

UJI EFEKTIVITAS EKSTRAK ETANOL BIJI KOPI ARABICA (*Coffea arabica*) TERHADAP BAKTERI *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) SECARA IN VITRO

TUGAS AKHIR

Untuk Memenuhi Persyaratan

Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran



Oleh:

Akbar Hidayatiko

NIM. 175070100111002

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

MALANG

2021





HALAMAN PENGESAHAN

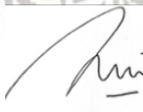
TUGAS AKHIR

UJI EFEKTIVITAS EKSTRAK ETANOL BIJI KOPI ARABICA (*Coffea arabica*) TERHADAP BAKTERI *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) SECARA IN VITRO

Oleh:
Akbar Hidayatiko
NIM. 175070100111002

Telah diuji pada
Hari : Rabu
Tanggal : 18 Agustus 2021
Dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji I


dr. Aulia Rahmi Pawestri PhD
NIP. 2012018705212001

Pembimbing I/Penguji II

Pembimbing II/Penguji III


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


Dr. dr. Mohammad Kuntadi Syamsul
Hidayat, Sp.OT, M.Kes, MMR
NIP. 196803042006041005

Mengetahui,
Ketua Program Studi Pendidikan Dokter




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

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Akbar Hidayatiko

NIM : 175070100111002

Program Studi : Program Studi Kedokteran

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar – benar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya. Apabila dikemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang,

Yang membuat pernyataan,



NIM. 175070100111002





DAFTAR ISI

LEMBAR PENGESAHAN.....	i
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN.....	i
KATA PENGANTAR.....	iii
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR TABEL.....	viii
DAFTAR LAMPIRAN.....	ix
DAFTAR SINGKATAN.....	x
ABSTRAK.....	xi
ABSTRACT.....	xii
BAB 1 PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	4
1.3. Tujuan.....	4
1.3.1. Tujuan Umum.....	4
1.3.2. Tujuan Khusus.....	4
1.4. Manfaat.....	5
1.4.1. Manfaat Keilmuan.....	5
1.4.2. Manfaat Aplikatif.....	5
BAB 2.....	6
2.1. Bakteri <i>Staphylococcus aureus</i>	6
2.1.1. Sejarah Resistensi Obat pada <i>Staphylococcus aureus</i>	6
2.1.2. Manifestasi Klinis.....	7
2.1.3. Taksonomi <i>Staphylococcus aureus</i>	12
2.1.4. Morfologi <i>Staphylococcus aureus</i>	12
2.1.5. Identifikasi <i>Staphylococcus aureus</i>	13
2.1.6. Epidemiologi.....	17
2.1.7. Patogenesis.....	18
2.1.8. Resistensi.....	20
2.2. Tanaman Kopi Arabika (<i>Coffea arabica</i>).....	24
2.2.1. Tinjauan Umum.....	24
2.2.2. Taksonomi Tanaman Kopi Arabika.....	26
2.2.3. Morfologi.....	27
2.2.4. Manfaat Tanaman Kopi Arabika.....	28
2.2.5. Kandungan Tanaman Kopi Arabika.....	29
2.3. Metode Dilusi Agar.....	37
BAB 3.....	40



3.1. Kerangka Konsep	40
3.2. Penjelasan Kerangka Konsep.....	41
3.3. Hipotesis Penelitian	42
BAB 4.....	43
4.1. Rancangan Penelitian	43
4.2. Sampel Penelitian.....	43
4.3. Pengulangan	43
4.4. Variabel Penelitian.....	44
4.4.1. Variabel Bebas	44
4.4.2. Variabel Terikat	44
4.5. Lokasi dan Waktu Penelitian	44
4.6. Definisi Operasional	44
4.7. Alat dan Bahan Penelitian	45
4.7.1. Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Biji Kopi Arabika.....	45
4.7.2. Alat dan Bahan Identifikasi Bakteri	46
4.7.3. Alat dan Bahan Pembuatan Agar Dilusi.....	47
4.7.4. Alat dan Bahan untuk Metode Maserasi	47
4.8. Prosedur Penelitian	48
4.8.1. Identifikasi Bakteri	48
4.8.2. Pembuatan Ekstrak Biji Kopi Arabika.....	51
4.8.3. Uji Antimikroba Ekstrak Biji Kopi Arabika dengan Metode Dilusi Agar.....	52
4.8.4. Pengamatan dan Pengukuran	54
4.8.5. Skema Prosedur Penelitian	56
4.9. Analisis Data	57
4.10. Jadwal kegiatan.....	58
BAB 5.....	59
5.1. Hasil Penelitian.....	59
5.1.1. Identifikasi <i>Streptococcus pneumoniae</i>	59
5.1.2. Hasil Ekstrak Biji Kopi Arabika.....	63
5.1.3. Hasil Penelitian Menggunakan Metode Dilusi Agar.....	63
5.2. Analisis Data	67
5.2.1. Pengujian Normalitas dan Homogenitas Ekstrak Biji Kopi Arabika.....	67
5.2.2. Hasil Uji Kruskal Wallis	68
5.2.3. Hasil Mann Whitney.....	69
5.2.4. Hasil Uji Korelasi Spearman	71
BAB 6.....	73
6.1. Pembahasan	73
BAB 7.....	79
7.1. Kesimpulan.....	79
7.2. Saran	79
DAFTAR PUSTAKA	80

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Infeksi *Staphylococcus aureus* pada kulit.....9

Gambar 2.2 Pneumonia akibat infeksi *Staphylococcus aureus*.....11

Gambar 2.3 Pewarnaan Gram *Staphylococcus aureus*.....13

Gambar 2.4 Tampilan kemampuan hemolisis bakteri.....15

Gambar 2.5 Koloni MSA.....16

Gambar 2.6 Struktur PBP2a.....21

Gambar 2.7 Diagram resistensi antibiotik.....23

Gambar 2.8 Mekanisme Transfer gene resisten pada bakteri.....24

Gambar 2.9 Biji Kopi Arabika.....25

Gambar 2.10 Tanaman Kopi Arabika *Coffea arabica* L.....28

Gambar 2.11 Epigallocatechin gallate.....31

Gambar 2.12 Mekanisme antibakterial EGCg terhadap *B. Subtilis*.....33

Gambar 2.13 Struktur Saponin triterpenoid.....34

Gambar 2.14 Struktur Caffeine, Alkaloid.....36

Gambar 4.1 Cara pengukuran MIC pada Metode Agar Dilusi55

Gambar 5.1 Hasil Pewarnaan Gram Bakteri *Streptococcus pneumoniae* pada perbesaran 1000x.....59

Gambar 5.2 Kultur Bakteri pada agar Mannitol.....60

Gambar 5.3 Tes Katalase bakteri61

Gambar 5.4 Hasil tes koagulase bakteri.....62

Gambar 5.5 Zona Hambat Uji Difusi Cefoxitin.....62

Gambar 5.6 Ekstrak Biji Kopi Arabika.....63

Gambar 5.7 Hasil Penelitian Uji Dilusi Agar Ekstrak Biji Kopi Arabika.....64

Gambar 5.8 Grafik Uji Korelasi Spearman.....72

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Molekul *S. aureus* 19

Tabel 2.2 Komposisi Biji Kopi Arabika.....30

Tabel 5.1 Hasil Pengamatan Pemberian Ekstrak Biji Kopi Arabika.....65

Tabel 5.2 Hasil Uji Normalitas Menggunakan Metode *Shapiro-Wilk*.....68

Tabel 5.3 Hasil Uji Homogenitas Levenne pada Pemberian Ekstrak.....68

Tabel 5.4 Hasil Uji *One-Way ANOVA*69

Tabel 5.5 Hasil Uji Post Hoc Tukey..... 70

Tabel 5.6 Hasil Uji Spearman..... 71

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Surat Determinasi Biji Kopi Arabika88

Lampiran 2 Hasil Analisis Data Statististik Menggunakan SPSS 26.....89

Lampiran 3 Dokumentasi Alat dan Bahan Penelitian.....99





DAFTAR SINGKATAN

- AD : *Alzheimer Disease*
- AKP : *Alkaline phosphatase*
- ANOVA : *Analysis of Variance*
- CABI : *Centre for Agriculture and Bioscience International*
- CDC : *Centers for Disease Control and Prevention*
- CFU : *Colony Forming Unit*
- CGA : *Chlorogenic acid*
- CLSI : *Clinical and Laboratory Standards Institute*
- COX : *Cyclo-oxygenase*
- DNA : *Deoxyribonucleic Acid*
- EGCg : *Epigallocatechin gallate*
- MBC : *Minimum Bactericidal concentration*
- MIC : *Minimum Inhibitory Concentration*
- MRSA : *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*
- MSA : *Manitol Salt Agar*
- PBP : *Penicillin-binding Protein*
- RNA : *Ribonukleat Acid*
- S. aureus* : *Staphylococcus aereus*
- SPSS : *Statistical Product and Service Solutions*
- VRSA : *Vancomycin-Resistant Staphylococcus aureus*
- XO : *Xanthine oxidase*

ABSTRAK

**UJI EFEKTIVITAS EKSTRAK ETANOL BIJI KOPI ARABICA (*Coffea arabica*)
TERHADAP BAKTERI *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) SECARA
IN VITRO****Akbar Hidayatiko¹, Sanarto Santoso², dan Mohammad Kuntadi Syamsul Hidayat³****1.Progam Studi Sarjana Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya****2.Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya****3.Departemen Orthopaedi dan Traumatologi, Fakultas Kedokteran Universitas****Brawijaya**

Abstrak

Staphylococcus aureus merupakan flora normal pada manusia. Infeksi *S.aureus* dapat menghasilkan manifestasi pada kulit, pneumonia, hingga infeksi aliran darah. Tingginya laju resistensi antibiotik pada *S.aureus* (MRSA) menjadikan ancaman kesehatan masyarakat terutama infeksi nosokomial mengingat prevalensinya yang tinggi. Diperlukan suatu inovasi agen antibakterial yang mudah didapatkan serta melimpah keberadaannya. Tanaman Kopi (*Coffea arabica*) merupakan tanaman yang banyak dikultivasi di Indonesia, negara penghasil kopi ke-3 di dunia. Penelitian ini menggunakan penelitian eksperimental laboratorium dengan desain *true experimental*. Fokus penelitian ditujukan pada keadaan koloni MRSA setelah dipaparkan ekstrak etanol Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) secara *in vitro* melalui metode dilusi agar untuk menentukan pertumbuhan koloni pada tiap *plate*. Kelompok perlakuan pada penelitian ini dibagi menjadi 2 kelompok yaitu kelompok kultur MRSA dengan aquades (kontrol negatif) serta kelompok kultur MRSA dengan konsentrasi ekstrak 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, dan 8%. Hasil analisa statistik didapatkan nilai uji Kruskal Wallis sebesar 0.000 ($p < 0.05$). Analisis data dilanjutkan menggunakan Uji Mann Whitney. Hasil analisis menunjukkan bahwa terdapat perbedaan signifikansi antara perlakuan (4 – 8% ekstrak kopi arabika) dengan kontrol negatif. Perbandingan antarkelompok lainnya menunjukkan nilai signifikansi kecuali konsentrasi 4% dengan 5% serta 4% dengan 6%. Uji signifikansi Spearman menghasilkan angka 0.000 dengan koefisien korelasi -0.942. Hasil tersebut menunjukkan peningkatan konsentrasi ekstrak Biji Kopi Arabika akan menurunkan pertumbuhan koloni MRSA secara signifikan. Sehingga, dapat disimpulkan bahwa ekstrak Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) memiliki efek antibakterial terhadap koloni MRSA secara *in vitro*.

Kata kunci: *Coffea arabica*, MRSA, nosokomial, resistensi

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is a normal flora in human-body. *S. aureus* infection can produce skin manifestations, pneumonia, until bloodstream infections. The high rate of antibiotic resistance in *S. aureus* (MRSA) poses a public health threat, especially nosocomial infections, given its high prevalence in the world. An innovative antibacterial agent is needed that is easy to obtain and abundant in existence. *Kopi Arabika* (*Coffea arabica*) is a plant that is widely cultivated in Indonesia, the 3rd coffee producing country in the world. This research uses laboratory experimental research with true experimental design. The focus of the study was on the state of MRSA colonies after exposure to ethanol extract of *Kopi Arabika*'s Beans (*Coffea arabica*) in vitro through the agar dilution method to determine the growth of colonies on each plate. The treatment group in this study was divided into 2 groups, namely the MRSA culture group with distilled water (negative control) and the MRSA culture group with extract concentrations of 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, and 8%. The results of statistical analysis obtained Kruskal Wallis test value of 0.000 ($p < 0.05$). Data analysis was continued using the Mann Whitney Test. There was significant difference between treatment (4 – 8% coffee arabica extract) and control group. Comparison between other groups showed significant values except for the concentration of 4% with 5% and 4% with 6%. Spearman's significance test resulted in the number 0.000 with a correlation coefficient of -0.942. These results indicate that increasing the concentration of *Kopi Arabika*'s Bean extract will significantly reduce the growth of MRSA colonies. Thus, it can be concluded that the extract of *Kopi Arabika*'s Beans (*Coffea arabica*) has an antibacterial effect against MRSA in vitro.

Keywords: *Coffea arabica*, MRSA, nosocomial, resistency

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Staphylococcus aureus adalah patogen manusia bakteri utama yang menyebabkan berbagai manifestasi klinis baik yang terjadi di lingkungan masyarakat maupun yang didapat di rumah sakit seperti bakteremia, endokarditis, infeksi osteoartikular, infeksi kulit dan jaringan lunak, pleuropulmoner, hingga infeksi nosokomial terkait peralatan invasif. Perawatan terhadap infeksi bakteri ini menjadi tantangan karena peningkatan kesulitan akibat munculnya strain resistan terhadap beberapa obat seperti MRSA (Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*). *S. aureus* ditemukan di lingkungan dan juga ditemukan pada flora normal manusia khususnya di kulit dan selaput lendir (paling sering area hidung) dari individu sehat. *S. aureus* biasanya tidak menyebabkan infeksi pada kulit sehat. Namun, jika dibiarkan memasuki aliran darah atau jaringan, bakteri ini dapat menyebabkan berbagai infeksi yang berpotensi serius. Transmisi biasanya berasal dari kontak langsung. Namun, beberapa infeksi melibatkan metode penularan lainnya, seperti fomit (Bonatti, 2008; Tong *et al.*, 2015).

S. aureus termasuk dalam keluarga Staphylococcaceae, gram positif berbentuk bulat dengan kecenderungan berkluster membentuk formasi anggur (Tong *et al.*, 2015). Sejatinya *S. aureus* merupakan bakteri komensal yang menempati sekitar 30% populasi manusia tanpa gejala meskipun terkadang dapat menyebabkan penyakit pada kondisi tertentu. Secara khusus, *S. aureus* adalah salah satu penyebab bakteremia (SAB) dan endokarditis infektif (IE) yang paling umum. Selain itu, bakteri ini juga dapat menyebabkan berbagai infeksi kulit dan jaringan lunak, terutama ketika kulit atau mukosa mendapatkan perlukaan (tidak intact). Infeksi *S. aureus* dapat menyebar melalui kontak dengan nanah dari luka

yang terinfeksi, kontak kulit ke kulit dengan orang yang terinfeksi, dan kontak dengan benda yang digunakan oleh orang yang terinfeksi seperti handuk, seprai, pakaian, atau peralatan atletik. Penggantian sendi dengan prosthesis menempatkan seseorang pada risiko khusus dengan penyakit artritis septik, endokarditis stafilokokus (infeksi katup jantung), dan pneumonia. Langkah-langkah pencegahan termasuk sering mencuci tangan dengan sabun, memastikan untuk mandi setiap hari, dekontaminasi bangsal rumah sakit, hingga skrining pasien cukup efektif dalam menekan infeksi MRSA (Tong *et al.*, 2015; Erikawati *et al.*, 2016).

Berbagai studi mengenai *S. aureus* sudah banyak dilakukan. Hanya saja, penelitian dengan menggunakan isolat MRSA masih sedikit dan masih menunjukkan tingkat resistensi yang tinggi. Diantara hasil penelitian tersebut, diketahui Biji Kopi Arabika memiliki khasiat antimikroba terhadap bakteri penyebab karies gigi *Lactobacillus acidophilus*. Pada penelitian tersebut, dipakai variabel Kopi Arabika serta Kopi Robusta (*Coffea robusta*). Hasil penelitian menunjukkan ekstrak Kopi Arabika konsentrasi 100% dan 75% memiliki daya inhibisi lebih tinggi daripada ekstrak Kopi Robusta dengan konsentrasi yang sama (Wijaya *et al.*, 2016). Pada penelitian oleh Runti dkk (2015), Ekstrak Kopi Arabika dievaluasi terhadap tiga bakteri Gram-positif yang berbeda dan dua Gram-negatif. Aktivitas antimikroba terbukti lebih menonjol terhadap strain Gram-positif. Ekstrak kopi Arabika menunjukkan efek bakteristatik yang signifikan terhadap *S. aureus* dan *Staphylococcus epidermidis* pada waktu pemaparan yang singkat dan menjadi bakterisidal setelah pemaparan dalam waktu lama. Namun, isolat yang digunakan dalam penelitian Runti bukanlah isolat MRSA (Runti *et al.*, 2015). Penelitian oleh Kapoor dan Mahajan (2018) menunjukkan bahwa ekstrak etanol Biji Kopi Arabika memiliki daya hambat terhadap bakteri *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*,

Alcaligenes denitrificans, *Campylobacter jejuni*, serta *Klebsiella pneumoniae*

menggunakan metode agar difusi (Mahajan dan Kapoor, 2018).

Indonesia sudah dikenal sebagai negara yang kaya akan bahan alam.

Coffea arabica L. merupakan genus *Coffea* yang terkenal. Tanaman ini di Indonesia lebih dikenal dengan nama *Kopi Arabika* dalam vokalisasi sehari-hari.

Tanaman ini terkultivasi di seluruh dunia. Tanaman Kopi Arabika pertama kali ditemukan di Daerah Yaman pada abad ke-12 dengan sebutan *bun*. Tanaman Kopi Arabika pada awalnya digunakan sebagai ramuan untuk memperpanjang waktu kerja (WMT, 2017). Setelah itu, Tanaman Kopi Arabika kemudian dengan cepat menjadi komoditas dunia. Tanaman Kopi Arabika diyakini sebagai spesies kopi pertama yang dibudidayakan dan merupakan kultivar dominan, mewakili sekitar 60% produksi global dunia (Sondahl and Vossen, 2005). Indonesia telah dikenal sebagai produsen kopi terbesar ke-3 dunia. Tanaman ini dibawa oleh pedagang Yaman pada masa pra-kolonial Belanda, hal tersebut membuat tanaman ini mudah dijumpai (Torrez and Elena, 2006). Terlebih, penulis memiliki usaha *cafe* yang membuat penulis ingin memanfaatkan tanaman ini khususnya pada bidang kesehatan dalam berinovasi menemukan zat alam yang dapat menjadi agen antibakteri, khususnya MRSA.

Skrining fitokimia kualitatif dan kuantitatif terhadap Biji Kopi Arabika mengungkapkan senyawa kimia bioaktif penting dalam kadar tinggi yang dapat dikaitkan dengan potensi antimikroba: Fenolik, flavonoid, steroid, saponin, alkaloid, dan terpenoid (Mahajan and Kapoor, 2018). Kandungan alkaloid dan fitokimia lainnya pada Biji Kopi Arabika, khususnya biji hijau (*green beans*), memiliki kadar yang sangat tinggi dibandingkan *roasted beans*. Alkaloid telah diketahui sebagai antioksidan, antimikrobal, efek diuretik, vasokonstriktor perifer, serta stimulan sistem saraf pusat (Acidri *et al.*, 2020).

Berdasarkan uraian diatas, terdapat kemungkinan bahwa Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) memiliki efek antimikroba terhadap MRSA. Penelitian ini dilakukan untuk mengkaji efek antimikroba ekstrak etanol Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) terhadap pertumbuhan bakteri MRSA. Melalui penelitian ini, penulis berharap tanaman ini dapat sebagai alternatif pilihan agen antimikroba untuk menanggulangi infeksi, terutama yang disebabkan oleh *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA).

1.2. Rumusan Masalah

1. Apakah ekstrak etanol Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) memiliki efek antimikroba terhadap bakteri *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) secara in vitro dengan metode dilusi agar?
2. Apakah ekstrak etanol Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) memiliki korelasi sangat kuat terhadap hambatan pertumbuhan bakteri MRSA secara in vitro dengan metode dilusi agar?

1.3. Tujuan

1.3.1. Tujuan Umum

Mempelajari efek antimikroba ekstrak etanol Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) terhadap bakteri *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) secara in vitro dengan metode dilusi agar.

1.3.2. Tujuan Khusus

Mengetahui hubungan antara kenaikan konsentrasi ekstrak etanol Biji Kopi

Arabika (*Coffea arabica*) terhadap hambatan pertumbuhan bakteri *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA).

1.4. Manfaat

1.4.1. Manfaat Keilmuan

1. Sebagai dasar untuk mengembangkan penelitian dalam bidang Kesehatan, khususnya tentang potensi pengobatan infeksi terkait MRSA menggunakan ekstrak etanol Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*).
2. Peluang publikasi dalam jurnal-jurnal ilmiah dan mendapatkan paten tentang potensi antimikroba terhadap *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA).

1.4.2. Manfaat Aplikatif

1. Pengembangan metode pengobatan infeksi yang disebabkan oleh *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA).
2. Sebagai pertimbangan bagi industri farmasi dalam menemukan bahan alternatif untuk pembuatan obat antimikroba.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Bakteri *Staphylococcus aureus***2.1.1. Sejarah Resistensi Obat pada *Staphylococcus aureus***

S. aureus pertama kali diisolasi dari jaringan abses pada sendi lutut oleh ahli bedah berkebangsaan Skotlandia pada tahun 1881, Sir Alexander Ogston. Ia menemukan suatu bakteri bulat berkluster membentuk bentukan anggur. Nama *Staphylococcus* berasal dari bahasa Yunani, *Staphyle*: anggur; *Kokkos*: biji-bijian.

Pada tahun 1884, dokter Jerman Friedrich Julius Rosenbach mampu menumbuhkan organisme dalam kultur murni dan mengategorikannya sesuai produksi warna mereka. Sampai pada tahun 1928, Alexander Fleming secara tidak sengaja menemukan penisilin dalam kultur Jamur *Penicillium notatum* yang mengkontaminasi kultur murni *S. aureus*. Senyawa penisilin murni berhasil diekstraksi pada tahun 1939 oleh Howard Walter Florey dan Ernst Boris Chain.

Dengan penggunaan klinis pertama pada tahun 1941, antibiotik penisilin awalnya digunakan terbatas pada tentara sekutu dalam Perang Dunia II. Obat ini terbukti sangat efektif dalam pengobatan beberapa infeksi bakteri sehingga dalam waktu singkat ia mendapatkan reputasi sebagai 'peluru ajaib' (Licitra, 2013; Khan, 2017).

Resistensi bakteri *S. aureus* pertama terjadi tepat setahun sebelum penggunaan klinis penisilin. Laporan *S. aureus* yang resisten terhadap penisilin diterbitkan pada tahun 1940. Resistensi terhadap obat ajaib ini menyebar dengan cepat dan methicillin dikembangkan pada tahun 1959 di Beecham, Inggris sebagai penisilin semi-sintetik pertama untuk mengobati infeksi yang disebabkan oleh *S. aureus* yang resisten terhadap penisilin. Methicillin diyakini menghentikan keberadaan *staphylococcus* yang resisten. Hanya perlu waktu sekitar dua tahun

hingga strain *S. aureus* yang resisten terhadap methicillin (MRSA) pertama dilaporkan. Vancomycin ditemukan pada tahun 1953 untuk mengatasi MRSA. Namun, pada tahun 1996 di Jepang dilaporkan resistensi *S. aureus* terhadap vancomycin (VRSA) dan tahun 2002 di Amerika Serikat. VRSA telah menjadi masalah global yang membutuhkan penggunaan antibiotik linezolid untuk perawatan. Meskipun linezolid tampaknya menjanjikan untuk mengobati infeksi VRSA, telah dilaporkan resisten dari beberapa belahan dunia (Khan, 2017). Khan *et al.*, menerbitkan laporan pertama India terhadap penemuan dua isolat klinis MRSA yang resistan terhadap linezolid pada Maret 2011 dari sampel pus. Dengan pilihan antimikroba yang terbatas, infeksi MRSA semakin sulit diobati dan dikaitkan dengan peningkatan morbiditas, mortalitas, serta pembengkakan biaya rumah sakit yang signifikan (Khan *et al.*, 2012).

