

UJI AKTIVITAS EKSTRAK DAUN MURBEI HITAM (*Morus nigra* L.) SEBAGAI ANTIBIOFILM *Klebsiella pneumoniae*

SKRIPSI

Oleh:

ALIF RAUDHAH HUSNUL KHOTIMAH

NIM. 16910026



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2020**

UJI AKTIVITAS EKSTRAK DAUN MURBEI HITAM (*Morus nigra* L.) SEBAGAI ANTIBIOFILM *Klebsiella pneumoniae*

SKRIPSI

Diajukan Kepada:
Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan
Universitas Islam Negeri
Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan Dalam
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran (S.Ked)

Oleh:

ALIF RAUDHAH HUSNUL KHOTIMAH

NIM. 16910026

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG
2020**

UJI AKTIVITAS EKSTRAK DAUN MURBEI HITAM (*Morus nigra* L.) SEBAGAI ANTIBIOFILM *Klebsiella pneumoniae*

SKRIPSI

Oleh:

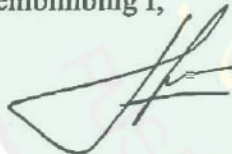
ALIF RAUDHAH HUSNUL KHOTIMAH

NIM. 16910026

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji:

Tanggal: 22 Mei 2020

Pembimbing I,



dr. Lailia Nur Rahma, M. Biomed
NIP. 19840623 201101 2 009

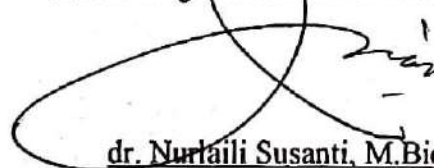
Pembimbing II,



dr. Yuliono Trika Nur Hasan, Sp. M
NIP. 19830702 20170101 1 121

Mengetahui,

Ketua Program Studi Pendidikan Dokter



dr. Nurtaili Susanti, M. Biomed
NIP. 19831024 201101 2 007

UJI AKTIVITAS EKSTRAK DAUN MURBEI HITAM (*Morus nigra* L.) SEBAGAI ANTIBIOFILM *Klebsiella pneumoniae*





SKRIPSI

Oleh:

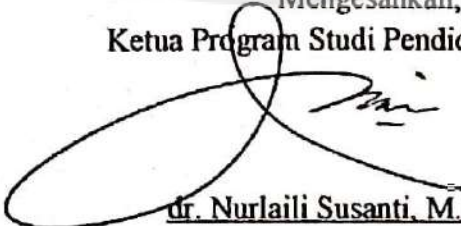
ALIF RAUDHAH HUSNUL KHOTIMAH

NIM. 16910026

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran (S.Ked)
Tanggal: 22 Mei 2020

Penguji Utama	<u>Dr. Zainabur Rahmah, S.Si, M.Si</u> NIDT. 1981020720 170101 2 122	
Ketua Penguji	<u>dr. Yuliono Trika Nur Hasan, Sp.M</u> NIP. 19830702 20170101 1 121	
Sekretaris Penguji	<u>dr. Lailia Nur Rahma, M.Biomed</u> NIP. 19840623 201101 2 009	
Penguji Integrasi Islam	<u>dr. Nurlaili Susanti, M.Biomed</u> NIP. 19831024 201101 2 007	

Mengesahkan,
Ketua Program Studi Pendidikan Dokter


dr. Nurlaili Susanti, M.Biomed
NIP. 19831024 201101 2 007

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Alif Raudhah Husnul Khotimah
NIM : 16910026
Program Studi : Pendidikan Dokter
Fakultas : Kedokteran dan Ilmu Kesehatan
Judul Penelitian : Uji Aktivitas Ekstrak Daun Murbei Hitam (*Morus nigra* L.)
sebagai Antibiofilm *Klebsiella pneumoniae*

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan data, tulisan, atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 19 Mei 2020

Yang membuat pernyataan,



Alif Raudhah Husnul Khotimah

NIM. 16910026

KATA PENGANTAR

Assalamualaikum warrahmatullahi wabarakatuh.

Puji syukur alhamdulillah penulis haturkan kehadiran Allah SWT atas limpahan Rahmat dan Hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan proposal skripsi dengan judul “Uji Efektivitas Ekstrak Daun Murbei Hitam (*Morus nigra* L.) sebagai Antibiofilm *Klebsiella Pneumoniae*”. Laporan proposal skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mengerjakan skripsi di Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

Selanjutnya penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak atas doa, harapan dan semangat yang telah diberikan sehingga penulis mampu melewati kesulitan dan hambatan dalam menyusun skripsi ini. Ucapan terima kasih ini penulis sampaikan kepada:

1. Prof. DR. H. Abd. Haris, M.Ag, selaku rektor UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. dr. Nurlaili Susanti, M. Biomed, selaku ketua Program Studi Pendidikan Dokter FKIK UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. dr. Lailia Nur Rahma, M. Biomed selaku dosen pembimbing 1 skripsi yang telah banyak memberikan pengarahan, masukan, perhatian, dan pengalaman yang berharga bagi penulis.
4. dr. Yuliono Trika Nur Hasan, Sp. M selaku dosen pembimbing 2 skripsi yang telah banyak memberikan perhatian, dukungan dan pengalaman selama penulis melakukan bimbingan skripsi.
5. Segenap sivitas akademika Program Studi Pendidikan Dokter, terutama seluruh dosen dan laboran, terima kasih atas segenap ilmu dan bimbingannya.
6. Ayahanda dan Ibunda tercinta yang senantiasa memberikan doa restu dan dukungan kepada penulis dalam menuntut ilmu dan menyelesaikan studi dengan baik.

