penelitian pendahuluan terlebih dahulu dengan konsentrasi ekstrak 6,25%, 3,125%, 1,675%, 0,8375%, dan 0%. Hasil penelitian pendahuluan digunakan sebagai dasar pemilihan konsentrasi untuk penelitian. Hasil penelitian pendahuluan dapat diamati pada **Gambar 5.6**. Penelitian pendahuluan menunjukkan adanya penipisan cincin biofilm secara visual pada dinding tabung dengan konsentrasi 6,25%.



Gambar 5.6 Uji Pendahuluan yang Memiliki Daya Hambat pada Konsentrasi 6,25%

5.1.3.2 Uji Hambat Pembentukan Biofilm

Berdasarkan hasil pada uji pendahuluan, dilakukan uji hambat dengan konsentrasi 6,25%, 3,125%, 1,675%, 0,8375%, dan 0% sebagai kontrol negatif pada bakteri *P. aeruginosa*.

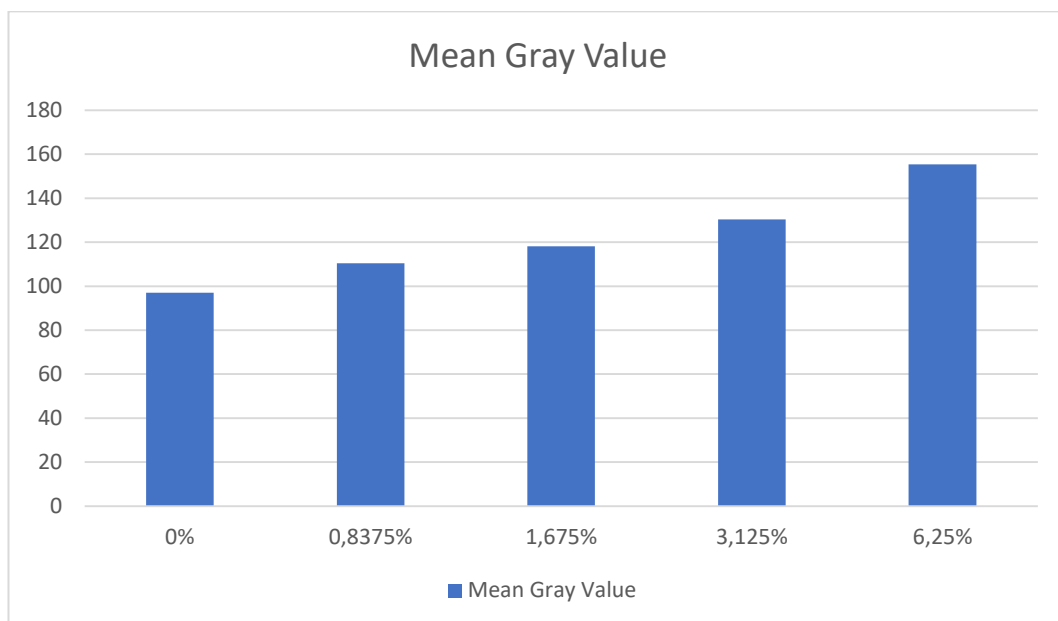
Pengamatan biofilm dilakukan dengan melihat intensitas warna pada area cincin ungu dinding tabung. Bentuk cincin difoto dengan kamera digital

kemudian dilakukan pengukuran menggunakan *Mean Gray Value* program *Adobe Photoshop CS6* dengan skala 0 - 255. Semakin rendah nilai *Mean Gray Value* menunjukkan intensitas warna yang semakin tebal. Nilai awal *Mean Gray Value* dilihat dengan pengukuran pada tabung kosong. Kadar Hambat Biofilm Minimal (KHBM) didapatkan dari kelompok perlakuan lebih kecil 10% dari *Mean Gray Value* tabung kosong. *Mean Gray Value* tabung kosong menunjukkan nilai sebesar 154,879. Hasil pengukuran selengkapnya berada pada **Tabel 5.1**.