2.1.2. Manifestasi Klinis

S. aureus merupakan flora normal pada manusia. Diperkirakan 20% - 30% populasi manusia adalah pembawa *S. aureus* yang dapat ditemukan sebagai bagian dari flora kulit normal, nostril, serta saluran reproduksi wanita yang lebih rendah (Senok *et al.*, 2009). Infeksi *S. aureus* dapat menyebabkan berbagai penyakit, mulai dari infeksi kulit ringan, seperti jerawat, impetigo, bisul, selulitis, folikulitis, karbunkel, *scalded skin syndrome*, dan abses, hingga penyakit yang mengancam jiwa seperti pneumonia, meningitis, osteomielitis, endokarditis, sindrom syok toksik, bakteremia, dan sepsis. Bakteri ini menjadi salah satu dari lima penyebab paling umum infeksi yang didapat di rumah sakit dan seringkali menjadi penyebab infeksi luka setelah operasi (Tong *et al.*, 2015). Setiap tahun, sekitar 500.000 pasien di rumah sakit di Amerika Serikat menderita infeksi stafilokokus, terutama spesies *S. aureus*. Dilaporkan 50.000 kematian setiap tahun di AS terkait dengan infeksi *S. aureus* (Schlecht *et al.*, 2015).

Infeksi kulit adalah bentuk paling umum dari infeksi *S. aureus*. Infeksi dapat bermanifestasi dalam berbagai cara, termasuk bisul kecil jinak, folikulitis, impetigo, selulitis, dan infeksi jaringan lunak invasif yang lebih parah. *S. aureus* sangat lazim pada orang dengan dermatitis atopik, lebih dikenal sebagai eksim. Sebagian besar ditemukan di lipatan atau tempat yang aktif, termasuk ketiak, ekstremitas, kepala, dan leher. Jerawat besar yang muncul di area tersebut dapat memperburuk infeksi jika terlaserasi. Hal ini dapat menyebabkan sindrom kulit melepuh, suatu bentuk parah yang dapat dilihat pada bayi baru lahir. Kehadiran *S. aureus* pada orang dengan dermatitis atopik bukan merupakan indikasi untuk diobati dengan antibiotik oral, karena bukti belum menunjukkan ini untuk memberi manfaat kepada pasien. Namun, antibiotik topikal dikombinasikan dengan kortikosteroid telah terbukti bermanfaat untuk memperbaiki kondisi ini. Kolonisasi *S. aureus* mendorong peradangan pada dermatitis atopik; *S. aureus* memanfaatkan defek pada barier lapisan epidermis orang dengan dermatitis atopik dengan memicu ekspresi sitokin sehingga memperburuk gejala (Kobayashi *et al.*, 2015).



Gambar 2.1. Infeksi *Staphylococcus aureus* pada kulit (a) Impetigo Krustosa; (b) Selulitis; (c) Infeksi sekunder *S. aureus* pada anak dengan dermatitis atopik (Kobayashi et al., 2015)

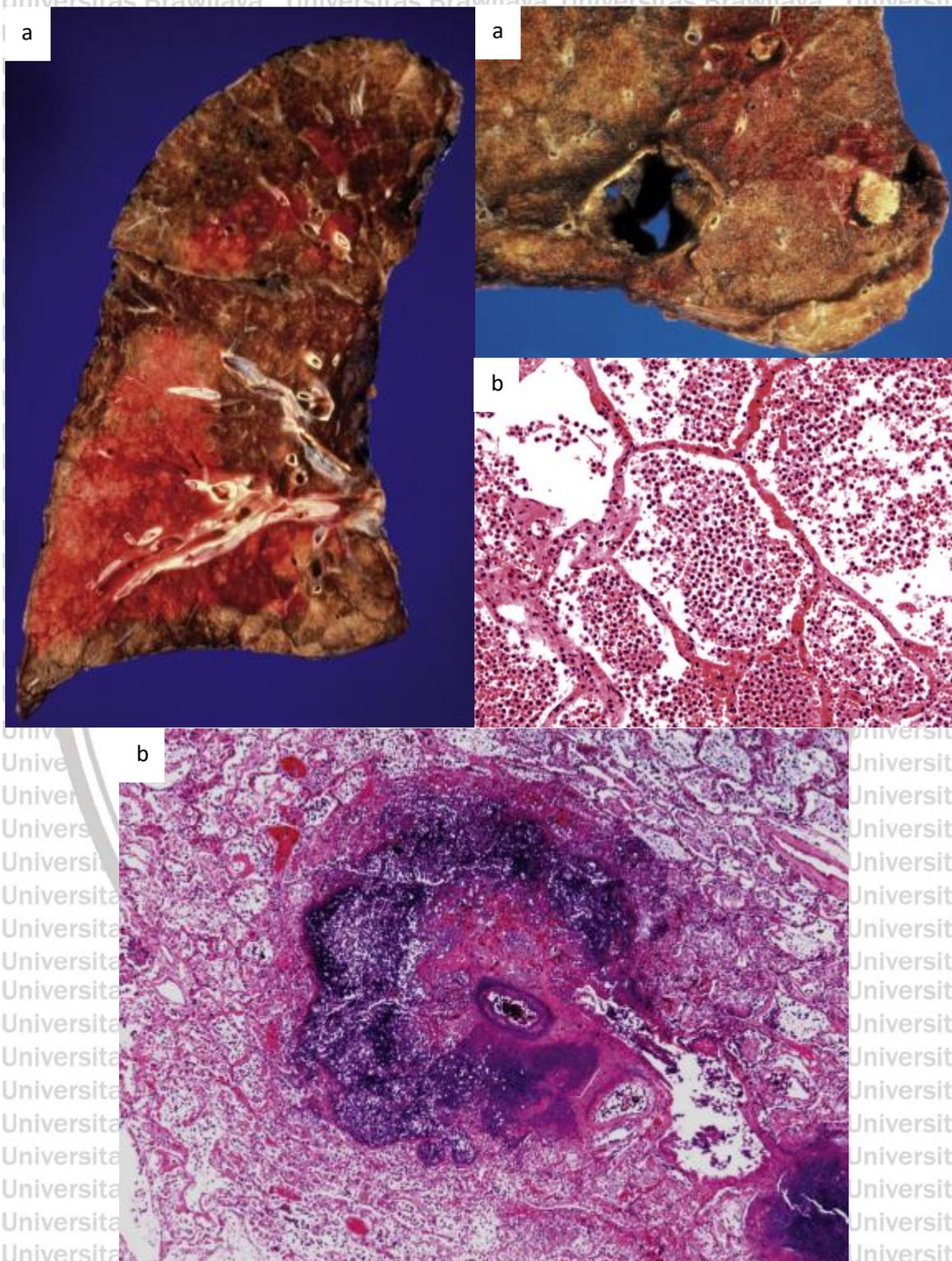
S. aureus juga dapat menginfeksi paru dan menyebabkan pneumonia.

Pneumonia terkait *S. aureus* terjadi 10% dari semua kejadian pneumonia dan biasanya terjadi karena mekanisme nosokomial. Pasien dengan stafilokokal

pneumonia biasanya terdapat influenza, kistik fibrosis, ataupun pasien dengan imun rentan. Stafilocokal pneumonia erat dikaitkan dengan keadaan bakteremia.

Toksin yang diproduksi bakteri dapat menyebabkan bentukan abses, kavitasi, ataupun empiema. Stafilocokal pneumonia sering terjadi pada pasien yang sangat muda ataupun sangat tua. Secara radiologi, stafilocokal pneumonia akan menampilkan gambaran infiltrat bilateral, biasanya pada lobus bawah, dapat berprogres menjadi konsolidasi atau kavitasi. Efusi pleura terjadi pada 50% kasus.

Secara makroskopis, didapatkan paru berwarna merah/ungu dengan cairan darah dan bronkitis eksudatif yang secara progresif menghasilkan kavitas berdinding tipis dengan pus berwarna hijau atau kuning kental (Gambar 2.1.a). Kemudian secara mikroskopis, ditemukan pola bronkopneumonia dengan infiltrat netrofil, fibrin, dan makrofag (Gambar 2.1.b). Nekrosis dengan pembentukan abses dan kavitasi juga sering ditemukan. Gambaran mikroskopis juga didapatkan gram positif kokkus dengan kluster membentuk anggur. Darah pada paru dapat dengan mudah dikultur (Zander dan Farver, 2018).



Gambar 2.2 Pneumonia (a) Gambaran Makroskopis Pneumonia; dan (b) Mikroskopis Pneumonia akibat infeksi *Staphylococcus aureus* (Zander dan Farver, 2018)

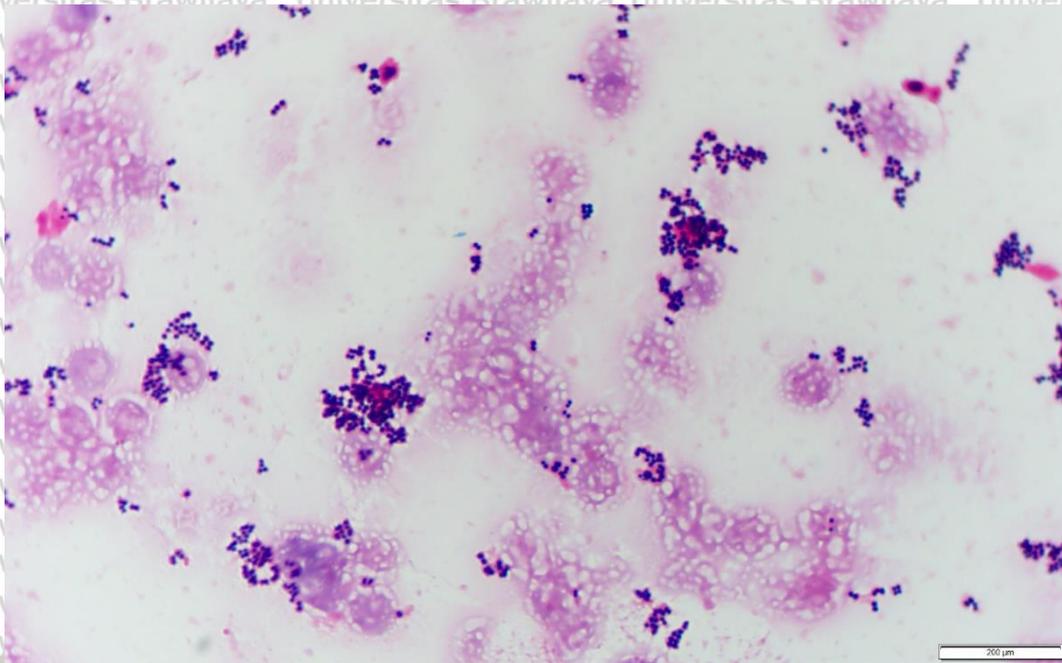
2.1.3. Taksonomi *Staphylococcus aureus*

CABI (2010) memaparkan klasifikasi bakteri *S. aureus* sebagai berikut:

Domain	: Bacteria
Phylum	: Firmicutes
Class	: Bacilli
Ordo	: Lactobacillales
Family	: Staphylococcaceae
Genus	: <i>Staphylococcus</i>
Species	: <i>Staphylococcus aureus</i>

2.1.4. Morfologi *Staphylococcus aureus*

S. aureus merupakan bakteri gram positif berukuran 0.5 – 1 µm. Bakteri *S. aureus* memiliki bentuk tunggal, bulat, sering ditemukan pada kluster yang membentuk pola menyerupai anggur. Bakteri ini memiliki kapsul, tidak berflagela, nonmotil, dan tidak membentuk spora. *S. aureus* memiliki karakteristik biokimia katalase positif, koagulase positif, oksidase negatif, reduktor nitrat, manitol fermenter, sensitif terhadap lempeng novobiosin, serta bersifat fakultatif anaerob yang berarti dapat tumbuh dengan ketiadaan oksigen. *S. aureus* termasuk bakteri komensal pada mamalia. Sepertiga manusia secara asimtomatis menjadi pembawa bakteri ini. Namun, pada keadaan tertentu, seperti imunitas rendah, bakteri dapat berubah menjadi patogen dan menimbulkan berbagai manifestasi klinis. Kultur dapat dilakukan salah satunya pada agar darah. Sampel dapat diambil dari kulit, mukosa, swab tenggorok, nostril, pus, maupun saluran reproduksi wanita bagian bawah (Tong *et al.*, 2015).



Gambar 2.3 Pewarnaan Gram *Staphylococcus aureus* pembesaran 1000x perhatikan dinding sel bakteri menyerap warna zat kristal violet dan morfologi *grap-like* (Holland, Arnold and Fowler, 2014)

2.1.5. Identifikasi *Staphylococcus aureus*

Prinsip identifikasi *S. aureus* dapat dilakukan dengan beberapa metode.

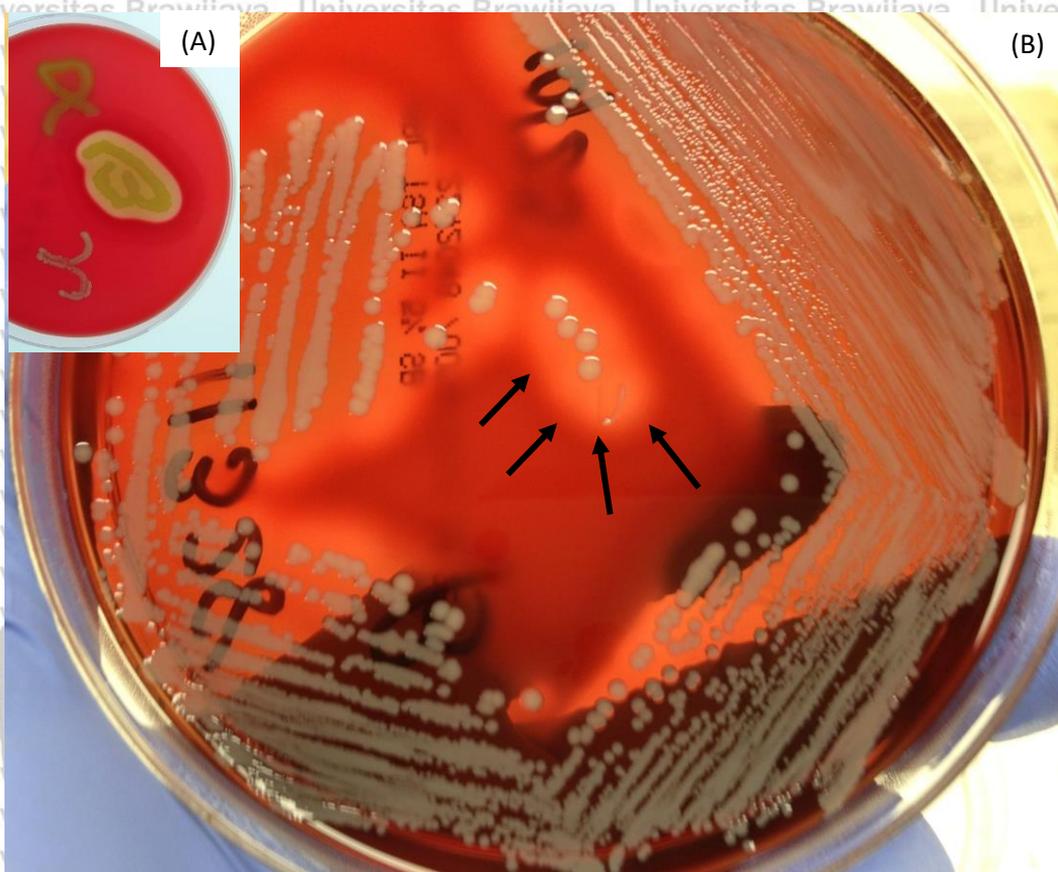
Metode-metode tersebut meliputi pengamatan koloni pada media kultur, pengamatan gambaran mikroskopis dari isolasi primer media, serta melakukan tes biokimia (Jawetz, 2007). Media pembenihan yang dapat digunakan untuk menumbuhkan *S. aureus* antara lain agar darah dan *mannitol salt* agar.

2.1.5.1. Agar Darah

Media agar darah biasa digunakan untuk isolasi dan menumbuhkan berbagai macam bakteri patogen. Media agar darah dapat digunakan untuk menetapkan kemampuan hemolisis dari bakteri tersebut. Media kultur ini kaya nutrisi yang menyediakan kondisi pertumbuhan bakteri optimal dan memiliki pH

sekitar 6.8 untuk menstabilkan sel darah merah serta menghasilkan zona hemolisis. Suhu kultur dipertahankan pada 20 - 45°C. Kandungan yang didapat pada agar darah meliputi nutrisi substrat (ekstrak hati dan pepton), NaCl, agar, dan darah domba (Butel *et al.*, 2005). Media Agar Darah merupakan media differensial yang berfungsi membedakan bakteri berdasarkan kemampuan bakteri melisis sel darah merah. Ekspresi dari kemampuan hemolisis bakteri dapat diketahui dari ada atau tidaknya zona bening di sekeliling koloni bakteri. Terdapat tiga tipe sifat hemolisis: alpha (α), beta (β), dan gamma (γ). Salah satu contoh bakteri yang memiliki tipe α -hemolisis adalah *Streptococcus pneumoniae*. Pada hemolisis alpha terjadi penurunan hemoglobin sel darah merah di sekitar koloni sehingga sekeliling bakteri akan memberikan warna hijau atau coklat dalam medium. Hemolisis beta didefinisikan sebagai proses lisis lengkap sel darah merah dengan tampilan warna transparan di sekeliling bakteri pada medium. Bakteri yang termasuk β -hemolisis adalah Bakteri *S. aureus* (dominan), *Streptococcus* Grup A dan *Streptococcus pyogenes*. Sedangkan, pada tipe γ -hemolisis menunjukkan ketiadaan tanda hemolisis. Bakteri yang memiliki sifat ini adalah *Klebsiella pneumoniae* dan *Enterococcus faecalis* (*Streptococcus* Grup D). Kemampuan menghemolisis sel darah merah tergantung oleh protein hemolysin yang dimiliki oleh bakteri (Jawetz, 2007; Sharma, 2015).

Pada *S. aureus*, koloni akan berwarna emas, hal tersebut sesuai dengan namanya (*aureus*:keemasan). Warna keemasan dihasilkan oleh pigmen stafilosantin. Koloni juga menunjukkan adanya tampilan warna transparan di sekitar bakteri yang menandakan sifatnya berupa β -hemolisis (Jawetz, 2007).



Gambar 2.4 Tampilan kemampuan hemolisis bakteri pada (A) Agar Darah, (B) Koloni *Staphylococcus aureus* menunjukkan β -hemolisis berwarna kuning dengan zona transparan di sekelilingnya pada Agar Darah (Sharma, 2015).

2.1.5.2. Mannitol Salt Agar

Mannitol Salt Agar (MSA) mengandung ekstrak daging sapi dan proteose pepton. Hal tersebut menjadikan MSA sangat bergizi karena menyediakan faktor pertumbuhan dan nutrisi penting seperti nitrogen, vitamin, mineral, dan asam amino untuk pertumbuhan. Media mengandung 7.5% konsentrasi natrium klorida yang menghasilkan penghambatan sebagian atau seluruh organisme bakteri selain stafilocokus. Mannitol adalah sumber karbohidrat yang dapat difermentasi,

hasil fermentasi akan mengarah pada produksi asam (asam laktat). *S. aureus*

tumbuh pada media ini dan memfermentasi mannitol untuk menghasilkan koloni kuning. Sebagian besar spesies koagulase negatif seperti *Staphylococci* dan *Micrococci* tidak memfermentasi mannitol dan tumbuh sebagai koloni merah kecil.

Warna koloni dan media disebabkan oleh reaktivitas fenol merah (indikator) terhadap pH medium. Fenol merah akan tetap menjadi merah pada pH 8.4 (basa)

dan fenol merah akan menjadi kuning pada pH 6.8 (asam). Agar digunakan

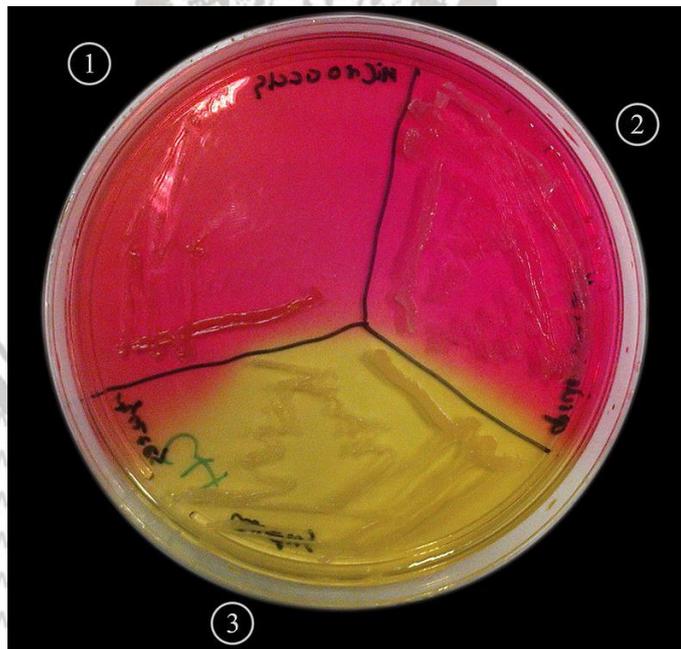
sebagai agen penguat. Selain itu, 5% Emulsi Kuning Telur dapat ditambahkan ke

media sebagai detektor aktivitas lipase stafilokokus bersama dengan fermentasi

manitol. Garam membersihkan emulsi kuning telur dan mikroorganisme yang

memproduksi lipase akan terdeteksi dengan adanya zona buram kuning di sekitar

koloni (Cindy, 2013).



Gambar 2.5 Koloni MSA (1) *Micrococcus* sp. dan (2) *Staphylococcus epidermidis*

menunjukkan warna merah muda karena tidak memfermentasi manitol.

Perhatikan koloni (3) *Staphylococcus aureus* berwarna kuning hasil perubahan fenol akibat asam yang dihasilkan dari fermentasi manitol (Cindy, 2013)

2.1.6. Epidemiologi

S. aureus (termasuk strain yang resistan terhadap obat seperti MRSA) ditemukan pada kulit dan selaput lendir, dan manusia adalah reservoir utama bagi organisme ini. Diperkirakan bahwa hingga setengah dari semua orang dewasa dijajah, dan sekitar 15% dari populasi terus-menerus membawa *S. aureus* di nares anterior. Beberapa populasi cenderung memiliki tingkat kolonisasi *S. aureus* yang lebih tinggi (hingga 80%), seperti petugas kesehatan, orang yang menggunakan jarum secara teratur (penderita diabetes dan pengguna obat intravena), pasien yang dirawat di rumah sakit, dan individu imun rentan. *S. aureus* dapat ditularkan dari orang ke orang melalui kontak langsung atau oleh *fomites* (Tong *et al.*, 2015).

Epidemiologi MRSA menurut Garoy dkk (2019) ditemukan 59 (72%) dari 82 sampel. Frekuensi MRSA pada pasien pria dan wanita adalah 55.9% dan 44.1%. Kelompok usia 19-40 tahun memiliki tingkat isolasi MRSA tertinggi dengan 22 (37.3%), diikuti oleh ≤ 18 yaitu 21 (35.6%). Frekuensi MRSA ditemukan pada pasien dengan abses, luka bakar, diabetes, dan luka operasi sebanyak 15 (62.5%), 12 (60%), 11 (78.6%), dan 21 (87.5%). Sumber utama infeksi MRSA terbanyak merupakan spesimen nanah 46 (71,9%) diikuti darah. Pasien dengan luka operasi memiliki frekuensi MRSA tertinggi (35.6%). Pasien dengan abses, luka bakar, dan diabetes memiliki frekuensi masing-masing 25.4%, 20.3%, serta 18.6%. Uji kerentanan antimikroba menunjukkan 19 (15.9%) resistensi terhadap vankomisin, 21 (11%) terhadap eritromisin, 5 (1.2%) terhadap gentamisin, dan sisanya oleh oksasiklin. Selain itu, juga ditemukan beberapa isolat dengan resistensi antibiotik kombinasi yang biasa digunakan: Oxa/Eryth, 5 (6.1%); Oxa/Gen/Eryth, 1 (1.2%); Oxa/Van, 9 (11%); Oxa/Van/Eryth, 2 (2,4%) (Garoy *et al.*, 2019). Sedangkan di Indonesia, Erikawati dkk (2016) mengungkapkan prevalensi MRSA di RSUD dr. Saiful Anwar Malang tahun 2010-2014 dengan

keseluruhan didapatkan 772 isolat *S. aureus*, 38.2% diantaranya merupakan isolat MRSA. Prevalensi MRSA tertinggi didapatkan pada tahun 2012 (45.3%), sedangkan prevalensi terendah pada tahun 2013 (33.5%). Kasus MRSA paling sering ditemukan dari pus (49%). Penurunan pada tahun 2013 terjadi akibat intervensi skrining massal dan edukasi kepada tenaga kesehatan di lingkungan RSSA pada tahun 2012 (Erikawati *et al.*, 2016).

