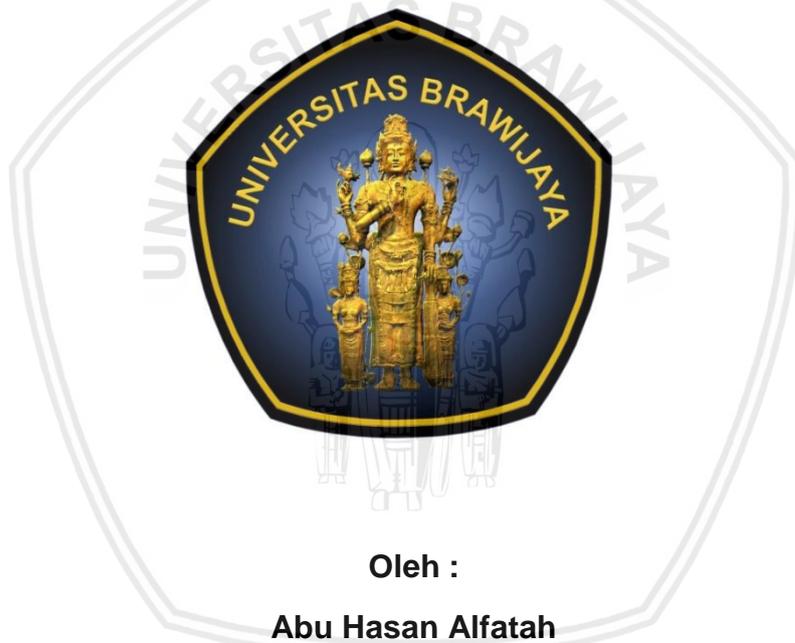


repository.ub.ac.id

**AKTIVITAS ANTIBIOFILM FRAKSI ETIL ASETAT EKSTRAK
DAUN PUTRI MALU (*Mimosa pudica*) PADA BAKTERI
Methicilin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA)
SECARA *IN VITRO***

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi**



Oleh :

Abu Hasan Alfatah

NIM 155070501111028

**PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI
JURUSAN FARMASI
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG**

2019



DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN PERSETUJUAN	Error! Bookmark not defined.
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	Error! Bookmark not defined.
ABSTRAK	Error! Bookmark not defined.
ABSTRACT	Error! Bookmark not defined.
KATA PENGANTARvi
DAFTAR ISI	Error! Bookmark not defined.
DAFTAR GAMBAR	Error! Bookmark not defined.
DAFTAR TABEL	Error! Bookmark not defined.
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	Error! Bookmark not defined.
1.2 Rumusan Masalah	Error! Bookmark not defined.
1.3 Tujuan Penelitian	Error! Bookmark not defined.
1.3.1 Tujuan Umum	Error! Bookmark not defined.
1.3.2 Tujuan Khusus	Error! Bookmark not defined.
1.4 Manfaat Penelitian	Error! Bookmark not defined.
1.4.1 Manfaat Akademik	Error! Bookmark not defined.
1.4.2 Manfaat Praktis	Error! Bookmark not defined.
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Putri Malu (<i>Mimosa pudica</i>)	Error! Bookmark not defined.
2.1.1 Taksonomi dan Deskripsi Tanaman	Error! Bookmark not defined.
2.1.2 Kandungan Kimia	Error! Bookmark not defined.
2.1.3 Aktivitas Farmakologi	Error! Bookmark not defined.
2.2 Bakteri <i>Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i> (MRSA) ..	Error! Bookmark not defined.
not defined.	
2.2.1 Taksonomi dan Karakteristik	Error! Bookmark not defined.
2.2.2 Patogenitas <i>Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	Error! Bookmark not defined.
Bookmark not defined.	
2.2.3 Manifestasi Klinis	Error! Bookmark not defined.
2.2.4 Resistensi <i>Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	Error! Bookmark not defined.
Bookmark not defined.	
2.3.6 Mekanisme Resistensi MRSA	Error! Bookmark not defined.



2.3 Biofilm.....	Error! Bookmark not defined.
2.3.1 Definisi Biofilm	Error! Bookmark not defined.
2.3.2 Komposisi dan Struktur Biofilm	Error! Bookmark not defined.
2.3.3 Pembentukan Biofilm.....	Error! Bookmark not defined.
2.3.4 Resistensi Biofilm terhadap Antibiotik.....	Error! Bookmark not defined.
2.3.5 Kontrol Biofilm.....	Error! Bookmark not defined.
2.3.6 Cara Pengujian Biofilm	Error! Bookmark not defined.
2.4 Ekstraksi.....	Error! Bookmark not defined.
2.5 Fraksinasi.....	Error! Bookmark not defined.

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep.....	Error! Bookmark not defined.
3.2 Penjelasan Kerangka Konsep	Error! Bookmark not defined.
3.3 Hipotesis Penelitian.....	Error! Bookmark not defined.

BAB 4 METODE PENELITIAN

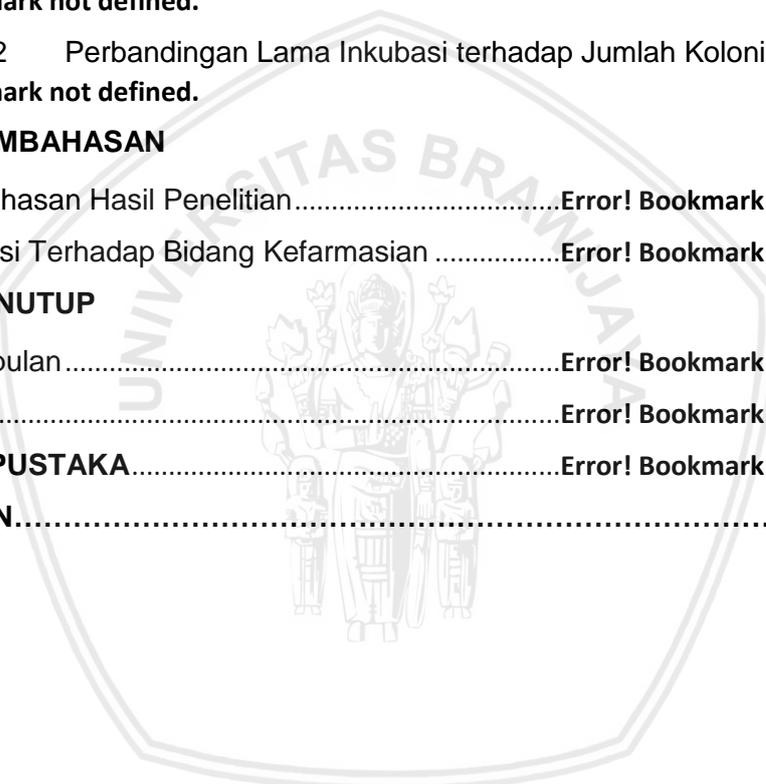
4.1 Rancangan Penelitian	Error! Bookmark not defined.
4.2 Sampel Penelitian	Error! Bookmark not defined.
4.3 Estimasi Jumlah Sampel.....	Error! Bookmark not defined.
4.4 Variabel Penelitian	Error! Bookmark not defined.
4.4.1 Variabel Bebas	Error! Bookmark not defined.
4.4.2 Variabel Terikat.....	Error! Bookmark not defined.
4.4.3 Variabel Kontrol	Error! Bookmark not defined.
4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian	Error! Bookmark not defined.
4.6 Instrumen Penelitian	Error! Bookmark not defined.
4.6.1 Maserasi Daun <i>M.pudica</i>	Error! Bookmark not defined.
4.6.1.1 Alat.....	Error! Bookmark not defined.
4.6.1.2 Bahan	Error! Bookmark not defined.
4.6.2 Fraksinasi	Error! Bookmark not defined.
4.6.2.1 Alat.....	Error! Bookmark not defined.
4.6.2.2 Bahan	Error! Bookmark not defined.
4.6.3 Pembuatan Suspensi Bakteri	Error! Bookmark not defined.
4.6.3.1 Alat.....	Error! Bookmark not defined.
4.6.3.2 Bahan	Error! Bookmark not defined.
4.6.4 Identifikasi Bakteri	Error! Bookmark not defined.

4.6.4.1	Alat	Error! Bookmark not defined.
4.6.4.2	Bahan	Error! Bookmark not defined.
4.6.5	Pembuatan Fraksi Etil Asetat	Error! Bookmark not defined.
4.6.5.1	Alat	Error! Bookmark not defined.
4.6.5.2	Bahan	Error! Bookmark not defined.
4.6.6	Uji Penghancuran Biofilm.....	Error! Bookmark not defined.
4.6.6.1	Alat.....	Error! Bookmark not defined.
4.6.6.2	Bahan	Error! Bookmark not defined.
4.6.7	Uji Perhitungan Pertumbuhan Bakteri.....	Error! Bookmark not defined.
4.6.7.1	Alat.....	Error! Bookmark not defined.
4.6.7.2	Bahan.....	Error! Bookmark not defined.
4.7	Definisi Operasional.....	Error! Bookmark not defined.
4.8	Rancangan Operasional Penelitian	Error! Bookmark not defined.
4.8.1	Ekstraksi Maserasi Daun Putri Malu	Error! Bookmark not defined.
4.8.2	Fraksinasi Ekstrak Daun <i>M.pudica</i>	Error! Bookmark not defined.
4.8.3	Identifikasi Bakteri	Error! Bookmark not defined.
4.8.3.1	Pewarnaan Gram	Error! Bookmark not defined.
4.8.3.2	Uji Koagulase.....	Error! Bookmark not defined.
4.8.3.3	Uji Katalase	Error! Bookmark not defined.
4.8.3.4	Uji Sensitivitas Cefoxitin	Error! Bookmark not defined.
4.8.4	Pembuatan Suspensi Bakteri MRSA	Error! Bookmark not defined.
4.8.5	Preparasi Fraksi Etil Asetat	Error! Bookmark not defined.
4.8.6	Uji Degradasi Biofilm.....	Error! Bookmark not defined.
4.8.7	Uji Perhitungan Jumlah Bakteri.....	Error! Bookmark not defined.
4.8.8	Analisis Data	Error! Bookmark not defined.
4.9	Skema Prosedur.....	Error! Bookmark not defined.

BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1	Hasil Ekstraksi dan Fraksinasi	Error! Bookmark not defined.
5.2	Hasil Identifikasi Bakteri <i>Methicillin Resistant Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	Error! Bookmark not defined.
5.3	Hasil Uji Antibiofilm Fraksi Etil Asetat Daun Putri Malu (<i>Mimosa pudica</i>) terhadap Bakteri MRSA.....	Error! Bookmark not defined.
5.4	Hasil Uji Perhitungan Jumlah Koloni Bakteri dengan Penilaian Skor ...	Error! Bookmark not defined.

5.5	Analisis Statistik.....	Error! Bookmark not defined.
5.5.1	Korelasi Spearman.....	Error! Bookmark not defined.
5.5.1.1	Hubungan antara dosis dengan degradasi biofilm.	Error! Bookmark not defined.
5.5.1.2	Hubungan antara dosis dengan jumlah koloni.	Error! Bookmark not defined.
5.5.2	Paired T-Test	Error! Bookmark not defined.
5.5.2.1	Perbandingan Lama Inkubasi terhadap Degradasi Biofilm	Error! Bookmark not defined.
5.5.2.2	Perbandingan Lama Inkubasi terhadap Jumlah Koloni.....	Error! Bookmark not defined.
BAB 6 PEMBAHASAN		
6.1	Pembahasan Hasil Penelitian.....	Error! Bookmark not defined.
6.2	Implikasi Terhadap Bidang Kefarmasian	Error! Bookmark not defined.
BAB 7 PENUTUP		
7.1	Kesimpulan.....	Error! Bookmark not defined.
7.2	Saran	Error! Bookmark not defined.
DAFTAR PUSTAKA.....		Error! Bookmark not defined.
LAMPIRAN.....		65



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Tumbuhan Putri Malu-----	7
Gambar 2.2 <i>Staphylococcus aureus</i> pada uji hemolisis di medium <i>Blood Agar</i> -	10
Gambar 2.3 Pembentukan Biofilm-----	15
Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian-----	20
Gambar 4.1 Skema Prosedur Fraksinasi <i>Mimosa pudica</i> -----	36
Gambar 4.2 Skema Prosedur Uji Bakteri-----	37
Gambar 5.1 Hasil Pewarnaan Gram Bakteri-----	39
Gambar 5.2 Hasil Uji Koagulase Bakteri-----	40
Gambar 5.3 Hasil Uji Katalase Bakteri-----	40
Gambar 5.4 Hasil Uji Sensitivitas Bakteri-----	41
Gambar 5.5 Diagram Persen Degradasi Biofilm Fraksi -----	42
Gambar 5.6 Diagram Perhitungan Skor Jumlah Koloni Bakteri-----	43

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 5.1 Hasil Fraksinasi-----	38
Tabel 6.1 Senyawa Metabolit Sekunder Berdasarkan Optimasi-----	47



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Surat Determinasi Tanaman Putri Malu.....	63
Lampiran 2. Perhitungan Rendemen Ekstrak Etanol 96% Daun Putri Malu.....	64
Lampiran 3. Perhitungan Rendemen Fraksi N-Heksana.....	64
Lampiran 4. Perhitungan Rendemen Fraksi Etil Asetat.....	64
Lampiran 5. Hasil <i>Optical Density</i> pada Inkubasi 1 Jam.....	65
Lampiran 6. Hasil <i>Optical Density</i> pada Inkubasi 2 Jam.....	66
Lampiran 7. Hasil Absorbansi pada Bakteri Inkubasi 1 Jam.....	67
Lampiran 8. Hasil Absorbansi pada Bakteri Inkubasi 2 Jam.....	68
Lampiran 9. Perhitungan Persentase Degradasi Biofilm.....	69
Lampiran 10. Data Persentase Degradasi Biofilm 1 Jam.....	69
Lampiran 11. Data Persentase Degradasi Biofilm 2 Jam.....	70
Lampiran 12. Nilai Persentase Degradasi Biofilm inkubasi 1 Jam.....	71
Lampiran 13. Nilai Persentase Degradasi Biofilm inkubasi 2 Jam.....	71
Lampiran 14. Uji Pertumbuhan Jumlah Koloni Bakteri.....	72
Lampiran 15. Penilaian Skor untuk Jumlah Koloni Bakteri.....	77
Lampiran 16. Analisis Data Statistik.....	77

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

**AKTIVITAS ANTIBIOFILM FRAKSI ETIL ASETAT EKSTRAK DAUN PUTRI
MALU (*Mimosa pudica*) PADA BAKTERI *Methicilin-Resistant
Staphylococcus aureus* (MRSA) SECARA *IN VITRO***

Oleh :

Abu Hasan Alfatah

155070501111028

Telah diuji pada:

Hari : Rabu

Tanggal : 10 Juli 2019

dan dinyatakan lulus oleh :

Penguji-I

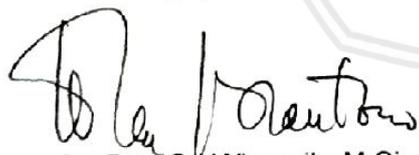


Ika Putri Nurhayati, S.Farm., M.Sc., Apt

NIP. 2013048909152001

Penguji-II/ Pembimbing-I

Penguji-III/ Pembimbing-II



Dr. Dra. Sri Winarsih, M.Si., Apt

NIP. 195408231981032001



Uswatun Khasanah, S.Farm., M.Farm., Apt

NIP. 2011068512222001

Mengetahui,

Ketua Program Studi Sarjana Farmasi



Alvan Febrian Shalas., M.Farm., Apt

NIP. 2011068502181001

ABSTRAK

Alfatah, Abu Hasan. 2019. *Aktivitas Antibiofilm Fraksi Etil Asetat Ekstrak Daun Putri Malu (Mimosa pudica) pada Bakteri Methicilin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Secara In Vitro*. Tugas Akhir, Program Studi Sarjana Farmasi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Dr. Dra. Sri Winarsih, M.Si., Apt. (2) Uswatun Khasanah, S.Farm., M.Farm., Apt.

Bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) merupakan salah satu bakteri yang dapat membentuk biofilm. Biofilm yaitu pelindung bakteri yang tersusun dari matriks eksopolisakarida. Biofilm dapat menghambat antibiotik yang bekerja sehingga menyebabkan resistensi antibiotik. Daun putri malu memiliki senyawa metabolit sekunder diantaranya yaitu senyawa flavonoid dan alkaloid. Senyawa ini didapatkan dari proses fraksinasi menggunakan pelarut etil asetat. Senyawa flavonoid dan alkaloid yang didapatkan dari fraksi etil asetat daun putri malu dapat memberikan efek antibiofilm sekaligus antibakteri bagi bakteri MRSA. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan antara pemberian dosis fraksi etil asetat terhadap degradasi biofilm dan terhadap jumlah koloni bakteri, hingga perbandingan lama inkubasi setelah pemberian fraksi etil asetat dengan degradasi biofilm dan dengan jumlah koloni bakteri. Dosis fraksi etil asetat yang digunakan yaitu 3mg, 6mg, 9mg, 12mg, 15mg. Degradasi biofilm diujikan dengan menggunakan microtiterplate dan dibaca *optical density* pada *ELISA reader* pada panjang gelombang 630nm. Lama inkubasi yang digunakan yaitu satu jam dan dua jam. Jumlah koloni bakteri dihitung menggunakan skor. Skor tertinggi +6 untuk bakteri sangat padat dan skor terendah +1 untuk bakteri sangat tidak padat. Hasil uji dianalisa secara statistik dengan SPSS korelasi Spearman dan dilanjutkan analisis *Paired T-Test*. Hasil degradasi biofilm yang terjadi menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis maka semakin besar persentase kerusakan biofilm yang terjadi dan semakin tinggi dosis maka semakin rendah jumlah koloni yang tumbuh. Untuk perbandingan lama inkubasi untuk persen degradasi yaitu 2 jam dan untuk jumlah koloni tidak ada perbedaan antara 1 jam dan 2 jam

Kata kunci: putri malu, MRSA, antibiofilm, koloni bakteri

ABSTRACT

Alfatah, Abu Hasan. 2019. *Antibiofilm Activity Ethyl Acetate Fraction of Putri Malu (Mimosa pudica) Leaf Extract in In Vitro Methicilin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Bacteria*. Final Assignment; Program Studi Sarjana Farmasi, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Dr. Dra. Sri Winarsih, M.Si., Apt. (2) Uswatun Khasanah, S.Farm., M.Farm., Apt.

Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) is one of the bacteria that can form biofilms. Biofilm is a protective bacterium composed of exopolysaccharide matrix. Biofilms can inhibit antibiotics so that they can cause antibiotic resistance. Putri Malu leaves have secondary metabolites including flavonoids and alkaloid. This compound is obtained from the fractionation process using ethyl acetate solvents. Flavonoid and alkaloid obtained from the ethyl acetate fraction of Putri Malu leaves are embarrassed to provide antibiofilm and antibacterial effects for MRSA bacteria. This study aims to determine relationship between the administration of ethyl acetate fraction to biofilm degradation and number of bacterial colonies, to comparison of incubation time with biofilm degradation and number of bacterial colonies. Dose of ethyl acetate fraction used was 3mg, 6mg, 9mg, 12mg, 15mg. Biofilm degradation was tested using microtiterplate and optical density read on ELISA reader at a wavelength of 630nm. Incubation time used is one hour and two hours. Number of bacterial colonies was calculated using a score. The highest score of +6 for bacteria is very dense and the lowest score +1 for bacteria is not very dense. The test results were analyzed statistically by SPSS Spearman correlation and continued with Paired T-Test analysis. The results of biofilm degradation showed that the higher dose, the greater percentage of biofilm damage and lower number of colonies growing. For the comparison of incubation time for percent degradation which is 2 hours and for the number of colonies there is no difference between 1 hour and 2 hours

Keywords: putri malu, MRSA, antibiofilm, bacteria colony

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Methicilin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) merupakan salah satu bahaya masalah kesehatan mengenai resistensi antibiotik. Resistensi antibiotik menjadi masalah yang serius di negara maju maupun negara berkembang seperti Indonesia. Pada Tahun 2010 proporsi MRSA diperkirakan 28% (Hongkong dan Indonesia) dan 70% (Korea) diantara semua isolat klinik *Staphylococcus aureus* sedangkan infeksi *Staphylococcus aureus* yang ditemukan di masyarakat terkait di negara-negara Asia sangat bervariasi, dari 5% - 35% (Chen & Huang, 2014). Bakteri MRSA merupakan salah satu mikroorganisme yang sering menyebabkan infeksi nosokomial (Kurniawati dkk, 2015).

Infeksi bakteri *Methicilin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA)* dapat berupa infeksi berat pada manusia dalam berbagai kasus seperti infeksi kulit, abses, bakteremia, endokarditis, pneumonia, septikimia, dll (Gnanamani *et al.*, 2017). Infeksi dapat berkembang menjadi suatu penyakit yang mematikan atau dapat berkembang menjadi penyakit menular akibat dari bakteri yang menginfeksi. Bakteri penyebab infeksi memiliki pertahanan diri yaitu dengan membentuk suatu pelindung atau lapisan yang disebut dengan biofilm. Menurut penelitian Purbowati, dkk (2017) Bakteri *Methicilin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA)* dengan metode CRA (Congo Red Agar) dapat melakukan pertahanan diri dengan membentuk biofilm. Biofilm merupakan salah satu produk hasil interaksi *quorum sensing (QS)* dari masing-masing organisme sehingga dapat membentuk suatu lapisan akibat dari penempelan bakteri pada permukaan

yang cocok (Arjuna *et al*, 2018). Sekitar 80% kejadian infeksi berkaitan dengan pembentukan biofilm yang dianggap sebagai mediator infeksi (Archer *et al*, 2011).

Pembentukan biofilm pada bakteri penyebab infeksi berperan dalam terjadinya suatu resistensi antibiotik. Angka resistensi bakteri umumnya lebih tinggi di *Intensive Care Unit* (ICU) dibanding di area pelayanan lain di rumah sakit (Dwiprahasto, 2005). *Intensive Care Unit* (ICU) seringkali disebut sebagai episentrum infeksi, karena pasien yang dirawat sangat rentan terhadap infeksi akibat kondisi *immunocompromised* dan juga meningkatnya risiko terinfeksi akibat mendapatkan berbagai tindakan medis yang invasif seperti pemasangan infus, intubasi ataupun ventilasi mekanik atau ventilator (Brusselaers *et al.*, 2011).