7. Badrus Umam Syabana yang setia menemani dan memberi semangat dalam proses penulisan skripsi.
8. Teman-teman neonatus angkatan 2016 yang senantiasa membantu, memberi dukungan dan semangat selama proses pengerjaan skripsi ini.
9. Semua pihak yang turut serta dalam membantu dan memberi semangat penulis dalam menyelesaikan skripsi ini baik berupa materiil maupun moril.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini masih terdapat banyak kekurangan. Akan tetapi, penulis berharap skripsi ini dapat memberikan manfaat kepada para pembaca dan khususnya bagi penulis secara pribadi. *Aamiin Ya Rabbal Alamin.*

Wassalamualaikum warrahmatullahi wabaraktuh.

Malang, Mei 2020

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSETUJUAN	iii
HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI	iv
HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xvi
DAFTAR SINGKATAN	xvii
ABSTRAK	xviii
 BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.2.1 Rumusan Masalah Umum	5
1.2.2 Rumusan Masalah Khusus	5
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.3.1 Tujuan Umum	6
1.3.2 Tujuan Khusus	6
1.4 Manfaat Penelitian	6
1.4.1 Manfaat Akademik	6
1.4.2 Manfaat Aplikatif	6
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Pneumonia	8
2.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	10
2.2.1 Taksonomi <i>Klebsiella pneumoniae</i>	10

2.2.2 Karakteristik <i>Klebsiella pneumoniae</i>	11
2.2.3 Faktor Virulensi <i>Klebsiella pneumoniae</i>	11
2.2.4 Identifikasi Karakteristik <i>Klebsiella pneumoniae</i>	13
2.2.4.1 Uji Pewarnaan Gram	13
2.2.4.2 Uji Biokimia	14
2.2.4.2 Biakan Pada Medium Differensial	17
2.3 Biofilm	18
2.3.1 Mekanisme Pembentukan Biofilm	19
2.3.2 <i>Quorum Sensing</i>	22
2.3.3 Pembentukan Biofilm dan <i>Quorum Sensing K. pneumoniae</i>	24
2.3.4 Biofilm Sebagai Penyebab Resisntensi Antibiotik	25
2.3.5 Uji Pembentukan Biofilm	25
2.4 Tanaman Murbei Hitam	30
2.4.1 Taksonomi Murbei Hitam	30
2.4.2 Morfologi Murbei Hitam	31
2.4.3 Manfaat Daun Murbei Hitam	32
2.4.4 Mekanisme Antibiofilm Kandungan Senyawa Murbei Hitam	34
2.4.4.1 Tanin	34
2.4.4.2 Fenolik	35
2.4.4.3 Antosianin	36
2.4.4.4 Terpenoid	36
BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS	
3.1 Kerangka Konsep Penelitian	38
3.2 Hipotesis Penelitian	41
BAB IV METODE PENELITIAN	
4.1 Desain Penelitian	42
4.2 Tempat dan Waktu Penelitian	42
4.3 Populasi dan Sampel Penelitian	43
4.3.1 Populasi Penelitian	43

4.3.2 Sampel Penelitian	43
4.4 Variabel Penelitian	43
4.4.1 Variabel Bebas	43
4.4.2 Variabel Terikat	43
4.5 Pengulangan	43
4.6 Definisi Operasional	44
4.7 Kriteria Penelitian	46
4.7.1 Kriteria Inklusi	46
4.7.2 Kriteria Eksklusi	47
4.8 Alat dan Bahan Penelitian	47
4.8.1 Alat-alat Penelitian	47
4.8.2 Bahan Penelitian	47
4.8.2.1 Daun Murbei Hitam (<i>Morus nigra</i> L.)	47
4.8.2.2 Bahan Uji	48
4.8.2.3 Bakteri Uji	48
4.9 Prosedur Penelitian	48
4.9.1 Persiapan Daun Murbei Hitam	48
4.9.2 Pembuatan Ekstrak Daun Murbei Hitam	49
4.9.3 Uji Fitokimia Ekstrak Daun Murbei	49
4.9.3.1 Uji Flavonoid	49
4.9.3.2 Uji Triterpenoid	49
4.9.3.3 Uji Alkaloid	50
4.9.3.4 Uji Steroid	50
4.9.3.5 Uji Saponin	50
4.9.3.6 Uji Fenolik	50
4.9.3.7 Uji Tanin	51
4.9.4 Persiapan Larutan Ekstrak	51
4.9.5 Kultur <i>Klebsiella pneumoniae</i> pada Agar MacConkey	51
4.9.6 Persiapan Media Pertumbuhan Biofilm	52
4.9.7 Penyiapan Suspensi Bakteri Uji	52