Tabel 5.1 Hasil Pengukuran Intensitas Warna Biofilm (Mean Gray Value)

Konsentrasi	Pengulangan						Mean \pm SD
	I	II	III	IV	V	VI	
0%	86,469	99,413	103,808	106,959	97,818	87,450	96,99 \pm 7,68
0,8375%	107,740	112,716	109,199	112,790	111,820	108,358	110,44 \pm 2,07
1,675%	113,963	116,440	113,349	125,202	116,180	124,124	118,21 \pm 4,70
3,125%	130,188	135,441	131,098	127,788	129,750	128,063	130,39 \pm 2,53
6,25%	155,423	159,237	163,107	146,415	150,281	157,620	155,35 \pm 5,56
Mean Gray Value Tabung Kosong	154,879						

Mean Gray Value digunakan untuk mengukur intensitas warna pada biofilm. KHBM didapat pada konsentrasi 6,25% dengan perbedaan 10% dari nilai *Mean Gray Value* tabung kosong yaitu diatas 139,391.



Gambar 5.7 Grafik Rata-Rata Pengukuran Mean Gray Value

*Terlihat peningkatan rata-rata Mean Gray Value seiring dengan peningkatan konsentrasi flavonoid ekstrak Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*)*

5.2 Analisis Data

Analisis hasil penelitian dilakukan dengan menggunakan *SPSS 25 for Windows*. Pertama, hasil *Mean Gray Value* pada **Tabel 5.1** dilakukan uji normalitas dan uji homogenitas untuk menentukan apakah data tersebar normal atau tidak tersebar normal dan perhitungan yang akan dilakukan untuk uji komparasi data. Setelah ditemukan bahwa data tersebar normal dan homogen, uji komparasi dilakukan dengan cara *Oneway ANOVA*. Uji komparasi dilakukan untuk memastikan adanya perbedaan yang signifikan antar kelompok data. Kemudian dilakukan uji *Post Hoc* dengan metode *Tukey* untuk mengetahui signifikansi masing-masing kelompok data. Terakhir, dilakukan uji korelasi *Spearman* untuk mengetahui hubungan antara variable dependen dan variable independen, yaitu berupa hubungan tebal biofilm bakteri dengan perubahan konsentrasi flavonoid ekstrak Buah Mahkota Dewa (Razali & Wah, 2011).

5.2.1 Uji Normalitas dan Uji Homogenitas

Uji normalitas dilakukan dengan cara *Shapiro-Wilk* dikarenakan jumlah data yang kurang dari 50. Dari uji normalitas didapatkan $p > 0,05$ pada semua konsentrasi, yang dapat disimpulkan bahwa persebaran data normal ($p > 0,05$). Pada uji homogenitas, didapatkan hasil $p = 0,056$. Dari hasil tersebut, dapat disimpulkan bahwa data homogen ($p > 0,05$).

5.2.2 Uji Oneway ANOVA

Setelah ditemukan data normal dan homogen, dilakukan uji komparasi dengan cara *Oneway ANOVA* untuk mengetahui perbedaan rata-rata tiap kelompok terhadap keseluruhan data. Didapatkan $p=0,000$. Hasil ini menunjukkan bahwa terdapat sedikitnya 2 kelompok data yang memiliki perbedaan *Mean Gray Value* secara signifikan (syarat $p<0,05$).

5.2.3 Uji *Post-Hoc Tukey*

Uji *Post-Hoc* dengan metode *Tukey* dilakukan untuk mengetahui signifikansi antara masing-masing kelompok konsentrasi dengan kontrol maupun antar konsentrasi. Dalam kelompok subset homogen yang didapat, konsentrasi 0,8375% dan 1,675% berada dalam subset kedua. Hal itu menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan pada perlakuan tersebut. Konsentrasi 0% berada pada subset pertama, 3,125% pada subset ketiga, dan 6,25% pada subset keempat. Nilai *Mean Gray Value* dengan konsentrasi 0%, 3,125%, dan 6,25% memberikan perbedaan signifikan dibandingkan konsentrasi lainnya.