Resistensi antibiotik terjadi dimana bakteri atau mikroorganisme dapat bertahan dengan membuat pertahanan diri sehingga obat tidak dapat efektif untuk bekerja. Antibiotik pada umumnya efektif untuk membunuh atau bekerja pada sel-sel bakteri atau mikroorganisme yang bersifat planktonik, sedangkan apabila bakteri membentuk biofilm maka bakteri akan tersusun rapat dalam biofilm dan akan tetap bertahan hidup. Terdapat beberapa mikroba yang menjadi perhatian akibat dari sifat resistensinya terhadap antibiotik atau antimikroba diantaranya yaitu *Methicilin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA), *Vancomycin-Resistant Enterococcus* (VRE), *Penicillin-Resistant Streptococcus pneumonia*, *multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa* (Smith, 2004). Bakteri *Staphylococcus aureus* menempati urutan pertama di antara agen penyebab infeksi antara lain infeksi implan medis dan infeksi nosokomial di seluruh dunia, dan terutama di negara-negara berkembang (Daniela Chessa *et al.*, 2015)

Menurut Siomoes, dkk (2010) kontrol biofilm dapat dilakukan dengan tiga cara, secara fisika dapat dilakukan dengan meningkatkan suhu, secara kimia dapat dilakukan dengan penambahan zat kimia seperti enzim berbasis deterjen, secara biologi dengan menggunakan bakteriofaga dan interaksi mikrobiologis. Penggunaan bahan alam menjadi prioritas alternatif yang dapat dikembangkan untuk mengontrol biofilm terutama penyebab infeksi karena mudah untuk didapatkan. Penggunaan bahan alam diharapkan senyawa yang terkandung dapat memiliki penetrasi sehingga dapat mengontrol biofilm yang terbentuk. Bahan alam yang dimanfaatkan untuk penelitian biofilm diantaranya yaitu minyak atsiri herba kemangi dan sari buah belimbing wuluh (Alfattah, 2015; Yuliandari, 2015). Sedangkan untuk bahan alam yang dapat digunakan sebagai antibakteri dan antibiofilm pada penelitian diantaranya yaitu ekstrak sereh (Dewi dkk, 2015), tanaman biduri (Sholeh, 2017), dan ekstrak etanol bunga bintang (Lestari, 2017).

Putri malu merupakan tanaman yang berpotensi untuk dimanfaatkan sebagai antimikroba. Potensi sebagai antibiofilm sudah dilakukan penelitian namun belum terdapat penelitian terkait pendegradasian biofilm untuk tanaman putri malu. Bagian tanaman yang dapat digunakan yaitu daun dari putri malu. Menurut Wijayakusuma (2008), salah satu senyawa yang terkandung dalam putri malu yaitu senyawa flavonoid golongan flavon dan flavonol dalam ekstrak metanol daunnya. Ekstrak tanaman yang mengandung flavonoid berpotensi dapat menghambat *intercellular adhesion genes icaA* dan *icaD* yang menjadi salah satu faktor pembentukan biofilm (Lee *et al.*, 2013). Carlo *et al* (1999) dan Estrela *et al* (1995) dalam Sabir (2005) dalam Kining dkk (2016) menyatakan bahwa gugus hidroksil yang terdapat pada struktur senyawa flavonoid dapat

menyebabkan pembentukan senyawa kompleks dengan protein sehingga biofilm terdenaturasi.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Kamelia (2018), fraksi etil asetat ekstrak etanol daun putri malu merupakan fraksi yang memiliki aktivitas hambatan terbesar berdasarkan uji antibakteri dengan metode difusi cakram. Menurut Taufan dkk (2016), fraksi etil asetat daun bandotan secara ilmiah mengandung senyawa metabolit sekunder yang dapat memberikan aktivitas sebagai antibakteri. Pada penelitian yang telah dilakukan oleh Reveny (2011) menginformasikan bahwa fraksi etil asetat daun sirih merah memberikan aktivitas antibakteri terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli*. Pada penelitian dengan menggunakan fraksi memiliki kelebihan dibandingkan ekstrak karena pada fraksi memiliki senyawa yang lebih sedikit dibandingkan dengan ekstrak sehingga dapat dioptimalkan senyawa yang dapat memberikan efek terhadap bakteri. Oleh karena itu, akan dilakukan penelitian uji aktivitas antibiofilm menggunakan fraksi etil asetat ekstrak daun putri malu secara *in vitro*. Hasil penelitian diharapkan fraksi etil asetat ekstrak daun putri malu dapat merusak biofilm bakteri *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) pembentuk dari biofilm tersebut dan sekaligus membunuh bakteri *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA).

1.2 Rumusan Masalah

1.2.1 Bagaimana hubungan dosis fraksi etil asetat daun putri malu (*Mimosa pudica*) dengan degradasi biofilm bakteri *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)?

- 1.2.2 Bagaimana hubungan dosis fraksi etil asetat daun putri malu (*Mimosa pudica*) dengan jumlah koloni bakteri *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)?
- 1.2.3 Bagaimana perbandingan antara lama inkubasi setelah pemberian fraksi etil asetat dengan degradasi biofilm dari bakteri *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)?
- 1.2.4 Bagaimana perbandingan antara lama inkubasi setelah pemberian fraksi etil asetat dengan jumlah koloni dari bakteri *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan aktivitas antibiofilm daun putri malu (*Mimosa pudica*) sehingga dapat membunuh bakteri *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)

1.3.2 Tujuan Khusus

- 1.3.2.1 Untuk mengetahui hubungan antara dosis fraksi etil asetat daun putri malu (*Mimosa pudica*) dengan degradasi biofilm *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) secara *in vitro*
- 1.3.2.2 Untuk mengetahui hubungan antara dosis fraksi etil asetat daun putri malu (*Mimosa pudica*) dengan jumlah koloni bakteri *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) secara *in vitro*
- 1.3.2.3 Untuk mengetahui perbandingan lama inkubasi setelah pemberian fraksi etil asetat dengan degradasi biofilm bakteri MRSA.

1.3.2.4 Untuk mengetahui perbandingan lama inkubasi setelah pemberian fraksi etil asetat dengan jumlah koloni bakteri MRSA yang tumbuh.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

Penelitian bermanfaat untuk sumber informasi mengenai tanaman *Mimosa pudica* dapat menjadi alternatif obat bahan alam sebagai dasar penelitian untuk penemuan obat baru.

1.4.2 Manfaat Praktis

Penelitian bermanfaat untuk memberikan informasi kepada masyarakat mengenai manfaat daun putri malu (*Mimosa pudica*) sebagai antibiofilm sekaligus dapat membunuh bakteri MRSA serta untuk dapat memperoleh kandidat senyawa obat herbal yang dapat dikembangkan menjadi obat bahan alam dalam mengatasi infeksi MRSA.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Putri Malu (*Mimosa pudica*)

2.1.1 Taksonomi dan Deskripsi Tanaman

Taksonomi tanaman putri malu (Jayani, 2007) yaitu :

Division	: Spermatophyta
Subdivision	: Angiospemiae
Classis	: Dicotyledonae
Ordo	: Rosales
Familia	: Mimosaceae
Genus	: Mimosa
Species	: <i>Mimosa pudica</i> L



Gambar 2.1. Tumbuhan Putri Malu (Joseph et al., 2013)

Tanaman *Mimosa pudica* memiliki daun berukuran kecil dengan susunan majemuk. Letak daun-daun tersebut saling berhadapan satu sama lain. Daun berwarna hijau dan ada pula yang berwarna kemerahan. Warna daun pada bagian bawah berwarna lebih pucat dibandingkan bagian atas, serta pada tangkal daun terdapat duri-duri kecil (Dalimartha, 2008).

Mimosa pudica merupakan tumbuhan yang menyebar luas, merupakan tumbuhan setengah kayu, dengan panjang batang hampir 1 meter, berduri, dan memiliki banyak rambut. Daunnya sangat sensitif, apabila disentuh daunnya akan menutup (Caius, 1980). Tanaman *Mimosa pudica* menutup daunnya untuk melindungi diri dari serangan hewan pemakan tumbuhan (herbivora) yang akan memakannya. Daun *Mimosa pudica* yang terkena rangsangan akan menutup secara bersamaan pada sore hari dan terbuka kembali saat matahari terbit. Daun putri malu dikatakan sensitif karena daun dapat terlipat karena sentuhan, panas, dan guncangan (Bhandari, 1990; Caius, 1980).

Bunga *Mimosa pudica* berbentuk seperti bola, berwarna merah muda dan bertangkai. Bunga putri malu memiliki rambut serta polennya berada di ujung rambut. Putik berwarna kuning. Tangkai bunganya berbulu halus. Saat matahari tenggelam, bunga akan menutup, terlihat seperti layu, namun saat matahari terbit, maka bunga akan mekar kembali (Dalimartha, 2008).

2.1.2 Kandungan Kimia

Daun dan akar *Mimosa pudica* mengandung senyawa mimosin, asam piperkolinat, tanin, alkaloid, saponin, triterpenoid, sterol, polifenol dan flavonoid (Jayani, 2007). Kandungan kimia dari ekstrak metanol daun *Mimosa pudica* menunjukkan adanya komponen bioaktif seperti terpenoid, flavonoid, glikosida, alkaloid, kina, fenol, tanin, saponin, dan kumarin (Gandhiraja *et al.*, 2009). Sedangkan pada skrining fitokimia dari ekstrak etanol tanaman putri malu (*Mimosa pudica*) didapatkan adanya senyawa steroid, karbohidrat, saponin, flavonoid, dan tannin (Tamiliarasi dan Ananthi, 2012).

2.1.3 Aktivitas Farmakologi

Herba putri malu berkhasiat sebagai penenang (*transquillizer*), peluruh dahak (ekspektoran), peluruh kencing (diuretik), obat batuk (antitusif), pereda demam (antipiretik), dan anti radang. Seluruh bagian tanaman ini dapat dipakai sebagai obat, yakni dari akar, batang, daun, hingga keseluruhan bagian tanaman, baik dalam bentuk segar maupun yang telah di keringkan. Akar putri malu sering dipakai sebagai diuretik untuk memperlancar pengeluaran air seni. Disamping itu, akar juga digunakan untuk pengobatan penyakit disentri. Akar dan biji putri malu dapat berkhasiat sebagai perangsang muntah, daunnya bisa digunakan untuk mengobati luka atau bengkak karena luka (Jayani, 2007).

Herba putri malu berkhasiat sebagai antikonvulsan (Ngo, 2004). Antidepresan (Molina dkk, 1999), selain itu ekstrak etanol putri malu juga mempunyai efek hiperglikemi (Amalraj dan Ignacimuthu, 2007). Valsa dan Karpagaganapathy (2004) menemukan bahwa serbuk akar dari *Mimosa pudica* memiliki pengaruh terhadap siklus ovarium dari mencit betina.

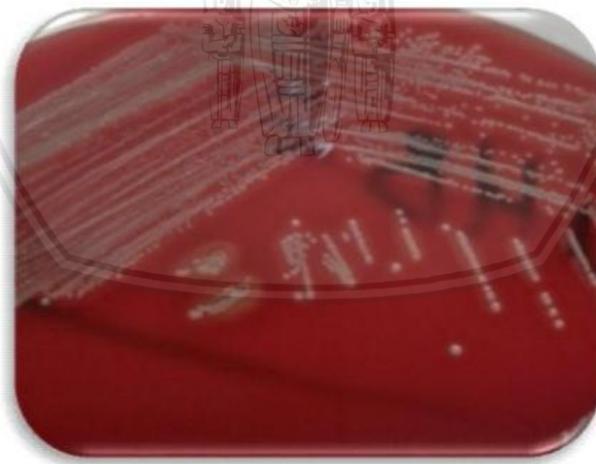
Penelitian yang telah dilakukan oleh Pujiatiningsih (2014) menyatakan bahwa ekstrak methanol dari tanaman daun putri malu dapat digunakan sebagai inhibitor enzim glukosidase untuk menurunkan kadar glukosa darah. Pada pengobatan cina, para ahli mengindikasikan putri malu untuk mengobati berbagai jenis penyakit seperti radang mata akut (konjungtivitis), kencing batu (urolitiasis), demam tinggi pada anak-anak, cacangan, insomnia, peradangan saluran napas (bronchitis), dan herpes zoster (Mehingko *et al*, 2010).

2.2 Bakteri *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)

2.2.1 Taksonomi dan Karakteristik

Taksonomi bakteri *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) (ITIS, 2018) yaitu :

Kingdom	: Bacteria
Subkingdom	: Posibacteria
Phylum	: Firmicutes
Class	: Bacili
Ordo	: Bacillales
Famili	: Staphylococcaceae
Genus	: Staphylococcus
Spesies	: <i>Staphylococcus aureus</i>
Subspesies	: <i>Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i>



Gambar 2.2 *Staphylococcus aureus* pada uji hemolisis di medium *Blood Agar* (Kemalapatni, 2017)

Staphylococcus aureus adalah bakteri bulat Gram-positif yang berbentuk kokus, jika dilihat dibawah mikroskop berbentuk seperti kelompok anggur

(Madigan *et al.*, 2008). Bakteri dengan berdiameter 0,7-1,2 μm , tersusun dalam kelompok yang tidak teratur seperti buah anggur, fakultatif anaerob, tidak membentuk spora, dan tidak bergerak (Rahmi dkk, 2015). Lebih dari 90% isolat klinik menghasilkan *S. aureus* yang mempunyai kapsul polisakarida atau selaput tipis yang berperan dalam virulensi bakteri (Jawetz *et al.*, 1995).

Salah satu jenis galur *Staphylococcus aureus* yaitu *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) adalah bakteri Gram positif yang menghasilkan pigmen kuning keemasan, berbentuk bulat kasar dengan permukaan halus, dan memiliki ukuran diameter sel berkisar antara 0,5 μm sampai 1,0 μm . Bakteri ini dapat menyebabkan berbagai penyakit menular seperti infeksi kulit, abses, bacteremia, endocarditis, pneumonia hingga septikimia (Gnanamani *et al.*, 2007).

Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) dapat dilakukan kontrol di lingkungan rumah sakit dengan cara mendeteksi secara akurat dan tepat waktu dari resistensi methicillin sebagai kunci dalam menentukan pemberian antibiotik yang tepat (Velasco *et al.*, 2005). Metode yang tepat untuk mengetahui dan memprediksi *Staphylococcus aureus* resistensi terhadap methicillin secara akurat yaitu dengan menggunakan difusi cakram cefoxitin, dimana sensitif dan spesifik dari cefoxitin hingga 100% (Khan *et al.*, 2010)

2.2.2 Patogenitas *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)

Menurut Jawetz *et al* (2005) patogen *S.aureus* akan menghasilkan koagulase dan pigmen yang berwarna kuning yang sifatnya hemolitik dan meragikan manitol. Infeksi lokal dari *S.aureus* biasanya merupakan suatu infeksi pada folikel rambut, atau abses yang umumnya merupakan infeksi peradangan

yang hebat, terlokalisir, sakit, mengalami penanahan sentral dan akan sembuh dengan cepat bila nanah dikeluarkan.

2.2.3 Manifestasi Klinis

Infeksi *Staphylococcus aureus* ditandai dengan kerusakan jaringan yang disertai abses bernanah. Beberapa penyakit infeksi lainnya yang disebabkan oleh *Staphylococcus aureus* adalah jerawat, bisul, impetigo dan infeksi pada luka. Infeksi yang lebih berat diantaranya pneumonia, mastitis, flebitis, meningitis, infeksi saluran kemih, osteomielitis, dan endokarditis. *Staphylococcus aureus* juga dapat menyebabkan infeksi nosokomial, keracunan makanan, dan sindroma syok toksik. Sedangkan bakteri *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) dapat menyebabkan berbagai penyakit menular seperti infeksi kulit, abses, bakteremia, endocarditis, pneumonia hingga septikimia (Gnanamani *et al*, 2007).

2.2.4 Resistensi *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)

Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) merupakan salah satu strain *S. aureus* isolat klinis yang ditemukan pada jaringan kulit pasien yang diketahui telah resisten terhadap metisilin (Smith *et al.*, 2017). MRSA mengalami resistensi antibiotik karena terjadinya perubahan genetika yang disebabkan oleh paparan terapi antibiotik yang tidak rasional yang dapat membuat bakteri mengalami perpindahan dari satu pasien ke pasien lainnya yang dapat disebut dengan transmisi (Mahmudah, 2013). MRSA merupakan patogen yang berbahaya karena memiliki resistensi terhadap beberapa kelompok antibiotik seperti aminoglikosida, sefalosporin, penicillin atau glikopeptida seperti vankomisin (Cihalova *et al*, 2015).

2.3.6 Mekanisme Resistensi MRSA

Mekanisme resistensi pada MRSA terdiri dari resistensi terhadap antimikroba betalaktam dan resistensi terhadap antimikroba nonbetalaktam. Pada resistensi antimikroba betalaktam di perankan oleh operon *mecA*. Operon *mecA* secara organisasi, struktur, fungsi dan mekanisme serupa dengan operon *blaZ* pada plasmid *S. aureus* produsen betalaktamase. Regulator pada operon *blaZ* berfungsi menekan transkripsi gen betalaktamase dan *blaR1* berupa *signal transduction Penicillin Binding Protein* (PBP) yang akan menginduksi transkripsi jika ada betalaktam (Yuwono, 2010). Mekanisme resistensi MRSA terhadap berbagai antimikroba nonbetalaktam diduga didasari adanya bukti bahwa *SCCmec* mengandung transposon dan *insertion sequences* seperti Tn554 pada ujung 5' *mecA* dan IS431 pada ujung 3' *mecA*. IS431 memiliki kemampuan rekombinasi dan dapat menjadi determinan resistensi terhadap merkuri, kadmium dan tetrasiklin. Gen lain yang berada di sekitar *SCCmec* seperti gen *gyrA* diperkirakan juga berinteraksi dengan *SCCmec* mengakibatkan resistensi terhadap kuinolon (Rohrer *et al*, 2003).

2.3 Biofilm

2.3.1 Definisi Biofilm

Biofilm merupakan bentuk struktural dari sekumpulan mikroorganisme yang dilindungi oleh matriks ekstraseluler yang disebut *Extracellular Polymeric Substance* (EPS), dimana EPS merupakan produk yang dihasilkan sendiri oleh mikroorganisme tersebut dan dapat melindungi dari pengaruh buruk lingkungan (Prakash *et al.*, 2003). Matriks ekstraseluler yang dibentuk tersusun atas polisakarida, protein, DNA yang berasal dari mikroba (Paraje, 2011).

Pembentukan biofilm dapat membuat bakteri bertahan terhadap pengaruh dariluar seperti antibiotik, desinfektan, hingga terhadap sistem imun dari inangnya. Didalam lapisan biofilm, mikroba cenderung tumbuh dan berkembang dengan pesat hingga membentuk koloni terutama pada permukaan bahan yang lembab dan kaya akan nutrisi (Tarver, 2009).

2.3.2 Komposisi dan Struktur Biofilm

Biofilm terdiri dari sel-sel mikroba dan *extracellular polymeric substance* (EPS). EPS dapat mencakup 50% samapi 90% dari total karbon organik biofilm dan dapat dianggap bahan matriks primer biofilm. EPS dapat berbeda sifat kimia dan fisik, tetapi terutama terdiri dari polisakarida (Homenta, 2016).

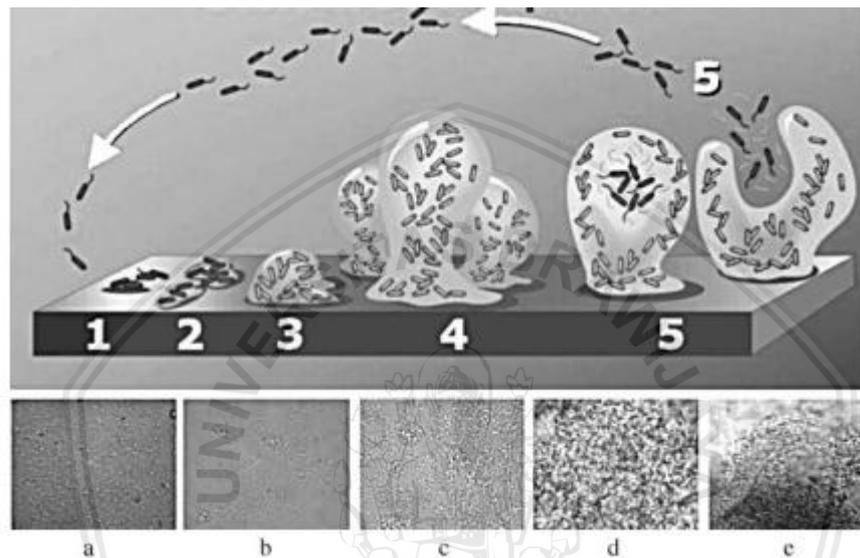
Polisakarida dari biofilm yaitu eksopolisakarida. Ikatan eksopolisakarida pada biofilm bersifat kaku. Jumlah eksopolisakarida yang dihasilkan oleh organisme pun berbeda-beda. Jumlah eksopolisakarida akan meningkat seiring dengan bertambahnya usia biofilm tersebut. Eksopolisakarida yang dihasilkan tergantung dari kandungan nutrisi dan media pertumbuhan. Kekurangan nitrogen, potassium dan fosfat dapat meningkatkan sintesis eksopolisakarida (Donlan, 2002).

Pada beberapa bakteri Gram positif, seperti Staphylococci, komposisi kimia dari EPS mungkin sangat berbeda dan terutama bersifat kation (Flemming *et al*, 2000). Penelitian Hussain *et al* (1993) menemukan bahwa lendir bakteri koagulase-negatif terdiri dari asam teikoik dicampur dengan jumlah kecil dari protein.

Pada struktur biofilm terdapat pori-pori dan saluran air yang berfungsi untuk nutrisi dan pembuangan melalui pertukaran produk dengan lingkungan luar secara aktif dan pasif (Yolazeniia, 2018). Struktur fisik dari biofilm menunjukkan

penurunan oksigen dan gradien nutrisi dari perifer ke tengah yang menyebabkan gradien metabolik bakteri pada arah sama, dengan kerentanan berbeda terhadap antibiotik dan imunitas (Tamashiro *et al*, 2009).

2.3.3 Pembentukan Biofilm



Gambar 2.3 Pembentukan Biofilm (Stoodley *et al*, 2002)

(Pada tahap pertama, menempelnya sel pada permukaan, kemudian di tahap kedua bakteri memproduksi EPS dan lebih kuat menempel. Pada tahap ketiga, perkembangan awal dari bentuk biofilm, pada tahap keempat yaitu pematangan dari bentuk biofilm. Pada tahap ke lima, penyebaran sel bakteri dari biofilm (Stoodley *et al*, 2002).)

Biofilm tumbuh melalui 3 tahap proses yaitu tahap awal yang terdiri dari perlekatan bakteri pada substrat. Bakteri tumbuh dan membelah kemudian membentuk kolonisasi di lingkungan sekitar dan terbentuklah biofilm. Bakteri ini tidak bekerja secara individual untuk membentuk biofilm, tetapi berkumpul menjadi rantai yang panjang untuk membantu mengawali tahap awal pembentukan biofilm. Biofilm matur merupakan struktur heterogenous kompleks pada keadaan dormant dan koloni bakteri tumbuh aktif dengan enzim, produk

yang diekskresikan, dan bagian kecil saluran pembentukan dari seluruh struktur (Warna, 2011).