2.1.7. Patogenesis

S. aureus adalah salah satu infeksi bakteri yang paling umum pada manusia dan merupakan agen penyebab berbagai infeksi manusia, termasuk bakteremia, endokarditis infeksi, infeksi kulit dan jaringan lunak (misalnya, impetigo, folikulitis, furunkel, karbunkel, selulitis, sindrom kulit melepuh, dan lainnya), osteomielitis, radang sendi septik, infeksi alat prostetik, infeksi paru (misalnya, pneumonia dan empiema), gastroenteritis, meningitis, sindrom syok toksik, dan infeksi saluran kemih. Manifestasi klinis bergantung pada strain yang terlibat dan lokasi infeksi, bakteri ini dapat menyebabkan infeksi invasif atau penyakit yang dimediasi oleh toksin (Tong *et al.*, 2015).

Patofisiologi sangat bervariasi tergantung pada jenis infeksi *S. aureus*. Mekanisme untuk menghindari respon imun inang meliputi produksi kapsul antifagositik, sekuestrasi antibodi inang, penyembunyian antigen oleh Protein A, pembentukan biofilm, kelangsungan hidup intraseluler, dan memblokir kemotaksis leukosit. Ikatan bakteri dengan protein matriks ekstraseluler dan fibronektin pada endokarditis infeksi dimediasi oleh protein terkait dinding sel bakteri seperti protein pengikat fibrinogen, faktor penggumpalan, dan asam teichoic. *Superantigen Staphylococcal* (TSST-1 atau *toxic shock syndrome toxin-1*) adalah faktor virulensi penting dalam endokarditis infeksi, sepsis, serta sindrom syok toksik. Infeksi pneumonia berhubungan dengan produksi senyawa PVL (Panton-Valentine

leukocidin), Protein A, dan alpha-hemolysin. Infeksi dapat menjadi lebih sering terjadi setelah infeksi virus influenza serta keadaan kistik fibrosis. Infeksi perangkat prostetik juga sering dimediasi oleh kemampuan strain *S. aureus* untuk membentuk biofilm serta berkomunikasi menggunakan *quorum sensing* dengan cara yang bervariasi tergantung pada kepadatan sel bakteri (Leo, Diep, dan Otto, 2009).

Tabel 2.1 Molekul *S. aureus* yang berkontribusi pada penghindaran kekebalan tubuh atau gangguan pada fungsi kekebalan tubuh inang (Leo, Diep, dan Otto, 2009)

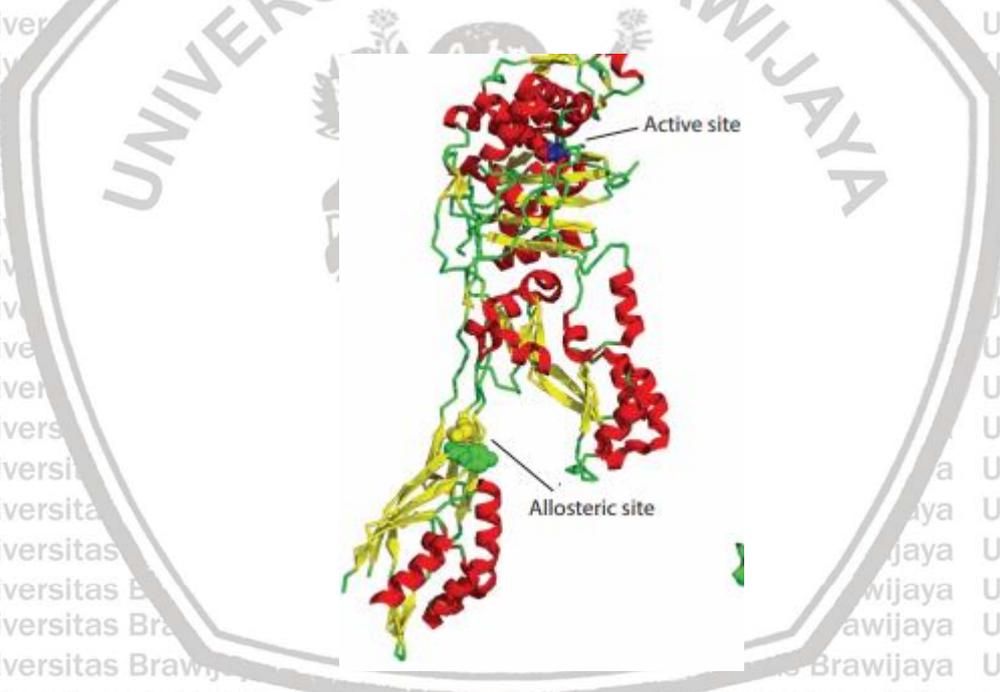
Gen	Protein atau Molekul	Fungsi atau Efek pada Sistem Imun
<i>ahpC, ahpF</i>	Alkyl hydroperoxide reduktase subunits C dan F, AhpC, dan AhpF	Menimbulkan resistensi terhadap ROS
<i>aur</i>	Zinc metalloproteinase aureolysin, Aur	Mendegradasi LL-37
<i>cap5</i> atau <i>cap8</i> genes	Kapsul polisakarida	Menghambat fagositosis
<i>kata</i>	Katalase, KatA	Mendetoksifikasi Hidrogen Peroksida
<i>chp</i>	Protein inhibitor kemotaksis of <i>S. aureus</i> , CHIPS	Menghambat kemotaksis
<i>clfA</i>	Faktor pembekuan A, ClfA	Menghambat fagositosis dan menimbulkan aktivasi platelet
<i>crtM, crtN</i>	Pigmen karotenoid, staphyloxanthin	Menimbulkan resistensi terhadap ROS
<i>dlt</i> operon	Dlt operon, DltABCD	Meningkatkan resistensi bakteri terhadap AMPs and phospholipase A ₂ grup II
<i>eap</i>	<i>Extracellular adherence protein</i> , Eap	Menghambat adhesi leukosit
<i>ecb</i>	<i>Extracellular complement-binding protein</i> , Ecb	Menghambat sintesis komplemen C5a
<i>efb</i>	<i>Extracellular fibrinogen-binding protein</i> , Efb	Menghambat sintesis komplemen C5a
<i>fnbA, fnbB</i>	<i>Fibronectin-binding proteins</i> A dan B, FnbA, serta FnbB	Aktivasi platelet
<i>hla, hly</i>	<i>Alpha-hemolysin</i> (α-hemolysin), Hla	Lisis sel inang
<i>hld</i>	Delta-hemolysin, Hld	Lisis sel inang

Gen	Protein atau Molekul	Fungsi atau Efek pada Sistem Imun
<i>hlgA, hlgB, hlgC</i>	subunit <i>Gamma-hemolysin</i> A, B, dan C; HlgA, HlgB, HlgC; <i>two-component leukocidin</i>	Lisis leukosit dan eritrosit
<i>icaA, icaD, icaB, icaC, icaR</i>	Polisakarida interseluler adhesin, PIA	Resistensi terhadap AMPs
<i>isdA, isdB</i>	Iron-regulated surface determinants of <i>S. aureus</i> , IsdA and IsdB	Resistensi terhadap AMPs, <i>skin fatty acids</i> , danneutrophil ROS
<i>lukS-PV, lukF-PV</i>	Leukocidin S-PV and F-PV subunits; LukS/F-PV; PVL; two-component leukocidin	Lisis sel fagosit
<i>lukD, lukE</i>	Leukocidin D and E; LukD and Luke; two-component leukocidin	Lisis leukosit
<i>mprF</i>	<i>Multiple peptide resistance factor</i> , MprF	Resistensi terhadap AMPs
<i>psm</i>	<i>Phenol-soluble modulins-like peptides</i> , PSMs	Lisis leukosit
<i>sak</i>	Stafylokinase	Menghambat pertahanan inang α -defensins
<i>sbi</i>	<i>IgG-binding protein</i> , Sbi	Mensekuestrasi IgG inang
<i>scn</i>	<i>Staphylococcal inhibitor of complement</i> , SCIN	Menghambat aktivasi komplemen
<i>sea, seb, secn, sed, see, seg, seh, sei, sej, sek, sel, sep</i>	<i>Staphylococcal enterotoxins</i> ; SEA, SEB, SECn, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, and SEP	Aktivasi sel T inang
<i>sodA, sodM</i>	Superoxide dismutase, SodA, SodM	Resistensi terhadap ROS
<i>spa</i>	Protein A	Mensekuestrasi IgG inang, Menghambat fagositosis
<i>ssl5</i>	<i>Staphylococcal superantigen-like 5</i> , SSL5	Mengikat PSGL-1
<i>ssl7</i>	<i>Staphylococcal superantigen-like 7</i> , SSL7	Mengikat C5a dan IgA
<i>tst</i>	<i>Toxic shock syndrome toxin-1</i> , TSST1	Aktivasi sel T inang

2.1.8. Resistensi

Resistensi *S. aureus* pertama kali ditemukan pada tahun 1941, hanya berselang dua tahun dari penemuan antibiotik penisilin. Kehadiran antibiotik metisilin pada tahun 1959 membuka harapan baru. Namun, penggunaan yang berlebihan dan penggunaan yang tidak adekuat membuat bakteri ini berevolusi,

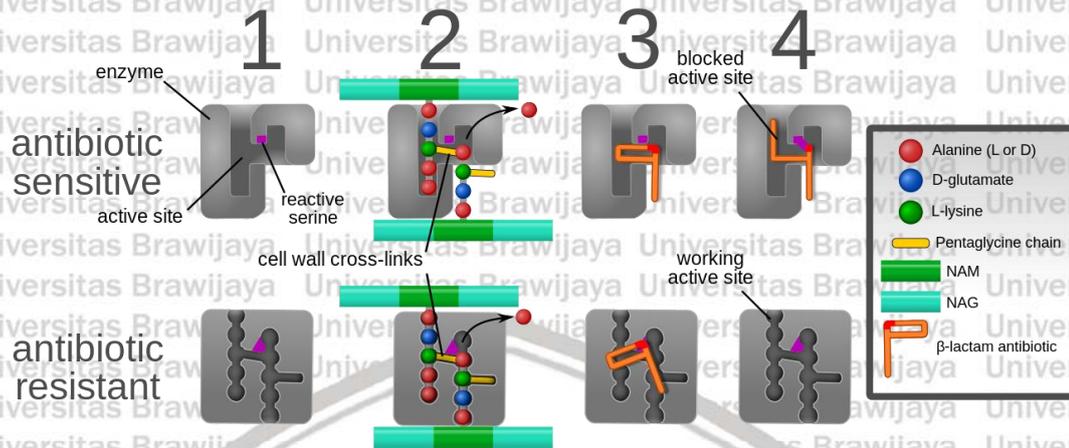
MRSA pertama dilaporkan pada tahun 1960. Saat ini, resistensi pada MRSA terutama dimediasi oleh gen *mecA*. Gen *mecA* mengkodekan protein pengikat penisilin baru, PBP-2a. Pada MRSA, paparan antibiotik anti-stafilokokus: methicillin, flucloxacillin, dicloxacillin, nafcillin, dapat menonaktifkan empat PBP berafinitas tinggi yang biasanya ada. Namun, PBP-2a, yang menunjukkan afinitas rendah terhadap methicillin, mengambil alih fungsi PBP ini, serta memungkinkan sel bakteri tumbuh walau dalam paparan antibiotik. Regulasi fenotip yang resisten metisilin dan produksi PBP-2a dipengaruhi oleh aksi gen lain. Dua gen *mecR1* dan *mecI* yang terletak di hulu dari *mecA* juga mengontrol ekspresi PBP-2a.



Gambar 2.6 Struktur PBP2a: Susunan monomer situs aktif dan alosterik (Otero *et al.*, 2013)

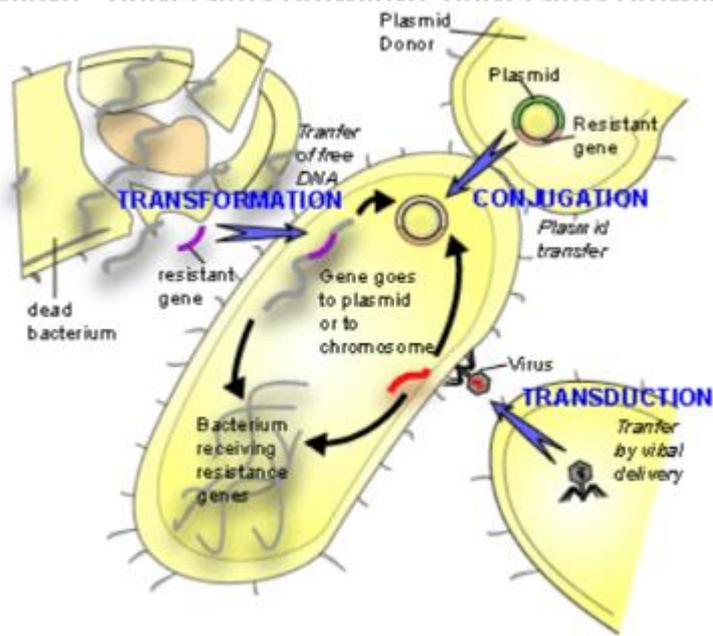
Selain itu, terdapat beberapa mekanisme lainnya terkait resistensi *S. aureus* terhadap berbagai antibiotik seperti inaktivasi enzimatis oleh antibiotik oleh produksi penisilinase yang akan membuat *S. aureus* tahan terhadap penisilin selain agen anti-stafilokokus, misal amoksisilin, ampisilin, benzil penisilin, dan penisilin V. Enzim pemodifikasi aminoglikosida juga akan membuat MRSA resisten

terhadap gentamisin, tobramycin, netilmicin, dan amikacin. *S. aureus* juga dapat merubah target antibiotik dengan menurunkan afinitas antibiotik seperti produksi *D-Ala-D-Lac* prekursor peptidoglikan serta *D-Ala-D-Ala* yang akan memberikan resistensi terhadap vankomisin dan teicoplanin. Mekanisme pompa eflux akan menghasilkan resistensi terhadap fluoroquinolon dan tetrasiklin dengan memompa molekul antibiotik keluar sitoplasma. Susunan genetik yang kompleks juga mendukung resistensi bakteri, misal elemen *mec staphylococcal chromosomal disc* atau operon *vanA*. Elemen tersebut diperoleh *S. aureus* melalui transfer gen horizontal. Resistensi terhadap antibiotik lain, termasuk fluoroquinolon, linezolid, dan daptomycin, telah berkembang melalui mutasi spontan dan seleksi positif. Saat ini, deteksi mekanisme resistensi secara tepat merupakan langkah penting bagi pengawasan resistensi antibiotik pada MRSA. Vankomisin tetap menjadi obat pilihan untuk pengobatan infeksi yang disebabkan oleh MRSA, meskipun secara intrinsik kurang aktif daripada penisilin anti-stafilokokus. Selain itu, jenis MRSA Resisten Multi Obat yang tinggi baru-baru ini muncul terhadap vankomisin, yang dikaitkan dengan tingkat kegagalan terapi vankomisin yang tinggi pada pneumonia dan bakteremia MRSA, yang mengakibatkan beban morbiditas dan mortalitas yang lebih tinggi. Akibatnya agen alternatif yang aktif terhadap MRSA telah dikembangkan dan dipasarkan yang meliputi linezolid, daptomycin, dan ceftaroline. Jika ada respons yang buruk terhadap vankomisin atau teicoplanin, agen alternatif harus dipertimbangkan untuk terapi infeksi MRSA yang serius, mis. bakteremia, endokarditis, diskitis tulang belakang, abses perinefrik, atau pneumonia MRSA.



Gambar 2.7 Diagram resistensi antibiotik melalui perubahan situs target antibiotik, dimodelkan setelah resistensi MRSA terhadap penisilin. Antibiotik β -laktam adalah enzim PBP aktif secara permanen yang penting untuk sintesis dinding sel dengan mengikat secara permanen ke situs aktif mereka. Namun, beberapa bentuk MRSA mengekspresikan PBP berbeda yang tidak akan membiarkan antibiotik masuk ke situs aktifnya (*Common License*)

Bakteri tersebut mendapatkan kemampuan resistensi antibiotik dari bakteri yang terlebih dahulu mendapatkan gen resistensi pada susunan DNA/plasmidnya. Transduksi, transformasi, dan Konjugasi merupakan mekanisme yang dipakai pada transfer gen. Konjugasi merupakan transfer gen dengan menggunakan jembatan transfer, Transformasi ialah kemampuan bakteri dalam menangkan gen resisten bebas, sedangkan transduksi merupakan transfer gene resisten yang diinduksi oleh virus, biasanya bakteriofag (Shaikh *et al.*, 2015; Rossotti and Orani, 2011).



Gambar 2.8 Mekanisme Transfer Gene Resistensi pada Bakteri (Rossotti dan Orani, 2011)

2.2. Tanaman Kopi Arabika (*Coffea arabica*)

2.2.1. Tinjauan Umum

Kopi telah menjadi produk primer yang paling berharga secara global, mempekerjakan lebih dari 26 juta orang di sepanjang rantai dari mulai proses budidaya terutama di negara berkembang hingga proses konsumsi di negara maju. Pada 2017, 160 juta kantong kopi diekspor, di mana Kopi Arabika (*Coffea arabica* L.) menyumbang 63.3% dari keseluruhan penjualan kopi. Sisanya sebagian besar adalah Kopi Robusta (*Coffea canephora* Pierre ex Froehner). Diperkirakan nilai industri kopi mencapai lebih dari 100 miliar USD di seluruh dunia dengan hingga 20 miliar USD hanya untuk ekspor. Kopi terutama diperdagangkan sebagai biji mentah ataupun olahan (Acidri *et al.*, 2020).

Indonesia adalah produsen kopi terbesar keempat di dunia pada saat ini.

Budidaya kopi di Indonesia dimulai pada akhir 1600-an dan awal 1700-an, pada

awal masa kolonial Belanda. Tanaman Kopi Arabika telah memainkan peran penting dalam pertumbuhan negara. Indonesia secara geografis dan klimatologi cocok untuk perkebunan kopi, dekat khatulistiwa dan dengan banyak daerah pegunungan pedalaman di pulau-pulau utamanya, menciptakan iklim mikro yang cocok untuk pertumbuhan dan produksi kopi (Torrez and Elena, 2006). *C. arabica* membutuhkan waktu sekitar tujuh tahun untuk menjadi dewasa sepenuhnya. *C. arabica* tumbuh dengan baik dengan curah hujan 1.0 – 1.5 meter (sekitar 40–59 inci) yang tersebar merata sepanjang tahun. *C. arabica* dibudidayakan pada ketinggian antara 1.300 dan 1.500 m meskipun ada perkebunan yang menanamnya serendah permukaan laut ataupun setinggi 2.800 m. *C. arabica* dapat mentolerir suhu rendah serta tidak membeku, dan tumbuh paling baik dengan suhu rata-rata antara 15 – 24°C. Kultivar komersial kebanyakan hanya tumbuh sekitar 5 m, bahkan seringkali dipangkas serendah 2 m untuk memudahkan panen. Tidak seperti *Coffea canephora*, *Coffea arabica* lebih suka ditanam di tempat teduh (USDA, 2014).



Gambar 2.9 Biji Kopi Arabika (Kiri) *Green coffee beans*, dan (Kanan) *Roasted coffee beans* (Common license)

Tanaman Kopi di Dunia secara pasar global didominasi oleh *Coffea arabica*

serta *Coffea canephora* (Kopi Robusta). Terdapat satu spesies kopi yang berasal dari Afrika, *Coffea liberica* atau dikenal dengan Kopi Ekselsa. Pemilihan Kopi

Arabika dalam penelitian ini selain mudah didapatkan di Indonesia, penelitian-penelitian yang membandingkan efek antimikroba antara dua spesies kopi Arabika dan Robusta, menghasilkan daya hambat yang lebih besar pada spesies Kopi Arabika (Runti *et al.*, 2015; Wijaya *et al.*, 2016). Literatur yang membahas Kopi

Arabika juga lebih banyak jika dilihat dari sudut pandang Mikrobiologi. Bahkan, Runti dkk (2015) menunjukkan bahwa ekstrak kopi arabika memiliki spektrum aktivitas antibakteri yang luas sekaligus memiliki dosis sitotoksik yang rendah terhadap manusia melalui penelitian *in vitro* menggunakan *human breast carcinoma cell line* (Runti *et al.*, 2015). Selain itu, metode pengekstrakan juga dinilai penting dalam kemampuannya mengekstraksi bahan aktif di dalam Biji Kopi Arabika. Perbandingan tiga jenis pelarut: Etanol, Kloroform, dan Air menunjukkan bahwa pelarut Etanol memiliki kemampuan mengekstrak senyawa aktif lebih banyak serta zona inhibisi yang lebih luas daripada pelarut kloroform dan air (Mahajan and Kapoor, 2018).

2.2.2. Taksonomi Tanaman Kopi Arabika

CABI (2010) memaparkan klasifikasi Tanaman Kopi Arabika sebagai berikut:

Domain : Eukaryota

Kingdom : Plantae

Divisio : Magnoliophyta

Class : Magnoliopsida

Subclass : Asteridae

Ordo : Rubiales

Family : Rubiaceae

Genus : *Coffea*

Species : *Coffea arabica* L.

2.2.3. Morfologi

Tanaman Kopi Arabika dapat tumbuh hingga 9 dan 12 m (30 dan 39 kaki), dan memiliki sistem percabangan terbuka; daunnya berseberangan, berbentuk bulat telur lonjong sampai lonjong sempurna, panjang 6 – 12 cm (2.5 – 4.5 inci) dan lebar 4 – 8 cm (1.5 – 3 inci), hijau tua mengkilap. Bunganya berwarna putih, diameter 10 – 15 mm dan tumbuh dalam kluster aksilarin. Bijinya terkandung dalam buah berbiji (biasa disebut "*cherry*") dengan diameter 10 – 15 mm, berwarna merah terang hingga ungu, dan biasanya berisi dua biji. Biji inilah yang sering disebut biji kopi (Schmitt and Christine, 2006). *Coffea arabica* adalah satu-satunya spesies poliploid dari genus *Coffea*, karena ia membawa 4 salinan dari 11 kromosom (total 44), bukan 2 salinan spesies diploid. Secara khusus, *Coffea arabica* sendiri merupakan hasil hibridisasi antara diploid *Coffea canephora* dan *Coffea eugenioides*, sehingga menjadikannya alotetraploid, dengan dua salinan dari dua genom yang berbeda (Prado *et al.*, 2019).



Gambar 2.10 Tanaman Kopi Arabika *Coffea arabica* L. (Common License)

2.2.4. Manfaat Tanaman Kopi Arabika

Kopi telah diklaim sebagai minuman fungsional yang merupakan sumber antioksidan penting, terutama karena tingginya jumlah senyawa fenolik dan kafein.

Konstituen kimia kopi arabika melibatkan senyawa fenolik dan turunannya (seperti asam klorogenat), alkaloid (khususnya kafein), alkohol diterpenoid (seperti cafestol dan kahweol), karbohidrat, lipid, senyawa volatil, serta heterosiklik. Asam klorogenat (CGA) merupakan salah satu senyawa dari asam trans-sinamat yang jumlahnya dalam kopi hijau berkurang secara signifikan selama proses pemanggangan (*roasting*) (Brezová, Šlebodová and Staško, 2009). Dalam dekade terakhir, senyawa polifenol telah dianggap sebagai salah satu bahan fungsional yang paling efektif dalam makanan dan minuman, dengan sifat antipenuaan, antioksidan, dan mampu menetralkan efek kerusakan oksidatif. Studi dengan ekstrak *C. arabica* telah mengungkapkan beberapa aktivitas biologis, seperti antibakteri (Almeida *et al.*, 2006; Kapoor and Mahajan, 2018; Bhakir, 2019),

antivirus (Utsunomiya *et al.*, 2008), anti-inflamasi (Moreira *et al.*, 2005; dos Santos *et al.*, 2011), aktivitas penekan ekspresi metaloproteinase (Chiang *et al.*, 2011), dan reduksi oksidatif yang mencegah kerusakan makromolekul (Hoelzl *et al.*, 2010). Selain senyawa fenolik, kopi juga dikenal sebagai sumber alkaloid yang kaya, terutama kafein. Metabolit sekunder tersebut telah menyajikan aktivitas biologis yang relevan seperti, misalnya, stimulasi sistem saraf pusat, diuretik, dan vasokonstriksi perifer. Kafein adalah alkaloid utama yang ada dalam biji kopi dan kandungannya berkorelasi dengan kualitas minuman, juga berkontribusi pada rasa pahit minuman (Kapoor and Mahajan, 2018).