5.2.4 Uji Korelasi *Pearson*

Uji Korelasi *Pearson* dilakukan untuk menilai kekuatan hubungan antara peningkatan konsentrasi flavonoid ekstrak dengan *Mean Gray Value*. Didapatkan nilai korelasi sebesar 0,948 dan nilai signifikansi $p=0,000$. Dari hasil tersebut, disimpulkan sebagai berikut :

1. Nilai korelasi = 0,948, yang berarti korelasi antara flavonoid ekstrak Buah Mahkota Dewa dengan *Mean Gray Value* sangat kuat.
2. Arah korelasi positif, yang berarti semakin tinggi konsentrasi flavonoid ekstrak buah Mahkota Dewa, semakin tinggi nilai *Mean Gray Value*, yang dapat dimaknai semakin tipis lapisan biofilm yang terbentuk.

3. Nilai $p=0,000$, yang berarti terdapat korelasi yang signifikan ($p<0,05$) antara konsentrasi flavonoid ekstrak buah Mahkota Dewa dengan Mean Gray Value.

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Ekstraksi Buah Mahkota Dewa

Dalam penelitian ini metode yang digunakan adalah eksperimental untuk mengetahui kemampuan flavonoid ekstrak buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) terhadap penghambatan pembentukan biofilm bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) termasuk tanaman herbal yang memiliki banyak manfaat pada penelitian sebelumnya. Kandungan dalam buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) yang diduga dapat menghambat pembentukan biofilm adalah flavonoid. Buah Mahkota Dewa didapatkan dalam bentuk ekstrak kental menyerupai pasta yang diperoleh dari Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang.

Flavonoid merupakan senyawa metabolit tumbuhan yang sangat melimpah di alam. Selain terdapat pada Mahkota Dewa juga tersebar luas pada tumbuhan tetapi jarang terdapat pada jamur dan lumut. Tumbuhan dengan morfologi sederhana seperti tumbuhan paku dan lumut mengandung flavonoid kompleks yang lebih sedikit dari subdivisi angiospermae. Komponen flavonoid yang terdapat pada Mahkota Dewa adalah kaempferol, myricetin, naringin, rutin, dan quercetin (Hendra *et. al*, 2011).

6.2 Uji Hambat Pembentukan Biofilm

Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang digunakan disimpan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan ditanam pada medium Nutrient Agar. Uji hambat pembentukan biofilm pada penelitian ini dilakukan dengan metode dilusi pada tabung. Hasil penelitian kemudian diamati dan didokumentasikan dengan menggunakan kamera digital. Pengukuran *Mean Gray Value* dari foto tabung dilakukan menggunakan *Adobe*

Photoshop CS6. Cara pengukuran ini dipilih karena dapat merepresentasikan ketebalan biofilm secara kuantitatif.

Penelitian pendahuluan dilakukan terlebih dahulu untuk menentukan konsentrasi yang akan digunakan. Penelitian pendahuluan dilakukan dengan konsentrasi 6,25%, 3,125%, 1,675%, dan 0,8375%. Penelitian pendahuluan menunjukkan adanya hambatan pembentukan biofilm secara visual pada konsentrasi 6,25%. Berdasarkan hasil tersebut, dilakukan penelitian uji hambat pembentukan biofilm dengan konsentrasi 6,25%, 3,125%, 1,675%, 0,8375%, dan 0% untuk mencari Kadar Hambat Biofilm Minimal dan konsentrasi efektif untuk menghambat biofilm dengan analisis statistik. Hasil penelitian kemudian didokumentasikan dan dilakukan pengukuran Mean Gray Value dengan *Adobe Photoshop CS6*. Hasil pengukuran Mean Gray Value menunjukkan bahwa rata-rata Mean Gray Value meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi flavonoid ekstrak buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*). Hal tersebut membuktikan bahwa biofilm yang terbentuk semakin tipis dan menandakan pembentukan biofilm *Pseudomonas aeruginosa* terhambat. Rata-rata hasil Mean Gray Value setiap konsentrasi kemudian dibandingkan dengan rata-rata Mean Gray Value tabung kosong. Kadar Hambat Biofilm Minimal ditentukan dari uji komparasi menggunakan metode *Oneway ANOVA*. Analisis statistik menunjukan bahwa Mean Gray Value nilai konsentrasi 6,25% sudah mencapai Kadar Hambat Biofilm Minimal. Hal ini dapat dilihat pada analisis dimana konsentrasi 6,25% merupakan konsentrasi yang mencapai batas 10% dari nilai Mean Gray Value tabung kosong. Diduga Kadar Hambat Biofilm Minimal tercapai pada konsentrasi 6,25% karena konsentrasi flavonoid ekstrak buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) dengan konsentrasi 6,25% sudah mampu menghambat pembentukan biofilm dari *Pseudomonas aeruginosa*.