2.3.4 Resistensi Biofilm terhadap Antibiotik

Biofilm dapat menyebabkan terjadinya resistensi antibiotik. Mekanisme pertahanan biofilm yang menyebabkan resistensi terhadap antibiotik adalah sebagai berikut (Paraje, 2011) :

a. Matriks biofilm menghalangi difusi antibiotik

Biofilm sebagai penghalang difusi fisik untuk mencegah antibiotik mencapai target. Antibiotik mampu menembus struktur campuran eksopolisakarida, DNA, dan protein untuk mencapai target tetapi tidak mampu mencapai pada konsentrasi efektif disemua bagian

b. Pembentukan lingkungan mikro dalam biofilm

Menipisnya jumlah nutrisi dan oksigen di dalam biofilm menyebabkan aktivitas metabolisme dan perlambatan pertumbuhan bakteri.

c. Diferensiasi menjadi sel persister

Persister sel dianggap tidak tumbuh atau tumbuh lambat, dan juga memiliki kerentanan yang sangat berkurang terhadap antibiotik. Dalam teori persister, rute dari subpopulasi kecil bakteri dalam biofilm berdiferensiasi menjadi sel aktif, mampu bertahan terhadap pengobatan antibiotik yang ekstrim karena perubahan genetik yang stabil.

d. Peningkatan produksi tekanan oksidatif

Tekanan oksidatif yang disebabkan oleh ketidakseimbangan antara jumlah oksidan, seperti radikal bebas, peroksida dan oksida nitrat, dengan antioksidannya. Gangguan keseimbangan prooksidan-antioksidan menyebabkan kelebihan produksi senyawa oksigen reaktif (SOR) yang dapat mengakibatkan kerusakan pada komponen seluler, termasuk DNA, protein dan lipid. Bakteri akan membentuk senyawa anti oksidan sebagai respon fisiologis terhadap SOR, sehingga bakteri dapat beradaptasi terhadap tekanan oksidatif yang menyebabkan perubahan metabolik yang cepat. Enzim utama yang terlibat dalam sistem pertahanan anti oksidan dan detoksifikasi SOR adalah superoksida dismutase (SOD) dan katalase (CAT).

e. Aksi antagonis antibiotik dan mekanisme degradasi aktif di beberapa bagian biofilm

Microenvironments dapat melawan aksi dari antibiotik dengan mekanisme degradasi aktif di beberapa bagian biofilm. Bakteri saling berkomunikasi dan mengaktifkan gen-gen tertentu sehingga enzim atau toksin dapat mendegradasi antibiotik.

Berikut ini faktor-faktor yang bertanggung jawab terhadap resistensi biofilm (Lewis, 2001).

a. Penurunan penetrasi dari anti mikroba

Biofilm dapat menghambat difusi dari substansi dan mengikat antibiotik akibat dari matriks ekstrapolimer yang membungkus bakteri

b. Penurunan tingkat pertumbuhan organisme dalam biofilm

Antimikroba lebih efektif membunuh sel-sel yang tumbuh dengan cepat. Beberapa antibiotik memerlukan sel-sel yang tumbuh dalam mekanisme penghambatannya seperti ciprofloxacin.

c. Ekspresi dari gen resistensi yang spesifik dari biofilm

Hal ini dapat terlihat dari resistensi suatu bakteri terhadap antibiotik, misalnya *Methicilin Resistent Staphylococcus aureus* atau *Pseudomonas aeruginosa* MDR (Multi Drug Resistant) memainkan peranan penting pada konsentrasi antibiotik yang rendah.

2.3.5 Kontrol Biofilm

Strategi yang dilakukan dalam mengontrol biofilm dapat dengan menggunakan metode kimia, fisika, dan biologi (Rai, 2013).

a. Kimia

Metode yang dilakukan yaitu dengan menggunakan suatu bahan kimia yang dapat membunuh atau menghilangkan mikroorganisme. Senyawa kimia antibiofilm ini dapat menghambat *quorum sensing* sehingga mengganggu pertukaran sinyal kimia antar sel-sel dalam sebuah proses dan dapat merusak matriks biofilm sel-sel bakteri dalam koloni, sehingga mendegradasi matriks yang menyebabkan pelepasan sel dari koloni dan pembebasan sel ke lingkungan (Pratiwi, 2008).

b. Fisika

Metode yang dilakukan yaitu dengan sterilisasi panas merupakan cara yang paling banyak dilakukan. Sterilisasi panas dibagi menjadi dua yaitu metode panas kering dan panas basah (Pratiwi, 2008)

c. Biologi

Pada metode ini memanfaatkan bakteriofaga. Pada dasarnya bakteriofaga merupakan virus tertentu yang menginfeksi bakteri melalui jalur yang spesifik serta bersifat nontoksik terhadap manusia, sehingga memiliki potensi yang baik untuk dikembangkan sebagai pengendali biofilm mikroba pada produk pangan (Kudva *et al*, 1999).

2.3.6 Cara Pengujian Biofilm

Deteksi dan analisis dari biofilm dapat dilakukan dengan berbagai macam metode. Salah satunya yaitu dengan menggunakan reaksi spesifik dari sel atau dengan matriks ekstraseluler. Kristal violet adalah salah satu metode yang banyak di gunakan untuk kemampuan dalam memberikan warna pada matriks polisakarida. Kristal violet adalah pewarnaan dasar bagi bakteri dan eksopolisakarida pada matriks biofilm (Pantanella *et al*, 2013). Selain itu dapat dengan menggunakan prosedur XTT ((2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide) yang mana dapat melihat aktivitas metabolik melalui reduksi dari garam tetrazolium menjadi formazan. Pada umumnya kebanyakan dari metode dibagi menjadi dua kategori yaitu dengan mengukur biomassa biofilm dengan Kristal violet atau dengan aktivitas metabolik dengan XTT (Corte *et al*, 2019)

2.4 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan senyawa berdasarkan prinsip *like dissolve like*. Pemisahan senyawa ini dengan menarik konstituen kimia yang terkandung berdasarkan kelarutannya di dalam pelarut yang digunakan.

Pemilihan pelarut menjadi pertimbangan yang penting, agar dapat melarutkan dan menarik keluar bahan aktif yang diinginkan (Harborne, 1999).

Secara umum terdapat dua jenis ekstraksi, yaitu ekstraksi secara panas dan ekstraksi secara dingin. Untuk ekstraksi secara panas misalnya refluks, penyulingan uap air dan untuk ekstraksi secara dingin misalnya maserasi, perkolasi dan soxhletasi (Dirjen POM, 1986; Kamelia,2018).

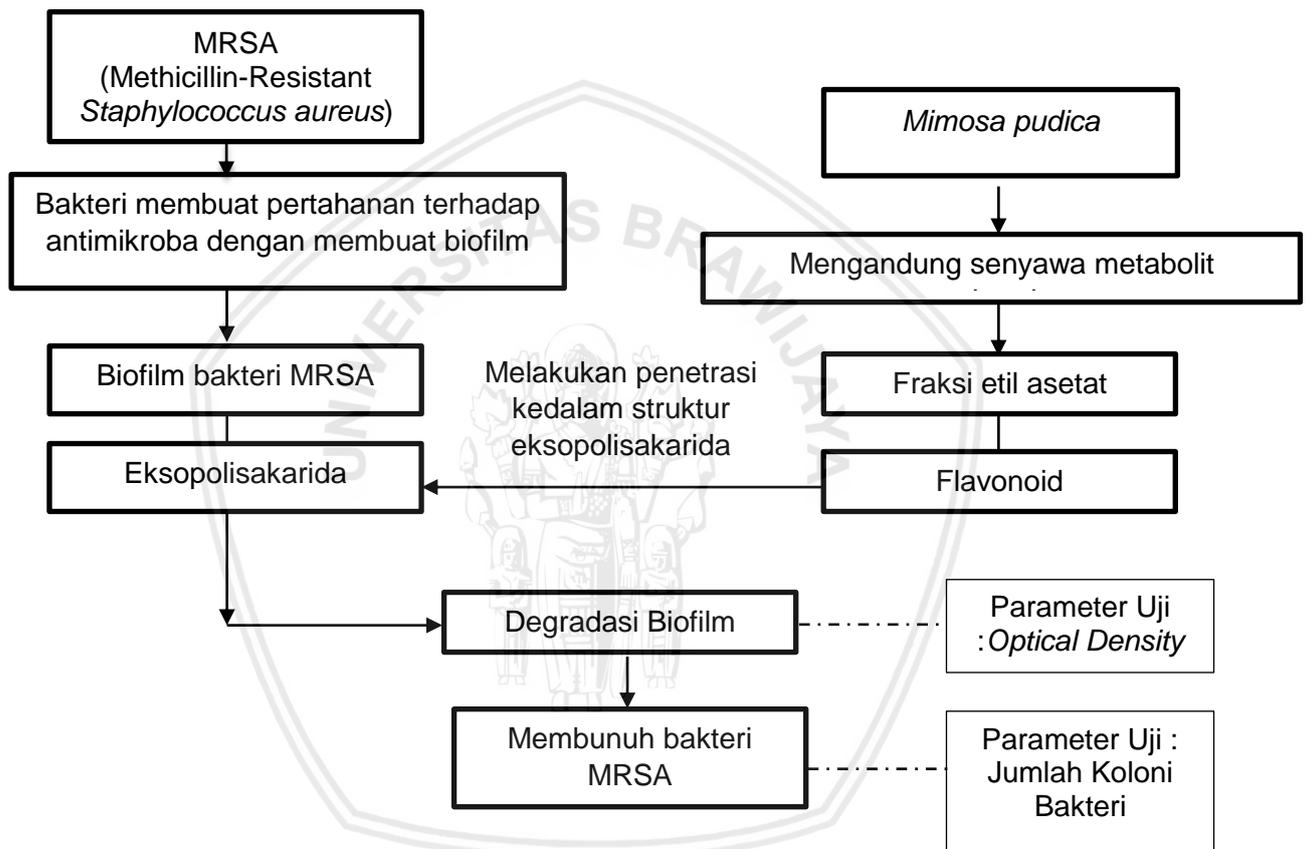
2.5 Fraksinasi

Fraksinasi merupakan suatu prosedur pemisahan senyawa berdasarkan pada perbedaan kepolarannya. Pemisahan terjadi karena adanya perbedaan massa jenis pada tiap fraksi, fraksi dengan massa jenis lebih besar akan berada di posisi atas. Fraksinasi pada umumnya digunakan untuk mempersempit jumlah metabolit sekunder yang tertarik dari ekstrak. Metode pemisahan yang banyak digunakan adalah metode ekstraksi cair-cair dan kromatografi. Fraksinasi dengan ekstraksi cair-cair menggunakan corong pisah sebagai alat pemisahannya. Dalam proses tersebut akan terjadi perpindahan cairan dari satu fase ke fase lain. Fase yang digunakan merupakan duan cairan yang tidak saling bercampur, biasanya air dan pelarut organik (Harborne,1999).

BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

3.2 Penjelasan Kerangka Konsep

Penggunaan antibiotik yang tidak rasional dapat menyebabkan terjadinya resistensi antibiotik. Resistensi antibiotik yang terjadi dikarenakan bakteri dapat membuat pertahanan dengan berupa biofilm. Biofilm terdiri dari sel-sel mikroba dan *extracellular polymeric substance* (EPS). EPS dapat mencakup 50% samapi 90% dari total karbon organik biofilm dan dapat dianggap bahan matriks primer biofilm. EPS dapat berbeda sifat kimia dan fisik, tetapi terutama terdiri dari polisakarida (Homenta, 2016).

Polisakarida dari biofilm yaitu eksopolisakarida. Ikatan eksopolisakarida pada biofilm bersifat kaku. Jumlah eksopolisakarida yang dihasilkan oleh organisme pun berbeda-beda. Jumlah eksopolisakarida akan meningkat seiring dengan bertambahnya usia biofilm tersebut. Eksopolisakarida yang dihasilkan tergantung dari kandungan nutrisi dan media pertumbuhan. Kekurangan nitrogen, potassium dan fosfat dapat meningkatkan sintesis eksopolisakarida (Donlan, 2002).

Banyaknya permasalahan resistensi antibiotik dibutuhkan alternatif dengan menggunakan bahan alam untuk kesehatan, khususnya dalam pengendalian dari resistensi bakteri. Bahan alam yang diduga memiliki aktivitas antibakteri adalah *Mimosa pudica*. Ekstrak yang digunakan sulit untuk dapat dikembangkan sebagai sediaan karena masih terdapat banyak profil metabolit yang dikandung didalamnya, sehingga diperlukan prosedu pemisahan kandungan profil metabolit berdasarkan karakteristik dengan menggunakan metode fraksinasi (Graham dan Rickwood, 1997) dan Penelitian yang dilakukan Kamelia (2018) menyatakan bahwa fraksi etil asetat tanaman putri malu

merupakan fraksi yang memiliki aktivitas hambatan terbesar berdasarkan uji antibakteri untuk bakteri MRSA dengan metode difusi cakram.

3.3 Hipotesis Penelitian

3.3.1 Fraksi etil asetat dapat menghancurkan biofilm bakteri *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA), semakin tinggi dosis fraksi etil asetat, maka semakin besar degradasi biofilm bakteri MRSA.

3.3.2 Fraksi etil asetat dapat membunuh bakteri *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA), semakin tinggi dosis fraksi etil asetat, maka semakin kecil jumlah koloni bakteri MRSA

3.3.3 Perbandingan lama inkubasi setelah pemberian fraksi etil asetat dengan degradasi biofilm, semakin lama inkubasi maka semakin tinggi degradasi biofilm

3.3.4 Perbandingan lama inkubasi setelah pemberian fraksi etil asetat dengan jumlah koloni bakteri MRSA, semakin lama inkubasi maka semakin kecil jumlah koloni bakteri MRSA

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini berupa penelitian *true experimental* di laboratorium secara *in vitro* dengan mengukur persentase degradasi biofilm berdasarkan *optical density* yang terbaca dan jumlah koloni bakteri.

4.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah bakteri MRSA yang didapatkan dari kultur bakteri yang tersedia pada persediaan kultur di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dari 4 penderita yang berbeda yang di isolasi dari pus dan sputum.

4.3 Estimasi Jumlah Sampel

Pada penelitian ini sampel yang digunakan adalah bakteri *MRSA*. Pada penelitian ini digunakan lima dosis fraksi etil asetat daun *Mimosa pudica* dan kontrol negatif (tanpa fraksi etil asetat).. Untuk kontrol negatif digunakan sumuran mengandung kultur bakteri tanpa penambahan fraksi. Dilakukan 6 macam perlakuan untuk menentukan besar pengulangan, maka akan digunakan rumus Notobroto (2005), Sehingga diperoleh jumlah pengulangan sebagai berikut :

$$\begin{aligned}
 p(n-1) &\geq 15 \\
 6n-6 &\geq 15 \\
 6n &\geq 15+6 \\
 6n &\geq 21 \\
 n &\geq 3,5 \approx 4
 \end{aligned}$$

Keterangan :

n = banyaknya pengulangan

p = jumlah kelompok perlakuan

Dengan demikian dalam penelitian ini dilakukan empat kali pengulangan menggunakan 4 galur bakteri MRSA yang berbeda.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah dosis dari fraksi etil asetat yaitu 3 mg, 6 mg, 9 mg, 12 mg, dan 15 mg.

4.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah hasil *Optical Density* (OD) yang dibaca berdasarkan tingkat kekeruhan bakteri MRSA sebagai persentase degradasi biofilm dan jumlah koloni bakteri MRSA.

4.4.3 Variabel Kontrol

Variabel kontrol pada penelitian ini adalah sumuran yang mengandung kultur bakteri tanpa penambahan fraksi dan agar plate yang ditumbuhi bakteri tanpa penambahan fraksi. Variabel lain yang diusahakan dibuat sama adalah kondisi steril, waktu inkubasi, suhu, kelembapan, dan media yang digunakan.

4.5 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmasi dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang pada bulan Maret 2019 – Juli 2019.

4.6 Instrumen Penelitian

4.6.1 Maserasi Daun *M.pudica*

4.6.1.1 Alat

Alat yang digunakan untuk ekstraksi maserasi adalah toples kaca, corong Buchner, gelas ukur 1 L, timbangan analitik, gelas beaker, *vacuum rotary evaporator*, oven, stirrer dan aluminium foil.

4.6.1.2 Bahan

Bahan yang digunakan untuk ekstraksi maserasi adalah serbuk daun *M.pudica*, aquadest dan etanol 96%

4.6.2 Fraksinasi

4.6.2.1 Alat

Alat yang digunakan untuk fraksinasi adalah corong pisah, pipet tetes, aluminium foil, cawan porselen, *vacuum rotary evaporator*, dan oven

4.6.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan untuk fraksinasi yaitu pelarut etil asetat dan ekstrak daun *M.pudica*.

4.6.3 Pembuatan Suspensi Bakteri

4.6.3.1 Alat

Alat yang digunakan yaitu korek api, bunsen, ose, kapas steril, tabung reaksi, mikropipet, vortex, spektrofotometer

4.6.3.2 Bahan

Bahan yang digunakan yaitu *Nutrient Agar (NA)*, *Nutrient Broth*, dan NaCl 0,9%.

4.6.4 Identifikasi Bakteri

4.6.4.1 Alat

Alat yang digunakan yaitu korek api, bunsen, ose, kapas steril, spidol permanen, *Cefoxitin disk*, plat *Staphaurex*, vortex, mikroskop

4.6.4.2 Bahan

Bahan yang digunakan yaitu, *Nutrient Agar* (NA), Larutan H₂O₂, akuades steril, kit pewarnaan Gram (Kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin), reagen *Staphurex*, dan minyak emersi

4.6.5 Pembuatan Fraksi Etil Asetat

4.6.5.1 Alat

Alat yang digunakan yaitu neraca analitik, sonikator, gelas beker, *microtube*, mikropipet, tip.

4.6.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan yaitu fraksi etil asetat daun putri malu, DMSO 10%, dan akuades

4.6.6 Uji Penghancuran Biofilm

4.6.6.1 Alat

Alat yang digunakan yaitu *microtiterplate U-bottom polystyrene 96 well*, *Biozatic Microplate Reader*, mikropipet, rak, tabung reaksi, timbangan analitik, inkubator.

4.6.6.2 Bahan

Bahan yang digunakan yaitu aquadest, kritsal violet, media *Nutrient Agar*, media Tryptone Soy Broth-Glukosa (TSB-glu), Phosphate Bufferd Saline (PBS), Isopropanol HCl

4.6.7 Uji Perhitungan Pertumbuhan Bakteri

4.6.7.1 Alat

Alat yang digunakan untuk perhitungan pertumbuhan bakteri adalah cawan petri, ose, api bunsen

4.6.7.2 Bahan

Bahan yang digunakan untuk perhitungan pertumbuhan jumlah koloni bakteri adalah Nutrient Agar (NA), empat isolat bakteri MRSA dan fraksi etil asetat daun putri malu (*Mimosa pudica*).

4.7 Definisi Operasional

- 4.7.1 Bakteri MRSA adalah kultur bakteri yang tersedia pada persediaan kultur Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang yang berasal dari 4 penderita yang berbeda
- 4.7.2 Serbuk kering daun putri malu (*Mimosa pudica*) diperoleh dari UPT Materia Medika Batu, Malang yang digunakan adalah bagian daun.
- 4.7.3 Ekstrak daun *M.pudica* diperoleh dengan metode ekstraksi maserasi yaitu dengan cara merendam serbuk daun simplisia *M.pudica* 300gram dengan pelarut Etanol 96% sebanyak 3 liter, kemudian di remaserasi sebanyak tiga kali dan dievaporasi dengan *vacuum rotary evaporator*.
- 4.7.4 Dalam penelitian ini fraksi etil asetat diperoleh dari hasil fraksinasi cair antara ekstrak etanol dengan etil asetat.
- 4.7.5 Degradasi biofilm diukur dengan persentase degradasi yang ditandai dari hasil *optical density* yang terbaca pada *Biozatic Microplate Reader* pada panjang gelombang 630nm.
- 4.7.6 Persentase degradasi biofilm menunjukkan bahwa semakin besar persentase degradasi maka semakin kecil biofilm yang terbentuk.
- 4.7.7 Uji perhitungan koloni bakteri berdasarkan penilaian skor, untuk nilai skor +6 terdapat koloni bakteri yang sangat padat, +5 terdapat koloni bakteri yang sangat padat tetapi terlihat jarak antar koloni, +4 terdapat koloni bakteri yang padat dan terlihat jarak antar koloni, +3 terdapat koloni

bakteri yang cukup padat dan terlihat jarak antar koloni, +2 terdapat koloni bakteri yang tidak padat dan terlihat jarak antar koloni +1 terdapat koloni bakteri dengan jumlah yang sangat tidak padat

4.8 Rancangan Operasional Penelitian

Prosedur operasional penelitian meliputi ekstraksi daun *M.pudica*, fraksinasi cair dengan pelarut etil asetat, identifikasi bakteri MRSA, uji penghancuran biofilm dan uji pertumbuhan jumlah koloni bakteri MRSA.

4.8.1 Ekstraksi Maserasi Daun Putri Malu

1. Ditimbang serbuk daun putri malu sebanyak 300 gram menggunakan timbangan analitik dan kemudian dimasukkan dalam toples kaca dan dicampur dengan etanol 96% sebanyak 3 liter.
2. Kemudian campuran serbuk daun putri malu dan Etanol 96% diaduk menggunakan stirrer dengan kecepatan 400 rpm selama 30 menit.
3. Toples kaca kemudian ditutup rapat menggunakan *plastic wrap* dan disimpan pada suhu ruang selama 1x24 jam.
4. Larutan hasil rendaman dipisahkan dari ampasnya dan dipindah ke toples kaca yang baru, kemudian disaring menggunakan corong *Buchner* yang terhubung dengan *vacuum*.
5. Proses remaserasi dilakukan sebanyak tiga kali.
6. Proses remaserasi pertama yaitu mencampurkan ampas maserasi awal dengan etanol 96% sebanyak 3 liter dan disimpan pada suhu ruang selama 1x24 jam. Hasil maserat disaring kembali menggunakan corong *Buchner* yang terhubung dengan vakum dan ditampung pada toples kaca hasil maserat. Prosedur yang sama diulang untuk proses remaserasi yang kedua dan ketiga. Setelah disaring, kemudian ekstrak dipisahkan

menggunakan *vacuum rotavapor* dengan suhu 40°C dengan kecepatan 30-35 rpm, kemudian ekstrak kental dikeringkan dalam oven pada suhu 40°C.

4.8.2 Fraksinasi Ekstrak Daun *M.pudica*

Fraksinasi dilakukan dengan menggunakan pelarut etil asetat (Can-ake, 2004)

1. ekstrak etanol ditimbang menggunakan timbangan analitik sebanyak 20 gram.
2. Ekstrak etanol kemudian disuspensikan dalam aquadest 100 ml dalam mortar
3. Suspensi ekstrak dengan air dimasukkan kedalam corong pisah. Ditambahkan pelarut n-heksan sebanyak 100 ml dalam suspensi air, dikocok selama 5 menit sambil sesekali dikeluarkan gas dalam corong pisah. Didiamkan hingga terbentuk dua lapisan. Lapisan yang terbentuk kemudian di pisahkan menjadi residu air dengan fraksi n heksana
4. Residu air kemudian di masukkan kembali kedalam corong pisah. Ditambahkan pelarut n-heksana sebanyak 100ml dikocok selama 5 menit sambil sesekali dikeluarkan gas dalam corong pisah. Didiamkan hingga terbentuk dua lapisan. Lapisan yang terbentuk kemudian di pisahkan
5. Prosedur sebelumnya di ulang hingga fraksi n-heksana menjadi jernih atau warna terlihat mulai konstan.
6. Setelah didapatkan fraksi n-heksana menjadi jernih atau warna terlihat konstan, kemudian fraksi n-heksana di tampung dalam satu wadah dan residu fraksi n-heksana kemudian di masukkan kembali kedalam corong pisah.