2.2.5. Kandungan Tanaman Kopi Arabika

Skrining fitokimia kualitatif dan kuantitatif dari Biji Kopi Arabika mengungkapkan beberapa senyawa kimia bioaktif penting yang dapat dikaitkan dengan potensi antimikrobal. Konstituen bioaktif seperti alkaloid, flavonoid, koumarin, kuinon, fenol, dan minyak atsiri. Selain senyawa aktif, ekstrak etanol Biji Kopi Arabika juga mengandung beberapa mineral, trigonelin, lemak, asam klorogenat, asam alifatis, oligosakarida, polisakarida, asam amino, protein, dan juga asam humat. Mineral yang telah diketahui terkandung dalam Biji Kopi Arabika antara lain C, O, Na, Mg, K, Ca, Fe, Zn, Cu, dan Br. Sebelumnya, telah diketahui adanya Asam Klorogenat pada Biji Kopi Arabika. Asam klorogenat termasuk keluarga dari ester yang terbentuk dari gabungan asam kuinat dan beberapa asam trans-sinamat, umumnya *caffeic*, *pcoumaric* dan asam ferulat. Asam Klorogenat merupakan metabolit sekunder terbanyak setelah kafein (Chan and Garcia, 2011; Kapoor and Mahajan, 2018).

Tabel 2.2 Komposisi Biji Kopi Arabika (Chan and Garcia, 2011)

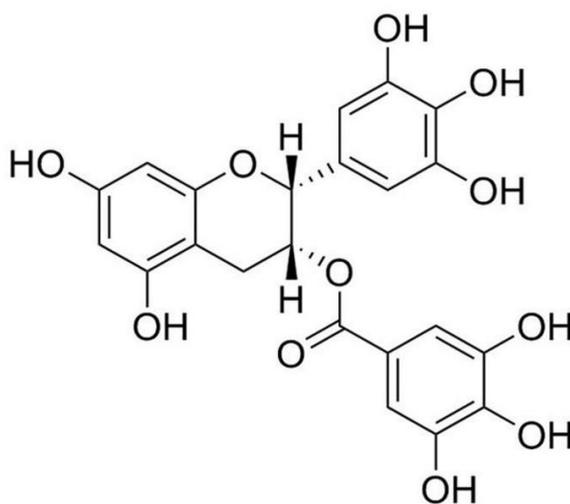
Komponen	Jumlah (%Bobot Kering)	
	<i>Green coffee beans</i>	<i>Roasted coffee beans</i>
Mineral	3.0 – 4.2	3.5 – 4.5
Kafein	0.9 – 1.2	1.0
Trigonelin	1.0 – 1.2	0.5 – 1.0
Lemak	12.0 – 18.0	14.5 – 20.0
Asam Klorogenat	5.5 – 8.0	1.2 – 2.3
Asam Alifatis	1.5 – 2.0	1.0 – 1.5
Oligosakarida	6.0 – 8.0	0.0 – 3.5
Polisakarida	50.0 – 55.0	24.0 – 39.0
Asam Amino	2.0	0
Protein	11.0 – 13.0	13.0 – 15.0
Asam Humat	-	16.0 – 17.0

2.2.5.1. Flavonoid dan Mekanisme Antibakteri

Flavonoid merupakan metabolit sekunder yang melimpah. Flavonoid biasanya didapatkan dari sel fotosintesis dan secara umum ada pada Kingdom Plantae. Flavonoid adalah kelas penting dari produk alami. Flavonoid termasuk dalam kelas metabolit sekunder tanaman yang memiliki struktur polifenol, banyak ditemukan dalam buah-buahan, sayuran dan minuman tertentu. Mereka memiliki

aneka efek biokimia dan antioksidan yang menguntungkan yang terkait dengan berbagai penyakit seperti kanker, penyakit Alzheimer (AD), aterosklerosis, dll. Flavonoid dikenal memiliki sifat antioksidan, anti-inflamasi, anti-mutagenik, dan anti-karsinogenik ditambah dengan kapasitasnya untuk memodulasi fungsi enzim seluler utama. Mereka juga dikenal sebagai inhibitor kuat untuk beberapa enzim, seperti *xanthine oxidase* (XO), *cyclo-oxygenase* (COX), *lipoxigenase* dan *phosphoinositide 3-kinase* (Panche, Diwan and Chandra, 2016).

Flavonoid memiliki struktur dasar dengan 3 atom karbon diantara dua cincin aromatis (C6-C3-C6). Berdasarkan struktur kerangka karbonnya, flavonoid dibagi menjadi 6 sub kelompok utama yaitu flavon, flavonol flavanon, flavanol, isoflavon, dan antosianidin (Cushnie dan Lamb, 2005; Krol *et al.*, 2019). Epigallocatechin gallate (EGCg), rutoside -3- O - quercetin, glycoside -3- O - kaempferol, glycoside -3- O-quercetin, quercetin, and kaempferol merupakan senyawa flavonoid yang dapat ditemukan pada Biji Kopi Arabika, dengan senyawa epigallocatechin gallate yang paling banyak dijumpai (Krol *et al.*, 2019).



Gambar 2.11 Epigallocatechin gallate, Salah Satu Flavonoid terbanyak pada Biji Kopi Arabika (Krol *et al.*, 2019)

Mekanisme kerja flavonoid sebagai antimikroba memiliki beberapa jalur.

Mekanisme tersebut dapat dibagi menjadi 3 yaitu menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi membran sel dan menghambat metabolisme energi (Cushnie dan Lamb, 2005).

Cushnie dan Lamb (2005) melakukan skrining pada 14 jenis flavonoid dengan struktur beragam untuk menghambat aktivitas DNA gyrase pada bakteri *Escherichia coli*, serta aktivitas antibakteri pada *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* dan *Stenotrophomonas maltophilia*. Pada penelitian tersebut ditemukan bahwa DNA gyrase pada bakteri *Escherichia coli* berhasil dihambat oleh tujuh komponen flavonoid yaitu *quercetin*, *epigallocatechin gallate*, *apigenin* dan 3,6,7,3,4 – *pentahydroxyflavone*.

Mekanisme penghambatan berhasil diketahui melalui ikatan atau interkalasi hidrogen dalam proses sintesis asam nukleat. Cincin A dan B pada flavonoid memegang peranan penting dalam proses interkalasi atau ikatan hidrogen dengan menumpuk basa asam nukleat yang menghambat pembentukan DNA dan RNA.

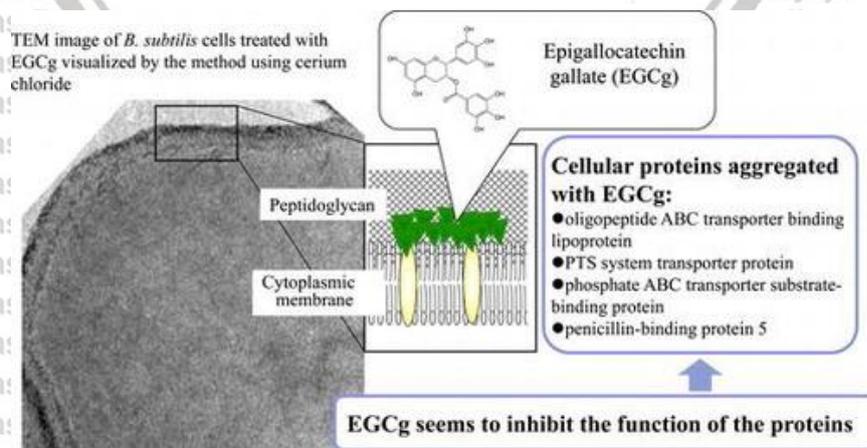
Letak gugus hidroksil di posisi 2',4' atau 2',6' dihidroksilasi pada cincin B sedangkan 5,7 dihidroksilasi pada cincin A. Flavonoid menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri, mikrosom, dan lisosom sebagai hasil interaksi antara flavonoid dengan DNA bakteri (Cushnie dan Lamb, 2005).

Mekanisme penghambatan senyawa flavonoid, flavon, pada girase DNA *Escherichia coli* dan inhibitorynya ditunjukkan dengan menghambat aktivitas girase melalui interkalasi ke dalam DNA. Sedangkan, *simocyclinone* D8 bertindak sebagai pengikat kompetitif DNA untuk menghambat fungsi girase dalam pembelahan sel (Xie et al., 2014).

Mekanisme kedua, kerja flavonoid menghambat fungsi membran sel melalui efek sophoraflavone G pada fluiditas membran yang diteliti melalui

membran model liposomal dan dibandingkan dengan flavon jenis kurang aktif, naringenin, karena lebih sedikit mengandung grup *8-lavdanulyl* dan *2 - hydroxyl*. Pada konsentrasi terkait MIC, sophoraflavone G telah berhasil menunjukkan peningkatan pada polarisasi fluoresens dari liposom secara signifikan. Hal tersebut mendanakan bahwa peningkatan gangguan pada fluiditas membran di bagian hidrofilik dan hidrofobik yang berdampak pada berkurangnya fluiditas dari lapisan luar maupun dalam membran sel. Naringenin juga mengurangi fluiditas membran sel namun dengan konsentrasi yang lebih Tinggi (Tsuchiya dan linuma, 2000).

Mekanisme ketiga, elektroforesis gel natrium dodesil sulfat-poliakrilamida (SDS-PAGE) dari seluruh protein sel menunjukkan bahwa perlakuan EGCg pada *Eschericia coli* menghasilkan peningkatan agregat protein yang tidak dapat bermigrasi dalam gel elektroforesis. Hasil ini menunjukkan bahwa EGCg mengikat protein bakteri tertentu untuk membentuk agregat kuat yang tahan terhadap pelarutan dengan deterjen ionik. Analisis protein bakteri menunjukkan bahwa target utama EGCg pada permukaan sel *E. coli* ialah porin, protein membran luar. Mekanisme EGCg lainnya terdapat pada gambar 2.12 (Nakayama *et al.*, 2015).

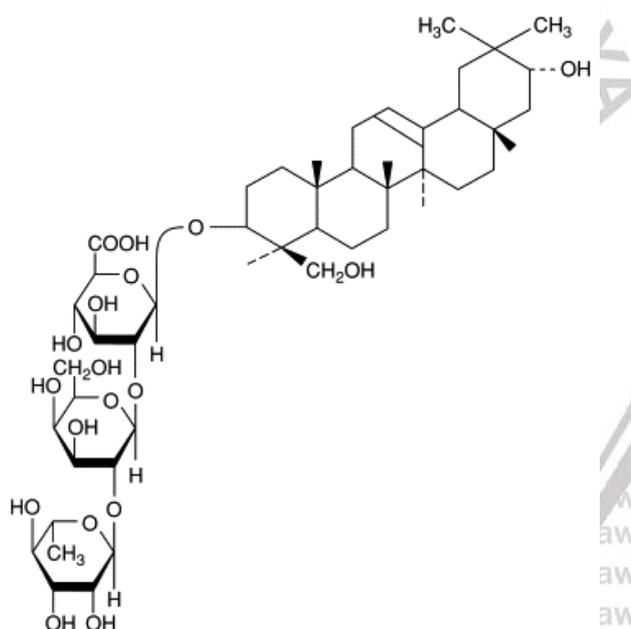


Gambar 2.12 Mekanisme antibakterial EGCg terhadap *B. Subtilis* (Ali *et al.*, 2017)

2.2.5.2. Saponin dan Mekanisme Antibakteri

Saponin adalah suatu senyawa kimia yang dapat berperan sebagai metabolit sekunder yang banyak terdapat di alam, yang tersusun dari gugus gula yang berikatan dengan aglikon atau sapogenin. Saponin atau saponosida adalah heterosida yang terdiri dari dua bagian: rantai glukid yang larut dalam air dan struktur liposoluble steroid triterpenik atau steroid secara umum (aglycone).

Saponin diklasifikasikan oleh mayoritas peneliti dalam dua kelompok sesuai dengan sifat aglikon mereka: saponin steroid & saponin triterpenoid (Bhatia and Dahiya, 2015).



Gambar 2.13 Struktur Saponin triterpenoid (Bhatia and Dahiya, 2015)

Mekanisme terbaru antibakterial dari saponin berhasil dijelaskan oleh Khan *et al* tahun 2018 dengan melisiskan sel bakteri oleh saponin. Khan dan kolega mengukur kandungan AKP (Alkaline phosphatase) dari masing-masing strain setelah terpapar dengan saponin. Isi AKP diukur sesuai dengan metode He *et al.*, dengan sedikit modifikasi. AKP ditemukan antara dinding sel dan membran sel sel

bakteri. Kebocoran AKP terjadi hanya ketika dinding sel bakteri rusak. Oleh karena itu jumlah AKP berbanding lurus dengan lisis sel. Ketika saponin menyebabkan *blister* dan berujung pada pecahnya dinding sel bakteri, isi dari sitoplasma bakteri akan keluar ke media eksternal (Khan *et al.*, 2018). Penelitian lain oleh Haryoto *et al* tahun 2018 dari Universitas Muhammadiyah Surakarta menunjukkan Kadar Hambat Minimum (KHM) yang terbentuk dari senyawa saponin hasil ekstrak daun Sirsak pada bakteri *Klebisella pneumonia* dan *S. aureus*. Haryoto mengemukakan bahwa senyawa golongan saponin, polifenol, dan antrakinon memiliki aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* (Haryoto *et al.*, 2018). Selain itu, Khan, pada percobaannya, juga mengemukakan bahwa saponin memiliki potensi antimikroba terhadap beberapa bakteri gram negatif dan gram positif diantaranya *Klebisella pneumonia*, *Eschericia coli*, dan beberapa serovarian *Salmonella* (Khan *et al.*, 2018).

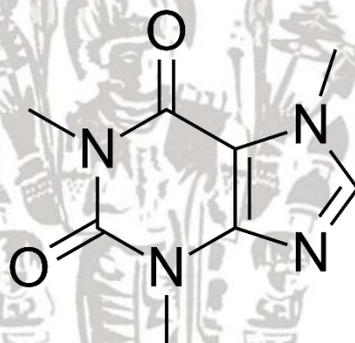
2.2.5.3. Alkaloid dan Mekanisme Antibakteri

Alkaloid adalah kelompok metabolit sekunder yang besar dan beragam secara struktural yang berasal dari mikroba, tumbuhan, atau hewan. Mereka dapat ditemukan di sekitar 300 famili tumbuhan (Cushnie *et al.*, 2014). Meskipun mereka ada di berbagai bagian tanaman, senyawa tertentu terbatas pada bagian tertentu, seperti kina pada kulit pohon kina (Abreu, McBain and Simões, 2012).

Alkaloid adalah struktur heterosiklik yang mengandung satu atau lebih atom nitrogen. Alkaloid dapat membentuk ikatan hidrogen dengan enzim, reseptor, dan protein, karena mereka memiliki, selain gugus fungsi, sebuah atom nitrogen penerima proton, dan satu atau bahkan lebih proton yang menyumbangkan atom hidrogen amina. Alkaloid memiliki banyak sifat farmakologis, seperti stimulan sistem saraf pusat (brucine), agen antikolinergik (atropin), aktivitas oksitosik dan vasokonstriktor (ergometrine), dan aktivitas antimalaria. Mereka diklasifikasikan

berdasarkan struktur kimianya atau asal alaminya (Abreu, McBain and Simões, 2012). Ada dua divisi besar dalam klasifikasi menurut struktur kimianya. Divisi pertama berisi alkaloid non-heterosiklik atau atipikal, juga disebut protoalkaloids atau amina biologis, seperti hordenine atau N-methyltyramine, colchicine, dan erythromycin. Divisi kedua meliputi heterosiklik atau alkaloid tipikal seperti hygrines yang termasuk dalam grup pirol dan pyrrolidine, dan kina yang termasuk dalam grup quinoline. Pada *coffea arabica*, caffein merupakan senyawa alkaloid.

Caffein pada Biji Kopi Arabika merupakan salah satu metabolit sekunder terbanyak yang dapat ditemui (Cushnie *et al.*, 2014).



Gambar 2.14 Struktur Caffeine, Alkaloid terbanyak pada Biji Kopi Arabika

(Caballero *et al.*, 2015)

Mekanisme pertama alkaloid dalam menghambat ataupun membunuh bakteri didapatkan dari kemampuannya dalam menghambat aktivitas dihidrofolat reduktase. Hambatan tersebut secara langsung berperan dalam menghambat sintesis asam nukleat karena enzim dihidrofolat reduktase krusial dalam produksi purin dan pirimidin. Kemudian, alkaloid juga dapat mengikat protein FtsZ dengan afinitas kuat yang mengakibatkan inhibisi aktivitas GTPase, inhibisi enzim tersebut menghambat pembelahan sel pada fase elongasi sel (Cushnie *et al.*, 2014; Shin, Prabhakaran and Kim, 2018).

Mekanisme kedua, alkaloid dapat bertindak seperti deterjen dengan mendisrupsi membran terluarnya pada bakteri gram negatif dan mendepolarisasi membran bakteri gram positif. Kemudian, kemampuan alkaloid dalam menghambat faktor virulensi ditunjukkan pada protein ToxT *Vibrio cholera* yang membuat bakteri tersebut menjadi kurang virulen. Penelitian tersebut dicoba secara in vitro dengan melihat penurunan kolonisasi *V. cholera* pada usus besar tikus dengan perlakuan alkaloid dibandingkan kelompok kontrol. Alkaloid juga mengurangi aktivitas kolagenase *P. gingivalis* dalam menyebabkan penyakit periodontal (Abreu, McBain and Simões, 2012).

Mekanisme ketiga muncul dari Caffeine, sebagai alkaloid terbanyak pada Biji Kopi Arabika. Caffeine dari ekstrak etanol Biji Kopi Hijau Arabika (*nonroasted*) dapat menginhibisi bakteri *Eschericia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, dan *Bacillus cereus* dengan metode *disc diffusion assay*. Mekanisme tersebut muncul diakibatkan kemampuan caffeine dalam menghambat sintesa protein dan DNA dengan menghambat penggabungan adenin dan timidin. Selanjutnya, caffeine mempercepat proses genotoksisitas setelah merusak komponen DNA (Pruthviraj *et al.*, 2011).

2.3. Metode Dilusi Agar

Metode dilusi agar terdiri dari dua teknik pengerjaan, yaitu teknik dilusi perbenihan cair dan teknik dilusi agar yang bertujuan untuk penentuan aktivitas antimikroba secara kuantitatif, antimikroba dilarutkan kedalam media agar atau kaldu yang kemudian ditanami bakteri yang akan dites. Metode ini dapat menggunakan agar *Mueller-Hinton* agar. Setelah diinkubasi semalam, konsentrasi terendah yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri disebut *Minimal Inhibitory Concentration* (MIC). Nilai MIC dapat pula dibandingkan dengan konsentrasi obat

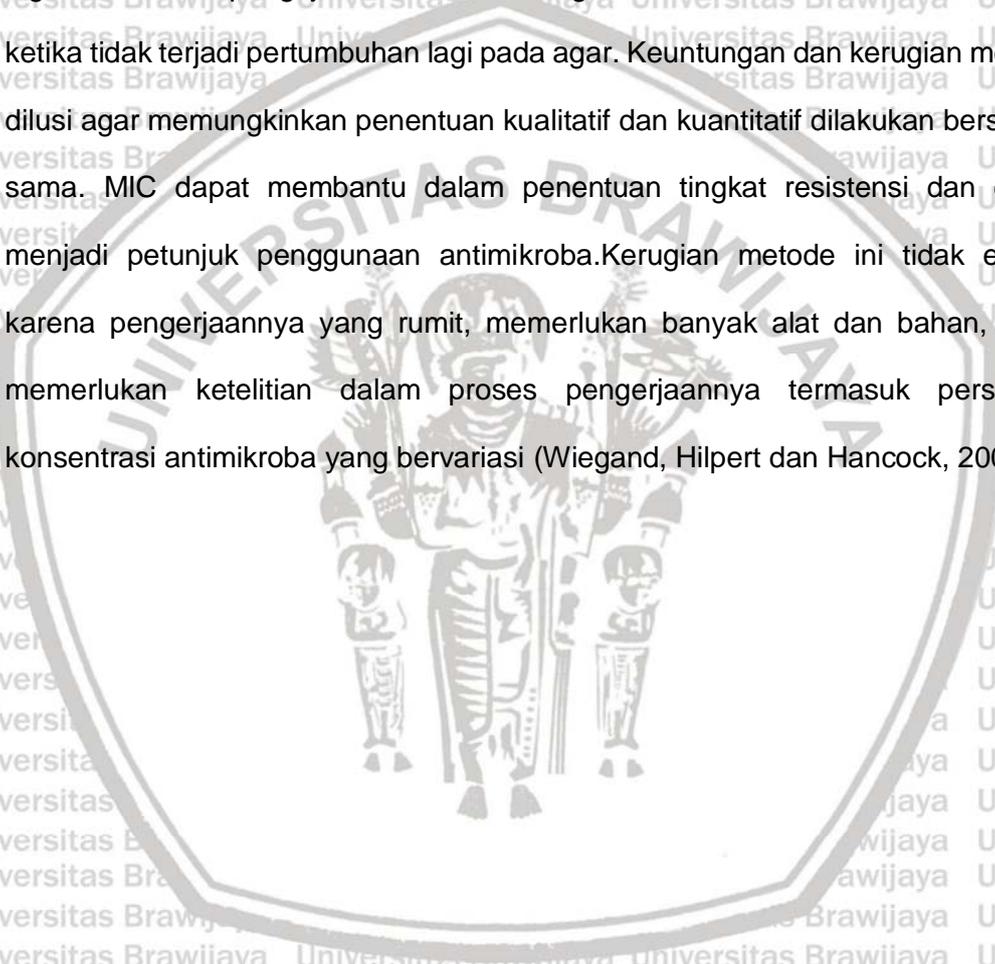
yang didapat di serum dan cairan tubuh lainnya untuk mendapatkan perkiraan respon klinis (Jawetz, 2005).

Antimikroba yang akan diuji diencerkan dengan air untuk menghasilkan varian konsentrasi. Konsentrasi tersebut kemudian dikombinasikan dengan agar yang meleleh untuk menghasilkan suatu *plate* dimana konsentrasi antibiotik akhir merepresentasikan 2 kali lipat seri konsentrasi dilusi (1, 2, 4, 8, 16, dst). Setelah ini, bakteri disiapkan untuk menyamai kekeruhan standar McFarland 0,5 (1×10^8 colony forming unit (CFU) ml^{-1}), dan 1–5 μl suspensi ini ditempatkan pada masing-masing *plate/spot* dengan peningkatan konsentrasi agen antimikroba menggunakan perangkat replikator (inokulum akhir adalah 5×10^4 CFU/spot). Teknik ini memungkinkan untuk mereplikasi banyak *spot* dari satu jenis atau bahkan berbeda jenis bakteri untuk diuji sehingga MIC antibiotik terhadap berbagai jenis bakteri dapat diuji sekaligus. Perlakuan kontrol diperlukan dengan meniadakan antibiotik. Setelah diberikan bakteri, pelat kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 16-18 jam. Setelah inkubasi, pelat diperiksa untuk menentukan apakah pertumbuhan bakteri telah terjadi di tempat yang diinokulasi. Konsentrasi antibiotik terendah yang mencegah pertumbuhan bakteri dianggap sebagai konsentrasi penghambatan minimum antibiotik (MIC) terhadap bakteri tersebut (Wiegand, Hilpert dan Hancock, 2008)

Dasar penentuan antimikroba secara *in vitro* adalah MIC dan MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*), MIC merupakan konsentrasi terendah antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan hasil yang dilihat dari pertumbuhan koloni pada agar atau kekeruhan media agar. Sedangkan, MBC adalah konsentrasi terendah antimikroba yang dapat membunuh 99.9% pada biakan selama waktu yang ditentukan. Absorpsi obat dan distribusi

antimikroba akan memengaruhi dosis, rute, dan frekuensi pemberian antimikroba untuk mendapatkan dosis efektif di tempat terjadinya infeksi (Alani *et al.*, 2015).