Penelitian ini sejalan dengan hasil penelitian dari Awolola (2014) dan Vasavi (2014) yang menyebutkan bahwa flavonoid dapat menghambat pembentukan biofilm pada *Pseudomonas aeruginosa* dengan menghambat *Quorum Sensing*. *Quorum Sensing* adalah metode komunikasi antar sel yang bergantung pada produksi, deteksi, dan respon terhadap molekul sinyal ekstrasel yang disebut *autoinducer*. *Las* dan *Rhl* merupakan dua *autoinducer* utama pada *Quorum Sensing Pseudomonas aeruginosa*. Ikatan kedua *autoinducer* yang merupakan bagian dari *LuxR-type* protein dengan reseptornya akan mengaktifkan fungsi reseptor untuk mengikat DNA dan menghasilkan gen untuk pembentukan biofilm. Flavonoid menghambat *autoinducer-binding receptor* secara antagonis sehingga pembentukan matriks biofilm terhambat. (Paczkowski *et. al.*, 2017).

6.3 Implikasi Terhadap Bidang Kedokteran

Hasil dari penelitian ini membuktikan bahwa peningkatan konsentrasi flavonoid ekstrak buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) mampu menghambat pembentukan biofilm pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Efek hambatan meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi flavonoid ekstrak buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*). Manfaat klinis yang dapat dikembangkan dari penelitian ini adalah potensi dari buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) sebagai alternatif terapi *adjuvan* (membantu khasiat obat lain) pada infeksi *Pseudomonas aeruginosa*. Pencegahan pembentukan biofilm diharapkan dapat meningkatkan penetrasi antimikrobal ke dalam sel bakteri, sehingga mempercepat penyembuhan serta mengurangi angka morbiditas dan mortalitas pada pasien.

6.4 Keterbatasan Penelitian

Confounding factor dalam penelitian ini adalah sifat *aerob obligat* bakteri *P. aeruginosa* juga mempengaruhi pengukuran Mean Gray Value. Sifat ini membuat biofilm tidak hanya ditemukan dalam bentuk cincin, namun juga ditemukan sebagai bercak keunguan di sekitar tabung. Keterbatasan dalam penelitian ini adalah pengamatan menggunakan Mean Gray Value belum dapat menilai secara langsung mekanisme penghambatan biofilm. Penelitian ini hanya dapat membuktikan bahwa terdapat hambatan pembentukan biofilm dari *Pseudomonas aeruginosa* seiring dengan peningkatan konsentrasi flavonoid ekstrak buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*). Selain itu, penggunaan *crude extract* pada penelitian ini menyebabkan partikel ekstrak menempel pada tabung. Hal ini menyulitkan proses pembersihan tabung dan perhitungan Mean Gray Value. Dilakukan pengukuran Mean Gray Value dengan terlebih dahulu mengambil foto dari tabung dan kemudian diukur dengan program *Adobe Photoshop CS6*, sehingga pencahayaan dan sudut pemotretan dapat mempengaruhi hasil nilai Mean Gray Value yang diukur.

Pada penelitian ini tidak digunakan zat aktif dari buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) secara langsung, dikarenakan metode ekstraksi yang tidak secara spesifik menghasilkan satu jenis zat aktif (hanya menghasilkan *crude extract*). Berdasarkan keterbatasan tersebut, belum diketahui secara pasti zat aktif manakah yang paling berperan dalam menghambat proses pembentukan biofilm. Dibutuhkan penelitian lebih lanjut mengenai zat aktif yang terkandung dalam buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) dalam menghambat pembentukan biofilm *Pseudomonas aeruginosa*. Keterbatasan lainnya adalah belum diketahui pengaruh lama penyimpanan ekstrak buah

Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) terhadap efektivitas sebagai penghambat pembentukan biofilm *Pseudomonas aeruginosa*. Diharapkan penelitian ini dapat dilanjutkan untuk mengetahui efek flavonoid ekstrak buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) sebagai penghambat pembentukan biofilm bakteri *Pseudomonas aeruginosa* secara *in vivo* yang kelak akan berguna bagi masyarakat luas.