7. Residu fraksi n-heksana ditambah dengan 100 ml etil asetat, kemudian dikocok selama 5 menit sambil sesekali dikeluarkan gas dalam corong pisah. Didiamkan hingga terbentuk dua lapisan. Lapisan yang terbentuk kemudian di pisahkan
8. Prosedur sebelumnya di ulang hingga fraksi etil asetat menjadi jernih atau warna terlihat mulai konstan.
9. Setelah didapatkan fraksi etil asetat menjadi jernih atau warna terlihat konstan, kemudian fraksi etil asetat di tampung dalam satu wadah
10. Fraksi etil asetat dipekatkan menggunakan vakum ratapor dengan suhu 40°C dan kecepatan 70rpm dan dikeringkan dalam oven pada suhu 40°C .
11. Setelah kering, fraksi ditimbang beratnya.
12. Disimpan dalam pendingin dengan suhu $2-8^{\circ}\text{C}$

4.8.3 Identifikasi Bakteri

4.8.3.1 Pewarnaan Gram

1. Koloni bakteri diambil dengan menggunakan ose bakteri.
2. Satu ose koloni bakteri yang telah diambil diletakkan pada gelas objek
3. Difiksasi dengan melewati gelas objek ke pemanas secukupnya
4. Ditetaskan larutan Kristal violet, diamkan 1 menit
5. Dibilas dengan air mengalir
6. Ditetaskan larutan lugol, diamkan 1 menit
7. Dibilas dengan air mengalir
8. Ditetaskan alkohol 96%
9. Dibilas dengan air mengalir
10. Ditetaskan larutan safranin, didiamkan 30 detik
11. Dibilas dengan air mengalir

12. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap, ditetesi minyak emersi untuk memperjelas dari pengamatan di bawah mikroskop dengan lensa objektif 1000 kali
13. Bakteri MRSA adalah bakteri Gram positif berbentuk kokus dengan hasil pewarnaan Gram berwarna ungu

4.8.3.2 Uji Koagulase

1. Dilakukan penyiapan media plasma 1-2 tetes pada gelas objek
2. Dengan menggunakan ose, koloni diambil dari media *Nutrient Agar* lalu dicampurkan dengan reagen *Staphaurex*
3. Diamati langsung reaksi yang terjadi, dikatakan positif apabila terjadi penggumpalan atau aglutinasi

4.8.3.3 Uji Katalase

1. Diambil koloni bakteri dari media *Nutrient Agar* (NA) menggunakan ose
2. Digoreskan pada *slide glass*
3. Ditambahkan larutan H_2O_2 , kemudian diamati langsung reaksi yang terjadi, dikatakan positif apabila terdapat gelembung udara yang berarti bakteri menghasilkan enzim katalase yang dapat menguraikan H_2O_2

4.8.3.4 Uji Sensitivitas Cefoxitin

Pada uji sensitivitas cefoxitin ini digunakan cakram yang mengandung 30 μ g cefoxitin (Khan *et al*, 2010).

1. Suspensi bakteri yang telah dibuat dimasukkan kedalam media *Nutrient Agar* (NA)
2. Kemudian diinkubasi 37⁰C selama 18 jam
3. Dihitung diameter zona hambat yang terbentuk. Jika zona hambat yang terbentuk ≤ 21 mm, maka dapat dikatakan bakteri tersebut positif

bakteri MRSA. Dan jika $\geq 13\text{mm}$, maka dapat dikatakan bakteri tersebut negatif bakteri MRSA.

4.8.4 Pembuatan Suspensi Bakteri MRSA

Setelah dipastikan bakteri MRSA, dilakukan pembuatan suspensi bakteri untuk mendapatkan konsentrasi bakteri 10^6 Colony Form Unit/mL (CFU/mL). Prosedur yang dilakukan adalah sebagai berikut:

- a. Sampel bakteri diinkolusikan kedalam media *Nutrient Broth* dengan menggunakan ose yang telah disterilkan dengan api Bunsen, kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi yang telah berisi media *Nutrient Broth*. Tabung reaksi kemudian di vortex dan di inkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
- b. Hasil suspensi bakteri kemudian dikeluarkan dan diukur menggunakan spektrofotometri dengan panjang gelombang 625nm untuk mengetahui *Optical Density* (OD) dari suspensi bakteri sebagai nilai kepadatan dari bakteri. Nilai OD dicatat sebagai N_1 untuk digunakan pada rumus perhitungan (Murray *et al*, 1999)

$$N_1 \times V_1 \approx N_2 \times V_2$$

Keterangan :

V_1 : Volume bakteri yang akan digunakan untuk pengenceran (Volume bakteri yang akan diambil dari tabung reaksi)

N_1 : Nilai absorbansi suspensi (Nilai OD)

V_2 : Volume suspensi bakteri uji yang diharapkan (5mL)

N_2 : Konsentrasi bakteri awal (0,1 Setara dengan 10^8 CFU/mL)

- c. Dari hasil perhitungan yang di dapatkan, diambil volume bakteri yang sesuai dengan perhitungan, kemudian di masukkan ke tabung reaksi lain dan ditambahkan larutan NaCl 0,9% steril hingga volume tepat 5mL. Tabung reaksi kemudian di vortex hingga homogen. Didapatkan suspensi bakteri 10^8 CFU/mL.

- d. Suspensi bakteri dengan konsentrasi 10^8 CFU/mL diencerkan hingga mendapatkan konsentrasi 10^6 CFU/mL dengan cara 1mL suspensi dengan konsentrasi 10^8 CFU/mL diambil kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi yang telah diisi 99mL *Nutrient Broth*. Tabung reaksi selanjutnya di vortex hingga homogen. Sehingga di dapatkan konsentrasi bakteri 10^6 CFU/mL.

4.8.5 Preparasi Fraksi Etil Asetat

Pembuatan larutan uji untuk perlakuan :

1. Ditimbang fraksi etil asetat sebanyak 75mg
2. Dilarutkan dalam 1mL DMSO 10% sehingga didapatkan konsentrasi 75mg/mL atau setara dengan dosis 15mg. Dilakukan pengenceran bertingkat sehingga didapatkan konsentrasi larutan uji 60mg/mL atau setara dengan dosis 12mg , 45mg/mL atau setara dengan dosis 9mg, 30mg/mL atau setara dengan dosis 6mg, dan 15mg/mL atau setara dengan dosis 3mg.
 - a. 75mg/mL sampel diambil 0,8mL ditambah dengan 0,2ml DMSO 10% sehingga konsentrasi menjadi 60mg/mL
 - b. 60mg/mL sampel diambil 0,75mL ditambah dengan 0,25ml DMSO 10% sehingga konsentrasi menjadi 45mg/mL
 - c. 45mg/mL sampel diambil 0,67mL ditambah dengan 0,33ml DMSO 10% sehingga konsentrasi menjadi 30mg/mL
 - d. 30mg/mL sampel diambil 0,5mL ditambah dengan 0,5ml DMSO 10% sehingga konsentrasi menjadi 15mg/mL

4.8.6 Uji Degradasi Biofilm

Eksperimen ini dilakukan berdasarkan metode yang dideskripsikan oleh (Sandasi *et al.*, 2015).

1. Sebanyak 100 μL suspensi bakteri ditambahkan pada sumur beserta 100 μL media TSB-glu
2. *Microtitter* di inkubasi selama 2 hari pada suhu 37°C
3. Setelah di inkubasi, suspensi di buang. Kemudian di cuci dengan air sebanyak 3 kali
4. Ditambahkan sebanyak 200 μL sampel pada setiap sumur, diinkubasi selama 1 jam dan 2 jam.
5. Setelah di inkubasi, cairan dibuang. *Microtitter* kemudian di cuci dengan PBS sebanyak 200 μL . Kemudian ditambahkan 200 μL Kristal violet 0,1% kesetiap sumur
6. Di diamkan pada suhu ruang selama 15 menit. Kemudian di cuci kembali menggunakan air sebanyak 3 kali
7. Ditambahkan 200 μL isopropanol HCl kesetiap sumur untuk selanjutnya dilakukan pembacaan *Optical Density*
8. Dilakukan pembacaan *Optical Density* (OD) menggunakan *Biozatic Microplate Reader* pada panjang gelombang 630 nm. Presentase penghancuran dihitung menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Degradasi Biofilm} = \frac{\text{Nilai OD Kontrol negatif} - \text{Nilai OD fraksi}}{\text{Nilai OD Kontrol negatif}} \times 100\%$$

Keterangan :

OD Kontrol negatif

: Biofilm tanpa penambahan fraksi etil asetat

OD Fraksi

: Biofilm dengan penambahan fraksi etil asetat

4.8.7 Uji Perhitungan Jumlah Bakteri

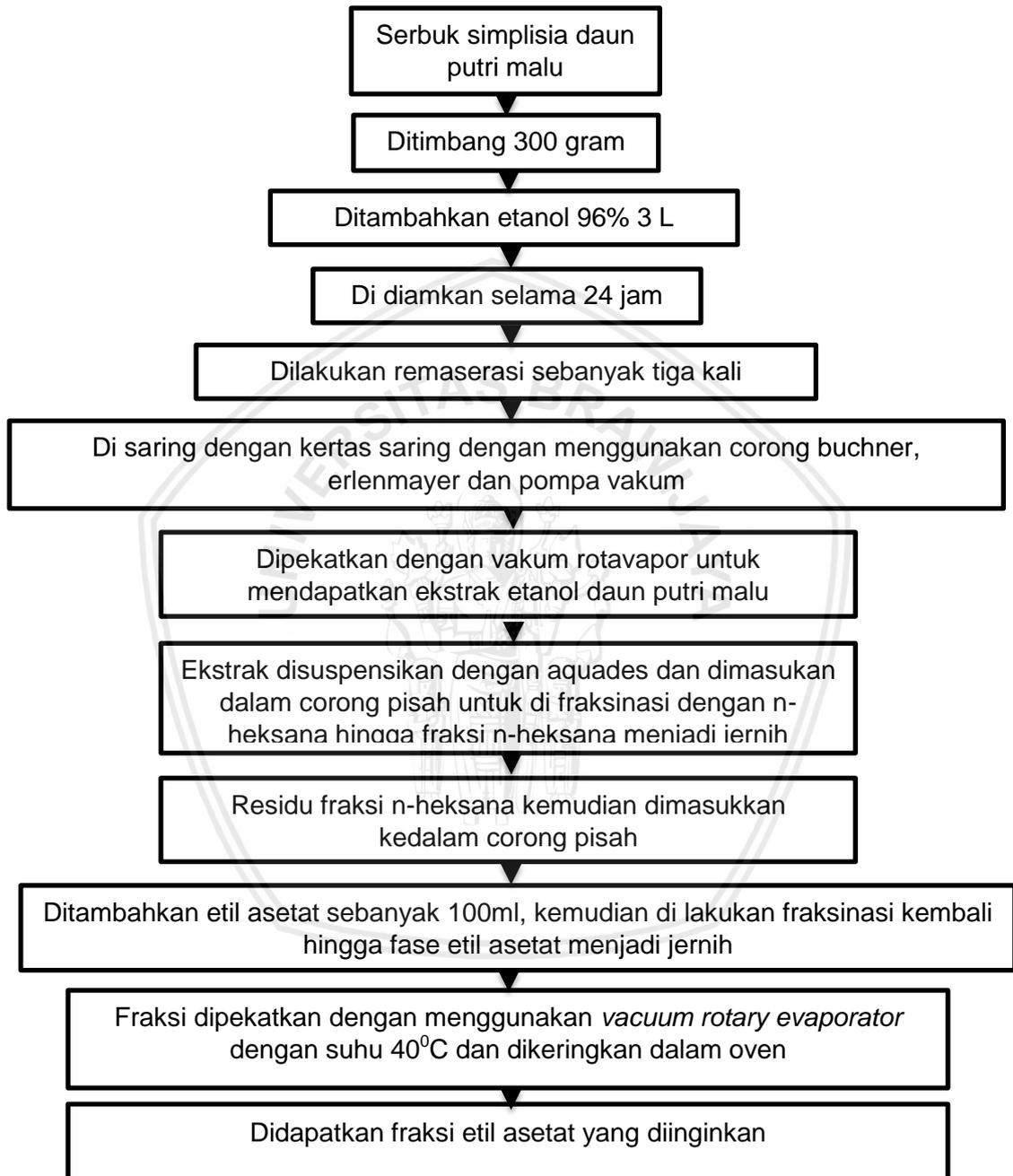
Uji perhitungan jumlah bakteri di hitung dengan metode *streak plate quadrant* dengan media *Nutrient Agar* (NA) (Liana *et al*, 2013) :

1. Disiapkan cawan petri dengan Media NA padat
2. Kemudian diambil dari setiap sumur sebanyak satu ose
3. Ose kemudian di goreskan pada media *Nutrient Agar* secara merata diseluruh permukaan media
4. Kemudian cawan petri diinkubasi selama 24 jam.
5. Koloni yang tumbuh dihitung, apabila tidak terhitung koloni diinterpretasikan dengan menggunakan penilaian skor

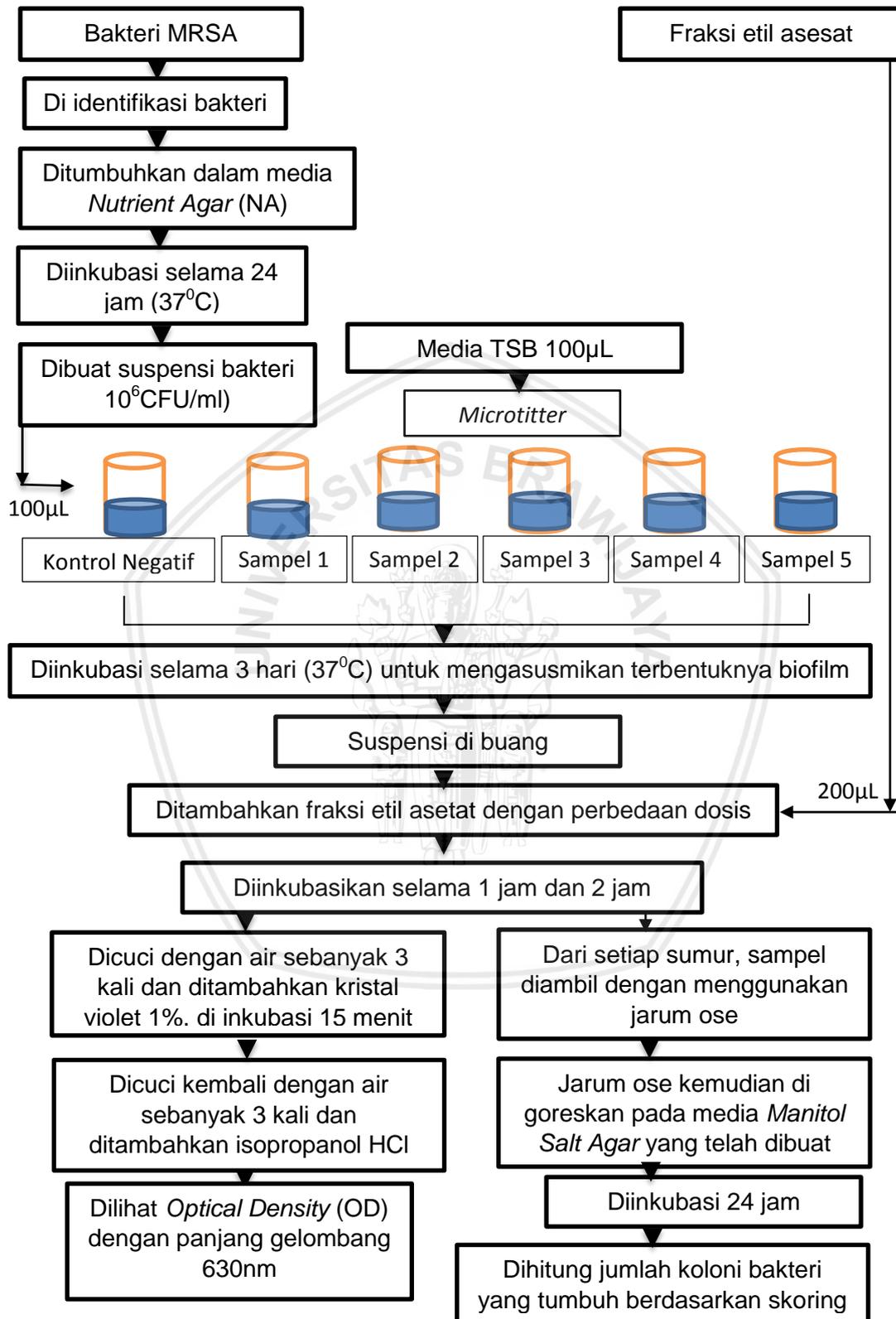
4.8.8 Analisis Data

Data yang di peroleh kemudian di analisis. Analisis data dilakukan dengan menggunakan program IBM SPSS dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Analisis data diuji dengan uji korelasi Spearman. Uji korelasi Spearman bertujuan untuk menganalisis adanya hubungan antara dosis dengan nilai persentase degradasi biofilm bakteri MRSA dan menganalisis adanya hubungan antara dosis dengan jumlah koloni bakteri. Untuk menganalisis perbandingan antara lama inkubasi dengan degradasi biofilm dan lama inkubasi dengan jumlah koloni bakteri di lakukan dengan menggunakan uji *Paired T-Test*.

4.9 Skema Prosedur



Gambar 4.1 Skema Prosedur Fraksinasi *Mimosa pudica*



Gambar 4.2 Skema Prosedur Uji Bakteri

BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Ekstraksi dan Fraksinasi

Serbuk daun putri malu (*Mimosa pudica*) merupakan sampel yang digunakan pada penelitian ini. Serbuk daun putri malu yang digunakan sebanyak 300 gram dan diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut organik. Pelarut yang digunakan pada penelitian ini yaitu etanol 96% sebanyak 3 liter. Bentuk ekstrak yang didapatkan berbentuk pasta dengan warna cokelat kehitaman dan mempunyai bau khas aromatik. Massa ekstrak yang didapatkan dari hasil penimbangan yaitu sebesar 26,6585 gram dan rendemen ekstrak sebesar 8,8861%.

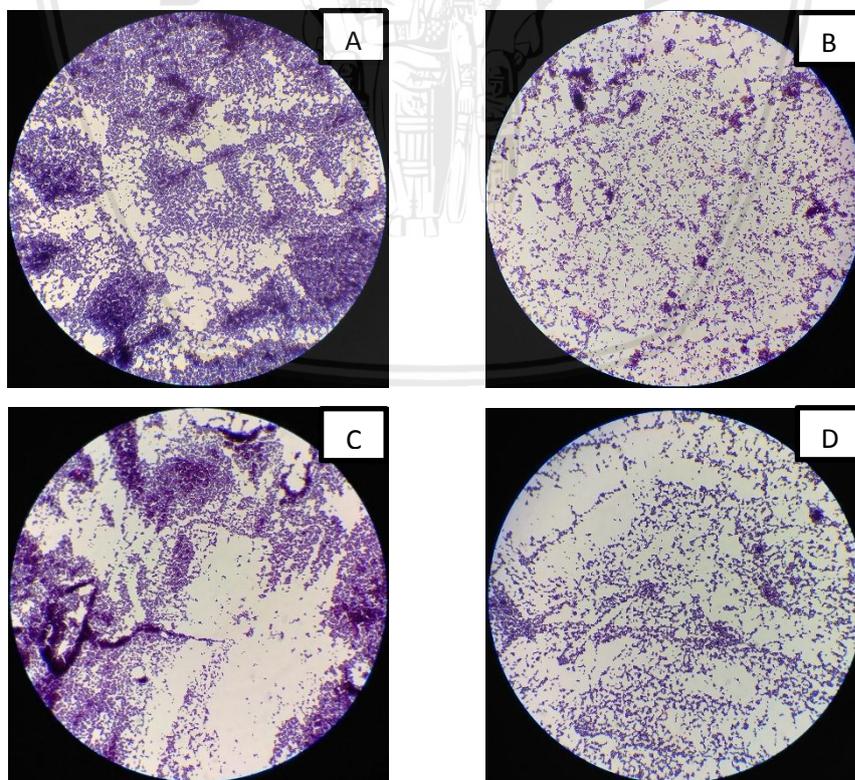
Penelitian ini juga menggunakan fraksinasi cair-cair bertingkat. Fraksinasi cair-cair bertingkat ini memiliki fungsi untuk membuat jumlah senyawa metabolit yang tertarik menjadi lebih sempit. Pelarut yang digunakan pada proses fraksinasi ini yaitu pelarut n-heksana dan pelarut etil asetat. Massa fraksi yang diperoleh dari tiap pelarut ditunjukkan pada **Tabel 5.1**.

Tabel 5.1 Hasil Fraksinasi

Jenis Fraksi	Jumlah pelarut	Massa Fraksi (gram)	Rendemen
N-Heksana	9 kali	2,0116	10,05%
Etil Asetat	7 kali	1,8943	9,47%

5.2 Hasil Identifikasi Bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)

Bakteri yang akan diujikan terlebih dahulu diidentifikasi untuk memastikan bahwa bakteri yang digunakan merupakan bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). Bakteri yang digunakan pada penelitian ini berjumlah empat bakteri MRSA yang didapatkan dari pus dan sputum. Untuk bakteri 1 dan 2 merupakan bakteri yang berasal dari pus dan bakteri 3 dan 4 merupakan bakteri yang berasal dari sputum. Identifikasi bakteri yang dilakukan yaitu dengan pewarnaan Gram, uji koagulase, uji katalase dan uji sensitivitas cefoxitin. Pada identifikasi pewarnaan Gram hasil yang didapatkan yaitu bakteri berwarna ungu dengan bentuk kokus atau menyerupai anggur seperti yang ditunjukkan pada **Gambar 5.1**.



Gambar 5.1 Hasil Pewarnaan Gram Bakteri

Keterangan : A = Bakteri 1, B = Bakteri 2, C = Bakteri 3, D = Bakteri 4 dengan perbesaran 1000 kali

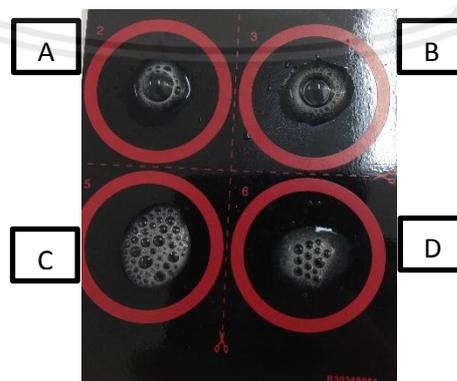
Hasil uji koagulasi menunjukkan bahwa bakteri positif dari genus *Staphylococcus* karena terjadinya penggumpalan atau aglutinasi, seperti yang ditunjukkan pada **Gambar 5.2**



Gambar 5.2 Hasil Uji Koagulasi Bakteri

Keterangan : A = Bakteri 1, B = Bakteri 2, C = Bakteri 3, D = Bakteri 4

Hasil uji katalase juga menunjukkan bahwa bakteri positif dari genus *Staphylococcus* dengan reaksi yang terjadi setelah ditambahkan larutan hidrogen peroksida terdapat gelembung udara, seperti yang ditunjukkan pada **Gambar 5.3**



Gambar 5.3 Hasil Uji Katalase Bakteri

Keterangan : A = Bakteri 1, B = Bakteri 2, C = Bakteri 3, D = Bakteri 4

Hasil uji sensitivitas cefoxitin adalah uji identifikasi yang spesifik terhadap jenis bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) karena diujikan langsung dengan antibiotik cefoxitin. Hasil menunjukkan bahwa bakteri positif *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) karena dari keempat bakteri, tiga diantaranya yaitu bakteri A, bakteri C, dan Bakteri D menunjukkan tidak adanya zona hambat yang terbentuk dan hanya satu bakteri yaitu bakteri B terdapat diameter zona hambat dengan ukuran 9mm seperti yang ditunjukkan pada **Gambar 5.4**.