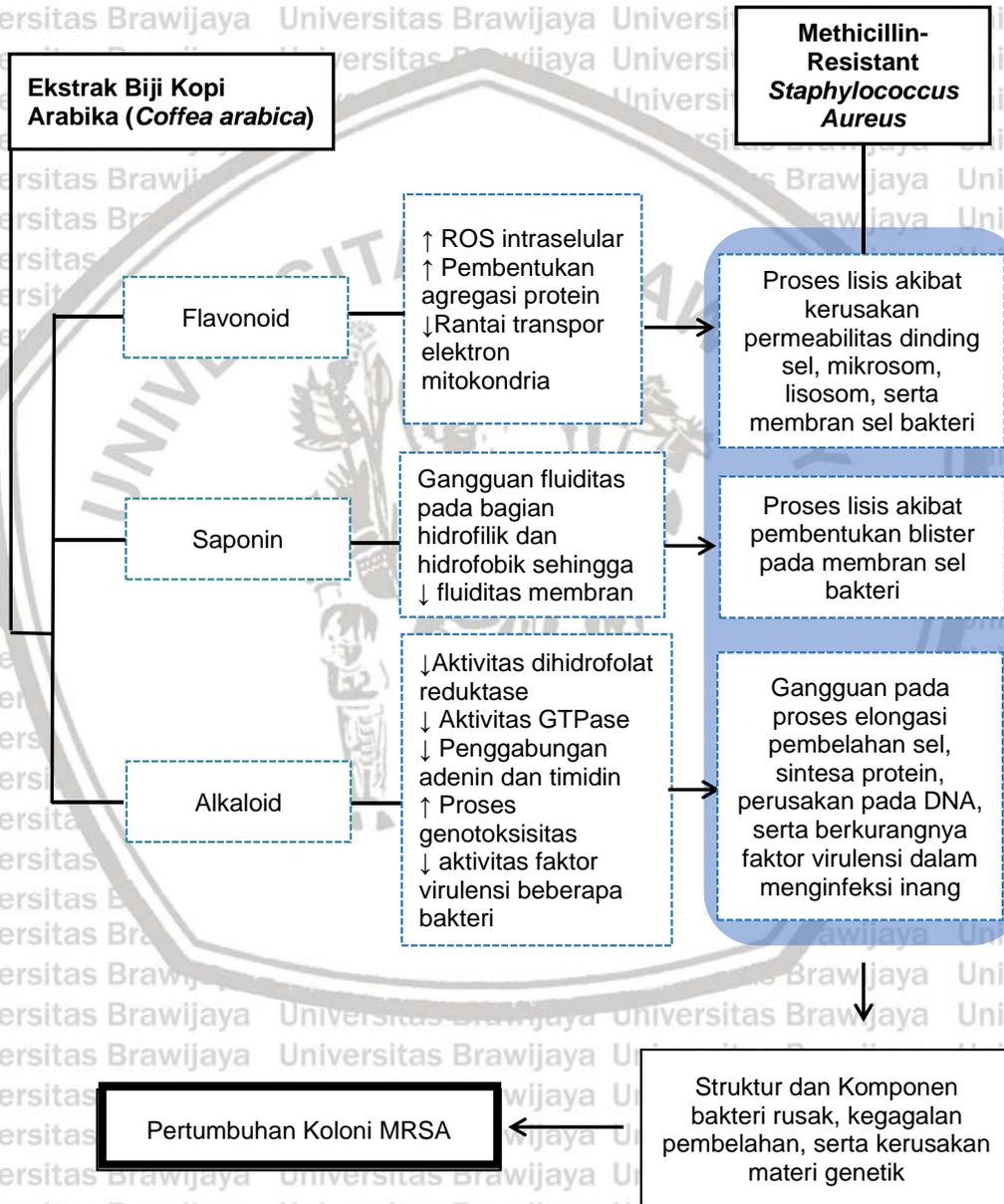
Penentuan konsentrasi minimum antibiotik yang dapat membunuh bakteri atau MBC dilakukan dengan menanam bakteri pada perbenihan cair yang digunakan untuk pengujian MIC ke dalam agar kemudian diinkubasi. MBC adalah ketika tidak terjadi pertumbuhan lagi pada agar. Keuntungan dan kerugian metode dilusi agar memungkinkan penentuan kualitatif dan kuantitatif dilakukan bersama-sama. MIC dapat membantu dalam penentuan tingkat resistensi dan dapat menjadi petunjuk penggunaan antimikroba. Kerugian metode ini tidak efisien karena pengerjaannya yang rumit, memerlukan banyak alat dan bahan, serta memerlukan ketelitian dalam proses pengerjaannya termasuk persiapan konsentrasi antimikroba yang bervariasi (Wiegand, Hilpert dan Hancock, 2008)



BAB 3

KERANGKA KONSEP

3.1. Kerangka Konsep



Keterangan:

: Diamati

: Tidak Diamati



3.2. Penjelasan Kerangka Konsep

Dalam penelitian ini digunakan ekstrak etanol Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*), tanaman timur tengah yang banyak tumbuh di Indonesia, tanaman ini diketahui mengandung senyawa flavonoid, saponin, dan alkaloid yang memiliki efek antimikroba. Flavonoid dapat merusak permeabilitas dinding sel dan beberapa komponen sel bakteri MRSA seperti dinding sel, mikrosom, dan lisosom.

Selain itu, bentukan senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut menyebabkan hilangnya integritas membran sel diikuti dengan proses lisis atau keluarnya komponen intraseluler. Sedangkan senyawa saponin dapat menimbulkan lepuhan atau *blister* pada membran sel MRSA yang akan diikuti dengan proses lisis sehingga menyebabkan bocornya konten sitoplasma bakteri ke lingkungan eksternal (Tsuchiya and linuma, 2000; Cushnie dan Lamb, 2005; Xie et al., 2014; Khan et al., 2018). Terakhir, alkaloid akan menyebabkan gangguan pada proses pembelahan sel, sintesa protein, perusakan DNA, serta berkurangnya faktor virulensi bakteri dalam menginfeksi inang (Abreu, McBain and Simões, 2012; Cushnie et al., 2014; Shin, Prabhakaran and Kim, 2018).

Berdasarkan uraian diatas dapat diperkirakan bahwa ekstrak Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) memiliki potensi untuk menghambat pertumbuhan bakteri MRSA.

3.3. Hipotesis Penelitian

1. Ekstrak etanol Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) memiliki efek antimikroba terhadap bakteri MRSA secara *in vitro*.
2. Konsentrasi ekstrak etanol Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) memiliki korelasi kuat terhadap daya hambat (MIC) pertumbuhan MRSA secara *in vitro*.



BAB 4

METODOLOGI PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Desain penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental laboratorium dengan rancangan eksperimental murni (*true experimental design*).

Fokus penelitian ditujukan pada keadaan bakteri MRSA setelah pemberian ekstrak etanol Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) *green beans* (nonroasted) yang diproses secara maserasi dengan pelarut etanol secara *in vitro* melalui metode dilusi agar untuk menentukan MIC terhadap bakteri MRSA.

4.2. Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan sampel bakteri uji MRSA yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.3. Pengulangan

Jumlah pengulangan yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan rumus Federer (Solimun, 2001):

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

Keterangan :

p = jumlah perlakuan yang dilakukan

n = jumlah pengulangan tiap perlakuan

Dalam penelitian ini digunakan perlakuan berupa 7 konsentrasi berbeda dari ekstrak Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) yaitu konsentrasi 0% sebagai kontrol negatif, dan konsentrasi 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%. Sehingga estimasi besar sampel adalah:

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

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

$$7n - 7 \geq 15$$

$$7 \geq 22$$

$$n \geq 3.14 \text{ (dibulatkan menjadi 3)}$$

Jumlah perlakuan ulang (n) yang digunakan dalam penelitian ini adalah 3.14 yang kemudian dibulatkan menjadi minimal 3 kali pengulangan.

4.4. Variabel Penelitian

4.4.1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*).

4.4.2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah MIC yang terlihat pada agar dilusi.

4.5. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dari bulan Oktober 2020 sampai dengan November 2020. Bahan Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) di peroleh di UPT Materia Medika kota Batu dalam bentuk simplisia. Pembuatan ekstrak Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) juga dilakukan di UPT Materia Medika kota Batu.

4.6. Definisi Operasional

- Biji Kopi Arabika yang digunakan dalam penelitian ini merupakan biji kopi hijau (*green beans*) yang didapatkan dari Materia Medika Batu dalam bentuk serbuk simplisia.

- b. Ekstrak etanol Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) diperoleh dengan proses ekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% dan dibagi menjadi konsentrasi 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%.
- c. Bakteri MRSA yang digunakan dalam penelitian berasal dari isolat milik Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.
- d. Kelompok kontrol negatif bakteri adalah dengan perlakuan akuades (tanpa ekstrak Biji Kopi Arabika).
- e. MIC merupakan konsentrasi terendah yang mampu menghambat pertumbuhan Bakteri MRSA pada agar dilusi yang ditunjukkan oleh pertumbuhan koloni pada spot agar Mueller-Hinton.
- f. Potensi antimikroba adalah suatu ukuran yang didapat dari pengaruh tiap konsentrasi ekstrak etanol Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) dalam menghambat pertumbuhan bakteri MRSA. Hal ini dilihat dari pertumbuhan koloni dalam *plate*.

4.7. Alat dan Bahan Penelitian

4.7.1. Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Biji Kopi Arabika

1. Alat
 - a. Oven
 - b. Timbangan
 - c. Gelas erlenmeyer
 - d. Kertas saring
 - e. *Rotatory evaporator*
 - f. Labu penampang etanol
 - g. Labu evaporator
 - h. Selang *water pump*

i. *Water pump*

j. *Water bath*

k. *Vacuum pump*

2. Bahan

a. Biji Kopi hijau Arabika (*Coffea arabica*)

b. Pelarut etanol 96%

c. Aquades

4.7.2. Alat dan Bahan Identifikasi Bakteri

1. Alat

a. Tabung reaksi

b. Ose

c. Lampu spiritus dan Bunsen

d. Inkubator

e. Spektrofotometer

f. Korek Api

g. Label

h. Kertas strip

i. Larutan reagen *tetramethyl p-phenylenediamine dichloride* 1%
(Kovac's reagen).

j. Object glass dan kaca penutup

k. Mikroskop

l. Plat kultur MRSA yang telah ditumbuhkan koloni

m. Air distilasi

n. Dropper steril

o. Tempat sampah untuk bahan infeksius



2. Bahan

- a. Biakan agar bakteri MRSA
- b. Agar Mueller Hinton (*nutrient rich agar*)
- c. Bahan pewarnaan Gram: kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin
- d. Akuades steril
- e. Kertas penghisap atau tisu
- f. Minyak imersi

4.7.3. Alat dan Bahan Pembuatan Agar Dilusi

1. Alat

- a. Cawan petri
- b. Pelubang sumuran (perforator)
- c. Pipet mikro
- d. Inkubator
- e. Bunsen *burner*
- f. Korek api
- g. Penggaris

2. Bahan

- a. Ekstrak etanol Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*)
- b. Suspensi bakteri MRSA 10^8 CFU/mL
- c. Aquades
- d. Agar Mueller Hinton

4.7.4. Alat dan Bahan untuk Metode Maserasi

1. Alat

- a. Toples tertutup
- b. Corong gelas
- c. Timbangan analitik



d. Gelas ukur

e. Botol

f. Erlenmeyer

g. Rotatory evaporator

h. Beaker glass

i. Shaker digital

2. Bahan

a. Simplisia Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*)

b. Etanol 96%

c. Kertas saring

4.8. Prosedur Penelitian

4.8.1. Identifikasi Bakteri

4.8.1.1 Pewarnaan Gram

a. Bersihkan object glass dan kemudian dipanaskan di atas nyala api bunsen

b. Ambil satu ose, buat sediaan hapusan bakteri pada *object glass*, kemudia tunggu hingga kering. Setelah kering fiksasi dengan dilewatkan diatas nyala api bunsen sebanyak 4 – 5 kali.

c. Tuangkan kristal violet pada sediaan. Kristal violet berfungsi sebagai bahan warna dasar, lalu diamkan hingga 1 menit. Setelah itu, buang sisa kristal violet dan bilas dengan air.

d. Tuangkan lugol pada sediaan selama 1 menit. Lalu buang sisa lugol dan bilas dengan air

e. Tuangkan larutan alkohol 96% pada sediaan selama 5-10 detik atau sampai warna cat luntur. Buang sisa alkohol dan bilas dengan air.

f. Tuangkan safranin pada sediaan. Safranin berfungsi sebagai bahan warna pembanding, diamkan hingga 30 detik. Buang sisa safranin dan bilas dengan air.

g. Keringkan sediaan menggunakan kertas penghisap, lalu ditetesi minyak emersi dan dilihat dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000x. Bakteri *S. aureus* memperlihatkan gambaran seperti sekumpulan kokus membentuk formasi anggur berwarna ungu (Gram Positif) (Tong *et al.*, 2015).

4.8.1.2 Tes Katalase

- Pada penelitian ini dilakukan tes katalase metode *slide/drop* sesuai protokol dari *American Society for Microbiology*.
- Dengan menggunakan ose steril, ambil satu koloni yang telah ditumbuhkan selama 18 – 24 jam dan letakkan pada *object glass* mikroskop.
- Gunakan *dropper* atau *Pasteur pipette* untuk memberikan 1 tetes 3% Hidrogen Peroksida (H_2O_2). Jangan diaduk.
- Amati keberadaan gelembung (Oksigen + Air = gelembung) pada *object glass*. Bakteri *S. aureus* akan menunjukkan hasil katalase positif (terbentuk gelembung udara) (ASM, 2010).

4.8.1.3 Tes Koagulase

- Pada penelitian ini dilakukan tes koagulase metode *Tube Coagulase* sesuai protokol dari *American Society for Microbiology*
- Labeli tabung reaksi dengan organisme yang akan diuji.
- Menggunakan pipettor, secara aseptik transfer 0,5 ml plasma yang dilarutkan ke dalam tabung reaksi.

- d. Pilih dua atau tiga koloni bakteri yang diisolasi untuk diuji dan kumpulkan dengan menggunakan loop steril atau tongkat aplikator.
- e. Emulsi bakteri dalam 0,5 ml plasma dan tempatkan di inkubator. Buang loop sekali pakai atau tongkat aplikator ke wadah buang atau sterilkan loop yang dapat digunakan kembali sebelum melanjutkan.
- f. Catat waktu ketika tes dimulai. Pada interval 4 jam ke depan, amati kultur, mencari bukti adanya gumpalan. Setiap pembentukan gumpalan adalah hasil positif.
- g. Jika tidak ada gumpalan diamati pada jam ke-4, maka tes dapat dilanjutkan dengan inkubasi semalam pada suhu kamar dan pengamatan akhir pada 24 jam.
- h. Organisme kontrol positif harus menunjukkan gumpalan pada akhir 24 jam, sedangkan organisme kontrol negatif seharusnya tidak menunjukkan penggumpalan.
- i. Bakteri *S. aureus* seharusnya menunjukkan adanya gumpalan yang menandakan sifatnya sebagai koagulasi positif.
- j. Ketika tes selesai, buang bahan yang terkontaminasi dengan tepat (ASM, 2010).

4.8.1.4 Pembuatan Suspensi Bakteri

- a. Beberapa koloni bakteri *S. aureus* dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril yang berisi *Nutrient Broth*.
- b. Tabung reaksi lalu diinkubasikan dalam inkubator pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
- c. Dilakukan spektrofotometri dengan panjang gelombang 625 nm untuk mengetahui OD (*Optical Density*) dari suspensi.

- d. Untuk mendapatkan konsentrasi bakteri sebesar 10^8 CFU/ml (sesuai standar McFarlan 0.5) yang setara dengan OD=0.1 maka dilakukan perhitungan sebagai berikut

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

Keterangan :

N_1 = Nilai absorbs suspensi (hasil spektrofotometri)

V_1 = Volume bakteri yang akan ditambah pengencer

N_2 = *Optical Density* (0,1 setara 10^8 CFU/ml)

V_2 = volume suspensi bakteri uji (10ml)

Dari hasil perhitungan maka diperoleh volume bakteri (ml) yang akan ditambahkan pengencer untuk mendapatkan konsentrasi 10^8 CFU/ml sebanyak 10 ml.

4.8.2. Pembuatan Ekstrak Biji Kopi Arabika

Pembuatan ekstrak etanol Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) dalam beberapa tahap seperti berikut.

1. Biji Kopi Hijau Arabika dicuci bersih dengan air mengalir lalu digiling hingga menjadi bagian yang lebih kecil kemudian ditimbang sebanyak 1000 gram.
2. Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) yang telah digiling kemudian ditimbang Kembali, jika perlu dihaluskan dengan blender, diayak hingga mendapatkan simplisia.
3. Lalu letakkan hasil simplisia ke dalam gelas Erlenmeyer ukuran 1 liter dan tuangkan etanol 96% sebanyak 800 ml untuk merendam simplisia, kemudian diamkan selama satu jam pada suhu ruang.
4. Massa dipindahkan ke dalam toples secara hati-hati kemudian

ditambahkan etanol 96% sebanyak 200 ml. Tutup toples dengan rapat selama 48 jam dan di-*shake* diatas *shaker* digital dengan kecepatan 50 rpm.

5. Saring ekstrak cair dengan penyaring kain. Tampung ekstrak dalam Erlenmeyer.

6. Lakukan remaserasi pada ampas sebanyak satu kali dengan cara dimasukkan kembali ke dalam toples dan ditambahkan dengan pelarut sampai terendam (minimal 5 cm diatas permukaan simplisia). Kemudian dibiarkan semalam atau 8 jam di atas *shaker*. Remaserasi menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 800 ml.

7. Hasil ekstrak cair pertama sampai dengan terakhir dijadikan satu dan diuapkan dengan menggunakan *rotary evaporator*. Diperlukan waktu 3 jam 30 menit untuk evaporasi.

8. Ekstrak cair yang dihasilkan kemudian dievaporasi atau diuapkan kembali di atas waterbath selama 2 jam untuk menghilangkan etanol. Untuk memastikan kdanungan etanol masih terdapat pada ekstrak dengan cara memasukan ekstrak pada tisu, apabila menguap maka masih terdapat etanol.

9. Setelah evaporasi selesai, ekstrak kemudian dioven kembali dengan suhu 80°C selama 2 jam. Hal ini bertujuan untuk menghilangkan sisa-sisa etanol 96% yang mungkin masih tersisa dalam ekstrak.

10. Hasil ekstraksi diletakkan dalam botol plastik atau kaca warna gelap lalu disimpan di dalam *freezer*.

4.8.3. Uji Antimikroba Ekstrak Biji Kopi Arabika dengan Metode Dilusi Agar

Penelitian ini menggunakan metode dilusi agar dengan melakukan pengamatan kadar hambat minimum (MIC) pada agar Mueller Hinton yang telah diberikan ekstrak etanol Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) sesuai variabel

konsentrasi. Metode agar dilusi dianggap sebagai standar emas pengujian kerentanan suatu mikroba atau cara paling akurat dalam mengukur resistensi bakteri terhadap antibiotik. Hasil metode agar dilusi mudah direproduksi dan mereka dapat dimonitor dengan biaya yang jauh lebih murah daripada apa yang diperlukan dari metode dilusi lainnya. Selain itu, hingga tiga puluh sampel patogen (ditambah dua kontrol) dapat diuji sekaligus, sehingga metode dilusi agar juga dapat berguna untuk tes *batch* (Victor, 2005).

Penelitian ini mengikuti protokol Agar dilusi oleh *Nature Protocol* tahun 2008. Berikut merupakan protokol pembuatan dilusi agar setelah pembuatan kultur *S. aureus* dilakukan:

1. Menyiapkan agar Mueller Hinton atau menggunakan Mueller Hinton *Broth* dengan menambahkan agar 1,7% (agar 17 gram/liter) sebelum diautoklaf. Diperlukan sekitar 25 ml untuk menuangkan satu cawan petri 15 x 100 mm untuk menghasilkan kedalaman 3-4 mm.
2. Autoklaf, setelah autoklaf pada suhu 121°C, 15 min, 1 bar), dinginkan media ke 50°C.
3. Saat medianya dingin, hitung jumlah larutan ekstrak (2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%).
4. Berikan jumlah yang tepat dari larutan ekstrak Biji Kopi Arabika.
5. Untuk setiap *plate*, tambahkan agar 25 ml pada suhu ~ 50°C ke dalamnya, campur dengan baik agar bersama larutan ekstrak Biji Kopi Arabika sesuai variabel konsentrasi (hindari gelembung).
6. Untuk kontrol positif, tuangkan agar pada *plate* kontrol tanpa larutan ekstrak Biji Kopi Arabika.
7. Keringkan permukaan agar agar baik dalam inkubator atau *free air laminar* selama 30 menit dan biarkan tutupnya terbuka.

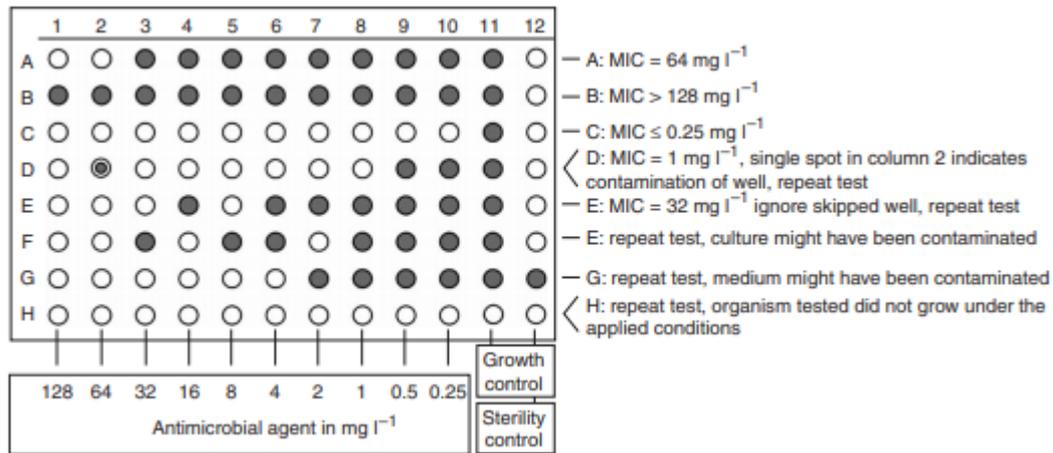
8. Tandai bagian bawah *plate* agar untuk menentukan orientasi.
9. Campur suspensi bakteri, disesuaikan dengan 1×10^8 CFU/ml
10. Ulangi untuk setiap isolat bakteri yang akan diuji. Pastikan untuk mencatat konten masing-masing sumuran
11. Serilisasikan replikator dengan merendam pin dalam etanol 95% dan melewatkannya melalui nyala api Bunsen. Pegang pin pada posisi tegak hingga api padam. Biarkan pin mendingin dalam posisi terbalik untuk menjaga sterilitas replikator.
12. Tempatkan replikator yang sudah disterilkan ke dalam piring mikrotiter untuk merendam pin dan memindahkannya ke *plate*. Buat inokulum dengan memulai terlebih dahulu dari *plate* kontrol (tanpa ekstrak Biji Kopi).
13. Kemudian, masukkan *plate* agar yang mengandung antibiotik dengan konsentrasi terendah ke konsentrasi tinggi.
14. Biarkan bintik-bintik inokulum mengering pada suhu kamar sebelum membalik piring.
15. Inkubasi *plate* agar di 37°C selama 16-20 jam dan Hitung koloni pada hari berikutnya.

4.8.4. Pengamatan dan Pengukuran

MIC didefinisikan sebagai konsentrasi terendah ekstrak Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) yang menghambat pertumbuhan terlihat dari isolat yang diuji dengan diamati oleh mata tanpa bantuan. Gambar 4.1 memberi contoh cara menginterpretasi kemungkinan pola pertumbuhan dalam pelat mikrotiter MIC.