4.9.8 Identifikasi Bakteri dengan Pewarnaan Gram	52
4.9.9 Identifikasi Bakteri dengan Uji Biokimia	53
4.9.9.1 Uji Biokimia pada media <i>Triple Sugar Iron Agar</i> (TSIA)	53
4.9.9.2 Uji Urease	54
4.9.9.3 Uji IMViC	54
4.9.10 Uji Pertumbuhan Biofilm	56
4.9.11 Uji Aktivitas Antibiofilm Murbei Hitam Terhadap Bakteri Uji	57
4.9.11.1 Uji Aktivitas Pencegahan Perlekatan Biofilm	57
4.9.11.2 Uji Aktivitas Penghambatan Pertumbuhan Biofilm	58
4.9.11.3 Uji Aktivitas Penghancuran Biofilm	59
4.10 Alur Penelitian	61
4.11 Analisis Data	62
 BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN	
5.1 Hasil	63
5.1.1 Determinasi Tanaman	63
5.1.2 Pembuatan Ekstrak	63
5.1.3 Uji Fitokimia	63
5.1.4 Karakterisasi <i>Klebsiella pneumoniae</i>	64
5.1.5 Hasil Uji Pertumbuhan Biofilm <i>Klebsiella pneumoniae</i>	66
5.1.6 Hasil Presentase Uji Aktivitas Antibiofilm Daun Murbei Hitam	67
5.1.6.1 Uji Pencegahan Perlekatan Biofilm <i>Klebsiella pneumoniae</i>	68
5.1.6.2 Uji Penghambatan Pertumbuhan Biofilm <i>Klebsiella pneumoniae</i> ...	69
5.1.6.3 Uji Penghancuran Biofilm <i>Klebsiella pneumoniae</i>	69
5.1.7 Hasil Analisis Data	70
5.1.7.1 Uji Normalitas dan Homogenitas	70
5.1.7.2 Uji <i>One Way Anova</i>	71
5.1.7.3 Uji <i>Post Hoc Tukey HSD</i>	72
5.1.7.4 Uji Korelasi <i>Pearson</i>	75
5.2 Pembahasan	78

5.3 Kajian Integrasi Islam dalam Uji Aktivitas Ekstrak Daun Murbei Hitam (*Morus nigra* L.) sebagai antibiofilm *Klebsiella pneumoniae* 95

BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan 101

6.2 Saran 101

DAFTAR PUSTAKA 102

LAMPIRAN112



DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Etiologi Pneumonia Nosokomial dan Komuniti	9
Tabel 2.2 Karakteristik genus <i>Enterobacteriaceae</i> pada Uji TSIA	17
Tabel 2.3 Karakteristik genus <i>Enterobacteriaceae</i>	17
Tabel 5.1 Hasil Uji Biokimia IMViC <i>K. pneumoniae</i>	65
Tabel 5.2 Hasil Uji Normalitas dan Homogenitas	71
Tabel 5.3 Hasil Uji <i>Post Hoc Tukey HSD</i> Pencegahan Perlekatan Biofilm	72
Tabel 5.4 Hasil Uji <i>Post Hoc Tukey HSD</i> Penghambatan Pertumbuhan Biofilm	73
Tabel 5.5 Hasil Uji <i>Post Hoc Tukey HSD</i> Penghancuran Biofilm	74

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Empat faktor virulensi klasik dan hipervirulen <i>K. pneumoniae</i>	13
Gambar 2.2 Karakteristik <i>Klebsiella pneumoniae</i>	14
Gambar 2.3 Morfologi koloni <i>K. pneumoniae</i> pada cawan agar <i>MacConkey</i>	18
Gambar 2.4 Struktur biofilm	19
Gambar 2.5 Proses pembentukan formasi biofilm	22
Gambar 2.6 Mekanisme <i>quorum sensing</i>	23
Gambar 2.7 Pertumbuhan bakteri penghasil biofilm dengan metode tabung	26
Gambar 2.8 Pertumbuhan bakteri penghasil biofilm pada <i>Congo Red Agar</i>	28
Gambar 2.9 Pembentukan biofilm bakteri pada <i>Tissue Culture Plate</i>	30
Gambar 2.10 Anatomi epidermis daun <i>Morus nigra</i> L.	32
Gambar 2.11 Cara kerja postulat terpena / terpenoid	37
Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian	38
Gambar 4.1 Prosedur Pewarnaan Gram	53
Gambar 4.2 Alur Penelitian	61
Gambar 5.1 Ekstrak kental daun murbei hitam (<i>Morus nigra</i> L.)	63
Gambar 5.2 Hasil uji fitokimia ekstrak kental daun murbei hitam	64
Gambar 5.3 Koloni <i>Klebsiella pneumoniae</i> pada media MCA (<i>Mac Conkey Agar</i>) dan pewarnaan gram <i>Klebsiella pneumoniae</i>	64
Gambar 5.4 Koloni <i>Klebsiella pneumoniae</i> pada media CRA (<i>Congo Red Agar</i>) berwarna hitam positif menghasilkan biofilm	66
Gambar 5.5 Uji pertumbuhan biofilm <i>K. pneumoniae</i>	67

Gambar 5.6 Presentase aktivitas antibiofilm daun murbei terhadap biofilm *K. pneumoniae* 68

Gambar 5.7 Uji aktivitas pencegahan perlekatan biofilm *K. pneumoniae* 68

Gambar 5.8 Uji aktivitas penghambatan pertumbuhan biofilm *K. pneumoniae* 69

Gambar 5.9 Uji aktivitas penghancuran biofilm *K. pneumoniae* 69



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Etik Penelitian	112
Lampiran 2. Determinasi Tanaman	113
Lampiran 3. Uji Fitokimia	114
Lampiran 4. Identifikasi Karakteristik Bakteri	115
Lampiran 5. Ekstraksi Daun Murbei Hitam (<i>Morus nigra</i> L.)	116
Lampiran 6. Pengujian Aktivitas Antibiofilm pada <i>Microplate</i>	117
Lampiran 7. Denah <i>Microplate</i> pada Uji Antibiofilm	118
Lampiran 8. Uji Pertumbuhan Biofilm <i>K. pneumoniae</i>	119
Lampiran 9. Uji Pencegahan Perlekatan Biofilm <i>K. pneumoniae</i>	120
Lampiran 10. Uji Penghambatan Pertumbuhan Biofilm <i>K. pneumoniae</i>	121
Lampiran 11. Uji Penghancuran Biofilm <i>K. pneumoniae</i>	122
Lampiran 12. Analisis Data Uji Pencegahan Perlekatan Biofilm <i>K. pneumoniae</i> ...	123
Lampiran 13. Analisis Penghambatan Pertumbuhan Biofilm <i>K. pneumoniae</i>	126
Lampiran 14. Analisis Data Uji Penghancuran Biofilm <i>K. pneumoniae</i>	129