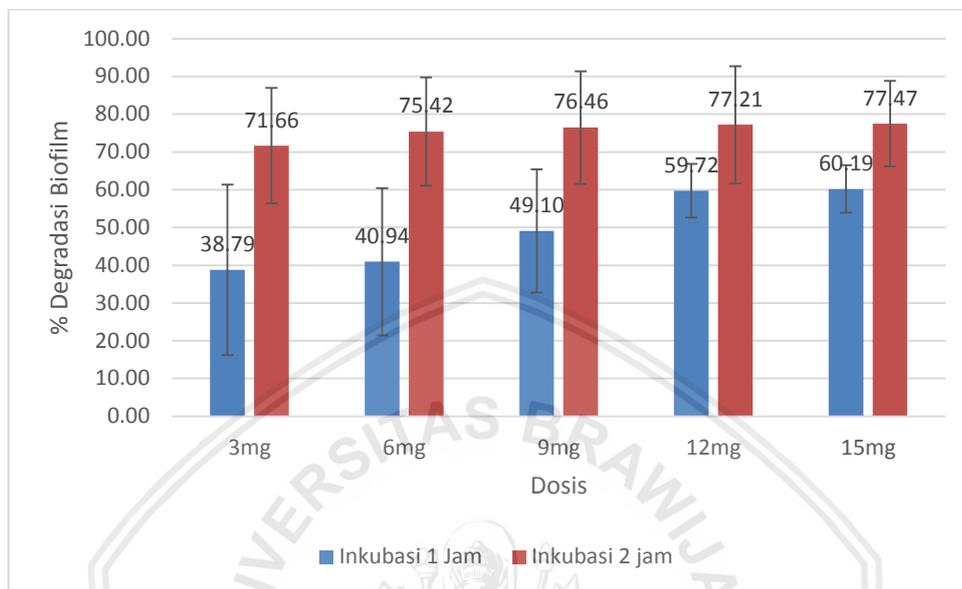
Gambar 5.4 Hasil Uji Sensitivitas Cefoxitin

Keterangan : A = Bakteri 1, B = Bakteri 2, C = Bakteri 3, D = Bakteri 4

5.3 Hasil Uji Antibiofilm Fraksi Etil Asetat Daun Putri Malu (*Mimosa pudica*) terhadap Bakteri MRSA

Fraksi etil asetat daun putri malu (*Mimosa pudica*) diuji antibiofilm menggunakan metode mikrotiterplate reader menggunakan ELISA reader untuk mengetahui aktivitas antibiofilmnya. Pada penelitian ini uji antibiofilm yang diuji yaitu degradasi biofilm. Aktivitas antibiofilm dari fraksi etil asetat yang diuji dibuktikan dengan melihat *Optical Density* yang terbaca pada ELISA reader dengan panjang gelombang 630nm setelah bakteri diinkubasi selama 48 jam dan

fraksi etil asetat diberikan lalu diinkubasi kembali selama 1 jam dan 2 jam. Nilai *Optical Density* yang terbaca kemudian dihitung dalam rumus degradasi biofilm.



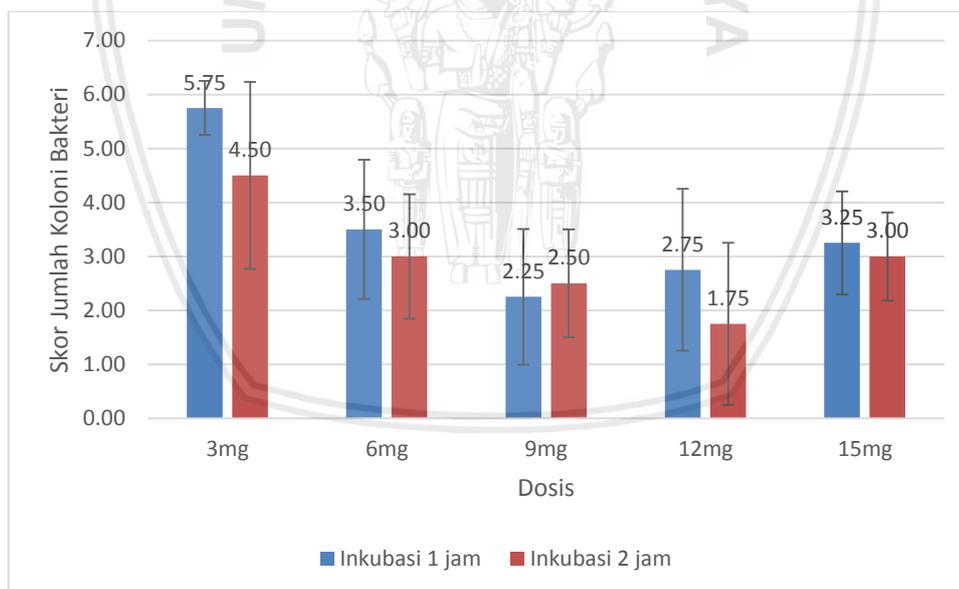
Gambar 5.5 Diagram Persen Degradasi Biofilm Fraksi Etil Asetat Daun Putri Malu (*Mimosa pudica*) terhadap Bakteri MRSA pada inkubasi selama 1 jam dan 2 jam

Berdasarkan hasil persen degradasi biofilm pada bakteri *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) pada inkubasi selama satu jam dan dua jam yang ditunjukkan pada **Gambar 5.5** diperoleh persen degradasi tertinggi hingga terendah yaitu dosis 15mg, dosis 12mg, dosis 9mg, dosis 6mg, hingga 3mg.

Pada penelitian ini dilakukan variasi lama waktu untuk penginkubasian sampel, sampel diinkubasi dengan dua variasi. Yang pertama yaitu dengan lama waktu yaitu satu jam inkubasi, dan yang kedua yaitu dengan dua jam inkubasi. Hasil untuk degradasi biofilm pada *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) pada inkubasi selama 1 jam dan 2 jam memiliki perbedaan yaitu pada inkubasi 2 jam memiliki persen degradasi yang lebih tinggi dibandingkan dengan inkubasi 1 jam.

5.4 Hasil Uji Perhitungan Jumlah Koloni Bakteri dengan Penilaian Skor

Setelah dilakukan uji degradasi, jumlah koloni bakteri di hitung berdasarkan penilaian skor, penilaian ini berdasarkan dari kepadatan jumlah koloni bakteri. Setelah diinkubasi satu jam dengan dua jam, maka beberapa sumur diambil satu ose kemudian dengan metode streaking, ose tersebut digoreskan pada *Nutrient Agar* untuk kemudian di inkubasi selama satu hari untuk dihitung jumlah koloni bakteri dengan penilaian skor. Skor tertinggi yaitu dengan nilai +6 dengan jumlah kepadatan yang sangat padat, dan skor terendah yaitu dengan nilai +1 dengan jumlah koloni yang sangat tidak padat dan memiliki jarak antar koloni yang dapat terlihat dengan jelas. Hasil uji perhitungan jumlah koloni bakteri ditunjukkan pada **Gambar 5.6**



Gambar 5.6 Diagram Penilaian Skor untuk Jumlah Koloni Bakteri pada Inkubasi Selama 1 Jam dan 2 Jam

Berdasarkan hasil perhitungan koloni bakteri didapatkan bahwa pada inkubasi 1 jam terdapat penurunan jumlah koloni dari dosis 3mg hingga 9mg

tetapi pada dosis 12 mg dan 15mg mengalami peningkatan jumlah koloni. Sedangkan untuk penurunan jumlah koloni bakteri pada inkubasi 2 jam mengalami penurunan jumlah koloni bakteri dari dosis 3mg hingga 12 mg tetapi pada dosis 15mg mengalami peningkatan jumlah koloni bakteri.

5.5 Analisis Statistik

5.5.1 Korelasi Spearman

5.5.1.1 Hubungan antara dosis dengan degradasi biofilm

Berdasarkan hasil degradasi biofilm yang di dapat kemudian data dianalisa dengan menggunakan *Software* IBM SPSS 20. Tingkat kepercayaan yang digunakan pada analisis ini yaitu 95% ($\alpha = 0,05$). Analisis data yang digunakan yaitu uji korelasi Spearman. Uji ini tidak harus memiliki data yang normal. Uji ini dilakukan untuk menganalisis hubungan antara dosis yang diberikan dengan degradasi biofilm yang terjadi. Hasil uji dari degradasi biofilm dengan inkubasi selama 1 jam menunjukkan adanya hubungan antara peningkatan dosis dengan persentase degradasi biofilm yang terjadi karena nilai signifikansi dari analisis menunjukkan bahwa $p = 0,01$ dan koefisien korelasi $r = 0,426$ yang berarti memiliki korelasi yang bermakna dan. Korelasi bermakna ditunjukkan apabila nilai signifikansi ($p < 0,05$). Analisis ini juga menunjukkan bahwa memiliki hubungan yang searah karena didapatkan koefisien korelasi yang bernilai positif, yang berarti peningkatan dosis searah dengan peningkatan degradasi biofilm yang terjadi.

Sedangkan untuk hasil uji dari degradasi biofilm dengan inkubasi selama 2 jam menunjukkan tidak adanya hubungan yang bermakna antara dosis dengan degradasi biofilm karena memiliki nilai signifikansi dari analisis menunjukkan bahwa $p = 0,278$ dan koefisien korelasi $r = 0,142$ yang berarti tidak memiliki

korelasi yang bermakna. Korelasi bermakna ditunjukkan apabila nilai signifikansi ($p < 0,05$).

5.5.1.2 Hubungan antara dosis dengan jumlah koloni

Hasil uji skoring jumlah koloni bakteri kemudian di analisis dengan menggunakan analisis Spearman. Hasil analisis menunjukkan terdapat perbedaan secara bermakna ($p < 0,05$) antara pemberian dosis dengan jumlah koloni bakteri pada inkubasi selama 1 jam, dan tidak terdapat perbedaan secara bermakna ($p > 0,05$) untuk pemberian dosis dengan jumlah koloni bakteri pada inkubasi selama 2 jam. Hasil ini dapat ditunjukkan dari nilai signifikansi untuk inkubasi selama 1 jam yaitu $p = 0,022$ dan koefisien korelasi yaitu $r = -0,509$. Untuk inkubasi selama 2 jam yaitu $p = 0,093$ dan koefisien korelasi yaitu $r = -0,386$. Analisis ini juga menunjukkan bahwa memiliki hubungan yang berlawanan arah karena didapatkan koefisien korelasi yang bernilai negatif, yang berarti peningkatan dosis berlawanan arah dengan jumlah koloni bakteri yang tumbuh.

5.5.2 Paired T-Test

5.5.2.1 Perbandingan Lama Inkubasi terhadap Degradasi Biofilm

Untuk mengetahui adanya pengaruh perbedaan lama inkubasi yang dilakukan pada bakteri setelah ditambahkan dengan fraksi etil asetat maka dilakukan analisis *Paired T-Test*. *Paired T-Test* digunakan untuk membandingkan lama inkubasi satu jam dan dua jam setelah pemberian fraksi etil asetat dengan degradasi biofilm yang terjadi.

Berdasarkan hasil analisis menunjukkan memiliki perbedaan bermakna antara lama inkubasi selama satu jam dan dua jam dengan persen degradasi karena nilai signifikansi ($p < 0,05$)

5.5.2.2 Perbandingan Lama Inkubasi terhadap Jumlah Koloni

Untuk mengetahui adanya pengaruh perbedaan lama inkubasi yang dilakukan pada bakteri setelah ditambahkan dengan fraksi etil asetat maka dilakukan analisis *Paired T-Test*. *Paired T-Test* digunakan untuk membandingkan lama inkubasi satu jam dan dua jam setelah pemberian fraksi etil asetat dengan jumlah koloni bakteri yang tumbuh.

Berdasarkan hasil analisis menunjukkan tidak memiliki perbedaan bermakna antara lama inkubasi selama satu jam dan dua jam dengan jumlah koloni bakteri karena nilai signifikansi ($p > 0,05$).



BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Pembahasan Hasil Penelitian

Pada penelitian ini daun putri malu (*Mimosa pudica*) digunakan untuk dapat mengatasi biofilm yang terbentuk dari bakteri *Methicilin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA). Senyawa metabolit sekunder dari daun putri malu (*Mimosa pudica*) didapatkan melalui metode ekstraksi maserasi dan fraksinasi. Proses ekstraksi dilakukan dengan menggunakan pelarut etanol 96%. Metode ekstraksi maserasi dipilih karena menggunakan peralatan yang sederhana dan prosedur yang tidak rumit hingga dapat dikategorikan metode yang murah untuk dilakukan. Ekstraksi maserasi merupakan metode yang memiliki keuntungan utama yaitu prosedur dan peralatan yang digunakan sederhana dan tidak dipanaskan sehingga bahan alam tidak menjadi terurai (Puspitasari dan Prayogo, 2017). Pemilihan pelarut menggunakan pelarut etanol pada penelitian ini karena kemampuan etanol dalam melarutkan senyawa semipolar seperti saponin, flavonoid, alkaloid dalam serbuk simplisia daun putri malu.

Setelah didapatkan ekstrak dengan metode ekstraksi maserasi, kemudian ekstrak dilakukan fraksinasi bertingkat. Fraksinasi ini dilakukan secara bertingkat sesuai dengan kepolaran dari pelarutnya mulai dari non polar hingga semipolar. Fraksinasi ini dimulai dengan pelarut non polar yaitu pelarut n-heksana dilanjutkan dengan pelarut semipolar yaitu pelarut etil asetat sehingga mendapatkan fraksi etil asetat. Tujuan dari fraksinasi ini untuk memisahkan senyawa berdasarkan tingkat kepolaran yang berbeda dalam dua pelarut yang

memiliki tingkat kepolaran yang berbeda pula (Pratiwi *et al.* 2016). Menurut Soeksmanto (2010) bahwa penggunaan pelarut yang berbeda tingkat kepolaran mempengaruhi jenis senyawa yang terekstrak. Menurut penelitian yang dilakukan Kamelia (2018) hasil optimasi ekstrak etanol dan fraksi daun putri malu (*Mimosa pudica*) masing-masing dapat menarik senyawa metabolit sekunder yang berbeda beda dan dapat ditunjukkan pada Tabel 6.1

**Tabel 6.1 Senyawa Metabolit Sekunder Berdasarkan Hasil Optimasi
(Kamelia, 2018)**

Sampel	Senyawa yang dapat ditarik
Ekstrak Etanol 96%	Flavonoid dan klorofil
Fraksi N-Heksana	Alkaloid, Saponin, Furanokumarin, dan klorofil
Fraksi Etil Asetat	Flavonoid, Alkaloid, Saponin, dan Furanokumarin

Pada penelitian ini, sebelum dilakukan uji aktivitas antibiofilm dilakukan identifikasi bakteri terlebih dahulu untuk memastikan bahwa bakteri yang digunakan sesuai dengan yang diinginkan. Bakteri yang diinginkan yaitu bakteri *Methicilin Resistant Staphylococcus aureus* dari empat galur yang berbeda. Empat galur yang digunakan yaitu dari sputum dan pus. Identifikasi yang dilakukan pada penelitian ini yaitu pewarnaan Gram, uji koagulase, uji katalase dan uji sensitivitas cefoxitin. Pada uji pewarnaan Gram, setelah diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000 kali, bakteri *Staphylococcus aureus* menunjukkan bahwa bakteri berbentuk kokus dan berwarna ungu setelah proses pewarnaan seperti yang ditunjukkan pada Gambar 5.1. Hal ini disebabkan

karena konsentrasi lipid dan ketebalan peptidoglikan sehingga pada bakteri dengan kategori Gram positif akan mempertahankan warna ungu dari pewarna primer (Post dan Songer, 2005). Menurut Lay (1994) bakteri Gram positif berwarna ungu disebabkan kompleks zat warna kristal violet-yodium tetap dipertahankan meskipun diberi larutan pemucat. Dinding sel bakteri Gram positif terdiri dari peptidoglikan yang tebal tanpa adanya lapisan lipoprotein atau polisakarida sedangkan bakteri Gram negatif memiliki dinding sel terdiri dari peptidoglikan tipis yang dibungkus oleh lapisan lipoprotein atau lipopolisakarida (Ijong, 2015).

Pada uji koagulase, bakteri *Staphylococcus aureus* menunjukkan bahwa bakteri memberikan respon koagulase positif karena terjadi penggumpalan seperti yang ditunjukkan pada Gambar 5.2. Menurut Andreasen (2008) koagulase positif umumnya dihasilkan oleh bakteri *Staphylococcus aureus*, namun dapat ditemukan juga bakteri *Staphylococcus aureus* dengan koagulase negatif. Koagulase negatif biasanya bertindak sebagai patogen oportunistik (Yurdakul *et al*, 2013). Koagulase merupakan salah satu protein yang menyerupai enzim dan dapat menggumpalkan plasma oksalat atau sitrat dengan bantuan suatu faktor yang terdapat pada serum (Karimela *et al*, 2017).

Pada uji katalase, bakteri *Staphylococcus aureus* menunjukkan bahwa bakteri memberikan respon katalase positif karena terbentuknya gelembung gas seperti yang ditunjukkan pada Gambar 5.3. Bakteri *Staphylococcus* sp menggunakan katalase untuk melindungi dari hidrogen peroksida (H_2O_2) dengan mengubahnya menjadi air dan oksigen (Locke *et al*, 2013). Uji katalase pada bakteri bentuk kokus digunakan untuk membedakan *Staphylococcus* dan

Streptococcus (Karimela *et al*, 2017). Kelompok *Streptococcus* memberi reaksi negatif, sedangkan *Staphylococcus* memberikan reaksi positif (Lay, 1994).

Setelah dilakukan serangkaian uji, uji yang dapat membedakan antara *Staphylococcus aureus* dengan *Methicilin Resistant Staphylococcus aureus* yaitu dengan uji sensitivitas Cefoxitin. Uji sensitivitas Cefoxitin ini menggunakan antibiotik Cefoxitin 30 μ g. Pendeteksian ini dilakukan dengan melihat zona hambat dari bakteri seperti yang ditunjukkan pada Gambar 5.4. Menurut CLSI (2012) diameter zona hambat cefoxitin yang dikategorikan *resistant* untuk bakteri *Staphylococcus aureus* yaitu ≤ 21 mm. Hasil dari keempat bakteri yang ditumbuhkan, tiga diantaranya tidak menunjukkan adanya zona hambat setelah diberikan antibiotik cefoxitin dan hanya satu yang menunjukkan adanya zona hambat dengan ukuran 9mm.

Uji selanjutnya yaitu uji aktivitas antibiofilm fraksi etil astet, aktivitas antibiofilm yang diujikan pada penelitian ini yaitu degradasi biofilm bakteri MRSA. Uji ini dilakukan dengan menggunakan metode mikrodilusi dengan menggunakan mikrotiter plate. Pemilihan metode ini dikarenakan sampel yang ingin diuji jumlahnya yang terbatas tetapi mikroorganisme atau variabel yang di ujikan dapat beragam. Keuntungan dari metode mikrodilusi ini adalah mudah dilakukan, serta memberikan efektivitas dalam segi bahan dan tempat (Jorgensen dkk, 2009).

Sebelum dilakukan pengukuran, kedalam mikrotiter dilakukan penambahan Krisal violet untuk pembacaan biofilm. Kristal violet adalah salah satu metode yang banyak di gunakan untuk kemampuan dalam memberikan warna pada matriks polisakarida. Kristal violet adalah pewarnaan dasar bagi

bakteri dan eksopolisakarida pada matriks biofilm (Pantanella *et al*, 2013). Prinsip dari pewarnaan ini yaitu adanya ikatan ion antara komponen seluler bakteri dengan senyawa dari pewarna yang biasa disebut dengan kromogen (Volk & Wohler, 1984).

Pengukuran nilai degradasi dilakukan dengan menggunakan alat *ELISA reader* dengan panjang gelombang 630nm. Hasil pengukuran kemudian di hitung menggunakan rumus persen degradasi biofilm sehingga didapatkan nilai degradasi biofilm.

Berdasarkan hasil persentase degradasi biofilm, terdapat hubungan antara dosis dengan peningkatan degradasi biofilm. Dosis yang digunakan pada penelitian ini yaitu 3mg, 6mg, 9mg, 12mg, dan 15mg. Dosis ini digunakan sebagai acuan dari penelitian sebelumnya yaitu pada penelitian Kamelia (2018), menurut penelitiannya dosis fraksi etil asetat yang telah memberikan efek hambatan yaitu dimulai pada dosis 3mg hingga 15mg. Pada dosis terendah yaitu 3mg fraksi etil asetat sudah memberikan efek degradasi biofilm dan meningkat seiring dengan peningkatan dosis hingga dosis tertinggi yaitu 15mg. Pada bakteri dengan perlakuan lama inkubasi satu jam memberikan efek peningkatan persentase degradasi biofilm, begitu pula dengan perlakuan lama inkubasi dua jam yang memberikan efek peningkatan persentase degradasi biofilm. Pemberian perbedaan perlakuan lama inkubasi ini ditunjukkan untuk mengetahui waktu efektif dalam mendegradasi biofilm yang dapat dikembangkan untuk penelitian lebih lanjut.

Dari hasil analisis statistik korelasi Spearman, diperoleh signifikansi kurang dari 0,05 ($p < 0,05$) yang menunjukkan bahwa terdapat hubungan yang

bermakna pemberian dosis dengan persentase degradasi biofilm pada bakteri dengan perlakuan lama inkubasi 1 jam, dan menunjukkan tidak terdapat hubungan yang bermakna pada pemberian dosis dengan persentase degradasi biofilm pada bakteri dengan perlakuan lama inkubasi 2 jam karena hasil signifikansi lebih dari 0,05 ($p < 0,05$). Untuk analisis korelasi pada uji koloni, menunjukkan bahwa terdapat hubungan antara pemberian dosis dengan jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada lama inkubasi 1 jam, tetapi tidak terdapat hubungan yang bermakna untuk lama inkubasi 2 jam. Pada hasil uji *Paired T-Test* didapatkan signifikansi kurang dari 0,05 ($p < 0,05$) antara lama inkubasi 1 jam dan 2 jam dengan persentase degradasi yang terjadi yang menunjukkan terdapat perbedaan bermakna antara lama inkubasi 1 jam dan 2 jam dengan persentase degradasi biofilm, sedangkan untuk perbedaan lama inkubasi 1 jam dan 2 jam dengan jumlah koloni, tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara lama inkubasi 1 jam dan 2 jam dengan jumlah koloni.

Pada penelitian yang telah dilakukan Mutmainah dkk (2018), efektivitas ekstrak etanol *Mimosa pudica* terhadap pembentukan biofilm bakteri *Staphylococcus aureus* menunjukkan hasil bahwa adanya penurunan nilai rerata pembentukan biofilm dimulai pada konsentrasi 50 mg mL^{-1} dan meningkat seiring bertambahnya konsentrasi. Hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak maupun fraksi etil asetat memiliki efek antibiofilm baik dengan menghambat biofilm atau dengan mendegradasi biofilm yang terbentuk pada bakteri. Menurut penelitian Yuliandari (2015) yang juga menguji aktivitas degradasi biofilm dari sari buah belimbing wuluh untuk bakteri *P.aeruginosa* menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi ekstrak yang digunakan maka semakin kecil rerata dari absorbansi

biofilm atau yang mengartikan bahwa semakin besar konsentrasi maka semakin besar degradasi biofilm yang terjadi.