Ketika pertumbuhan terjadi di semua pengenceran yang mengandung agen antimikroba, MIC dicatat lebih besar dari konsentrasi tertinggi. MIC dicatat kurang dari atau sama dengan konsentrasi terendah, hanya ketika tidak ada pertumbuhan terjadi pada konsentrasi yang diuji. Sumur jernih dalam serangkaian sumur

dengan pertumbuhan terlihat, mis., Pertumbuhan pada 1, 2 dan 8 mg/mL, tetapi tidak pada 4 mg/mL, disebut sumur yang dilewati dan harus diabaikan. Pertumbuhan titik di sumur terisolasi mengindikasikan kontaminasi. Tes harus diulang (Wiegand, Hilpert, dan Hancock, 2008)



Gambar 4.1 Cara pengukuran MIC pada Metode Agar Dilusi (Wiegand, Hilpert and Hancock, 2008)

4.8.5. Skema Prosedur Penelitian

Ekstrak Biji Kopi Arabika Hijau (*Coffea arabica*)

Uji Identifikasi *Staphylococcus aureus*:

1. Pewarnaan Gram
2. Pengujian Katalase
3. Pengujian Koagulase

Penanaman pada *Nutrient Broth* Agar

Pembuatan Suspensi bakteri dengan konsentrasi 10^4 CFU / ml

Uji Efek Antibakterial (Tes Dilusi Agar)

0%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%. Ekstrak Biji Kopi Hijau Arabika (*Coffea arabica*)

Dimasukkan dalam inkubator pada suhu 37°C selama 18-24 jam

Meneteskan suspensi *Staphylococcus aureus* sebanyak 10 µl pada permukaan agar

Dimasukkan dalam inkubator pada suhu 37°C selama 18-24 jam

Amati pertumbuhan koloni jamur dan tentukan MIC

4.9. Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) untuk windows versi 26. Adapun langkah-langkah pengujian sebagai berikut.

1. Uji normalitas data dengan menggunakan *Shapiro-Wilk test* untuk menguji apakah data tersebar normal (parametik) atau tidak tersebar normal (non parametik).
2. Uji homogenitas data dengan menggunakan *Levenne test* untuk menguji apakah data homogen (parametik) atau tidak homogen (non parametik).
3. Uji komparasi dilakukan dengan cara *One-Way ANOVA* > 2 kelompok untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian ekstrak etanol Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) terhadap pertumbuhan MRSA, dengan syarat sebaran data harus normal dan varian data harus homogen. Namun jika data tidak homogen atau tidak tersebar normal, maka digunakan metode *Kruskal Wallis* untuk mengetahui perbedaan MIC yang terbentuk di sekitar lubang sumuran pada setiap perlakuan oleh ekstrak Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*).
4. Uji *Post Hoc Tukey* dilakukan untuk mengetahui pasangan kelompok sampel yang memberikan perbedaan yang signifikan.
5. Uji Korelasi Spearman dilakukan untuk mengetahui hubungan antara pemberian konsentrasi ekstrak etanol Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) yang berbeda dengan besarnya MIC bakteri MRSA.

4.10. Jadwal kegiatan

No	Kegiatan	Bulan 1				Bulan 2				Bulan 3			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Tahap Persiapan													
1.	Mengurus perijinan penelitian												
2.	Mengurus perijinan laboratorium												
3.	Belanja alat dan bahan penelitian												
4.	Membuat ekstrak etanol Biji Kopi Arabika												
5.	Memiakkan bakteri												
Tahap Pelaksanaan													
1.	Melaksanakan penelitian pendahuluan												
2.	Uji identifikasi bakteri												
3.	Pembuatan sumuran pada cawan patri												
4.	Induksi kontrol negatif dan perlakuan												
5.	Pengamatan zona hambat												
Tahap Penyelesaian													
1.	Analisis data												
2.	Penyusunan Laporan akhir												

BAB 5

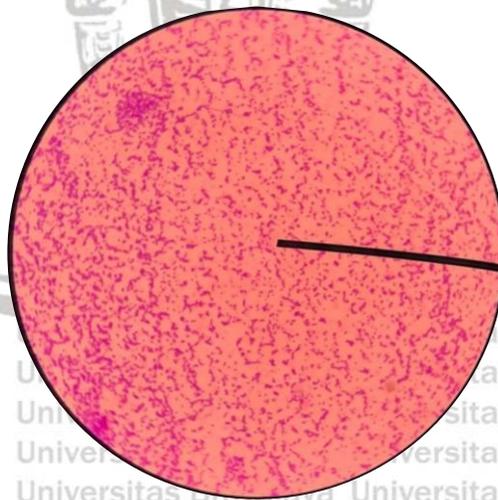
HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1. Hasil Penelitian

5.1.1. Identifikasi *Streptococcus pneumoniae*

Bakteri *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) yang akan digunakan dalam penelitian ini diperoleh dan telah identifikasi di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Proses identifikasi terdiri dari uji pewarnaan Gram, kultur agar Mannitol Salt, tes katalase, tes koagulase, dan uji sensitivitas Cefoxitin.

5.1.1.1. Uji Pewarnaan Gram



Gambar 5.1 Hasil Pewarnaan Gram Bakteri *Streptococcus pneumoniae* pada perbesaran 1000x

Pada hasil pewarnaan Gram dari bakteri yang diuji (Gambar 5.1) tampak bentukan kokus (bulat), beberapa terlihat membentuk formasi menyerupai anggur,

dan memiliki warna warna ungu. Warna ungu ini mengindikasikan bahwa bakteri tersebut merupakan golongan bakteri gram positif. *S. aureus* pada pewarnaan Gram tampak sebagai bakteri kokus yang bersifat Gram positif serta sering menunjukkan gambaran formasi Anggur (Brooks *et al.*, 2008).

5.1.1.2. Uji Kultur Agar Mannitol-Salt

Pada hasil kultur agar Mannitol terlihat koloni bakteri yang diuji menampilkan koloni berwarna kuning serta zona kekuningan di sekitar koloni.

Gambaran koloni seperti itu menunjukkan bakteri memiliki kemampuan memfermentasi mannitol untuk menghasilkan pewarnaan kuning. Perubahan warna dari semula merah menjadi kuning akibat perubahan pH menjadi lebih asam akibat proses fermentasi manitol. Diketahui, pada medium agar Mannitol, *Staphylococcus aureus* akan menunjukkan koloni berwarna kuning dengan zona kekuningan di sekitar koloni (CDC, 2018).



Gambar 5.2 Kultur Bakteri pada agar Mannitol menunjukkan Gambaran koloni berwarna kuning dengan zona kekuningan di sekitarnya

5.1.1.3. Tes Katalase

Tes katalase terhadap bakteri yang diuji menunjukkan hasil positif yang ditunjukkan dengan munculnya gelembung pada strip uji. Serupa dengan hasil pengujian, bakteri *S. aureus* juga menghasilkan hasil positif pada uji katalase dengan menghasilkan gelembung oksigen (CDC, 2018). Tes katalase bertujuan untuk membedakan antara Genus *Streptococcus spp.* dengan *Staphylococcus spp.* Hasil uji katalase ditunjukkan pada Gambar 5.3



Gambar 5.3 Tes Katalase bakteri yang diuji menunjukkan adanya gelembung (hasil positif)

5.1.1.4. Tes Koagulase

Tes koagulase terhadap bakteri yang diuji menunjukkan hasil positif yang ditunjukkan dengan munculnya butiran pasir pada strip uji. Serupa dengan hasil pengujian, bakteri *S. aureus* juga menghasilkan hasil positif pada uji koagulase dengan menghasilkan butiran pasir (CDC, 2018). Tes koagulase bertujuan untuk membedakan antara Spesies *S. aureus* dengan *Coagulase-Negative Staphylococci* (CoNS) seperti *S. epidermidis* dan *S. haemolyticus* (ASM, 2018). Hasil uji koagulase ditunjukkan pada Gambar 5.3.



Gambar 5.4 Hasil tes koagulase bakteri yang diuji menunjukkan adanya butiran pasir (hasil positif)

5.1.1.5. Tes Cefoxitin

Cefoxitin merupakan penginduksi kuat sistem regulasi *mecA*. *The Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) tahun 2006 telah merekomendasikan metode difusi cakram cefoxitin untuk mendeteksi MRSA. Ini dilakukan dengan menggunakan cakram cefoxitin 30 µg dan diameter zona hambat ≤ 19 mm dilaporkan sebagai resisten terhadap metisilin dan ≥ 20 mm dianggap sensitif terhadap metisilin (CLSI, 2006). Pada bakteri uji, didapatkan zona hambat sebesar 14 mm (≤ 19 mm). Hasil tersebut menunjukkan bahwa bakteri termasuk golongan resisten terhadap cefoxitin (jenis antibiotik β -laktamase).



Gambar 5.5 Zona Hambat Uji Difusi Cefoxitin

5.1.2. Hasil Ekstrak Biji Kopi Arabika

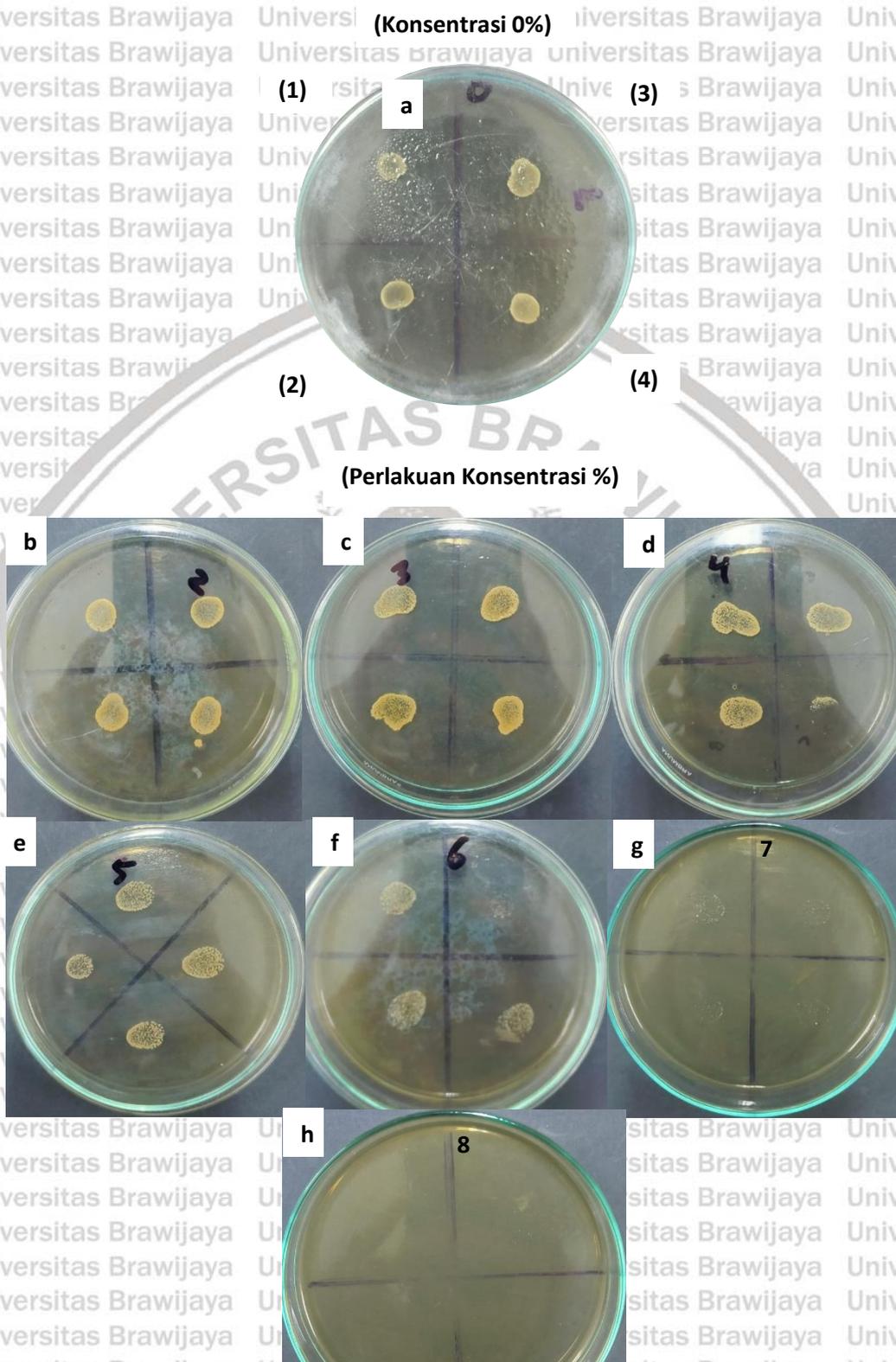


Gambar 5.6 Ekstrak Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*)

Bahan simplisia Biji Kopi Arabika diperoleh dari Materia Media Batu dan proses ekstraksi dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Metode yang digunakan adalah metode maserasi dengan pelarut etanol 96%, karena beberapa fitokimia seperti flavonoid dan saponin banyak terekstrak menggunakan metode ini (Oliveira *et al.*, 2009). Gambar 5.5 diatas menunjukkan bahwa ekstrak etanol Biji Kopi Arabika memiliki konsistensi cair dan berwarna keruh hijau kecoklatan.

5.1.3. Hasil Penelitian Menggunakan Metode Dilusi Agar

Konsentrasi ekstrak Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) yang digunakan dalam penelitian adalah 2% sampai dengan 8% dengan interval jarak 1% (Konsentrasi 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%) dengan kontrol negatif menggunakan aquades. Penentuan hasil dilakukan dengan mengamati pertumbuhan koloni jamur pada keempat titik pengulangan dalam *plate* media Nutrient Broth dan menentukan MIC-nya.



Gambar 5.7 Hasil Penelitian Uji Dilusi Agar Ekstrak Biji Kopi Arabika

(a) Konsentrasi 0% **(b)** Konsentrasi 2% **(c)** Konsentrasi 3% **(d)** Konsentrasi 4%
(e) Konsentrasi 5% **(f)** Konsentrasi 6% **(g)** Konsentrasi 7% **(h)** Konsentrasi 8%

Selanjutnya dilakukan pengamatan pada *plate* media Nutrient Agar yang telah diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Didapatkan dari hasil penelitian, konsentrasi 0% atau kontrol negatif menunjukkan bakteri dapat hidup dan membentuk koloni dengan sangat tebal dan rapat. Kemudian, konsentrasi 2% dan 3% koloni tumbuh sangat tebal dengan jarak yang rapat pada keempat titik pengulangan. Pada konsentrasi 4% dan 5% koloni *S. aureus* masih tumbuh sangat tebal namun bagian tengah merenggang. Pada konsentrasi 6% koloni *S. aureus* sedikit menipis dan koloni mulai memisah. Pada konsentrasi 7% koloni *S. aureus* ditemukan menyebar, semakin tipis, dan memisah. Hingga pada konsentrasi 8% sudah tidak ditemukan pertumbuhan koloni Bakteri *S. aureus* (Lihat gambar 5.7).

Tabel 5.1 Hasil Pengamatan Pemberian Ekstrak Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) terhadap Perumbuhan Koloni MRSA

Konsentrasi		Pengulangan				Rata-Rata
		1	2	3	4	
0%	A	+4	+4	+4	+4	+4
	B	+4	+4	+4	+4	
	C	+4	+4	+4	+4	
2%	A	+4	+4	+4	+4	+4
	B	+4	+4	+4	+4	
	C	+3	+4	+3	+4	
3%	A	+4	+3	+4	+4	+4
	B	+4	+4	+4	+4	
	C	+4	+3	+4	+3	
4%	A	+2	+3	+3	+2	+3
	B	+3	+3	+3	+1	
	C	+2	+3	+3	+2	
5%	A	+3	+3	+2	+2	+3
	B	+2	+3	+2	+3	
	C	+3	+3	+3	+3	

Lanjut pada halaman selanjutnya

6%	A	+2	+3	+2	+2	+2
	B	+2	+2	+2	+2	
	C	+3	+3	+3	+3	
7%	A	+1	+1	+1	0	+1
	B	+1	+1	+1	+1	
	C	+1	+1	+1	+1	
8%	A	0	0	0	0	+1
	B	0	0	+1	0	
	C	0	0	0	0	

A, B, C merupakan penanda pengamat berbeda yang memberikan pendapat visual. Pengamat A merupakan peneliti sendiri, pengamat B merupakan analis Lab. Mikrobiologi FKUB dan pengamat C merupakan non-peneliti dan non-analis. Penilaian didasarkan oleh dua variabel: Ketebalan dan kerapatan koloni yang dinilai secara subjektif menggunakan mata telanjang oleh tiga orang pengamat seperti yang telah dijabarkan diatas. Jika koloni sangat lebat dan sangat rapat/menyatu seperti sampel kontrol negatif maka diberi skor +4. Koloni yang lebat dan rapat namun tidak setebal dan serapat kontrol negatif diberikan nilai +3. Jika ada salah satu indikator yang berkurang, baik ketebalan atau kerapatannya, maka diberi nilai +2. Jika terdapat pengurangan dalam dua indikator sekaligus, ketebalan dan kerapatan, maka diberikan nilai +1. Terakhir, jika tidak ada/nihil koloni tumbuh, maka diberi nilai 0.

Berdasarkan hasil pengamatan seperti yang tampak pada tabel terlihat bahwa kenaikan konsentrasi sebanding dengan kemampuan ekstrak untuk menghambat pertumbuhan koloni. Hal ini terlihat dari semakin tipisnya koloni yang secara kuantitatif dinilai dari semakin kecilnya tingkat ketebalan dan kerapatan/jarak dari koloni seiring dengan kenaikan konsentrasi ekstrak Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*). Berdasarkan data pada tabel dapat disimpulkan bahwa

bahan aktif pada ekstrak ekstrak Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) memiliki efek antimikroba terhadap MRSA dibandingkan dengan yang tidak diberi ekstrak. Hasil penelitian tersebut kemudian dianalisis secara statistik

5.2. Analisis Data

Data hasil pengukuran oleh tiga pengamat berbeda selanjutnya dibuatkan rerata. Hasil rerata dianggap mewakili hasil keseluruhan dari satu variabel konsentrasi. Hasil rerata tiap konsentrasi kemudian dimasukkan ke dalam pengujian/analisis data. Uji analisis parametrik *One Way ANOVA* digunakan pada penelitian ini. Sebelumnya, dipastikan terlebih dahulu bahwa data yang akan dianalisa terdistribusi secara normal dan homogen menggunakan uji normalitas metode *Shapiro-Wilk* dan *Levenne*. Jika syarat awal berupa data yang terdistribusi normal dan homogen menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dan *Levenne* terpenuhi ($\alpha > 0.05$), maka analisa dengan uji *One Way ANOVA* dapat dilakukan. Namun, jika syarat awal tidak terpenuhi, maka akan dilanjutkan dengan uji nonparametrik *Kruskal-Wallis* serta *Mann-Whitney* untuk menguji hipotesis dari data yang tersedia. Jika uji *one-way ANOVA* menunjukkan nilai signifikansi < 0.05 , maka dapat dilanjutkan dengan uji *Post-hoc*, dan uji korelasi.

5.2.1. Pengujian Normalitas dan Homogenitas Ekstrak Biji Kopi Arabika

Hasil uji normalitas (tabel 5.3) menunjukkan nilai signifikansi ($p < 0.05$), sehingga dapat disimpulkan bahwa zona hambat pertumbuhan bakteri ekstrak Biji Kopi Arabika tidak berdistribusi normal. Sedangkan Hasil uji homogenitas (tabel 5.4) menunjukkan nilai signifikansi zona hambat sebesar 0.287 ($p > 0.05$), sehingga dapat disimpulkan data tersebut homogen. Uji normalitas dan homogenitas menunjukkan bahwa data penelitian tidak normal namun homogen, sehingga uji dilanjutkan dengan menggunakan uji nonparametrik *Kruskal-Wallis*.

Tabel 5.2 Hasil Uji Normalitas Sample *Shapiro-Wilk* pada pemberian Ekstrak Biji Kopi Arabika

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Ketebalan_Koloni	.197	32	.003	.852	32	.000
Konsentrasi	.115	32	.200*	.929	32	.037

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Tabel 5.3 Hasil Uji Homogenitas Levene pada Pemberian Ekstrak

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Ketebalan_Koloni	Based on Mean	8.333	7	24	.000
	Based on Median	1.476	7	24	.223
	Based on Median and with adjusted df	1.476	7	9.000	.287
	Based on trimmed mean	6.474	7	24	.000

Keterangan Tabel
 P = 0.287 : Signifikan ($p > 0.05$)

5.2.2. Hasil Uji Kruskal Wallis

Uji *Kruskal Wallis* digunakan untuk mengetahui perbedaan pengaruh pemberian ekstrak Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) terhadap pertumbuhan koloni MRSA. Sebelumnya, dibuat dua hipotesis penelitian sebagai berikut:

- Hipotesis Awal (H0): Tidak ada perbedaan pengaruh pemberian ekstrak Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) terhadap pertumbuhan koloni MRSA
- Hipotesis alternatif (H1): Ada perbedaan pengaruh pemberian ekstrak Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) terhadap pertumbuhan koloni MRSA



Tabel 5.4 Hasil Uji *Kruskal Wallis* antara Konsentrasi Ekstrak Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) terhadap Pertumbuhan Koloni Bakteri MRSA

Test Statistics ^{a,b}		Ranks		
		Konsentrasi	N	Mean Rank
Kruskal-Wallis H	Ketebalan_Koloni	0	4	27.00
		2%	4	27.00
		3%	4	24.88
		4%	4	15.25
		5%	4	16.88
		6%	4	12.00
		7%	4	6.00
		8%	4	3.00
		Total	32	
		df		
Asymp. Sig.			.000	

a. Kruskal Wallis Test
b. Grouping Variable: Konsentrasi

Keterangan Tabel :
P = 0.000 : Signifikan (p < 0.05)

Uji *Kruskal Wallis* menunjukkan hasil p = 0.00 (syarat perbedaan signifikan pada uji jika p < 0.05). Hal tersebut dapat disimpulkan bahwa H0 ditolak dan H1 dapat diterima atau dengan kata lain terdapat minimal satu penurunan signifikan pertumbuhan MRSA dengan pemberian dosis ekstrak Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*).

5.2.3. Hasil Mann Whitney

Uji *Mann Whitney* termasuk salah satu Uji Post Hoc yang dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) terhadap pertumbuhan koloni MRSA yang berbeda secara signifikan antarkelompoknya. Apabila p ≤ 0.05 maka dapat dinyatakan terdapat perbedaan pengaruh pemberian ekstrak Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) terhadap pertumbuhan koloni MRSA. Hasil analisis uji *Mann Whitney* perbedaan ekstrak Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) terhadap pertumbuhan koloni MRSA dapat diketahui melalui tabel berikut ini:

Tabel 5.5 Hasil Uji Post Hoc Tukey

	K-	P2%	P3%	P4%	P5%	P6%	P7%	P8%
K-		1.000	0.317	0.013*	0.011*	0.008*	0.011*	0.008*
P2%			0.317	0.013*	0.011*	0.008*	0.011*	0.008*
P3%				0.032*	0.040*	0.011*	0.015*	0.011*
P4%					0.495	0.127	0.017*	0.013*
P5%						0.040*	0.015*	0.011*
P6%							0.011*	0.008*
P7%								0.040*
P8%								

Keterangan Tabel :

* = Terdapat perbedaan signifikan

Hasil analisis pada tabel 5.6 menunjukkan bahwa konsentrasi ekstrak Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) 0% atau kontrol negatif menghasilkan hasil yang berbeda signifikan terhadap konsentrasi 4%, 5%, 6%, 7%, dan 8% namun tidak didapatkan perbedaan terhadap konsentrasi 2% dan 3%. Konsentrasi 2% menunjukkan adanya perbedaan terhadap seluruh konsentrasi kecuali konsentrasi 3%. Konsentrasi 3% juga menunjukkan adanya perbedaan terhadap seluruh konsentrasi di atasnya namun menunjukkan ketiadaan perbedaan dengan konsentrasi dibawahnya. Hubungan antarkonsentrasi 4%, 5%, 6%, 7%, dan 8% secara keseluruhan didapatkan adanya perbedaan yang signifikan, kecuali 4% dengan 5% serta 4% dengan 6% yang tidak terdapat perbedaan signifikan. Uji analisis kontrol negatif dengan seluruh persatuan konsentrasi didapatkan angka signifikansi pada konsentrasi ekstrak Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) $\geq 4\%$.

Dengan kata lain, konsentrasi ekstrak *Biji Kopi Arabika (Coffea arabica)* 4%, 5%, 6%, 7%, dan 8% telah menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap MRSA.