DAFTAR SINGKATAN

AHL	: <i>Acyl Homoserine Lactone</i>
AI-2	: Auto Inducer-2
AMP	: <i>Antimicrobial peptides</i>
ANOVA	: <i>Analysis of variance</i>
CAP	: <i>Community-Acquired Pneumonia</i>
CPS	: <i>Capsular Polysaccharide</i>
CRA	: <i>Congo Red Agar</i>
EPS	: <i>Extracellular Polymeric Substances</i>
HAP	: <i>Hospital-Acquired Pneumonia</i>
ISK	: <i>Infeksi Saluran Kemih</i>
LPS	: <i>Lipopolysaccharide</i>
MBIC	: <i>Minimal Biofilm Inhibitory Concentration</i>
MIC	: <i>Minimum Inhibitory Concentration</i>
OD	: <i>Optical Density</i>
PBS	: <i>Phosphatase Buffer Saline</i>
QS	: <i>Quorum Sensing</i>
TCP	: <i>Tissue Culture Plate</i>
TSB	: <i>Trypticase Soy Broth/Tryptone Soya Broth</i>
TSIA	: <i>Triple Sugar Iron Agar</i>
UNICEF	: <i>United Nations Children's Fund</i>
VAP	: <i>Ventilator Associated Pneumonia</i>

ABSTRAK

Khotimah, Alif Raudhah Husnul. 2020. Uji Aktivitas Ekstrak Daun Murbei Hitam (*Morus nigra* L.) sebagai Antibiofilm *Klebsiella pneumoniae*. Skripsi. Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, Pembimbing: (I) dr. Lailia Nur Rahma, M.Biomed (II) dr. Yuliono Trika Nur Hasan, Sp.M.

Pneumonia merupakan masalah kesehatan dengan angka kematian yang tinggi, terutama *Ventilator Associated Pneumonia* (VAP). Penyebab terbanyak VAP adalah *Klebsiella pneumoniae*. Bakteri ini memiliki kemampuan membentuk biofilm kuat sehingga sulit untuk dieradikasi. Daun murbei hitam memiliki kandungan senyawa tannin, terpenoid, steroid dan antosianin yang dipercaya memiliki efek antibiofilm terhadap *K. pneumoniae*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas ekstrak daun murbei hitam sebagai pencegah perlekatan, penghambat pertumbuhan dan penghancuran biofilm *K. pneumoniae*. Metode yang digunakan adalah metode *tissue culture plate*. Perlakuan berupa penambahan ekstrak daun murbei hitam dengan konsentrasi 0,16 mg/ml, 0,08 mg/ml, 0,04 mg/ml, 0,02 mg/ml dan 0,01 mg/ml. Hasil penelitian dibaca menggunakan *microplate reader* dan diperoleh nilai *optical density* (OD). Hasil penelitian menunjukkan bahwa daun murbei hitam memiliki aktivitas pencegahan perlekatan, penghambatan pertumbuhan, dan penghancuran biofilm *K. pneumoniae* dengan aktivitas tertinggi pada konsentrasi berturut-turut yaitu 0,04 mg/ml, 0,04 mg/ml, dan 0,16 mg/ml. Presentase aktivitas antibiofilm pada konsentrasi tersebut berturut-turut yaitu 28,13%, 19,68% dan 25,70%. Hasil analisis data penelitian pada uji pencegahan perlekatan dan penghambatan pertumbuhan biofilm menunjukkan bahwa besar nilai *optical density* tidak dipengaruhi oleh besar konsentrasi ekstrak daun murbei hitam. Sedangkan, pada uji penghancuran biofilm besar nilai *optical density* dipengaruhi secara signifikan oleh besar konsentrasi ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra* L.).

Kata Kunci: *Morus nigra* L., biofilm, *optical density*, *Klebsiella pneumoniae*.

ABSTRACT

Khotimah, Alif Raudhah Husnul. 2020. Test Activity of Black Mulberry (*Morus nigra* L.) Leaf Extract as Antibiofilm *Klebsiella pneumoniae*. Thesis. Medical Study Program of the Faculty of Medicine and Health Sciences of the State Islamic University of Maulana Malik Ibrahim Malang, Advisor: (I) dr. Lailia Nur Rahma, M.Biomed (II) dr. Yuliono Trika Nur Hasan, Sp.M.