Menurut penelitian yang telah dilakukan oleh Kamelia (2018) fraksi etil asetat ekstrak etanol daun putri malu memiliki senyawa metabolit sekunder berupa flavonoid. Menurut Lee *et al* (2013) Ekstrak tanaman yang mengandung flavonoid berpotensi dapat menghambat *intercellular adhesion genes icA* dan *icaD* yang menjadi salah satu faktor pembentukan biofilm. Flavonoid juga dapat memiliki aktivitas dalam mendegradasi biofilm. Menurut Sabir (2005) dalam Kining dkk (2016) Mekanisme dari flavonoid sebagai agen untuk mendegradasi yaitu dengan cara gugus hidroksil yang terdapat pada struktur senyawa flavonoid membentuk senyawa kompleks dengan protein melalui ikatan hidrogen sehingga menyebabkan perubahan struktur protein dan asam nukleat. Perubahan struktur tersebut dapat menyebabkan protein penyusun eksopolisakarida terdenaturasi.

Setelah degradasi biofilm yang terjadi, penelitian ini menguji pertumbuhan jumlah koloni dari bakteri. Akibat dari adanya degradasi biofilm membuat bakteri terbebas dari biofilm sehingga bakteri akan bersifat planktonik dan diharapkan fraksi dapat membunuh bakteri. Hal ini sangat berhubungan antara degradasi biofilm dengan jumlah koloni bakteri, semakin besar degradasi biofilm maka semakin besar kemungkinan bakteri dapat mati akibat dari fraksi etil asetat.

Pengujian ini di tentukan dengan penilaian menggunakan skor. Hal ini dikarenakan sangat rapatnya koloni bakteri yang tumbuh pada *plate* sehingga tidak dapat dihitung menggunakan *colony counter*. *Plate* yang memiliki jumlah koloni sangat padat diberikan skor +6 sebagai nilai tertinggi dan *plate* yang memiliki jumlah koloni yang sangat tidak padat diberikan skor +1 sebagai nilai

terendah. Berdasarkan hasil yang didapatkan, fraksi etil asetat ekstrak etanol daun putri malu dapat menurunkan jumlah koloni bakteri pada inkubasi selama satu jam dan dua jam. Penurunan jumlah koloni bakteri karena adanya senyawa flavonoid yang dapat membunuh bakteri. Aktivitas flavonoid dalam membunuh bakteri yaitu dengan cara menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi membran sel dan menghambat metabolisme energi (Hendra *et al*, 2011). Mekanisme antibakteri dari flavonoid dengan menghambat sintesis asam nukleat adalah cincin A dan B yang memegang peranan dalam proses interkalasi atau ikatan hidrogen dengan menumpuk basa asam nukleat yang menghambat pembentukan DNA dan RNA. Flavonoid dapat menyebabkan kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri, mikrosom dan lisosom (Cushnie dan Lamb, 2005).

Mekanisme kerja flavonoid dalam menghambat fungsi membran sel adalah membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga merusak membran sel bakteri (Nuria *et al*, 2009). Mekanisme kerja flavonoid menghambat metabolisme energi yaitu dengan cara menghambat penggunaan oksigen oleh bakteri (Cushnie dan Lamb, 2005).

Selain dari flavonoid, terdapat alkaloid yang tertarik pada fraksi etil asetat. Alkaloid juga dapat memberikan aktivitas antibakteri. Mekanisme alkaloid sebagai antibakteri adalah sebagai interkalator DNA dan menghambat dari enzim topoisomerase pada sel bakteri (Karou, 2005). Selain itu, mekanisme alkaloid sebagai antibakteri adalah dengan mengganggu komponen penyusun dari peptidoglikan sel bakteri sehingga lapisan dinding sel yaitu peptidoglikan tidak terbentuk secara utuh dan mengakibatkan kematian sel (Darsana *et al*, 2012).

Penelitian ini memiliki keterbatasan, diantaranya yaitu pada perhitungan jumlah koloni bakteri. Pertumbuhan bakteri sangat rapat dan padat sehingga sulit untuk dilakukan perhitungan dengan menggunakan *colony* counter dan mengakibatkan hasil yang didapatkan tidak konsisten. Selain itu, tanaman yang digunakan berasal dari Batu Materia Medika sehingga apabila digunakan tanaman yang sama tetapi berasal dari daerah yang berbeda dapat memungkinkan mendapatkan hasil yang berbeda. Selain itu belum dilakukannya penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh stabilitas, kelarutan dan lama penyimpanan fraksi terhadap hasil yang didapatkan.

1.2 Implikasi Terhadap Bidang Kefarmasian

Penelitian ini didapatkan fraksi yang dapat mendegradasi biofilm dari bakteri MRSA yang dapat dikembangkan potensinya untuk dapat mengatasi masalah resistensi antibiotik dari MRSA akibat dari biofilm yang terbentuk pada bakteri dan dapat dikembangkan menjadi potensi pemurnian senyawa sehingga dapat digunakan dengan tepat.

BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan, disimpulkan bahwa:

- 7.1.1 Pemberian dosis fraksi etil asetat memiliki hubungan dengan degradasi biofilm yang terjadi. Semakin tinggi dosis yang diberikan maka semakin besar nilai degradasi yang diperoleh.
- 7.1.2 Pemberian dosis fraksi etil asetat memiliki hubungan dengan jumlah koloni bakteri. Semakin tinggi dosis yang diberikan maka semakin kecil jumlah koloni bakteri.
- 7.1.3 Adanya perbedaan perbandingan lama inkubasi satu jam dan dua jam dengan degradasi biofilm. Lama inkubasi yang menunjukkan degradasi biofilm yang tertinggi yaitu pada inkubasi 2 jam.
- 7.1.4 Tidak adanya perbedaan perbandingan lama inkubasi satu jam dan dua jam dengan jumlah koloni.

7.2 Saran

Saran untuk penelitian selanjutnya, mungkin dapat dilakukan pengenceran terlebih dahulu terhadap sampel sebelum dilakukan perhitungan uji koloni bakteri sehingga hasil dapat konsisten. Dapat dilakukan optimasi dosis dari senyawa murni yang didapatkan dari fraksi etil asetat ekstrak etanol untuk degradasi biofilm bakteri MRSA.

DAFTAR PUSTAKA

- Alfattah, M. 2015. *Uji Aktivitas Antibiofilm In Vitro Minyak Atsiri Herba Kemangi Terhadap Bakteri Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, dan Staphylococcus aureus*. Skripsi. UIN Syarifhidayatullah Jakarta, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan
- Almaraj, T., Ignacimuthu, S. 2007. *Hyperglycemic Effect of Leaves of Mimosa pudica Linn*. Department of Life Science, India
- Andreasen, C B. 2008. Staphylococcosis dalam Diseases of Poultry. 12th ed. Diedit Oleh Saif YM, Fadly AM, McDougald, Nolan, LK, Swayne DE USA : Blackwell Publishing p 892-896
- Archer N.K, M.J. Mazaitis, J.W. Conserton, J.G. Leid, M.E. Powes, M.E Shirliff. 2011. *Staphylococcus aureus* Biofilms Properties, Regulation and Roles in Human Disease. Landes Bioscience. *Virulence* 2:5, 445-459
- Arjuna A., Pratama W.P., Sartini., Mufidah. Uji Pendahuluan Anti-biofilm Ekstrak Teh Hijau dan Teh Hitam pada *Streptococcus mutans* melalui Metode *Microtitter Plate*. *Jurnal Farmasi Galenika*, 2018, 4 (1): 44 - 49
- Bhandari, M.M. Flora of the Indian Desert. Pbl. MPS Repros, Jodhpur, India: (1990). 136.
- Briao, G.V., Jahn, S.L., Foletto, E.L., Dotto, G.L. 2017. Adsorption of Crystal Violet Dye onto a Mesoporous ZSM-5 Zeolite Synthetized using Chitin as Template. *Journal of Colloid and Interface Science*. 08: 070
- Brussalaers N., Blot, S. and Vogelaers, D. Deep Seated Candida Infection in the Intention Care Unit. *Netherland Journal Critical Care*, 2011, 15(4) :184-190
- Can-ake, R., Gilda E. R., Filogonio, M.P., and Luis, M.P. 2004. *Bioactive terpenoids from roots and leaves of Jatropha gumeri*. *Rev Soc Quim Mex*. 48
- Caius, J.F. Medicinal and poisonous Legumes of India. Pbl. Scientific Publishers, Jodhpur, India: (1980). 174-177.
- Chen CJ & Huang YC. (2014). New epidemiology of Staphylococcus aureus infection in Asia. *Clin Microbiol Infect*. 20(7) : 605-606.
- Cihalova, K. Chudobova D., Michalek P., Moulick A., Guran R., Kopel P., et al. *Staphylococcus aureus* and MRSA Growth and Biofilm Formation after Treatment with Antibiotics and SeNPs. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16 24656-24672



- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; Approved Standard M02-A11. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Corte, L., Casagrande, D P., Tascini, C., Roscini, L., Cardinali, G. 2019. Biofilm Specific Activity: A Measure to Quantify Microbial Biofilm. *Microorganisms* 7:73
- Cushnie, T.P.Tim., Lamb, Andrew., 2005. Journal Antimicrobial Activity of Flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* Vol 26: 343-356.
- Dalimartha S. 2008. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia Jilid 2*. Jakarta : PT. Niaga Swadaya
- Daniela C, Giulia G, Vittorio M. *Review:An overview of Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus with a focus on developing countries*. *J Infect Dev Ctries* 2015; 9(6):547-550. doi:10.3855/jidc.6923
- Darsana, I., Besung, I., Mahatmi, H. 2012. Potensi Daun Binahong (*Anredera codifolia* (Tenore) steenis) dalam Menghambat Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli* secara In Vitro. *Indonesia Mediscus Veterinus*.
- Dewi, Z Y., Nur, A., dan Hertriani, T. Efek Antibakteri dan Penghambatan Biofilm Ekstrak Sereh (*Cymbopogon nardus* L.) Terhadap Bakteri *Streptococcus mutans*. *Majelis Kedokteran Gigi Indonesia*. 2015; 1(2):136-141
- Donlan, R M. Biofilms : Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*. 2002; Vol. 8 No. 9
- Dwiphraсто, I. Kebijakan Untuk Meminimalkan Risiko Terjadinya Resistensi Bakteri di Unit Perawatan Intensif Rumah Sakit. *JPMK*. 2005; 8 (4):177-81.
- Elliot T, Worthington T, Osman H, Gill M. 2014. *Mikrobiologi Kedokteran & Infeksi Ed 4*. Jakarta : EGC.
- Flemming H.C., Wingender, J.G., Mayer, C. 2000. *Physico-chemical Properties of Biofilms*. In : Evans LV, editor. *Biofilms : Recent Advances in Their Study and Control*. Amsterdam L Harwood Academic Publishers
- Gandhiraja N., Sriram S., Meena V., Srilakshmi k., Sasikumar C., Rajeshwari R.. Phytochemical Screening and Antimicrobial Activity of The Plant Extracts of *Mimosa pudica* L. Against Selected Microbes. *Ethnobotanical Leaflets*. 2009; 13: 618-24
- Gnanamani A., Hariharan P., and Satyaseela M. *Staphylococcus aureus*: Overview of Bacteriology, Clinical Disease, Epidemiology, Antibiotic Resistance and Therapeutic Approach. *Frontiers in Staphylococcus aureus In Tech*, 2017, 1(1): 1-28.

- Graham J.M., and Rickwood D. *Subcellular Fractionation*, Oxford University Press, USA, 1997. P. 210-300
- Hanni, L E. 2016. *Modul Bahan Ajar Cetak Farmasi : Farmakognosi dan Fitokimia*. BPP SDM Kemenkes. Jakarta.
- Harborne JB. 1987. *Metode Fitokimia : Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan (Terjemahan Kosasih P dan Iwang S)*. Edisi 2. Bandung : Institut Teknologi Bandung
- Harborne JB, Baxter H. The handbook of natural flavonoids, Vols 1 and 2. Chichester, UK: John Wiley and Sons; 1999. Hayati, EK., Fasyah, AG., dan Sa'adah, L. 2010. Fraksinasi dan Identifikasi Senyawa Tanin pada Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L). *Alchemy*, 4(2): 193 – 200.
- Hendra, R., Ahmad, S., Sukari A., Shukor, MY., Oskouelan E. 2011. Flavonoid Analyses and Antimicrobial Activity of Various Parts of *Phaleria macrocarpa* (Scheff). Boerl Fruit. *Intr. J Mol Sci* Vol 12: 3422-3431
- Homenta, Heriyannis. Infeksi Biofilm Bakterial. *Jurnal e-Biomedik (eBm)*, 2016, Volume 4 (1).
- Hussain, M., Wilcox, M.H., White, P.J. The Slime of Coagulase-negative Staphylococci : Biochemistry and Relation to Adherence. *FEMS Microbiol Rev*, 1993, Vol 104.
- Ijong, FG. 2015. *Mikrobiologi Perikanan dan Kelautan*. Jakarta : Rineka Cipta
- ITIS (Integrated Taxonomic Information System). 2017. Taxonomic Hierarchy: *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus*, (Online), (<http://www.itis.gov>, diakses 23 Januari 2019).
- Jawetz, E., J.L. Melnick, E.A. Adelberg, G.F. Brooks, J.S. Butel, and L.N. Ornston. 1995. *Mikrobiologi Kedokteran*. (Diterjemahkan Nugroho dan R.F. Maulany). Edisi ke-20. Penerbit Buku Kedokteran EGC., Jakarta.
- Jayani, E.F.Y. 2007. *Morfologi, Anatomi, dan Fisiologi Mimosa pudica L*. Jakarta : Tanaman Obat Indonesia
- Jorgensen, J.H., Ferraro, M.J. 2009. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. *Clinical Infectious Disease* 49 :1749-55
- Joseph JP, Meddows TR, Webster DP, Newton JD, Myerson SG, Prendergast B, Scarborough M, Herring N. 2013. Prioritizing echocardiography in *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *J Antimicrob Chemother* 68:444–449.

- Kamelia, Nilna J. 2018. *Aktivitas Antibakteri Fraksi Ekstrak Etanol Daun Putri Malu (Mimosa pudica) Terhadap Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Secara In Vitro*. Skripsi. Fakultas Kedokteran. Universitas Brawijaya
- Karimela, E J., Ijong, F G., Dien, H A. Karakteristik *Staphylococcus aureus* yang Diisolasi dari Ikan Asap Pinekhe Hasil Olahan Tradisional Kabupaten Sangihe. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 2017 Volume 20 Nomer 1
- Karou, D., Savadogo, A., Canini, A., Saydou, Y., Monstesano, C., Simpoire, J., et al. 2005. Antibacterial Activity of Alkaloids from *Sida Acuta*. *African Journal of Biotechnology* 4(12):1452-1457.
- Kemalaputri, D W., Nur J, S., Budiharjo, A. Deteksi MRSA (*Methicillin Resistant Staphylococcus aureus*) Pada Pasien Rumah Sakit Dengan Metode MALDI-TOF MS dan MULTIPLEX PCR. *Jurnal Biologi*, 2017; Volume 6 No.4 Hal. 51-61
- Khan, F., Shukla, I., Rizvi, M. 2010. Cefoxitin Disc Test as a Marker for Detecting Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* Isolates. *Journal of Pure and Applied Microbiology* Vol. 4 (2), p.831-835
- Kining, E. 2015. *Aktivitas Antibiofilm Ekstrak Air Daun Melinjo, Daun Singkong, dan Daun Pepaya terhadap Bakteri Pseudomonas aeruginosa secara In Vitro*. Thesis. Program Studi Biokimia, Institut Pertanian Bogor
- Kudva, I.T., Jelacic, S., Tarr, P.I., Youderian P., Hovde, C.J. Biocontrol of *Escherichia coli* O157 with O157-specific Bacteriophages. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999. Volume 65 : 3767 – 3773.
- Kurniawati, A FS., Satyabakti, P., Arbianti, N. 2015. Perbedaan Risiko *Multidrug Resistance Organisms* (MDROS) Menurut Faktor Risiko dan Kepatuhan *Hand Hygiene*. *Jurnal Berkala Epidemiologi*. Vol 3 No. 3 Halaman 277-289
- Lay, BW. 1994. *Analisa Mikroba di Laboratorium*. Jakarta : Raja Grafindo Persada
- Lee, J-H., J.H. Park, H.S. Cho, S.W. Joo, M.H. Cho, J. Lee. 2013. Anti-biofilm Activities of Quercetin and Tannic Acid Against *Staphylococcus aureus*. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*. Vol 29, Issue 5.
- Lestari, Dwi R S. 2017. *Potensi Antibakteri dan Antibiofilm Ekstrak Etanol Bunga Bintaro (Cerbera odolla) terhadap Staphylococcus aureus ATCC 6538*. Thesis. Fakultas Farmasi. Universitas Widya Mandala Katolik, Surabaya.
- Lewis K. 2001. *Riddle of Biofilm Resistance Animicrob Agents Chemotherapy* : 45, 999-1007.

- Liana, M. S., Abrar, Arfan., Merint. 2013. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat pada Usus Ayam Boiler. *Agripet* Vol (13) No. 1:43-48. Fakultas Pertanian Universitas Swiwijaya.
- Locke T, Keat S, Walker A, Mackinnon R. 2013. *Microbiology and Infectious Diseases on The Move*. Jakarta (ID): Penerbit Indeks.
- Liu, H., Zhao, Y., Zhao, D., Gong, T., Wu, Y., Han, H., *et al.* Antibacterial and Anti-biofilm Activities of Thiazolidione Derivatives Against Clinical *Staphylococcus strains*. *Emerging Microbes and Infections*. 2015, 4 doi:10.1038/emi.2015.1
- Mahmudah, R., Umiana, T S., Ekowati, C.N. Identifikasi Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pada Tenaga Medis dan Paramedis di Ruang Intensive Care Unit (ICU) dan Ruang Perawatan Bedah Rumah Sakit Umum Daerah Abdul Moeloek. *Medical Journal of Lampung University*, 2013, Vol. 2 no.4.
- Madigan, M T., Bender, K S., Buckley, Daniel H., Sattley W M., Stahl, David Allan.2008. *Biology Of Microorganisms*. San Francisco : Pearson.
- Mehingko L., Awaloei H., Wowor MP. Uji Efek Antimikroba Estrak Daun Putri Malu (*Mimosa pudica* Duchas & Walp) secara In Vitro. *Jurnal Biomedik*. 2010; 2(1): 44-49
- Molina, M., Contreras, C M., Tellez, Alcantara P. 1999. *Mimosa pudica* May Posseses Antidepressant Actions in The Rat. USA : Phytomedicine. Hal : 319-323.
- Murray, P. R., Baron, E. J., Pfaller, M. A., Tenover F. C., and Tenover, R. H. 1999. *Manual of Clinical Microbiology 7th Edition*. American Society for Microbiology. Washington DC. Pp. 284
- Mutmainah, Bq., Supnawadi., Ni Matuzahroh. 2018. Efektivitas Ekstrak Etanol *Mimosa pudica* L. Terhadap Pembentukan Biofilm *Staphylococcus aureus*. *Prosiding Seminar Nasional Pendidikan Biologi*.
- Ngo, B. E. 2004. Anticonvulsant Activity of *Mimosa pudica* Decoction. USA : Phytotherapia. Hal 309-314
- Nismawati., Sjahril, R, dan Agus R. 2018. Deteksi *Methicillin Resistent Staphylococcus aureus* (MRSA) Pada Rumah Sakit Universitas Hasanuddin dengan Metode Kultur. *Prosiding Seminar Nasional Megabiodiversitas Indonesia*. Gowa. Universitas Hasanuddin.
- Notobroto, H. 2005. *Penelitian Ekstperiental dalam Materi Praktikum Teknik Sampling dan Perhitungan Besar Sampel Angkatan III*, Lembaga Penelitian Universitas Airlangga, Surabaya.