BAB 7

KESIMPULAN

7.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah flavonoid ekstrak buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) menghambat pembentukan biofilm pada *Pseudomonas aeruginosa* secara *in vitro*, yang ditunjukkan penurunan biofilm seiring dengan peningkatan dosis konsentrasi ekstrak buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) dengan nilai KHBM pada konsentrasi 6,25%.

7.2 Saran

Diperlukan penelitian lebih lanjut menggunakan flavonoid ekstrak murni dari buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) dalam menghambat pembentukan biofilm *Pseudomonas aeruginosa*, sehingga dapat diketahui secara lebih spesifik zat aktif mana yang dapat menghambat biofilm. Penelitian secara *in vivo* diperlukan untuk menilai efek toksisitas dari ekstrak buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) sehingga dapat digunakan sebagai alternatif terapi infeksi bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

DAFTAR PUSTAKA

- Allen, L., Dockrell, D. H., Pattery, T., Daniel, G., Cornelis, P., Hellewell, P. G., Moira, K. B., and Whyte, M. K. B. (2017) 'Pyocyanin Production by *Pseudomonasaeruginosa* Induces Neutrophil Apoptosis and Impairs Neutrophil-Mediated HostDefenses In Vivo'. doi: 10.4049/jimmunol.174.6.3643.
- Altaf, R., Zaini, M., Asmawi, B., Dewa, A., Sadikun, A. and Umar, M. I. (2013) 'Phytochemistry and medicinal properties of *Phaleria macrocarpa* (Scheff .) Boerl . extracts', 7(13). doi: 10.4103/0973-7847.112853.
- Andrade, J. M. D. M., & Fasolo, D. (2014). Polyphenol Antioxidants from Natural Sources and Contribution to Health Promotion. *Polyphenols in Human Health and Disease*, 253–265. doi: 10.1016/b978-0-12-398456-2.00020-7.
- Arifianti, L. *et al.* (2014) 'Pengaruh Jenis Pelarut Pengekstraksi E-Journal Planta Husada Vol.2, No.1 April 2014', 2(1), pp.3-6.
- Astriyai, W. *et al.* (2017) 'Daya Hambat Ekstrak Buah Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) Dengan Pelarut Ethanol dan Aquades', 18(2), pp. 8–13. doi: 10.21776/ub.jtapro.2017.018.02.2.
- Balczon, R., Prasain, N., Ochoa, C., Prater, J., Zhu, B., Alexeyev, M., Sayner, S., Frank, D. W. and Stevens, T. (2013) 'Pseudomonas aeruginosa Exotoxin Y-Mediated Tau Hyperphosphorylation Impairs Microtubule Assembly in Pulmonary Microvascular Endothelial Cells', *PLoS One*, 8(9). doi: 10.1371/journal.pone.0074343.
- 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 dipublikasikn, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang
- Coskun, O. (2016). Separation Tecniques: Chromatography. *Northern Clinics of Istanbul*. doi: 10.14744/nci.2016.32757
- Cushnie, T. P. T., Cushnie, B. and Lamb, A. J. (2014) 'Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities', *International Journal of Antimicrobial Agents*, 44(5), pp. 377–386. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2014.06.001.