Pneumonia is a health problem with high mortality, especially Ventilator-Associated Pneumonia (VAP). The most common cause of VAP is *Klebsiella pneumoniae*. This bacterium can make strong biofilms that are difficult to eradicate. The black mulberry leaf contains tannin, terpenoids, steroids and anthocyanins which are believed to have an antibiofilm effect on *K. pneumoniae*. This study aims to study the activity of black mulberry leaf extract as attachment prevention, growth inhibition and destruction of *K. pneumoniae* biofilms. The method used is the tissue culture plate method. The treatments consisted of black mulberry leaf extract with a concentration 0.16 mg/ml, 0.08 mg/ml, 0.04 mg/ml, 0.02 mg/ml, and 0.01 mg/ml. The results of the study were read using a microplate reader and optical density (OD) values were obtained. The results showed that black mulberry leaves had activity against attachment, growth inhibition, and destruction of *K. pneumoniae* biofilms with the highest activity at concentrations 0.04 mg/ml, 0.04 mg/ml, and 0.16 mg/ml. The percentage of antibiofilm activity in these combinations was 28.13%, 19.68%, and 25.70%. The results of the analysis data on the attachment prevention and growth inhibition of biofilm showed that the value of optical density was not influenced by the large concentration of black mulberry leaf extract. Meanwhile, in the biofilm destruction test, the value of optical density was significantly affected by the large concentration of black mulberry leaf extract (*Morus nigra* L.).

Keywords: *Morus nigra* L., biofilm, optical density, *Klebsiella pneumoniae*.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pneumonia merupakan masalah kesehatan dengan angka kematian yang tinggi baik di negara maju maupun di negara berkembang. Pneumonia adalah penyakit infeksi saluran pernafasan yang menyebabkan peradangan pada parenkim paru. Infeksi berawal saat terjadi aspirasi organisme orofaring ke distal bronkus kemudian membentuk biofilm yang diikuti dengan proliferasi dan invasi bakteri pada parenkim paru. Biofilm yang dibentuk oleh suatu bakteri dapat melindungi bakteri tersebut dari proses fagositosis oleh sel-sel sistem imun tubuh manusia dan penetrasi antibiotik. Sehingga pada pasien pneumonia, asinus jaringan paru akan terisi dengan cairan berserta infiltrasi sel-sel radang yang masuk ke dalam alveoli dan rongga interstisium kemudian mengakibatkan asupan oksigen menjadi terbatas (Setiati *dkk*, 2014; Lebeaux *et al.*, 2014).

Pneumonia menjadi penyebab utama kematian pada balita di dunia. Pneumonia menyumbang sekitar 16 persen dari seluruh kematian anak dibawah 5 tahun. Diperkirakan sekitar 2.400 anak meninggal dunia setiap harinya akibat pneumonia (UNICEF, 2018). Sedangkan di Indonesia, angka kejadian pneumonia per 1000 balita yaitu sebesar 20,54%. Angka kematian pada bayi akibat pneumonia pada tahun 2017 lebih tinggi 2 kali lipat dibandingkan angka kematian pada anak usia 1 – 4 tahun (Kemenkes RI, 2018).

Pneumonia sebagian besar disebabkan oleh mikroorganisme meliputi virus, jamur dan bakteri. Berdasarkan tempat terjadinya infeksi, pneumonia dibagi menjadi pneumonia-masyarakat (*community-acquired pneumonia/CAP*) dan

pneumonia nosokomial (*hospital-acquired pneumonia/HAP*) (Rahajoe dkk, 2013). Salah satu mikroorganisme penyebab HAP adalah *Klebsiella pneumoniae*. Bakteri ini menduduki bakteri ketiga terbanyak penyebab HAP dengan presentase sebesar 15,2% dan penyebab terbanyak *ventilator associated pneumonia* (VAP) sebesar 22%. *Ventilator associated pneumonia* (VAP) merupakan bentuk infeksi nosokomial akibat adanya pembentukan biofilm bakteri yang paling sering terjadi di unit pelayanan intensif, khususnya pada penderita yang menggunakan alat ventilasi mekanik (Salukanan dkk, 2018).

Klebsiella pneumoniae adalah bakteri gram negatif yang termasuk dalam anggota famili *Enterobacteriaceae*. *K. pneumoniae* adalah bakteri anaerob fakultatif yang memiliki bentuk batang dan berukuran $2 \mu\text{m} \times 0,5 \mu\text{m}$ (Paczosa MK & Mecsas J, 2016). *K. pneumoniae* merupakan bakteri saprofit yang secara normal berada di permukaan mukosa tubuh manusia, termasuk saluran gastrointestinal dan orofaring. *K. pneumoniae* dapat ditemukan di lingkungan, tanah, permukaan air, dan pada perangkat medis (Rock C, et al., 2014). Namun saat ini, *K. pneumoniae* menjadi bakteri patogen oportunistik yang memanfaatkan penurunan fungsi kekebalan tubuh untuk menginfeksi tubuh manusia. *K. pneumoniae* dapat membentuk biofilm yang terbentuk dari matriks eksopolisakarida sehingga bakteri ini menjadi lebih virulen. Pembentukan biofilm ini diperantai oleh mekanisme komunikasi antar bakteri yaitu *Quorum Sensing* (QS) yang dimediasi oleh autoinducer-2 (AI-2) (Sun, S. et al., 2016).

Bakteri yang membentuk biofilm menyebabkan gagalnya terapi antibiotik. Hal ini karena antibiotik hanya dapat mengeliminasi bakteri dalam bentuk *planktonic* saja, sedangkan bakteri dalam bentuk biofilm akan tetap hidup dan terus

melepaskan koloni bakteri yang menyebabkan infeksi yang berulang. Setelah membentuk biofilm, bakteri dapat menghindar dari sistem kekebalan tubuh manusia. Hal ini menyebabkan upaya eradikasi *Klebsiella pneumoniae* menjadi semakin sulit (Patel, I. *et al.*, 2014).

Saat ini banyak penelitian yang berusaha mencari solusi untuk mencegah terbentuknya lapisan biofilm pada infeksi bakteri. Salah satunya dengan melakukan pemanfaatan bahan alam yang dipercaya memiliki potensi untuk mencegah terbentuknya biofilm dari bakteri patogen khususnya *Klebsiella pneumoniae*. Salah satu bahan alam yang diketahui memiliki potensi antibiofilm adalah murbei hitam (*Morus nigra* L.).