- Nuria, M C., Faizaitun., A, Sumantri. 2009. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Jarak Pagar (*Jatropha curcas L*) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* Atcc25923, *Escherichia coli* Atcc 25922, dan *Salmonella typhi* Atcc 1408, Vol 2(6): 26-37
- Panche AN., Diwan AD., Chandra SR., Flavonoids : an overview. *Journal of Nutritional Science*.2016; 5(47): 1-10.
- Pantanella, F., Valenti, P., Natalizi, T. 2013. Analytical Techniques to Study Microbial Biofilm on Abiotic Surfaces : Pros and Cons of The Main Techniques Currently in Use. *Ann.Ig.*, 25:31-42.
- Paraje, M.G. 2011. *Antimicrobial resistance in biofilms*. Argentina. Formatex. Hal 736-744.
- Post, K. W. and Songer, GJ. 2005. *MICROBIOLOGY Bacterial and Fungal Agent of Animal Disease*. Elsevier Saunders: Philadelphia
- Potter, P. & AG, P., 2005. *Buku Ajar Fundamental Keperawatan: Konsep, Proses dan Praktek*. 4 ed. Jakarta: EGC
- Prakash B.M. Veeregowda and G. Krishnappa. 2003. *Biofilms: A Survival Strategy of Bacteri*. *Current Sci.*, 85: 1299-1307.
- Pratiwi, L., Fudholi, A., Martien, R., Pramono, S. 2016. Ethanol Extract, Ethyl Acetate Extract, Ethyl Acetate Fraction, and n-Heksan Fraction Mangosteen Peels (*Garcinia mangostana*) As Source of Bioactive Substance Free-Radical Scavengers. *Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research* 01 : 71-82
- Pratiwi, Sylvia T. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Jakarta : Erlangga
- Pujiatiningsih, A. S. 2014. Pemberian Ekstrak Putri Malu (*Mimosa pudica* Linn) Secara Oral Menurunkan Kadar Gula Darah Post Prandial Pada Tikus (*Rattus norvegicus*) Jantan Galur Wistar Prediabetes. Tesis. Pascasarjana. Universitas Udayana. Denpasar.
- Purbowati, Rini., Devi, E D R., Ama, F. Kemampuan Pembentukan Slime pada *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, MRSA dan *Escherichia coli*. *Jurnal Florea*, 2017, Volume 4 No. 2.
- Puspitasari, A D dan Prayogo, L S. 2017. Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi dan Sokletasi Terhadap Kadar Fenolik Total Ekstrak Etanol Daun Kersen (*Muntingia calabura*). *Jurnal Ilmiah Cendikia Eksakta*. Fakultas Farmasi : Universitas Wahid Hasyim Semarang
- Rahmi, Y., Darmawi., Abrar, M., Jamin, F., Fakhurrazi., dan Fahrimal, Y. Identifikasi Bakteri *Staphylococcus aureus* pada Preputium dan Vagina Kuda (*Equus caballus*). *Jurnal Medika Veterinaria*, 2015, Vol. 9 No. 2

- Rai, Ravishankar. 2013. *Microbial Biofilms and Their Control by Various Antimicrobial Strategies*. Departement of Studies in Microbiology, University of Mysore. India. Formate
- Reveny, J. 2011. Daya Antimikroba Ekstrak dan Fraksi Daun Sirih Merah (*Piper betle* Linn.). *Jurnal Ilmu Dasar*. Volume. 12, No. 1
- Rohrer S, B M., Rossi J, Bachi BB. 2003. *Mechanisms of methicillin resistance*. In: *Fluit AC, Schmitz FJ, editors. MRSA: Current perspectives*. Norfolk England : Caister Academic Press,; 31-54.
- Rustini., I S., dan Armin F. 2016. Penentuan Multi Drug Resisten *Pseudomonas aeruginosa* (MDRPA) yang Berasal dari Sampel Klinis Pasien RSUP DR. M Djamil Padang. *Prosiding Rakernas dan Pertemuan Ilmiah Tahunan Ikatan Apoteker Indonesia 2016* e-ISSN : 2541-0474
- Saifudin, Azis. 2014. *Senyawa Alam Metabolit Sekunder Teori, Konsep, dan Teknik Pemurnian*. Yogyakarta : Deepublish
- Sandasi, L CM., Viljoen, A.M. 2010. *The In Vitro Antibiofilm Activity of Selected Culinary Herb and Medical Plants Against Listeria Monocytogenes*, *Letters in Applied Microbiology* (50). Page : 30-35
- Savage GP. Saponins. In : Benjamin Caballero (ed). *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. 2nd edition. Oxford : Academic Press. 2003; p.5095-5098.
- Schwaber MJ., Carmeli Y..Mortality and Delay in Effective Therapy Associated With Extended-Spectrum Beta-Lactamase Production in Enterobacteriaceae Bacteraemia : A Systematic Review and Meta Analysis. *Journal Antimicrob Chemother*.2007; 60: 913-20.
- Sholeh, M Maftuchin. 2017. *Sitotoksitas, Aktivitas Antibakteri dan Antibiofilm Tanaman Biduri*. Skripsi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Insitut Pertanian Bogor
- Simoës M., Simoës L.C., Machado I., Pereira M.O., Vieira M.J. 2006. *Control of flow-generated biofilms using surfactants – evidence of resistance and recovery*. *Food and Bioproducts Processing* 84: 338–345.
- Smith J.L, Fratamico P.M, Novak J.S. 2004. Quorum sensing : a primer for food microbiologists. *Journal of Food Protection* 67 : 1053-1070.
- Smith, K., Perez, Ana., Ramage, Gordon., Lappin, David., Gemmell, Curtis G., Lang, Sue. *Biofilm formation by Scottish clinical isolates of Staphylococcus aureus*, 2017, pp. 1018–1023.
- Soeksamanto. 2010. Mahkota Dewa, *Phaleria macrocarpa* (Scheff) Boerl. (Thymelaceae) *Biodiversita*, 8 (2) : 92-95

- Stoodley, P., Sauer, K., Davies D.G., Costerton, J.W. 2002. *Biofilm as Complex Differentiated Communities*. Montana : Deprtement of Biology State Universiy of New York
- Taufan, S H., Tedja, I T., Herawati, S I., Hanafi, M. 2010. Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat Daun Tanaman Bandotan (*Ageratum conyzoides L.*). *Jurnal Ilmiah Ibnu Sina Volume 1(1) p 88-96*. Universitas Muhammadiyah Mataram. Mataram
- Tamashiro, E., Antunes, M.B., Palmer, J.N., Cohen, N.A., Anselmo-Lima, W.T. Implication of Bacterial Biofilms in Chronic Rhinosinusitis. *BJID* 2009; 13(3):232 – 5.
- Tamilrasi T., Ananthi T. 2012. Phytochemical Analysis and Anti Microbial Activity of *Mimosa pudica* Linn. *Research Journal of Chemical Sciences*.2012; 2(2): 72-74
- Tarver T. 2009. *Biofilms A Threat to Food Safety*. Page : 46-52 Available at: <http://www.ift.org> diakses desember 22, 2017.
- Valsala, S dan Karpagaganapathy, P R. 2004. *Effect of Mimosa pudica Root Powder on Oestrous Cycle and Ovulation in Cycling Female Albino Rat, Rattus norvegicus*. *Phytother Res*. Hal : 190-192
- Velasco, D., del Mar Tomas, M., Cartelle, M., Baceiro, A., Perez, A., Mollins, F., et al. 2005. Evaluation of Different Methods for Detecting Methicillin (oxacillin) resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 55, 379-382.
- Volk and Wheeler. 1984. *Mikrobiologi Dasar Edisi Kelima Jilid 1*. Jakarta : Erlangga
- Warna, Dwi Aju Fatmawati. Hubungan Biofilm *Streptococcus mutans* terhadap Resiko Terjadinya Karies Gigi. *Stomatognatic (J.K.G Unej)*, 2011, Volume 8(3): 127-130
- Wijayakusuma HMH. 2008. *Bebas penyakit ginjal dan saluran kemih*. Cetakan Pertama. Jakarta: Pustaka Bunda,.Hal.64.
- Yolazenia., J, Bestari, B., Irfandy, D. Biofilm Bakteri pada Penderita Rinosinusitis Kronis. *Jurnal Kesehatan Melayu*, 2018, Volume 1 No. 2
- Yuliandari, Rezky. 2015. *Uji Aktivitas Antibiofilm Sari Buah Belimbing Wuluh (Averrhoa bilimbi L) Terhadap Pseudomonas aeruginosa Secara In Vitro*. Skripsi. UIN Syarif Hidayatullah Jakarta. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan.
- Yurdakul, N E., Erginkaya, Z., and Unal, E. 2013. Antibiotic Resistance of *Enterococci*, coagulase negative *Staphylococci* and *Staphylococcus aureus* Isolated from Chicken Meat. *J. Food Sci.* 31(1):14 -19

Yuwono. Pandemi Resistensi Antimikrob: Belajar dari MRSA. *JKK*, 2010, No.1.





LAMPIRAN

Lampiran 1. Surat Determinasi Tanaman Putri Malu


PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR
DINAS KESEHATAN
UPT LABORATORIUM HERBAL MATERIA MEDICA BATU
 Jalan Lahor No.87 Telp. (0341) 593396
KOTA BATU 65313

Nomor : 074/388A/102.7/2019
 Sifat : Biasa
 Perihal : **Determinasi Tanaman Putri Malu**

Memenuhi permohonan saudara :

Nama : ABU HASAN ALFATAH
 NIM : 155070501114028
 Fakultas : FAKULTAS KEDOKTERAN, UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG

1. Perihal determinasi tanaman putri malu

Kingdom : Plantae (Tumbuhan)
 Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
 Super Divisi : Spermatophyta (Menghasilkan biji)
 Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
 Kelas : Dicotyledonae
 Bangsa : Rosales
 Suku : Mimosaceae/ Leguminosae
 Marga : Mimosa
 Jenis : *Mimosa pudica* L.
 Nama Daerah : Putri malu, si kejut, rebah bangun (Melayu); daun kaget, akan kaget (Sulawesi); si hirput, si kerput, si kajut, jujuk ancing (Sumatera); bujang kagik, jujuk boring, jobaragan, rondo kagit (Jawa); padang getap (Bali); *han xiu cau* (China).
 Kunci Determinasi : 1b-2b-3b-4b-6b-7b-9b-10b-11b-12b-13b-14a-15b-197b-208a-209b-210b-211a-214b-215b-216b-217b-218b-1b-6a-5-1a

2. Morfologi : Herba memanjat berbunga satu setengah perdu, tinggi 0.3-1.5 m. Batang dengan rambut sikat, menoreh miring ke bawah, berdiri menempel. Daun tersebar menyirip rangkap, penumpu bentuk lanset, daun pada sentuhan melipat ke diri. Bunga bonggol memanjang panjang 1-2.4 cm, menjadi satu, tangkai dengan rambut sepat. Kelopak bunga kecil bergerigi 4, tabung mahkota putih, bertaju 4, benang sari 4, warna ungu. Buah polong, pipih bentuk garis. Biji bulat pipih. Akar tunggang, kuat.

3. Nama Simplisia : *Mimosa pudica* Foliolum/ Daun Putri malu

4. Kandungan Kimia : Mimosin, tannin, asam amino, sterol, dan asam pikekolinat.

5. Penggunaan : Penelitian (Tugas Akhir).

6. Daftar Pustaka

- Anonim. <http://www.plantamor.com/index.php?plant=854>, diakses 15 desember 2010.
- Syamsuludayat, Sri Sugati dan Johny Ria Hutapea. 1991. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia 1*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
- Tim Redaksi Agromedia. 2008. *Buku Pintar Tanaman Obat: 431 Jenis Tanaman Penggempur Penyakit*. Agromedia Pustaka, Jakarta.
- Van Steenis, CGGJ. 2008. *FLORA, untuk Sekolah di Indonesia*. Pradnya Paramita, Jakarta.

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

Batu, 14 Mei 2019
 Kepala UPT Lab. Herbal Materia Medica Batu


 Dr. Husin R.M., Ds., Apt., M.Kes.
 NRP. 1961110219031003

Lampiran 2. Perhitungan Rendemen Ekstrak Etanol 96% Daun Putri Malu

$$\% \text{ Rendemen Ekstrak Etanol} = \frac{\text{Berat akhir}}{\text{Berat awal}} \times 100\%$$

$$\begin{aligned} \% \text{ Rendemen Ekstrak Etanol} &= \frac{26,6585 \text{ gram}}{300 \text{ gram}} \times 100\% \\ &= 8,88 \% \end{aligned}$$

Lampiran 3. Perhitungan Rendemen Fraksi N-Heksana

$$\% \text{ Rendemen Fraksi N – Heksana} = \frac{\text{Berat akhir}}{\text{Berat awal}} \times 100\%$$

$$\begin{aligned} \% \text{ Rendemen Fraksi N – Heksana} &= \frac{2,0116 \text{ gram}}{20,0022 \text{ gram}} \times 100\% \\ &= 10,05\% \end{aligned}$$

Lampiran 4. Perhitungan Rendemen Fraksi Etil Asetat

$$\% \text{ Rendemen Fraksi Etil Asetat} = \frac{\text{Berat akhir}}{\text{Berat awal}} \times 100\%$$

$$\begin{aligned} \% \text{ Rendemen Fraksi Etil Asetat} &= \frac{1,8943 \text{ gram}}{20,0022 \text{ gram}} \times 100\% \\ &= 9,47\% \end{aligned}$$

Lampiran 5. Hasil *Optical Density* pada Inkubasi selama 1 Jam

Biozatic Indonesia

Plate No.: Biofilm MRSA 1 CutOff: 0 Test Mode: Plate Test
 WL1: 630 LP Range: 0 Test Doctor:
 WL2: None Determine Symbol: > Test Date: 2011-01-03

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0.5990	0.8760	0.9330	0.2840	0.3450	0.3500	0.5380	0.4950	0.3860	0.7000	0.5120	0.4440	Sample OD Result S/CO
B	0.2706	0.2964	0.3050	0.2343	0.2607	0.4045	0.2931	0.3639	0.2339	0.3113	0.3248	0.2350	Sample OD Result S/CO
C	0.2989	0.3733	0.2476	0.2178	0.2961	0.3296	0.2557	0.2724	0.3003	0.2776	0.2565	0.2804	Sample OD Result S/CO
D	0.2648	0.4098	0.3180	0.1761	0.3010	0.2651	0.1053	0.1821	0.2358	0.2267	0.2967	0.2243	Sample OD Result S/CO
F	0.1989	0.2886	0.3393	0.1519	0.1188	0.2010	0.1539	0.1222	0.1930	0.2107	0.2391	0.2469	Sample OD Result S/CO
F	0.1742	0.3924	0.2768	0.1270	0.1640	0.1547	0.1079	0.1462	0.2051	0.1624	0.2541	0.2766	Sample OD Result S/CO
G	0.0950	0.0721	0.0979	0.0625	0.0864	0.0878	0.0962	0.1183	0.0830	0.0751	0.1088	0.0745	Sample OD Result S/CO
H	0.1261	0.1057	0.1132	0.1072	0.1044	0.0883	0.1357	0.1176	0.1261	0.0944	0.1037	0.0730	Sample OD Result S/CO

Review Doctor: Jack

Review:

Report Time: 2011-01-03 09:36:46 PM

Lampiran 6. Hasil Optical Density pada Inkubasi selama 2 jam

Biozatic Indonesia

Plate No.: Biofilm MRSA 2 CutOff: 0 Test Mode: Plate Test
 WL1: 630 LP Range 0 Test Doctor:
 WL2: None Determine Symbol: > Test Date: 2011-01-03

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	5.0890	4.7190	5.4720	0.9570	0.7980	0.7800	1.8150	2.0810	1.2650	2.3680	2.1020	2.4400	Sample OD Result S/CO
B	0.4870	0.8281	0.7783	0.4125	0.4371	0.3985	0.3831	0.4756	0.4914	0.2941	0.6630	0.5625	Sample OD Result S/CO
C	0.4176	0.7779	0.5479	0.3382	0.3990	0.3874	0.2501	0.4197	0.4252	0.2441	0.5398	0.5306	Sample OD Result S/CO
D	0.3817	0.5559	0.5891	0.3448	0.4113	0.3650	0.1598	0.4870	0.3990	0.1912	0.5384	0.5048	Sample OD Result S/CO
E	0.3246	0.6097	0.5739	0.3016	0.4193	0.3932	0.1348	0.4648	0.4530	0.1495	0.5071	0.3223	Sample OD Result S/CO
F	0.3251	0.6635	0.5725	0.2692	0.2762	0.3930	0.1395	0.3942	0.4235	0.2391	0.5796	0.6953	Sample OD Result S/CO
G	0.2876	0.2327	0.2091	0.1392	0.1454	0.1392	0.0778	0.2071	0.1788	0.1866	0.2169	0.2724	Sample OD Result S/CO
H	0.1244	0.1318	0.1479	0.1120	0.1014	0.1168	0.1022	0.1361	0.1053	0.1504	0.1497	0.1170	Sample OD Result S/CO

Review Doctor: Jack

Review:

Report Time: 2011-01-03 09:35:14 PM

Lampiran 7. Hasil Absorbansi pada Bakteri Inkubasi 1 Jam

	Bakteri A		
	Absorbansi		
	r1	r2	r3
dosis 3mg	0.2706	0.2964	0.3050
dosis 6mg	0.2989	0.3733	0.2476
dosis 9mg	0.2648	0.4098	0.3180
dosis 12mg	0.1989	0.2886	0.3393
dosis 15mg	0.1742	0.3924	0.2768
kontrol	0.5990	0.8760	0.9330

	Bakteri B		
	Absorbansi		
	r1	r2	r3
dosis 3mg	0.2343	0.2607	0.4045
dosis 6mg	0.2178	0.2961	0.3296
dosis 9mg	0.1761	0.3010	0.2651
dosis 12mg	0.1519	0.1188	0.2010
dosis 15mg	0.1270	0.1640	0.1547
kontrol	0.2850	0.3450	0.3500

	Bakteri C		
	Absorbansi		
	r1	r2	r3
dosis 3mg	0.2931	0.3639	0.2339
dosis 6mg	0.2557	0.2724	0.3003
dosis 9mg	0.1053	0.1821	0.2458
dosis 12mg	0.1539	0.1222	0.1930
dosis 15mg	0.1079	0.1462	0.2051
kontrol	0.5380	0.4950	0.3860

	Bakteri D		
	Absorbansi		
	r1	r2	r3
dosis 3mg	0.3113	0.3248	0.2350
dosis 6mg	0.2776	0.2565	0.2804
dosis 9mg	0.2267	0.2967	0.2243
dosis 12mg	0.2107	0.2391	0.2469
dosis 15mg	0.1624	0.2541	0.2766
kontrol	0.7000	0.5120	0.4440

Lampiran 8. Hasil Absorbansi pada Bakteri Inkubasi 2 Jam

	Bakteri A		
	Absorbansi		
	r1	r2	r3
dosis 3mg	0.4870	0.8281	0.7783
dosis 6mg	0.4176	0.7779	0.5479
dosis 9mg	0.3817	0.5559	0.5891
dosis 12mg	0.3246	0.6097	0.5739
dosis 15mg	0.3251	0.6635	0.5725
kontrol	5.0890	4.7190	5.4720

	Bakteri B		
	Absorbansi		
	r1	r2	r3
dosis 3mg	0.4125	0.4371	0.3985
dosis 6mg	0.3382	0.3990	0.3874
dosis 9mg	0.3448	0.4113	0.3650
dosis 12mg	0.3016	0.4193	0.3932
dosis 15mg	0.2692	0.2762	0.3930
kontrol	0.9570	0.7980	0.7800

	Bakteri C		
	Absorbansi		
	r1	r2	r3
dosis 3mg	0.3831	0.4756	0.4914
dosis 6mg	0.2501	0.4197	0.4252
dosis 9mg	0.1598	0.4870	0.3990
dosis 12mg	0.1348	0.4648	0.4530
dosis 15mg	0.1395	0.3942	0.4235
kontrol	1.8150	2.0810	1.2650

	Bakteri D		
	Absorbansi		
	r1	r2	r3
dosis 3mg	0.2941	0.6630	0.5625
dosis 6mg	0.2441	0.5398	0.5306
dosis 9mg	0.1912	0.5384	0.5048
dosis 12mg	0.1495	0.5071	0.3223
dosis 15mg	0.2391	0.5796	0.6953
kontrol	2.3680	2.1020	2.4400

Lampiran 9. Perhitungan Persentase Degradasi Biofilm

$$\% \text{ Degradasi Biofilm} = \frac{\text{Nilai OD Kontrol Negatif} - \text{Nilai OD Fraksi}}{\text{Nilai OD Kontrol Negatif}} \times 100\%$$

$$\% \text{ Degradasi Biofilm} = \frac{0,5990 - 0,2706}{0,5990} \times 100\% = 54,8247 \%$$

Lampiran 10. Data Persentase Degradasi Biofilm 1 jam

		% Degradasi biofilm perlakuan 1 jam				
Bakteri		Dosis 3mg	Dosis 6mg	Dosis 9mg	Dosis 12mg	Dosis 15mg
A	replikasi 1	54.8247	50.1002	55.7930	66.7947	70.9182
	replikasi 2	66.1644	57.3858	53.2192	67.0548	55.2055
	replikasi 3	67.3098	73.4620	65.9164	63.6334	70.3323
	rerata	62.7663	60.3160	58.3095	65.8276	65.4853
	SD	6.9014	11.9533	6.7123	1.9047	8.9074
B	replikasi 1	17.7895	23.5789	38.2105	46.7018	55.4386
	replikasi 2	24.4348	14.1739	12.7536	65.5652	52.4638
	replikasi 3	-15.5714	5.8286	24.2571	42.5714	55.8000
	rerata	8.8843	14.5271	25.0738	51.6128	54.5675
	SD	21.4383	8.8805	12.7481	12.2584	1.8308
C	replikasi 1	45.5204	52.4721	80.4275	71.3941	79.9442
	replikasi 2	26.4848	44.9697	63.2121	75.3131	70.4646
	replikasi 3	39.4041	22.2021	36.3212	50.0000	46.8653
	rerata	37.1365	39.8813	59.9870	65.5691	65.7581
	SD	9.7183	15.7635	22.2293	13.6249	17.0343
D	replikasi 1	55.5286	60.3429	67.6143	69.9000	76.8000
	replikasi 2	36.5625	49.9023	42.0508	53.3008	50.3711
	replikasi 3	47.0721	36.8468	49.4820	44.3919	37.7027
	rerata	46.3877	49.0307	53.0490	55.8642	54.9579
	SD	9.5015	11.7722	13.1498	12.9458	19.9482

Lampiran 11. Data Persentase Degradasi Biofilm 2 jam

		% Degradasi biofilm perlakuan 2 jam				
Bakteri		Dosis 3mg	Dosis 6mg	Dosis 9mg	Dosis 12mg	Dosis 15mg
A	replikasi 1	90.4303	91.7941	92.4995	93.6215	93.6117
	replikasi 2	82.4518	83.5156	88.2200	87.0799	85.9398
	replikasi 3	85.7767	89.9872	89.2343	89.5121	89.5376
	rerata	86.2196	88.4323	89.9846	90.0712	89.6964
	SD	4.0077	4.3528	2.2363	3.3065	3.8384
B	replikasi 1	56.8966	64.6604	63.9707	68.4848	71.8704
	replikasi 2	45.2256	50.0000	48.4586	47.4561	65.3885
	replikasi 3	48.9103	50.3333	53.2051	49.5897	49.6154
	rerata	50.3441	54.9979	55.2115	55.1769	62.2914
	SD	5.9662	8.3696	7.9483	11.5743	11.4462
C	replikasi 1	78.8926	86.2204	91.1956	92.5730	92.3140
	replikasi 2	77.1456	79.8318	76.5978	77.6646	81.0572
	replikasi 3	61.1542	66.3874	68.4585	64.1897	66.5217
	rerata	72.3974	77.4798	78.7506	78.1424	79.9643
	SD	9.7761	10.1235	11.5204	14.1977	12.9308
D	replikasi 1	87.5802	89.6917	91.9257	93.6867	89.9029
	replikasi 2	68.4586	74.3197	74.3863	75.8754	72.4263
	replikasi 3	76.9467	78.2541	79.3115	86.7910	71.5041
	rerata	77.6619	80.7552	81.8745	85.4510	77.9444
	SD	9.5809	7.9854	9.0462	8.9809	10.3666

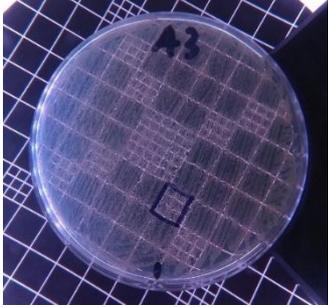
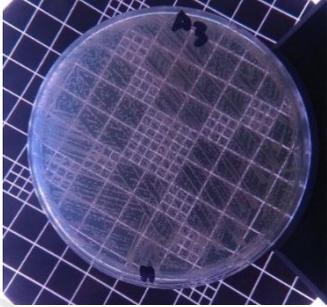
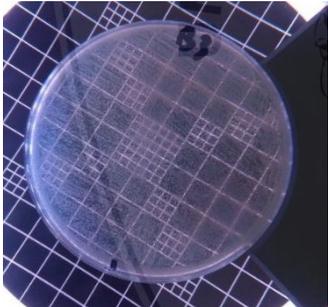
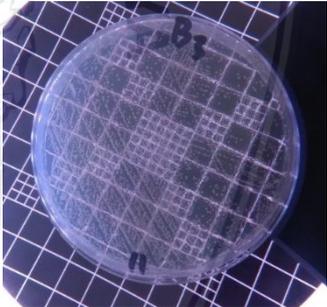
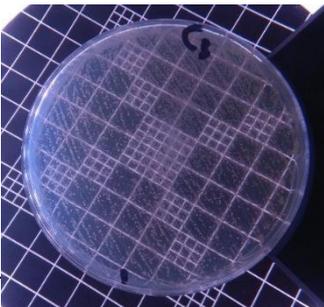
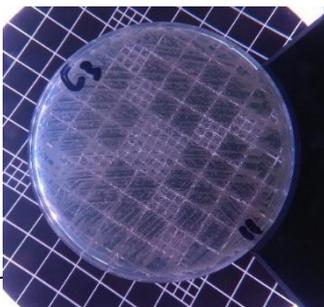
Lampiran 12. Nilai Persentase Degradasi Biofilm pada inkubasi selama 1 jam