- Cuzick, A., Stirling, F. R., Lindsay, S. L. and Evans, T. J. (2016) 'The type III pseudomonas exotoxin U activates the c-Jun NH 2-terminal kinase pathway and increases human epithelial interleukin-8 production', *Infection and Immunity*, 74(7), pp. 4104–4113. doi: 10.1128/IAI.02045-05
- Ditjen POM. (2000). *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Cetakan Pertama. Jakarta: Departemen Kesehatan RI. Halaman. 10-12.
- Ghasemzadeh, A. *et al.* (2015) 'Comparative Evaluation of Different Extraction Techniques and Solvents for the Assay of Phytochemicals and Antioxidant Activity of Hashemi Rice Bran', pp. 10822–10838. doi: 10.3390/molecules200610822.
- Hendra, R., Ahmad, S., Sukari, A. and Shukor, M. Y. (2011) 'Flavonoid Analyses and Antimicrobial Activity of Various Parts of Phaleria macrocarpa Boerl Fruit', pp. 3422–3431. doi: 10.3390/ijms12063422.
- Huang, X. *et al.* (2015) 'Research on the treatment of Pseudomonas aeruginosa pneumonia in children by macrolide antibiotics', pp. 479–482. doi: 10.1515/med-2015-0082.
- Jawetz, Melnick, Adelberg's, Karen C, Janet S, et al. 2016. *Medical Microbiology, Pseudomonads and Acinetobacter*, 27th Ed., McGraw-Hill Education, New York, p. 245 – 247.
- Khatoon, Z., Mctiernan, C. D., Suuronen, E. J., Mah, T.-F., & Alarcon, E. I. (2018). Bacterial Biofilm Formation on Implantable Devices and Approaches to Its Treatment and Prevention. *Heliyon*, 4(12). doi: 10.1016/j.heliyon.2018.e01067.
- Labauve, A. E., & Wargo, M. J. (2012). Growth and Laboratory Maintenance of Pseudomonas aeruginosa. *Current Protocols in Microbiology*. doi: 10.1002/9780471729259.mc06e01s25
- Lay, M. M., Karsani, S. A., Banisalam, B., Mohajer, S. and Abd Malek, S. N. (2014) 'Antioxidants, phytochemicals, and cytotoxicity studies on Phaleria macrocarpa Boerl Seeds', *BioMed Research International*, 2014. doi: 10.1155/2014/410184.
- Lederberg, Joshua *et al.* *Pseudomonas*. Encyclopedia of Microbiology. Second Edition. Volume 3. San Diego, 2010. p. 876-891.
- Leung, Wallace Woon-Fong. 2008. *Industrial Centrifugation Technology*. New York, NY: McGraw-Hill.

- Michalska, M. and Wolf, P. (2015) 'Pseudomonas Exotoxin A: Optimized by evolution for effective killing', *Frontiers in Microbiology*, 6(SEP), pp. 1–7. doi: 10.3389/fmicb.2015.00963.
- Mittal, R., Aggarwal, S., Sharma, S., Chhibber, S. and Harjai, K. (2009) 'Urinary tract infections caused by Pseudomonas aeruginosa: A minireview', *Journal of Infection and Public Health*, 2(3), pp. 101–111. doi: 10.1016/j.jiph.2009.08.003.
- Moses, T., Papadopoulou, K. K. and Osbourn, A. (2014) 'Metabolic and functional diversity of saponins , biosynthetic intermediates and semi-synthetic derivatives', 9238, pp. 1–24. doi: 10.3109/10409238.2014.953628.
- Nikolaidis, I. and Dessen, A. (2014) 'Resistance to antibiotics targeted to the bacterial cell wall', 23, pp. 243–259. doi: 10.1002/pro.2414.
- Noorhamdani, et al. 2016. *Bakteriologi Medik, Bakteri Batang Gram Negatif*, Edisi Kedua, Laboratorium Mikrobiologi FKUB, Malang, hal 225 – 228.
- Nurhasnawati, H., Handayani, F. and Samarinda, A. F. (2017) 'Sokletasi Terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Jambu Bol *Syzygium malaccense* L .)', 3(1), pp. 91–95.
- Paczkowski, J., Mukherjee, S., McCready, A., Cong, J., Aquino, C., Kim, H., Henke, B., Smith, C. and Bassler, B. (2017). *Flavonoids Suppress Pseudomonas aeruginosa Virulence through Allosteric Inhibition of Quorum-sensing Receptors*, 292(10), 4064-4076, doi: 10.1074/jbc.M116.770552.
- PDPI. 2014. *Pneumonia Nosokomial Pedoman Diagnosis & Penatalaksanaan Di Indonesia*. Jakarta, hal. 2-3.
- Rasamiravaka, T., Labtani, Q., Duez, P., & Jaziri, M. E. (2015). The Formation of Biofilms by Pseudomonas aeruginosa: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms. *BioMed Research International*, 2015, 1–17. doi: 10.1155/2015/759348
- Razali, N. M., & Wah, Y. B. (2011). Power comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling tests. *Journal of Statistical Modeling and Analytics*, 2(1), 21–33. <https://doi.org/doi:10.1515/bile-2015-0008>, diakses tanggal 29 Oktober 2019
- Rocha, C. L., Coburn, J., Rucks, E. A. and Olson, J. C. (2003) 'Characterization of Pseudomonas aeruginosa Exoenzyme S as a Bifunctional Enzyme in J774A . 1 Macrophages', *Society*, 71(9), pp.