5.2.4. Hasil Uji Korelasi Spearman

Uji Korelasi *Spearman* dilakukan untuk mengetahui hubungan antara pemberian konsentrasi ekstrak Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) dengan pertumbuhan koloni MRSA. Hubungan signifikan ditunjukkan dengan $p < 0.05$, sedangkan nilai $p > 0.05$ menunjukkan bahwa korelasi tidak signifikan atau diartikan tidak terdapat hubungan yang signifikan antara konsentrasi ekstrak Biji Kopi Arabika dengan pertumbuhan koloni. Adapun klasifikasi nilai korelasi *Spearman* sebagai berikut (Sugiyono, 2011):

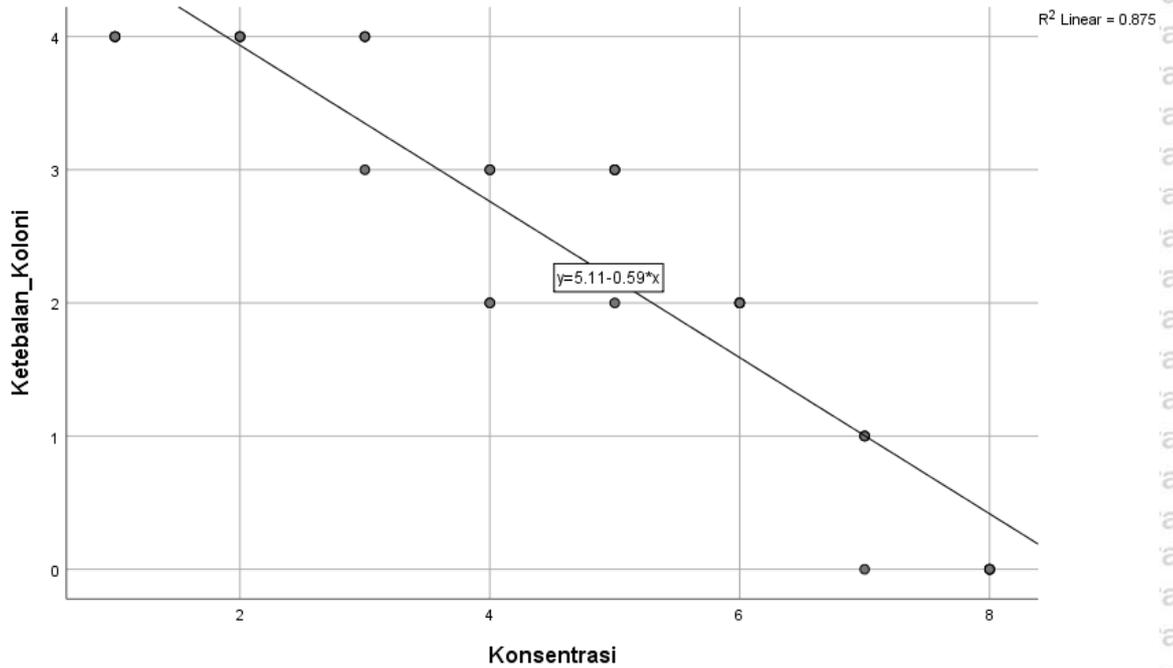
- Nilai Korelasi 0 – 0.199 = sangat rendah
- Nilai Korelasi 0.200 – 0.399 = rendah
- Nilai Korelasi 0.400 – 0.599 = sedang
- Nilai Korelasi 0.600 – 0.799 = kuat
- Nilai Korelasi 0.800 – 1.000 = sangat kuat

Korelasi dapat bertanda positif dan negatif. Korelasi positif menunjukkan arah yang searah antarvariabel. Sedangkan korelasi negatif menunjukkan arah yang berlawanan. Hasil analisis hubungan konsentrasi ekstrak Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) dengan pertumbuhan koloni MRSA dapat dilihat melalui tabel berikut:

Tabel 5.6 Hasil Uji Spearman

Correlations				
		Korelasi_Konsentrasi		Korelasi_Ketebalan
Spearman's rho	Korelasi_Konsentrasi	Correlation Coefficient	1.000	-.942**
		Sig. (2-tailed)	.	.000
		N	28	28
Korelasi_Ketebalan	Korelasi_Konsentrasi	Correlation Coefficient	-.942**	1.000
		Sig. (2-tailed)	.000	.
		N	28	28

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



Gambar 5.8 Grafik Uji Korelasi Spearman Antara Peningkatan Ekstrak Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) terhadap Diameter Zona Hambat Pertumbuhan Bakteri MRSA

Nilai korelasi didapatkan -0.942 yang berarti korelasi antara pemberian konsentrasi ekstrak Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) dengan pertumbuhan koloni MRSA termasuk kategori sangat kuat. Sedangkan, arah korelasi negatif ditunjukkan dengan tanda minus yang berarti semakin tinggi konsentrasi ekstrak Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) akan menghasilkan koloni MRSA yang semakin tipis dan renggang. Begitu pula jika konsentrasi ekstrak semakin rendah.

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1. Pembahasan

Penelitian yang dilakukan bertujuan untuk mengetahui efektivitas ekstrak Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) terhadap pertumbuhan MRSA secara in vitro.

Penelitian dilakukan dengan menggunakan metode dilusi agar, metode tersebut dipilih karena hasil ekstrak dari Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) berwarna coklat kehijauan serta memiliki konsistensi yang sedikit kental, sehingga tidak memungkinkan menggunakan metode dilusi tabung dan difusi agar. Selain itu, metode dilusi agar dipilih karena dapat mengukur MIC dari sebuah ekstrak terhadap pertumbuhan bakteri (Wiegand, Hilpert dan Hancock, 2008). Hasil dari penelitian ini adalah didapatkannya *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC), yaitu kadar konsentrasi ekstrak yang mempengaruhi pertumbuhan MRSA hingga menunjukkan tidak ditemukannya pertumbuhan koloni pada media penanaman *Nutrient Agar* yang telah dicampur dengan ekstrak dan kemudian diletakkan dalam inkubator selama 18 – 24 jam pada suhu 37°C.

Pada penelitian ini digunakan bahan Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) yang sudah dikeringkan, kemudian digiling untuk diubah menjadi bentuk simplisia (serbuk), selanjutnya diekstrak dengan metode maserasi yang menggunakan pelarut etanol 96% di UPT Materia Medika Kota Batu. Metode ini dilakukan karena prosedur dan peralatannya lebih sederhana. Selain itu, berbagai senyawa aktif Biji Kopi Arabika akan lebih banyak didapatkan menggunakan metode maserasi dibandingkan metode lainnya seperti rebusan air (Firdaus *et al.*, 2017). Isolat MRSA yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Sebelum melakukan penelitian, terlebih dahulu dilakukan uji identifikasi bakteri yang terdiri dari kultur media Agar Mannitol-Salt, Pewarnaan Gram, Tes Koagulase, Tes Katalase, dan Uji Cefoxitin sebagai identifikasi galur resisten metisilin. Kultur *Mannitol Salt Agar* didapatkan koloni berwarna kuning dengan zona kekuningan di sekitar koloni membentuk bentukan konveks/cembung. Pewarnaan gram dengan perbesaran 1000x dan minyak imersi menunjukkan bentukan bakteri kokus, berwarna ungu (gram negatif). Bakteri ditemukan secara tunggal, berpasangan, atau dalam kluster yang menyerupai formasi anggur. Pada uji Katalase bakteri yang diuji menunjukkan hasil positif. Hal tersebut ditunjukkan oleh munculnya gelembung pada strip uji. Uji koagulase juga menunjukkan hasil positif dengan munculnya bentukan butiran pasir pada strip uji. Dari seluruh pengujian yang telah dilakukan, dapat diidentifikasi bakteri yang digunakan adalah *S. aureus*. Terakhir, untuk menentukan Galur, dilakukan Uji menggunakan Uji Cefoxitin, hasil final Uji Cefoxitin resisten terhadap cefoxitin pada bakteri *S. aureus* yang menandakan bakteri tersebut galur MRSA.

Uji pengaruh pertumbuhan koloni MRSA terhadap Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) dilakukan menggunakan konsentrasi 2% - 8% dengan interval 1% serta kontrol negatif menggunakan aquades (Konsentrasi 0%) dengan pengulangan 4 kali pada setiap konsentrasi. Dari hasil penelitian pada didapatkan konsentrasi 0% atau kontrol negatif menunjukkan bakteri dapat hidup dan membentuk koloni dengan sangat tebal dan rapat. Kemudian, konsentrasi 2% dan 3% koloni tumbuh sangat tebal dengan jarak yang rapat pada keempat titik pengulangan. Pada konsentrasi 4% dan 5% koloni *S. aureus* masih tumbuh sangat tebal namun bagian tengah merenggang. Pada konsentrasi 6% koloni *S. aureus* sedikit menipis dan koloni mulai memisah. Pada konsentrasi 7% koloni *S. aureus* ditemukan menyebar, semakin tipis, dan memisah. Hingga pada konsentrasi 8% sudah tidak

ditemukan pertumbuhan koloni Bakteri *S. aureus*. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi 8% merupakan MIC ekstrak Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) terhadap pertumbuhan MRSA.

Faktor yang mempengaruhi pertumbuhan koloni bakteri MRSA secara in vitro pada penelitian ini dikarenakan adanya senyawa-senyawa pada biji kopi yang memiliki efek untuk menghambat pertumbuhan MRSA seperti flavonoid, saponin, dan alkaloid (Panche, Xie *et al.*, 2014; Diwan dan Chandra, 2016; Bhatia dan Dahiya, 2015).

Mekanisme kerja flavonoid sebagai antimikroba memiliki beberapa jalur. Mekanisme tersebut dapat dibagi menjadi 3 yaitu menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi membran sel dan menghambat metabolisme energi (Cushnie dan Lamb, 2005). Mekanisme penghambatan berhasil diketahui melalui ikatan atau interkalasi hidrogen dalam proses sintesis asam nukleat. Cincin A dan B pada flavonoid memegang peranan penting dalam proses interkalasi atau ikatan hidrogen dengan mengelasi basa asam nukleat sehingga menghambat pembentukan DNA dan RNA. Flavonoid menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri, mikrosom, dan lisosom sebagai hasil interaksi antara flavonoid dengan DNA bakteri (Cushnie dan Lamb, 2005). Mekanisme kedua, kerja flavonoid menghambat fungsi membran sel melalui efek sophoraflavone G pada fluiditas membran. Mekanisme ketiga muncul dari salah satu struktur flavonoid yang ditemukan pada akar *Glycyrrhiza inflata*, *lichocalcones* A dan C. Haraguchi *et al.* Pada tahun 2010 menyebutkan bahwasannya struktur tersebut secara kuat menginhibisi konsumsi oksigen pada bakteri *Micrococcus luteus* dan *S. aureus* sehingga melepaskan membran sel, hal tersebut diyakini oleh gangguan pada proses transport elektron yang berimbas pada turunya integritas (Bouyahya, 2016).

Saponin adalah suatu senyawa kimia yang dapat berperan sebagai metabolit sekunder yang banyak terdapat di alam, yang tersusun dari gugus gula yang berikatan dengan aglikon atau saponogenin. Mekanisme terbaru antibakterial dari saponin berhasil dijelaskan oleh Khan *et al* tahun 2018 dengan melisiskan sel bakteri oleh saponin. Khan dan kolega mengukur kandungan AKP (Alkaline phosphatase) dari masing-masing strain setelah terpapar dengan saponin. Isi AKP diukur sesuai dengan metode He *et al.*, dengan sedikit modifikasi. AKP ditemukan antara dinding sel dan membran sel sel bakteri. Kebocoran AKP terjadi hanya ketika dinding sel bakteri rusak. Saponin menyebabkan *blister* dan berujung pada pecahnya dinding sel bakteri, sehingga isi dari sitoplasma bakteri akan keluar ke media eksternal (Khan *et al.*, 2018).

Alkaloid merupakan salah satu senyawa yang paling banyak kedua ditemukan dalam kopi. Rasa kopi yang dikenal oleh masyarakat luas dibentuk oleh adanya kafein, suatu senyawa alkaloid. Alkaloid dapat menghambat aktivitas dihidrofolat reduktase. Hambatan tersebut secara langsung berperan dalam menghambat sintesis asam nukleat karena enzim dihidrofolat reduktase krusial dalam produksi purin dan pirimidin. Kemudian, alkaloid juga dapat mengikat protein FtsZ dengan afinitas kuat yang mengakibatkan inhibisi aktivitas GTPase, inhibisi enzim tersebut menghambat pembelahan sel pada fase elongasi sel (Cushnie *et al.*, 2014; Shin, Prabhakaran and Kim, 2018). Alkaloid juga dapat bertindak seperti deterjen dengan mendisrupsi membran terluarnya pada bakteri gram negatif dan mendepolarisasi membran bakteri gram positif. Kafein juga diketahui dapat menghambat berbagai macam pertumbuhan bakteri karena kemampuannya dalam menghambat sintesa protein dan DNA dengan menghambat penggabungan adenin dan timidin. Selanjutnya, kafein

mempercepat proses genotoksisitas setelah merusak komponen DNA (Pruthviraj *et al.*, 2011).

Dari hasil penelitian yang sudah didapatkan, kemudian dilakukan analisis data yang diawali dengan uji normalitas dengan metode *Shapiro-Wilk* untuk mengetahui distribusi normal suatu data dari pengaruh ekstrak Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) terhadap pertumbuhan MRSA. Dari uji normalitas, didapatkan $p < 0.05$ yang dapat disimpulkan bahwa distribusi data tidak normal, karena syarat distribusi normal adalah $p \geq 0.05$. Uji kemudian dilanjutkan dengan metode nonparametrik.

Pengujian perbedaan pengaruh ekstrak Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) terhadap pertumbuhan MRSA dilakukan menggunakan metode *Kruskal Wallis*, karena dari pengujian normalitas pengaruh pemberian ekstrak Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) terhadap pertumbuhan MRSA, didapatkan hasil uji normalitas yang tidak normal sehingga digunakan uji nonparametrik. Uji *Kruskal Wallis* menunjukkan hasil $p = 0.00$ (syarat perbedaan signifikan pada uji jika $p < 0.05$). Hal tersebut dapat disimpulkan bahwa terdapat penurunan signifikan pertumbuhan MRSA dengan pemberian dosis ekstrak Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) dengan peningkatan konsentrasi

Pengujian selanjutnya dilakukan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui pengaruh pemberian konsentrasi ekstrak Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) terhadap pertumbuhan MRSA yang berbeda signifikan dengan syarat hasil $p \leq 0.05$.

Hasil analisis menunjukkan bahwa ekstrak biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) 0% atau kontrol negatif menghasilkan hasil yang berbeda signifikan terhadap konsentrasi 4%, 5%, 6%, 7%, dan 8% namun tidak didapatkan

perbedaan terhadap konsentrasi 2% dan 3%. Konsentrasi 2% menunjukkan adanya perbedaan terhadap seluruh konsentrasi kecuali konsentrasi 3%. Konsentrasi 3% juga menunjukkan adanya perbedaan terhadap seluruh konsentrasi di atasnya namun menunjukkan ketiadaan perbedaan dengan konsentrasi dibawahnya. Hubungan antarkonsentrasi 4%, 5%, 6%, 7%, dan 8% secara keseluruhan didapatkan adanya perbedaan yang signifikan, kecuali 4% dengan 5% serta 4% dengan 6% yang tidak terdapat perbedaan signifikan. Uji analisis kontrol negatif dengan seluruh persatuan konsentrasi didapatkan angka signifikansi pada konsentrasi ekstrak Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) $\geq 4\%$. Dengan kata lain, konsentrasi ekstrak Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) 4%, 5%, 6%, 7%, dan 8% telah menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap MRSA.

Setelah itu, dilanjutkan dengan pengujian korelasi spearman yang dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui korelasi konsentrasi ekstrak Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) terhadap pertumbuhan MRSA. Hasil uji korelasi spearman pada penelitian ini adalah $R = -0.942$ dan $p=0.000$, dengan $p<0.05$, memiliki arti adanya signifikansi yang berkorelasi sangat kuat, dan arah korelasi negatif, yang berarti semakin tinggi konsentrasi ekstrak Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) akan menghasilkan koloni MRSA yang semakin tipis dan renggang.

Begitu pula jika konsentrasi ekstrak semakin rendah maka semakin tebal dan rapat koloni MRSA yang terbentuk.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil yang diperoleh dari penelitian, dapat disimpulkan

1. Ekstrak Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) memiliki efek antimikroba terhadap bakteri MRSA secara *in vitro* dengan metode dilusi agar.
2. Ekstrak Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) memiliki korelasi sangat kuat terhadap hambatan pertumbuhan bakteri MRSA secara *in vitro* dengan metode dilusi agar.

7.2. Saran

Berdasarkan penelitian ini, terdapat beberapa saran untuk kedepannya:

1. Penelitian lebih mendalam tentang efektivitas ekstrak Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) sebagai antimikroba terhadap bakteri lainnya masih perlu dilakukan.
2. Penelitian lebih mendalam tentang zat senyawa aktif dalam ekstrak etanol Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*) yang mempunyai daya antibakteri paling besar.
3. Penelitian lebih lanjut untuk mengetahui dosis toksisitas, dan efek samping yang dapat ditimbulkan oleh pemberian ekstrak etanol Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*).
4. Penelitian lebih lanjut untuk mengetahui hubungan antara lama simpan ekstrak dengan efek antimikroba yang dimiliki oleh ekstrak Biji Kopi Arabika (*Coffea arabica*).

DAFTAR PUSTAKA

Abreu, A., McBain, A. and Simões, M., 2012. Plants as sources of new antimicrobials and resistance-modifying agents. *Natural Product Reports*, 29(9), p.1007.

Acidri, R., Sawai, Y., Sugimoto, Y., Handa, T., Sasagawa, D., Masunaga, T., Yamamoto, S. and Nishihara, E., 2020. Phytochemical Profile and Antioxidant Capacity of Coffee Plant Organs Compared to Green and Roasted Coffee Beans. *Antioxidants*, 9(2), p.93.

Alani, Zimmerman, Kui, Wink. 2015. Pharmacological synergism of bee and plant secondary metabolites against multi-drugs resistance microbial pathogen. *International Jou. of Phytotherapy and Phytopharmacology*. 22(2):245-55.

Almeida, A., Farah, A., Silva, D., Nunan, E. and Glória, M., 2006. Antibacterial Activity of Coffee Extracts and Selected Coffee Chemical Compounds against Enterobacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(23), pp.8738-8743.

Aly, M., Khalil, S. and Metwaly, A., 2014. Isolation and Molecular Identification of *Klebsiella* Microbe Isolated from Chicks. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*, 43(1), p.97.

Bhakkir, K., 2019. The antibacterial activity of green coffee and Arabica coffee extracts on cariogenic *Streptococcus mutans* isolated from dental caries: An in vitro study. *University of Thi-Qar Journal of Science*, 1(12), pp.89-92.

Bonatti, H., 2008. Epidemiology and Outcomes of Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *Yearbook of Surgery*, 2008, pp.148-150.

Brezová, V., Šlebodová, A. and Staško, A., 2009. Coffee as a source of antioxidants: An EPR study. *Food Chemistry*, 114(3), pp.859-868.

Chiang, H., Lin, T., Chiu, C., Chang, C., Hsu, K., Fan, P. and Wen, K., 2011. *Coffea arabica* extract and its constituents prevent photoaging by suppressing MMPs expression and MAP kinase pathway. *Food and Chemical Toxicology*, 49(1), pp.309-318.

Cindy, A., 2013. *Great Adventures in the Microbiology Laboratory*. Pearson. pp. 175–176. [ISBN 978-1-269-39068-2](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.06.001).

Cushnie, T. T., Cushnie, B., and Lamb, A. J. 2014. Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. *Int. J. Antimicrob. Agents* 44, 377–386. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2014.06.001

D. Sue Katz. 2010. Coagulase test protocol.

Doern, C., Park, J., Gallegos, M., Alspaugh, D. and Burnham, C., 2016. Investigation of Linezolid Resistance in *Staphylococci* and *Enterococci*. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(5), pp.1289-1294.

dos Santos, M., Almeida, M., Lopes, N. and de Souza, G., 2011. Evaluation of the Anti-inflammatory, Analgesic and Antipyretic Activities of the Natural Polyphenol Chlorogenic Acid. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 29(11), pp.2236-2240.

Erikawati, D., Santosaningsih, D. and Santoso, S., 2016. *Tingginya Prevalensi*

MRSA Pada Isolat Klinik Periode 2010- 2014 Di RSUD Dr. Saiful Anwar Malang, Indonesia.

Garoy, E., Gebreab, Y., Achila, O., Tekeste, D., Kesete, R., Ghirmay, R., Kiflay, R. and Tesfu, T., 2019. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA):

Prevalence and Antimicrobial Sensitivity Pattern among Patients—A Multicenter Study in Asmara, Eritrea. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 2019, pp.1-9.

Hoelzl, C., Knasmüller, S., Wagner, K., Elbling, L., Huber, W., Kager, N., Ferk, F.,

Ehrlich, V., Nersesyan, A., Neubauer, O., Desmarchelier, A., Marin-Kuan,

M., Delatour, T., Verguet, C., Bezençon, C., Besson, A., Grathwohl, D.,

Simic, T., Kundi, M., Schilter, B. and Cavin, C., 2010. Instant coffee with

high chlorogenic acid levels protects humans against oxidative damage of macromolecules. *Molecular Nutrition & Food Research*, 54(12), pp.1722-

1733.

Holland, T., Arnold, C. and Fowler, V., 2014. Clinical Management of *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *JAMA*, 312(13), p.1330.

Jawetz, Melnick, Adelbergs. 2005. *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta: Salemba Medika.

Johnson, A., 2011. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the European landscape. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(Supplement 4), pp.iv43-iv48.

Karen Reiner. 2010. Catalase test protocol.

Khan, M Fareed. 2017. "Brief History of *Staphylococcus aureus*: A Focus to Antibiotic Resistance". *EC Microbiology* 5.2: 36-39.

Khan, M., 2012. Emergence of linezolid resistant *Staphylococcus aureus* in Bastar tribal region, India. *Journal of Microbiology and Infectious Diseases*, 2(3), pp.127-128.

Klein, E., Smith, D. and Laxminarayan, R., 2007. Hospitalizations and Deaths Caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, United States, 1999–2005. *Emerging Infectious Diseases*, 13(12), pp.1840-1846.

Kobayashi, T., Glatz, M., Horiuchi, K., Kawasaki, H., Akiyama, H., Kaplan, D., Kong, H., Amagai, M. and Nagao, K., 2015. Dysbiosis and *Staphylococcus aureus* Colonization Drives Inflammation in Atopic Dermatitis. *Immunity*, 42(4), pp.756-766.

Król, K., Gantner, M., Tatarak, A. and Hallmann, E., 2019. The content of polyphenols in coffee beans as roasting, origin and storage effect. *European Food Research and Technology*, 246(1), pp.33-39.

Leo, F., Diep, B. and Otto, M., 2009. Host Defense and Pathogenesis in *Staphylococcus aureus* Infections. *Infectious Disease Clinics of North America*, 23(1), pp.17-34.

Licitra, G., 2013. Etymologia: *Staphylococcus*. *Emerging Infectious Diseases*, 19(9).

Lorian, Victor (2005). [*Antibiotics in Laboratory Medicine*](#). Lippincott Williams & Wilkins.

Mahajan, R. and Kapoor, N., 2018. Phytochemical Analysis And Antimicrobial Activity Of Roasted Beans Of Coffea Robusta. *Int. Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 8(1), pp.89-95.

Mahajan, R. and Kapoor, N., 2018. Phytochemical Analysis And Antimicrobial Activity Of Roasted Beans Of Coffea Robusta. *Int. Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 8(1), pp.89-95.

Martinez-Torres, Maria Elena. 2006. *Organic Coffee*. Ohio University. ISBN 9780896802476. Retrieved 19 September 2020.

Moreira, D., Monteiro, M., Ribeiro-Alves, M., Donangelo, C. and Trugo, L., 2005. Contribution of Chlorogenic Acids to the Iron-Reducing Activity of Coffee Beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(5), pp.1399-1402.

Naber, C., 2009. Staphylococcus aureus Bacteremia: Epidemiology, Pathophysiology, and Management Strategies. *Clinical Infectious Diseases*, 48(s4), pp.S231-S237.

Nakayama, M., Shimatani, K., Ozawa, T., Shigemune, N., Tomiyama, D., Yui, K., Katsuki, M., Ikeda, K., Nonaka, A. and Miyamoto, T., 2015. Mechanism for the antibacterial action of epigallocatechin gallate (EGCg) on *Bacillus subtilis*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 79(5), pp.845-854.

Orent W. 2006. "A Brief History of Staph". *Proto Magazine*.

Patel, S., Chauhan, H., Patel, A., Shrimali, M., Patel, K., Prajapati, B., Kala, J., Patel, M., rajgor, M. and Patel, M., 2017. Isolation and Identification of *Klebsiella pneumoniae* from Sheep-Case Report. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(5), pp.331-334.



Prado, Sara Guiti; Collazo, Jaime A.; Stevenson, Philip C.; Irwin, Rebecca E.