Murbei hitam (*Morus nigra* L.) adalah tanaman yang banyak dimanfaatkan sebagai obat. Murbei hitam memiliki kandungan senyawa bioaktif yang cukup banyak, terutama senyawa turunan fenolik. Hal ini membuat murbei hitam banyak dimanfaatkan sebagai pengobatan penyakit, antara lain diabetes mellitus, iritasi tenggorokan, kerusakan pada gigi, dan anemia (Khaira, 2018). Selain itu, daun murbei hitam dan bagian organ lainnya telah banyak digunakan secara farmakologis di dunia, terutama di China (Gundogdu *et al.*, 2011).

Morus nigra L. memiliki kandungan senyawa-senyawa yang dipercaya juga memiliki efek antibakteri dan antibiofilm terhadap *K. pneumoniae*. Beberapa penelitian sebelumnya telah melaporkan bahwa daun murbei hitam memiliki senyawa utama seperti flavonoid, polifenol, terpenoid, dan steroid (Andallu *et al.*, 2014; Taufiq *dkk*, 2016; Wutsqo, 2018; Aulifa, *et al.*, 2018). Hingga saat ini hanya ada penelitian yang meneliti khasiat antibakteri daun murbei hitam terhadap *K.*

pneumoniae akan tetapi belum ada yang meneliti khasiat antibiofilm daun murbei hitam (*Morus nigra* L.) terhadap biofilm *K. pneumoniae*.

Efek antibakteri *Morus nigra* L. telah dibuktikan oleh penelitian Souza *et al.*, (2017) dimana daun *Morus nigra* L. memiliki nilai *minimum inhibitory concentration* (MIC) terhadap *E. coli*, *K. pneumoniae*, dan *S. aureus* berturut-turut adalah <0.195 mg/ml, 0.390 mg/ml dan 12.50 mg/ml. Aulifa *dkk* (2015) meneliti tentang efek antibakteri batang, buah, dan daun *Morus nigra* L. terhadap *S. epidermidis* dan *P. acnes*. Sedangkan Ramadan *et al.*, (2017) meneliti efek antibakteri, antibiofilm dan aktivitas antitumor dari ekstrak etanol daun anggur dan mulberry terhadap *E. coli*, *S. aureus* dan *Ps. aeruginosa*.

Morus nigra L. memiliki kandungan senyawa terpenoid, fenolik, tanin dan antosianin yang memiliki kemampuan dalam menghambat pembentukan biofilm pada *K. pneumoniae*. Pada proses pembentukan biofilm, terpenoid mampu menghambat dua proses penting yaitu pengambilan oksigen dan fosforilasi oksidatif. Hal ini menyebabkan bakteri kekurangan oksigen untuk pertumbuhannya dan mengganggu proses terbentuknya biofilm (Mahizan *et al.*, 2019). Kemudian, senyawa fenolik juga dapat berinteraksi dengan protein bakteri dan struktur dinding sel sehingga membuat kerusakan membran sitoplasma, mengurangi fluiditas membran, menghambat sintesis asam nukleat, dan sintesis dinding sel (Daglia, 2011; Cushnie *et al.*, 2011; Gyawali *et al.*, 2014). Sedangkan pada proses maturasi biofilm, senyawa tanin berperan penting karena memiliki kemampuan menekan regulasi dari gen *pgaC* sehingga proses agregasi interseluler pada tahap maturasi biofilm terganggu dan siklus pembentukan biofilm pun terganggu (Chen *et al.*, 2014). Selain itu tannin juga menghambat enzim *reverse transkriptase* dan DNA

topoisomerase sehingga terjadi perubahan struktur protein yang membuat denaturasi dari EPS yang membuat biofilm terdegradasi (Nuria *dkk*, 2009; Kining *dkk*, 2016; Slobodníková *et al.*, 2016). Kemudian, senyawa antosianin diketahui dapat menghambat produksi AHL dan *quorum sensing* yang diatur fenotip seperti produksi EPS pada pembentukan biofilm *K. pneumoniae* (Gopu *et al.*, 2015).

Khasiat daun murbei hitam ini merupakan suatu bukti bahwa segala sesuatu yang telah diciptakan oleh Allah pasti mengandung manfaat. Seperti firman-Nya dalam Al Quran surat Asy Syu'ara ayat 7 sebagai berikut.

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿الشعراء : ٧﴾

Artinya: “Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, betapa banyak Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam pasangan (tumbuh-tumbuhan) yang baik?” (QS. Asy-Syu'ara': 7) (Dusturuna, 2018).

Berdasarkan ayat tersebut, Allah telah berfirman bahwa semua makhluk yang diciptakan Allah baik makhluk hidup maupun benda mati selalu memiliki manfaat yang melekat. Oleh karena itu penulis tertarik untuk melakukan penelitian terkait efek ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra* L.) sebagai pencegah perlekatan biofilm, penghambat pembentukan biofilm, dan penghancur biofilm *Klebsiella pneumoniae*.

1.2 Rumusan Masalah

1.2.1 Rumusan Masalah Umum

Bagaimanakah aktivitas ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra* L.) sebagai antibiofilm *Klebsiella pneumoniae*?

1.2.2 Rumusan Masalah Khusus

1. Bagaimanakah aktivitas ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra* L.) terhadap pencegahan perlekatan biofilm *Klebsiella pneumoniae*?