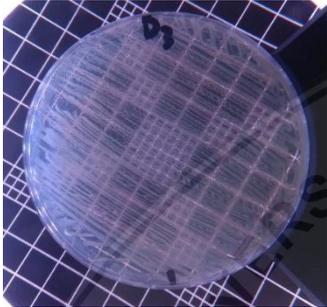
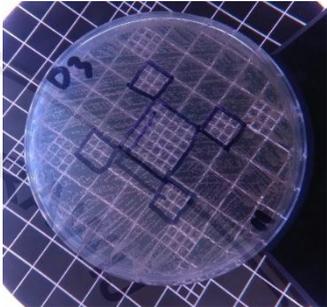
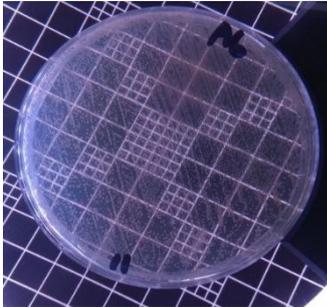
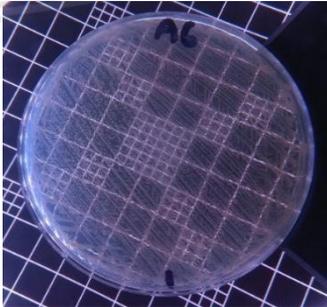
% degradasi biofilm perlakuan 1 jam					
Bakteri	3mg	6mg	9mg	12mg	15mg
A	62.7663	60.3160	58.3095	65.8276	65.4853
B	8.8843	14.5271	25.0738	51.6128	54.5675
C	37.1365	39.8813	59.9870	65.5691	65.7581
D	46.3877	49.0307	53.0490	55.8642	54.9579
rerata \pm SD	38.7937 \pm 22.5808	40.9388 \pm 19.4906	49.1048 \pm 16.2910	59.7184 \pm 7.1206	60.1922 \pm 6.2725

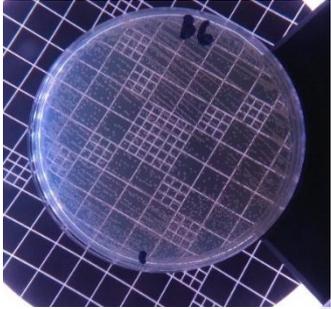
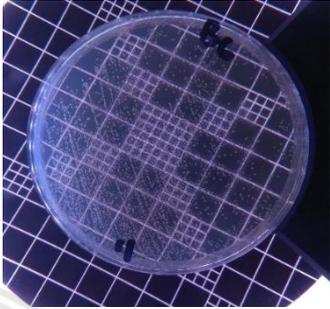
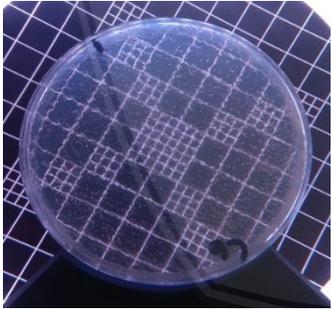
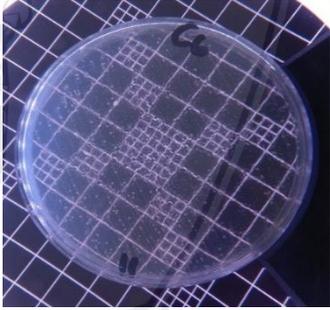
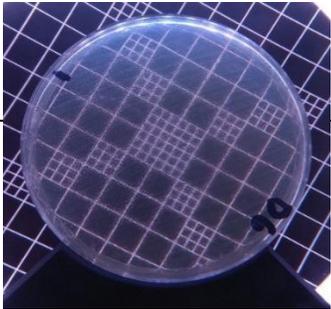
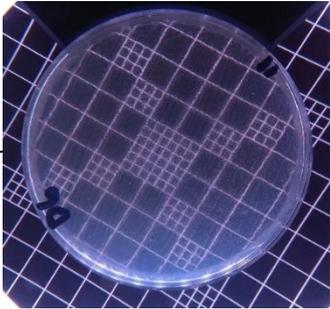
Lampiran 13. Nilai Persentase Degradasi Biofilm pada inkubasi selama 2 jam

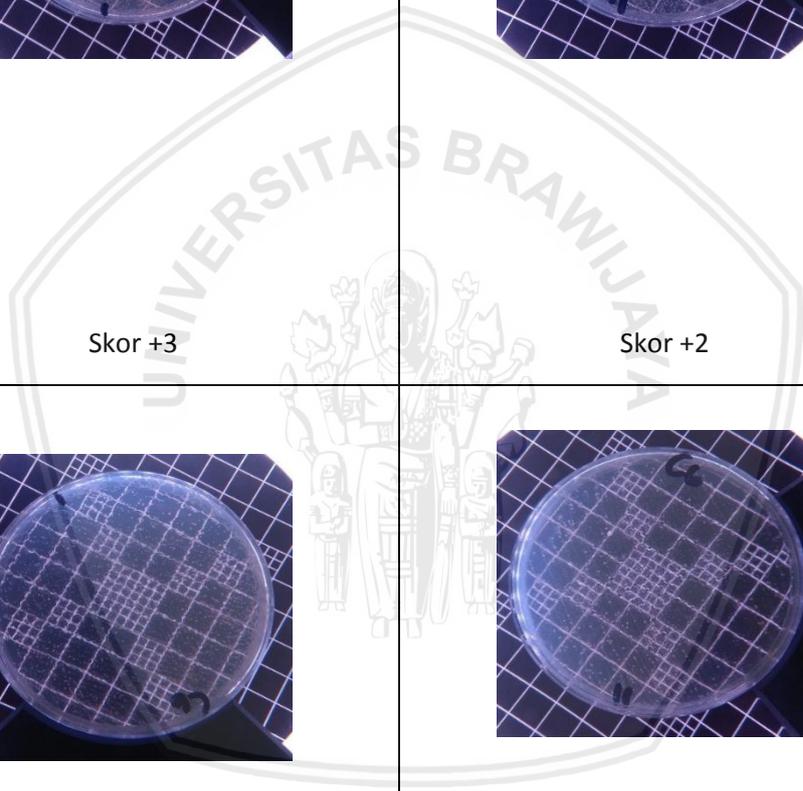
% degradasi biofilm perlakuan 2 jam					
Bakteri	3mg	6mg	9mg	12mg	15mg
A	86.2196	88.4323	89.9846	90.0712	89.6964
B	50.3441	54.9979	55.2115	55.1769	62.2914
C	72.3974	77.4798	78.7506	78.1424	79.9643
D	77.6619	80.7552	81.8745	85.4510	77.9444
rerata \pm SD	71.6558 \pm 15.3070	75.4163 \pm 14.3653	76.4553 \pm 14.9329	77.2104 \pm 15.4882	77.4741 \pm 11.3479

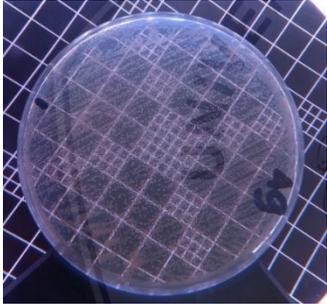
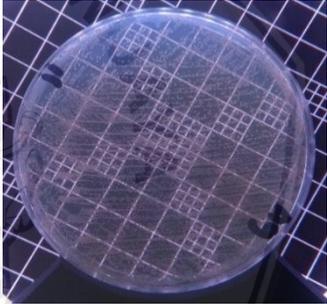
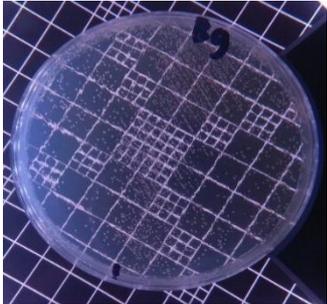
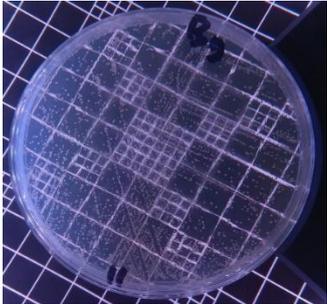
Lampiran 14. Uji Pertumbuhan Jumlah Koloni Bakteri

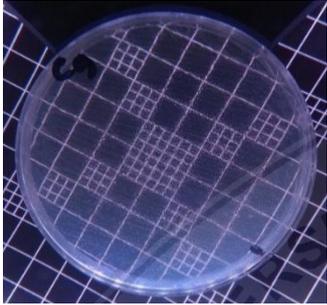
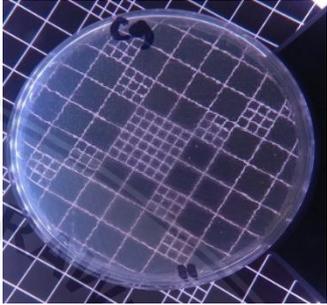
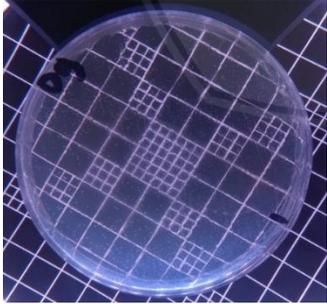
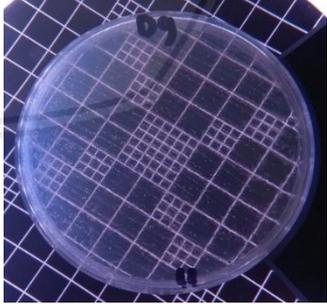
DOSIS 3mg 1 JAM INKUBASI	DOSIS 3mg 2 JAM INKUBASI
 <p data-bbox="507 972 603 1003">Skor +6</p>	 <p data-bbox="1042 972 1137 1003">Skor +5</p>
 <p data-bbox="507 1630 603 1662">Skor +5</p>	 <p data-bbox="1042 1630 1137 1662">Skor +2</p>
	

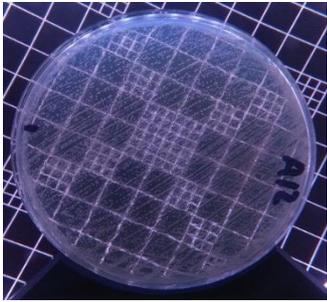
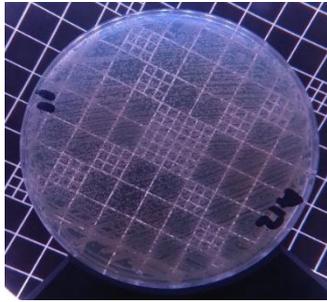
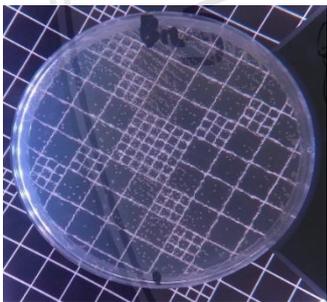
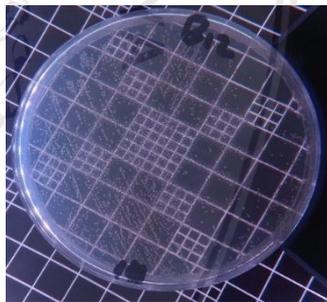
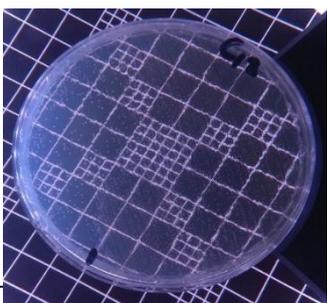
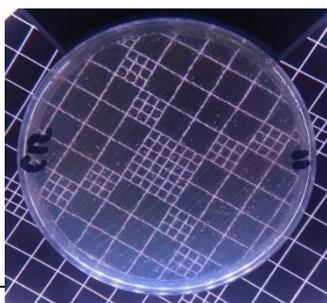
<p>Skor +6</p>	<p>Skor +6</p>
 <p>Skor +6</p>	 <p>Skor +5</p>
<p>DOSIS 6mg 1 JAM INKUBASI</p>	<p>DOSIS 6mg 2 JAM INKUBASI</p>
	

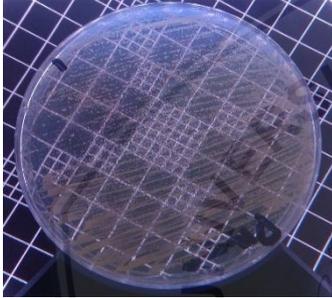
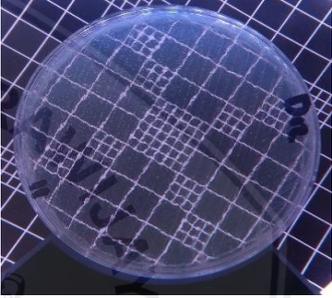
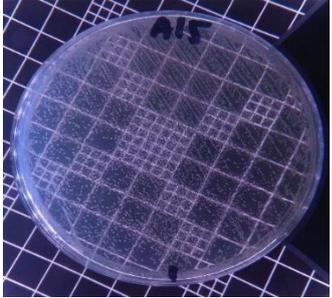
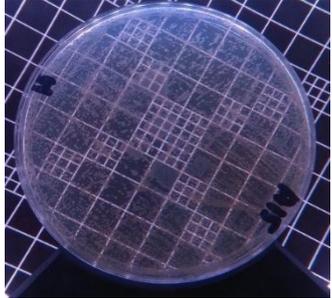
<p>Skor +5</p>	<p>Skor +4</p>
 <p>Skor +3</p>	 <p>Skor +2</p>
 <p>Skor +2</p>	 <p>Skor +2</p>
	

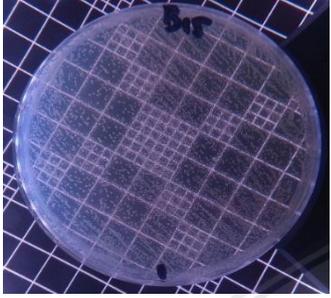
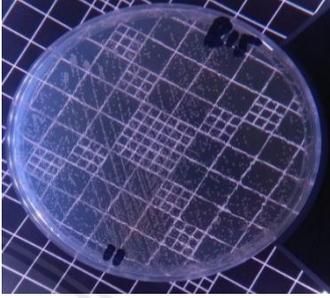
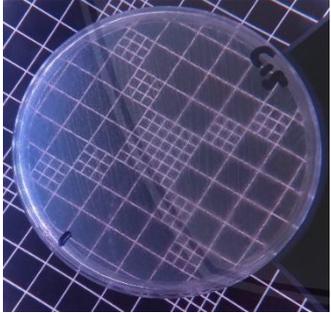
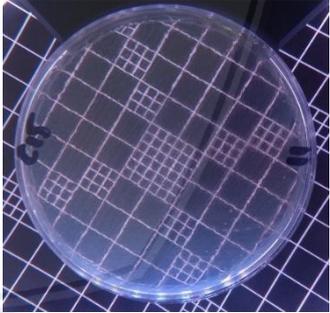
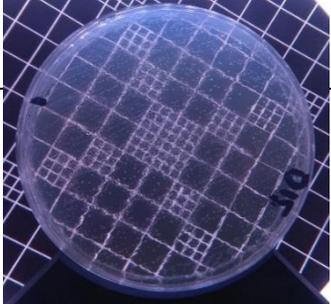
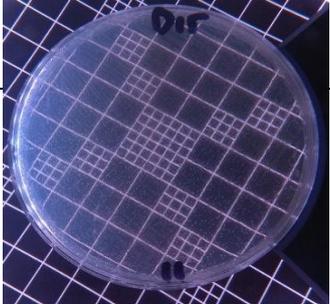


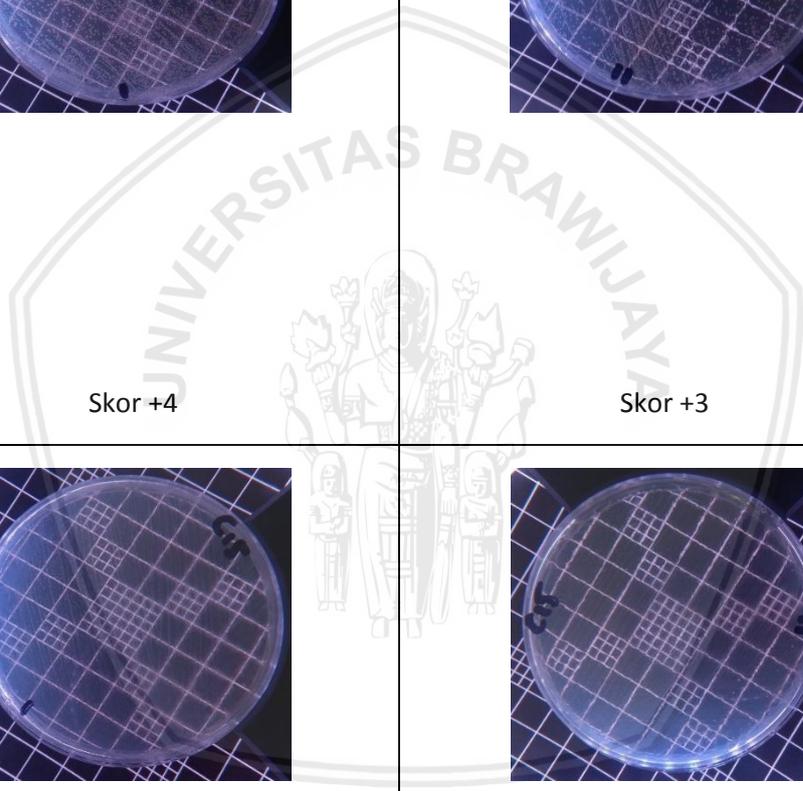
<p>Skor +4</p>	<p>Skor +4</p>
<p>DOSIS 9mg 1 JAM INKUBASI</p>	<p>DOSIS 9mg 2 JAM INKUBASI</p>
 <p>Skor +4</p>	 <p>Skor +4</p>
	

<p>Skor +2</p>	<p>Skor +2</p>
 <p>Skor +2</p>	 <p>Skor +2</p>
 <p>Skor +1</p>	 <p>Skor +2</p>

DOSIS 12mg 1 JAM INKUBASI	DOSIS 12mg 2 JAM INKUBASI
 <p data-bbox="507 965 603 999">Skor +4</p>	 <p data-bbox="1038 965 1134 999">Skor +4</p>
 <p data-bbox="507 1624 603 1657">Skor +2</p>	 <p data-bbox="1038 1624 1134 1657">Skor +1</p>
	

<p>Skor +1</p>	<p>Skor +1</p>
 <p>Skor +4</p>	 <p>Skor +1</p>
<p>DOSIS 15mg 1 JAM INKUBASI</p>	<p>DOSIS 15mg 2 JAM INKUBASI</p>
	

<p>Skor +2</p>	<p>Skor +2</p>
 <p>Skor +4</p>	 <p>Skor +3</p>
 <p>Skor +4</p>	 <p>Skor +4</p>
	



Skor +3	Skor +3
---------	---------

Lampiran 15. Penilaian Skor untuk Jumlah Koloni Bakteri

Bakteri	skoring jumlah koloni 1 jam				
	3mg	6mg	9mg	12mg	15mg
A	6	5	4	4	2
B	5	3	2	2	4
C	6	2	2	1	4
D	6	4	1	4	3
rerata	5.75	3.50	2.25	2.75	3.25
SD	0.50	1.29	1.26	1.50	0.96

Bakteri	skoring jumlah koloni 2 jam				
	3mg	6mg	9mg	12mg	15mg
A	5	4	4	4	2
B	2	2	2	1	3
C	6	2	2	1	4
D	5	4	2	1	3
rerata	4.50	3.00	2.50	1.75	3.00
SD	1.73	1.15	1.00	1.50	0.82

Lampiran 16. Analisis Data Statistik

Uji Korelasi Perlakuan Inkubasi 1 Jam

Correlations

		Dosis	Persen_degradasi
Spearman's rho	Correlation Coefficient	1.000	.426**
	Dosis Sig. (2-tailed)	.	.001
	N	60	60
Persen_degradasi	Correlation Coefficient	.426**	1.000
	Sig. (2-tailed)	.001	.
	N	60	60

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

Uji Korelasi Perlakuan Inkubasi 2 Jam

Correlations

		Dosis	Persen_degradasi
Spearman's rho	Correlation Coefficient	1.000	.142
	Dosis Sig. (2-tailed)	.	.278
	N	60	60
Persen_degradasi	Correlation Coefficient	.142	1.000
	Sig. (2-tailed)	.278	.
	N	60	60

Uji Korelasi Perhitungan Jumlah Koloni Inkubasi 1 Jam

Correlations

		Dosis	Skoring_koloni
Spearman's rho	Correlation Coefficient	1.000	-.509*
	Dosis Sig. (2-tailed)	.	.022
	N	20	20
Skoring_koloni	Correlation Coefficient	-.509*	1.000
	Sig. (2-tailed)	.022	.

N	20	20
---	----	----

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Uji Korelasi Perhitungan Jumlah Koloni Inkubasi 2 jam

		Dosis	Skoring_koloni
Spearman's rho	Correlation Coefficient	1.000	-.386
	Dosis Sig. (2-tailed)	.	.093
	N	20	20
	Correlation Coefficient	-.386	1.000
	Skoring_koloni Sig. (2-tailed)	.093	.
		N	20

Uji Paired T-Test Lama Inkubasi dengan Degradasi Biofilm

		Paired Differences				t	df	Sig. (2-tailed)	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower				Upper
Pair 1	Dosis_3mg1 - Dosis_3mg2	-32.8620750	13.8990855	4.0123204	-41.6931326	-24.0310174	-8.190	11	.000
Pair 2	Dosis_6mg1 - Dosis_6mg2	-34.4775333	8.8444858	2.5531831	-40.0970515	-28.8580152	-13.504	11	.000
Pair 3	Dosis_9mg1 - Dosis_9mg2	-27.3504917	8.3684434	2.4157615	-32.6675469	-22.0334364	-11.322	11	.000
Pair 4	Dosis_12mg1 - Dosis_12mg2	-17.4919417	15.0725339	4.3510658	-27.0685728	-7.9153105	-4.020	11	.002
Pair 5	Dosis_15mg1 - Dosis_15mg2	-17.2819417	10.3220525	2.9797199	-23.8402610	-10.7236224	-5.800	11	.000

Uji Paired T-Test Lama Inkubasi dengan Jumlah Koloni Bakteri

		Paired Differences				t	df	Sig. (2-tailed)	
		Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	95% Confidence Interval of the Difference				
					Lower				Upper
Pair 1	Dosis_3mg2 - Dosis_3mg1	-1.25000	1.25831	.62915	-3.25225	.75225	-1.987	3	.141
Pair 2	Dosis_6mg1 - Dosis_6mg2	.50000	.57735	.28868	-.41869	1.41869	1.732	3	.182
Pair 3	Dosis_9mg1 - Dosis_9mg2	-.25000	.50000	.25000	-1.04561	.54561	-1.000	3	.391
Pair 4	Dosis_12mg1 - Dosis_12mg2	1.00000	1.41421	.70711	-1.25033	3.25033	1.414	3	.252
Pair 5	Dosis_15mg1 - Dosis_15mg2	.25000	.50000	.25000	-.54561	1.04561	1.000	3	.391