2019. A comparison of coffee floral traits under two different agricultural practices. *Scientific Reports*; **9** (1): 7331

Pruthviraj, P., Sutchita, B., Shital, K., Shitta, K. and Singh, B., 2011. Evaluation of Antibacterial Activity of Caffeine. *International Journal of Ayurveda and Pharmacy*, [online] 2(4), pp.1354 - 1357. Available at: <<http://ijrap.net>> [Accessed 3 October 2020].

Rasmussen, R., Fowler Jr, V., Skov, R. and Bruun, N., 2011. Future challenges and treatment of *Staphylococcus aureus* bacteremia with emphasis on MRSA. *Future Microbiology*, 6(1), pp.43-56.

Schlecht, L., Peters, B., Krom, B., Freiberg, J., Hänsch, G., Filler, S., Jabra-Rizk, M. and Shirliff, M., 2015. Systemic *Staphylococcus aureus* infection mediated by *Candida albicans* hyphal invasion of mucosal tissue. *Microbiology*, 161(1), pp.168-181.

Schmitt, Christine B. (2006). Montane Rainforest with Wild *Coffea Arabica* in the Bonga Region (SW Ethiopia): Plant Diversity, Wild Coffee Management and Implications for Conservation. *Cuvillier Verlag*. p. 4. ISBN 978-3-86727-043-4

Senok, A., Verstraelen, H., Temmerman, M. and Botta, G., 2009. Probiotics for the treatment of bacterial vaginosis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*.

Shin, J., Prabhakaran, V. and Kim, K., 2018. The multi-faceted potential of plant-derived metabolites as antimicrobial agents against multidrug-resistant pathogens. *Microbial Pathogenesis*, 116, pp.209-214.



Söndahl, M. R.; van der Vossen, H. A. M. 2005. "The plant: Origin, production and botany". In Illy, Andrea; Viani, Rinantonio (eds.). *Espresso Coffee: The Science of Quality* (Second ed.). Elsevier Academic Press. p. 21. ISBN 978-0-12-370371-2.

Subramaniam, G., Yew, X. and Sivasamugham, L., 2019. Antibacterial activity of *Cymbopogon citratus* against clinically important bacteria. *South African Journal of Chemical Engineering*, 34, pp.26-30.

Tong, S., Davis, J., Eichenberger, E., Holland, T. and Fowler, V., 2015. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), pp.603-661.

Tong, S., Davis, J., Eichenberger, E., Holland, T. and Fowler, V., 2015. *Staphylococcus aureus* Infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3), pp.603-661.

USDA GAIN (2014). Indonesia Coffee Annual 2014, Global Agricultural Information Network (GAIN), *USDA Foreign Agricultural Service*. Available at: http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Coffee%20Annual_Jakarta_Indonesia_5-14-2014.pdf

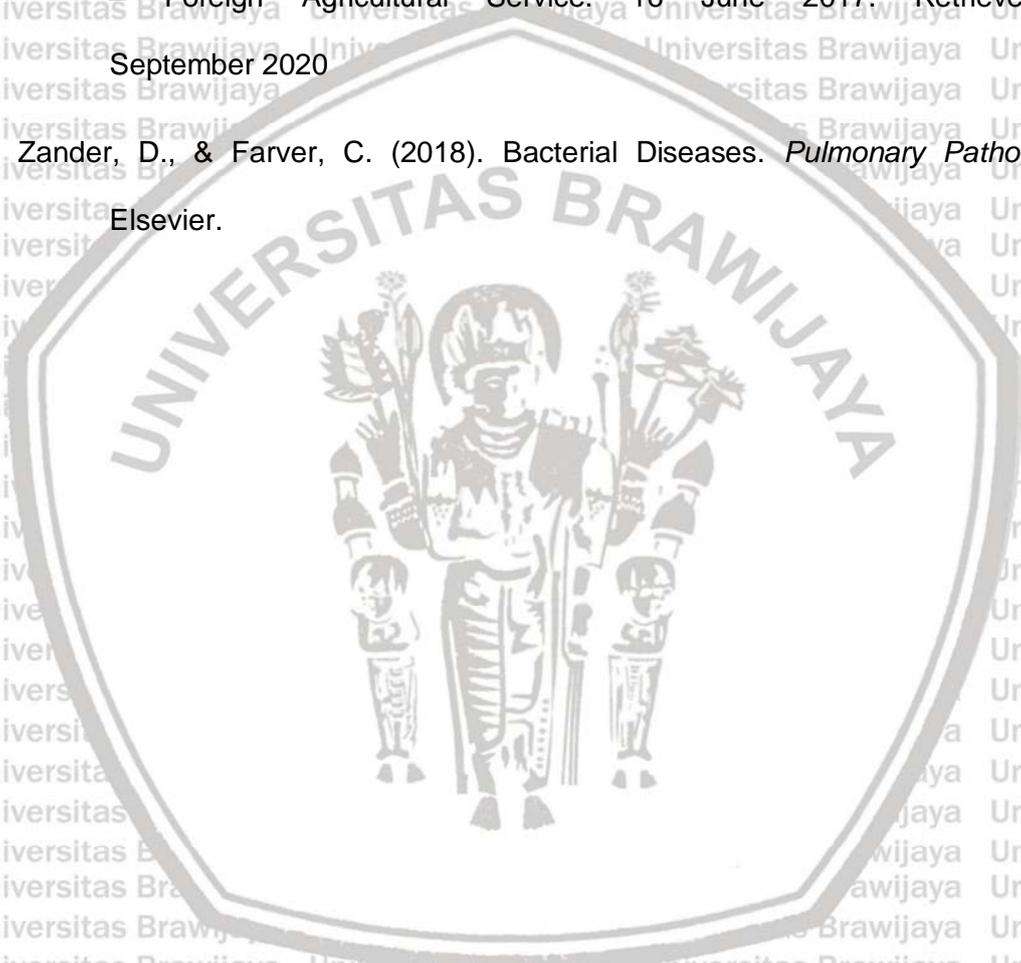
Utsunomiya, H., Ichinose, M., Uozaki, M., Tsujimoto, K., Yamasaki, H. and Koyama, A., 2008. Antiviral activities of coffee extracts in vitro. *Food and Chemical Toxicology*, 46(6), pp.1919-1924.

Wiegand, I., Hilpert, K. and Hancock, R., 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), pp.163-175.

Wiegand, I., Hilpert, K. and Hancock, R., 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), pp.163-175.

World Markets and Trade: Coffee. 2017. United States Department of Agriculture – Foreign Agricultural Service. 16 June 2017. Retrieved 19 September 2020

Zander, D., & Farver, C. (2018). Bacterial Diseases. *Pulmonary Pathology*. Elsevier.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat Determinasi Biji Kopi Arabika



PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR
DINAS KESEHATAN

UPT LABORATORIUM HERBAL MATERIA MEDICA BATU
Jalan Lahor No.87 Telp. (0341) 593396, e-mail: materiamedicabatu@jatimprov.go.id
KOTA BATU 65313

Nomor : 074/ 553A/ 102.7/ 2020
Sifat : Biasa
Perihal : **Determinasi Tanaman Kopi Arabika**

Memenuhi permohonan saudara :

Nama : AKBAR HIDAYATIKO
NIM : 175070100111002
Fakultas : KEDOKTERAN, UNIVERSITAS BRAWIJAYA

1. Perihal determinasi tanaman kopi arabica

Kingdom : Plantae (Tumbuhan)
Superkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
Super Divisi : Spermatophyta (Menghasilkan biji)
Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
Kelas : Magnoliopsida (berkeping dua / dikotil)
Sub Kelas : Asteridae
Ordo : Rubiales
Famili : Rubiaceae (suku kopi-kopian)
Genus : Coffea
Spesies : *Coffea arabica* L.
Sinonim : Kopi (Sunda), kopi (Jawa)
Kunci Determinasi : 1b-2b-3b-4b-6b-7b-9b-10b-11b-12b-13b-14b-16a-239b-243b-244b-248b-249b-250a-251a-252b-1b-3b-4b-5b-6b-7a-1b

2. Morfologi : Habitus: Perdu, tinggi 2-3 m. Batang: Tegak, bulat, percabangan monopodial, permukaan kasar, kuning kotor. Daun: Tunggal, berhadapan, lonjong, tepi rata, ujung meruncing, pangkat tumpul, panjang 8-15 cm, lebar 4-7 cm, bertangkai pendek, hijau, pertulangan menyirip, permukaan daun berlekuk-lekuk jelas, hijau, pangkal daun bentuk taji. Bunga: Majemuk, bentuk payung, di ketiak daun, kelopak lonjong, lima helai, panjang ± 3 mm, hijau, tangkai benang sari berlekatan membentuk tabung, panjang ± 8 mm, putih, tangkai putik menjulang keluar tabung, putih, mahkota bentuk bintang, lima helai, panjang 7-9 mm, putih. Buah: Batu, bulat telur, diameter 0.5-1 cm, masih muda hijau setelah tua merah. Biji: Bentuk ½ bola, salah satu permukaan beralur, panjang 0.5-1 cm, putih kehijauan. Akar: Tunggang, kuning muda.

3. Bagian yang digunakan : Biji.

4. Penggunaan : Penelitian tugas akhir.

5. Daftar Pustaka

- Van Steenis, CGGJ. 2008. *FLORA: untuk Sekolah di Indonesia*. Pradnya Paramita, Jakarta.

Demikian surat keterangan determinasi ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batu, 25 November 2020

KEPALA UPT LABORATORIUM HERBAL
MATERIA MEDICA BATU



ACHMAD MABRUR, SKM, M.Kes.
DINAS KESEHATAN
80203 199203 1 004



Lampiran 2. Hasil Analisis Data Statistik Menggunakan SPSS 26

Uji Analisis *Mann-Whitney*

Test Statistics^a

	Ketebalan_K oloni
Mann-Whitney U	8.000
Wilcoxon W	18.000
Z	.000
Asymp. Sig. (2-tailed)	1.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 ^b

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.

Test Statistics^a

	Ketebalan_K oloni
Mann-Whitney U	6.000
Wilcoxon W	16.000
Z	-1.000
Asymp. Sig. (2-tailed)	.317
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.686 ^b

a. Grouping Variable: Konsentrasi

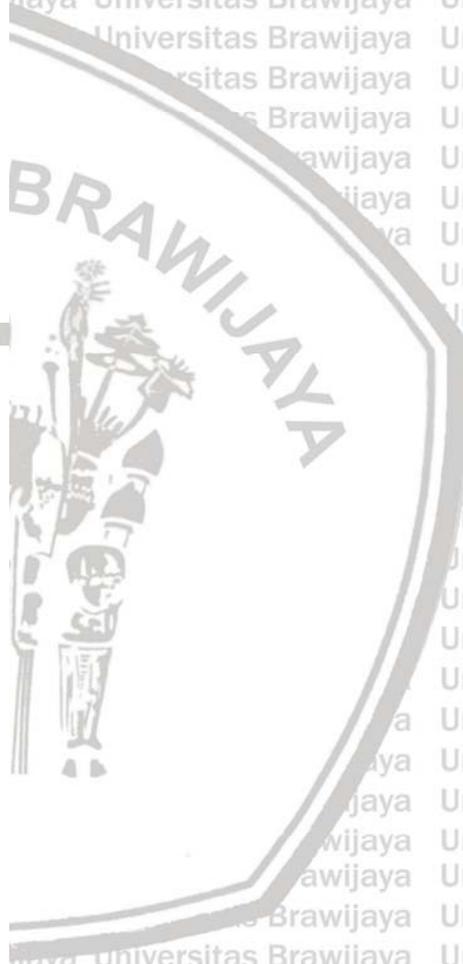
b. Not corrected for ties.

Test Statistics^a

	Ketebalan_K oloni
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.494
Asymp. Sig. (2-tailed)	.013
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^b

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.



Test Statistics^a

	Ketebalan_K oloni
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.530
Asymp. Sig. (2-tailed)	.011
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^b

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.

Test Statistics^a

	Ketebalan_K oloni
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.646
Asymp. Sig. (2-tailed)	.008
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^b

a. Grouping Variable: Konsentrasi

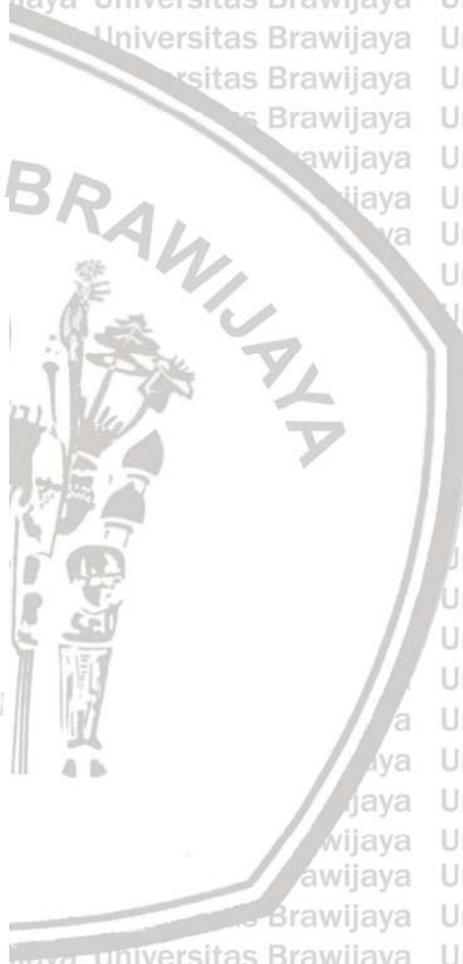
b. Not corrected for ties.

Test Statistics^a

	Ketebalan_K oloni
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.530
Asymp. Sig. (2-tailed)	.011
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^b

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.



Test Statistics^a

	Ketebalan_K oloni
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.646
Asymp. Sig. (2-tailed)	.008
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^b

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.

Test Statistics^a

	Ketebalan_K oloni
Mann-Whitney U	6.000
Wilcoxon W	16.000
Z	-1.000
Asymp. Sig. (2-tailed)	.317
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.686 ^b

a. Grouping Variable: Konsentrasi

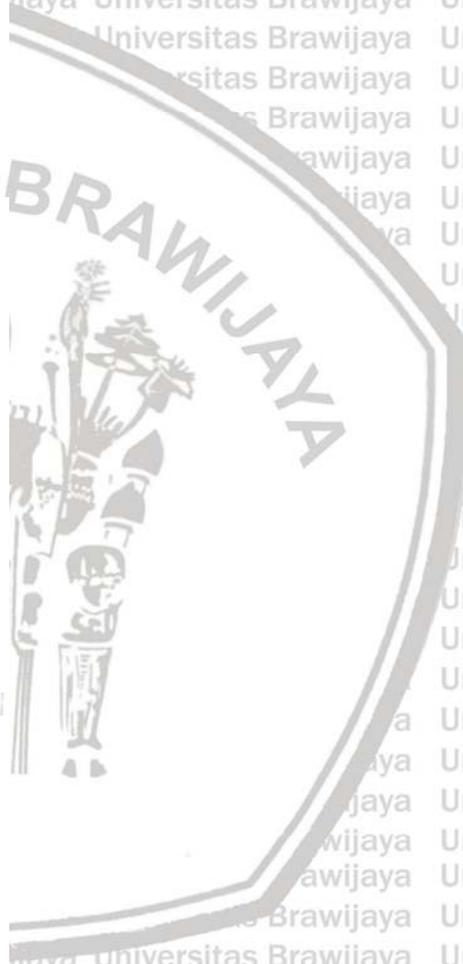
b. Not corrected for ties.

Test Statistics^a

	Ketebalan_K oloni
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.494
Asymp. Sig. (2-tailed)	.013
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^b

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.



Test Statistics^a

	Ketebalan_Koloni
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.530
Asymp. Sig. (2-tailed)	.011
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^b

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.

Test Statistics^a

	Ketebalan_Koloni
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.646
Asymp. Sig. (2-tailed)	.008
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^b

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.

Test Statistics^a

	Ketebalan_Koloni
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.530
Asymp. Sig. (2-tailed)	.011
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^b

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.



Test Statistics^a

	Ketebalan_K oloni
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.646
Asymp. Sig. (2-tailed)	.008
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^b

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.

Test Statistics^a

	Ketebalan_K oloni
Mann-Whitney U	1.000
Wilcoxon W	11.000
Z	-2.139
Asymp. Sig. (2-tailed)	.032
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.057 ^b

a. Grouping Variable: Konsentrasi

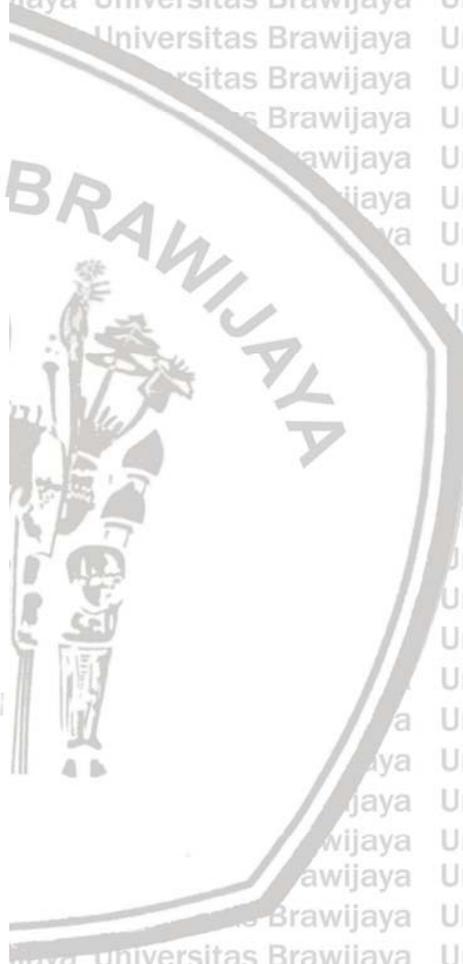
b. Not corrected for ties.

Test Statistics^a

	Ketebalan_K oloni
Mann-Whitney U	1.500
Wilcoxon W	11.500
Z	-2.055
Asymp. Sig. (2-tailed)	.040
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.057 ^b

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.



Test Statistics^a

	Ketebalan_K oloni
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.530
Asymp. Sig. (2-tailed)	.011
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^b

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.

Test Statistics^a

	Ketebalan_K oloni
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.428
Asymp. Sig. (2-tailed)	.015
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^b

a. Grouping Variable: Konsentrasi

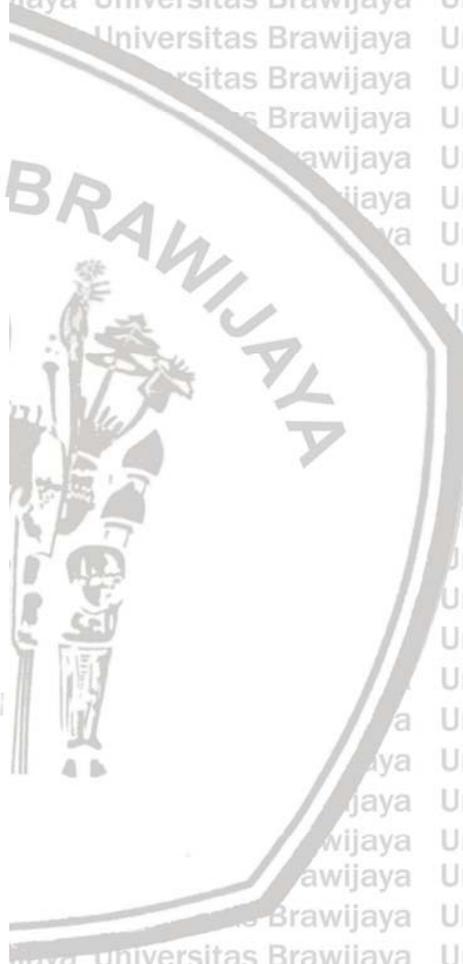
b. Not corrected for ties.

Test Statistics^a

	Ketebalan_K oloni
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.530
Asymp. Sig. (2-tailed)	.011
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^b

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.



Test Statistics^a

	Ketebalan_K oloni
Mann-Whitney U	6.000
Wilcoxon W	16.000
Z	-.683
Asymp. Sig. (2-tailed)	.495
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.686 ^b

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.

Test Statistics^a

	Ketebalan_K oloni
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	14.000
Z	-1.528
Asymp. Sig. (2-tailed)	.127
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.343 ^b

a. Grouping Variable: Konsentrasi

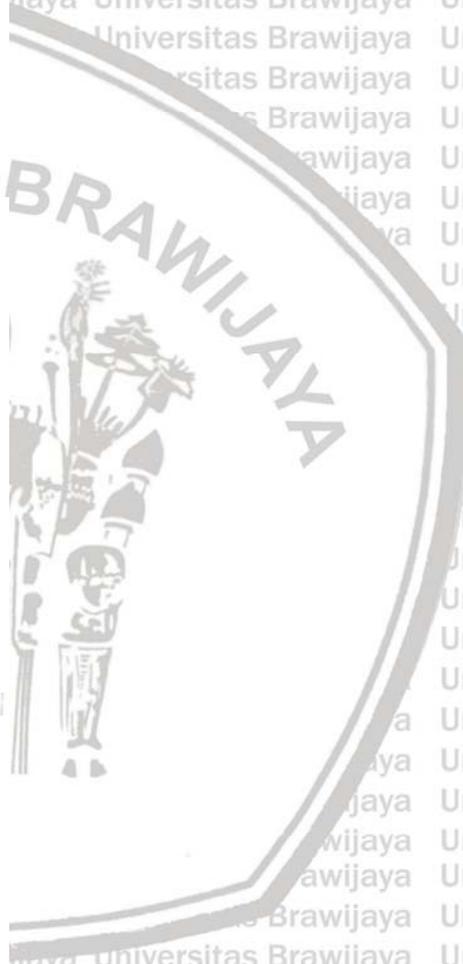
b. Not corrected for ties.

Test Statistics^a

	Ketebalan_K oloni
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.397
Asymp. Sig. (2-tailed)	.017
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^b

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.



Test Statistics^a

	Ketebalan_K oloni
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.494
Asymp. Sig. (2-tailed)	.013
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^b

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.

Test Statistics^a

	Ketebalan_K oloni
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	12.000
Z	-2.049
Asymp. Sig. (2-tailed)	.040
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.114 ^b

a. Grouping Variable: Konsentrasi

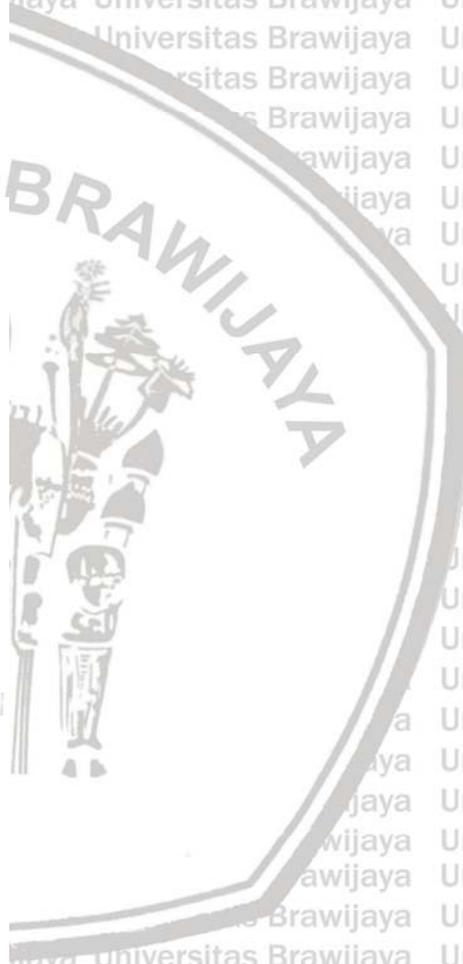
b. Not corrected for ties.

Test Statistics^a

	Ketebalan_K oloni
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.428
Asymp. Sig. (2-tailed)	.015
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^b

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.



Test Statistics^a

	Ketebalan_K oloni
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.530
Asymp. Sig. (2-tailed)	.011
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^b

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.

Test Statistics^a

	Ketebalan_K oloni
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.530
Asymp. Sig. (2-tailed)	.011
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^b

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.

Test Statistics^a

	Ketebalan_K oloni
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.646
Asymp. Sig. (2-tailed)	.008
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 ^b

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.



Test Statistics^a

	Ketebalan_K loni
Mann-Whitney U	2.000
Wilcoxon W	12.000
Z	-2.049
Asymp. Sig. (2-tailed)	.040
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.114 ^b

a. Grouping Variable: Konsentrasi

b. Not corrected for ties.



Lampiran 3. Dokumentasi Alat dan Bahan Penelitian