2. Bagaimanakah aktivitas ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra* L.) terhadap penghambatan pertumbuhan biofilm *Klebsiella pneumoniae*?
3. Bagaimanakah aktivitas ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra* L.) terhadap penghancuran biofilm *Klebsiella pneumoniae*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui aktivitas ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra* L.) sebagai antibiofilm *Klebsiella pneumoniae*.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengetahui aktivitas ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra* L.) dalam mencegah perlekatan biofilm *Klebsiella pneumoniae*.
2. Mengetahui aktivitas ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra* L.) dalam menghambat pembentukan biofilm *Klebsiella pneumoniae*.
3. Mengetahui aktivitas ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra* L.) dalam menghancurkan biofilm *Klebsiella pneumoniae*.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

Memberikan kajian informasi dalam pengembangan ilmu kesehatan mengenai manfaat ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra* L.) sebagai antibiofilm pada *Klebsiella pneumoniae*.

1.4.2 Manfaat Aplikatif

1. Penelitian ini dapat menjadi bahan pertimbangan dalam pemilihan bahan alam sebagai alternatif pengobatan pasien dengan infeksi *Klebsiella pneumoniae*.

2. Penelitian ini dapat bermanfaat sebagai sumber informasi pemanfaatan daun murbei hitam sebagai antibiofilm bakteri.



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Pneumonia

Pneumonia adalah penyakit infeksi saluran pernafasan bawah akut yang menyebabkan peradangan dari parenkim paru. Pada pneumonia, asinus jaringan paru terisi dengan cairan berserta infiltrasi sel-sel radang ke dalam alveoli dan rongga interstisium. Hal ini mengakibatkan asupan oksigen menjadi terbatas (Setiati *dkk*, 2014).

Pneumonia dapat dibagi menjadi dua berdasarkan tempat terjadinya infeksi, yaitu pneumonia komunitas (*Community-Acquired Pneumonia/CAP*) dan pneumonia nosokomial (*Hospital-Acquired Pneumonia/HAP*). Pneumonia komunitas terjadi saat infeksi berasal dari masyarakat/komunitas, yaitu penyakit dimulai dari luar rumah sakit atau setelah masuk rumah sakit dan mendapat diagnosis dalam kurun waktu kurang dari 48 jam. Sedangkan pneumonia nosokomial terjadi apabila infeksi terjadi di rumah sakit, yaitu dimulai 48 jam setelah pasien mendapat perawatan, baik di ruang rawat umum ataupun ICU tanpa pemakaian ventilator (Rahajoe *dkk*, 2013). Pada pneumonia nosokomial juga dikenal istilah *ventilator associated pneumonia* (VAP). VAP merupakan bentuk infeksi nosokomial akibat adanya pembentukan biofilm bakteri yang paling sering terjadi di unit pelayanan intensif, khususnya pada penderita yang menggunakan alat ventilasi mekanik (Salukanan *dkk*, 2018).

Pneumonia disebabkan oleh mikroorganisme meliputi virus, bakteri dan jamur, selain itu dapat disebabkan juga oleh aspirasi dan radiasi. Berdasarkan pada Buku Ajar Farmakoterapi Gangguan Saluran Pernapasan karangan Syamsudin dan Keban

(2013), penyebab tersering pada pneumonia nosokomial dan pneumonia komunitas berbeda seperti pada tabel berikut.

Tabel 2.1 Etiologi Pneumonia Nosokomial dan Komunitas

Sumber Infeksi	Etiologi
Nosokomial	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Komunitas	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Legionella pneumoniae</i> , <i>Haemophilus influenzae</i> , Adenovirus, Influenza tipe A, B, dan C.

(sumber: Syamsudin dan Keban, 2013)

Menurut Rahajoe *dkk* (2013), etiologi pneumonia pada neonatus dan bayi berbeda dengan anak yang lebih besar. Etiologi pneumonia pada neonatus dan bayi antara lain yaitu *Streptococcus grup B*, *E. coli*, *Pseudomonas sp*, atau *Klebsiella sp*. Sedangkan etiologi pneumonia pada balita sering disebabkan oleh *S. pneumoniae*, *H. influenzae tipe B*, dan *S. aureus*.

Menurut Setiati *dkk* (2014) dalam Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam, ada 3 faktor yang mempengaruhi patogenesis pneumonia, yaitu tingkat imunitas pasien, jenis mikroorganisme yang menginfeksi, dan interaksi dengan lingkungan. Pneumonia nosokomial terjadi saat patogen berasal dari inhalasi, aspirasi bahan orofaring, adanya kebocoran pada saluran endotrakeal, dan adanya kolonisasi patogen pada pipa endotrakeal yang berhasil mencapai trakea. Sehingga patogen dapat masuk ke dalam saluran nafas bagian bawah dan mengalami kolonisasi. Proses infeksi pneumonia terjadi setelah patogen berhasil melewati mekanisme pertahanan tubuh manusia, meliputi daya tahan humoral (antibodi dan komplemen), mekanik (epitel cilia dan mucus) dan seluler (polinuklear, leukosit, limfosit, makrofag dan sitokin). Patogen dapat berkolonisasi akibat proses terapi yang telah dilakukan dan berbagai

faktor internal pasien. Faktor tersebut antara lain yaitu adanya penyakit penyerta yang berat, tindakan bedah, pemberian antibiotik, obat-obatan lain dan tindakan invasif pada saluran pernafasan. Pneumonia juga dapat terjadi melalui mekanisme lain yaitu adanya pasasi bakteri pencernaan ke paru, penyebaran secara hematogen, dan akibat tindakan intubasi.