5296–5305. doi: 10.1128/IAI.71.9.5296.

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

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

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

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

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

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

LAMPIRAN

Lampiran 1. Alat dan Bahan Penelitian



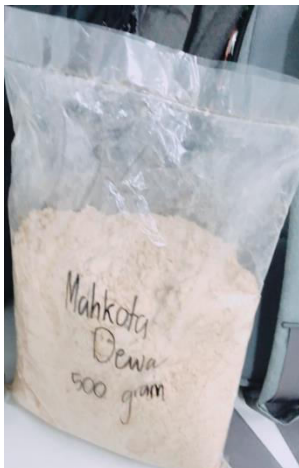
Vortex



Mikroskop



Flavonoid Ekstrak Mahkota Dewa



Serbuk Mahkota Dewa



Pipet Mikro



Inkubator

Lampiran 2. Uji Normalitas dan Uji Homogenitas

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Mean Gray Value	.206	6	.200*	.906	6	.408

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Mean Gray Value	3.312	4	25	.056

Lampiran 3. Uji Oneway ANOVA

ANOVA

Mean Grey Value

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	11734651753.1 33	4	2933662938.28 3	99.474	.000
Within Groups	737297535.833	25	29491901.433		
Total	12471949288.9 67	29			

Lampiran 4. Uji *Post-Hoc* Tukey

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Mean Gray Value

Tukey HSD

(I) Konsentrasi	(J) Konsentrasi	Mean		Sig.	95% Confidence Interval	
		Difference (I-J)	Std. Error		Lower Bound	Upper Bound
0	0,8375	-13451.00000*	3135.38416	.002	-22659.2200	-4242.7800
	1,675	-21223.50000*	3135.38416	.000	-30431.7200	-12015.2800
	3,125	-33401.83333*	3135.38416	.000	-42610.0533	-24193.6134
	6,25	-58361.00000*	3135.38416	.000	-67569.2200	-49152.7800
0,8375	0	13451.00000*	3135.38416	.002	4242.7800	22659.2200
	1,675	-7772.50000	3135.38416	.128	-16980.7200	1435.7200
	3,125	-19950.83333*	3135.38416	.000	-29159.0533	-10742.6134
	6,25	-44910.00000*	3135.38416	.000	-54118.2200	-35701.7800
1,675	0	21223.50000*	3135.38416	.000	12015.2800	30431.7200
	0,8375	7772.50000	3135.38416	.128	-1435.7200	16980.7200
	3,125	-12178.33333*	3135.38416	.005	-21386.5533	-2970.1134
	6,25	-37137.50000*	3135.38416	.000	-46345.7200	-27929.2800
3,125	0	33401.83333*	3135.38416	.000	24193.6134	42610.0533
	0,8375	19950.83333*	3135.38416	.000	10742.6134	29159.0533
	1,675	12178.33333*	3135.38416	.005	2970.1134	21386.5533
	6,25	-24959.16667*	3135.38416	.000	-34167.3866	-15750.9467
6,25	0	58361.00000*	3135.38416	.000	49152.7800	67569.2200
	0,8375	44910.00000*	3135.38416	.000	35701.7800	54118.2200
	1,675	37137.50000*	3135.38416	.000	27929.2800	46345.7200
	3,125	24959.16667*	3135.38416	.000	15750.9467	34167.3866

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

Homogeneous Subsets

Mean Gray Value

Tukey HSD^a

Konsentrasi	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
0	6	96986.1667			
0,8375	6		110437.1667		
1,675	6		118209.6667		
3,125	6			130388.0000	
6,25	6				155347.1667
Sig.		1.000	.128	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

Lampiran 5. Uji Korelasi *Pearson*

Correlations

		Konsentrasi	Intensitas
Konsentrasi	Pearson Correlation	1	.948**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	30	30
Intensitas	Pearson Correlation	.948**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	30	30

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