Pneumonia menimbulkan gejala klinis menyerupai infeksi secara umum, yaitu demam, sakit kepala, gelisah, malaise, penurunan nafsu makan, mual, muntah, diare, dan terkadang ditemukan gejala infeksi ekstrapulmoner. Selain itu pneumonia juga memiliki gejala lain akibat gangguan pada sistem pernapasan meliputi batuk, sesak nafas, retraksi dada, takipnea, nafas cuping hidung, *air hunger*, merintih, dan sianosis (Rahajoe *dkk*, 2013)

2.2 *Klebsiella Pneumoniae*

2.2.1 Taksonomi *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae termasuk dalam genus *Klebsiella* yang meliputi bakteri dengan ciri non-motil, gram negatif dan memiliki kapsul yang tebal. Berikut ini adalah taksonomi dari *K. pneumoniae* (Barr, 1977).

Kingdom	= Bacteria
Phylum	= Proteobacteria
Class	= Gammaproteobacteria
Order	= Enterobacteriales
Family	= Enterobacteriaceae
Genus	= <i>Klebsiella</i>
Species	= <i>Klebsiella pneumoniae</i>

2.2.2 Karakteristik *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae pertama kali dideskripsikan oleh Carl Friedlander pada tahun 1882 sebagai bakteri yang diisolasi dari paru-paru pasien yang meninggal karena pneumonia. Spesies *Klebsiella* banyak ditemukan di alam, termasuk pada tumbuhan, hewan, dan manusia. Mereka adalah agen penyebab beberapa jenis infeksi pada manusia, termasuk infeksi saluran pernapasan, infeksi saluran kemih (ISK), dan infeksi pada aliran darah (Martin & Bachman, 2018).

K. pneumoniae adalah bakteri gram negatif yang memiliki bentuk batang dan tidak menghasilkan spora. Bakteri ini berukuran 2 μm x 0,5 μm . termasuk dalam anggota famili *Enterobacteriaceae*. *K. pneumoniae* adalah bakteri patogen oportunistik yang memanfaatkan penurunan fungsi kekebalan tubuh untuk menginfeksi tubuh manusia (Paczosa MK & Meccas J, 2016).

K. pneumoniae tumbuh dengan baik pada suhu 37°C. Bakteri ini bersifat anaerob fakultatif. Bakteri dapat meragikan karbohidrat jika ditumbuhkan dalam keadaan anaerob. Sebaliknya bakteri akan menggunakan siklus asam trikarbositat dan sistem transport elektron untuk memperoleh energi jika ditumbuhkan dalam keadaan aerob. *K. pneumoniae* dapat mereduksi nitrat menjadi nitrit, tidak bisa mencairkan alginate, memiliki hasil tes oksidase negatif, dan menggunakan siklus *butanediol fermentative pathway* untuk meragikan glukosa (Maisonnauve, 2017).

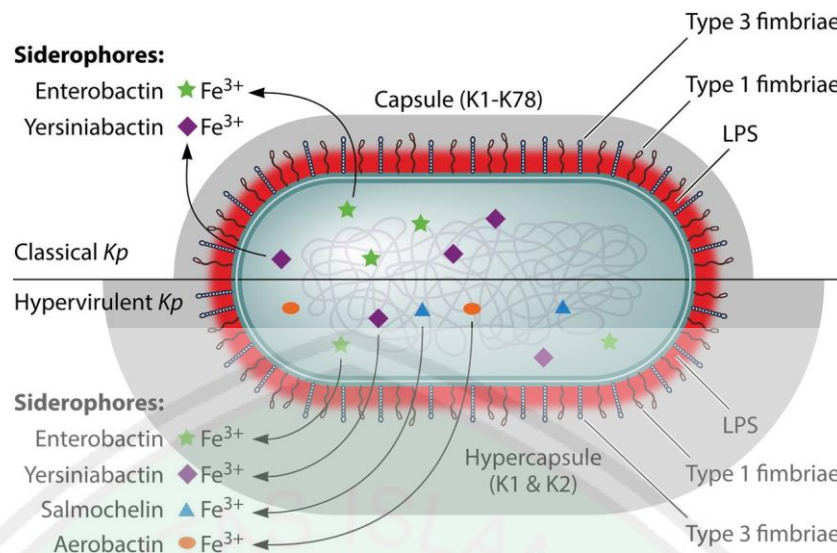
2.2.3 Faktor Virulensi *Klebsiella Pneumoniae*

K. pneumoniae memiliki faktor virulensi yang berkontribusi terhadap patogenesisnya yaitu lipopolisakarida (LPS), *capsular polysaccharide* (CPS), fimbriae (tipe 1 dan tipe 3), dan siderofor. LPS yang juga dikenal sebagai endotoksin adalah komponen utama sel membrane semua bakteri gram-negatif.

LPS suatu bakteri mengandung antigen lipid A, inti, dan O-polisakarida untuk menolak pembunuhan yang dimediasi oleh komplemen. Sedangkan CPS sebagai faktor utama virulensi *K. pneumoniae* adalah lapisan luar patogen yang mengandung sel polimorfonuklear, yang menciptakan resistensi terhadap fagositosis (Shakib *et al.*, 2018).

K. pneumoniae terkenal memproduksi 77 polisakarida kapsuler (antigen K) yang berbeda dan 8 tipe dasar antigen O. Antigen kapsul yang paling penting adalah K1 dan K2. Antigen K diakui sebagai faktor virulensi dan menunjukkan efek perlindungan dengan berkontribusi pada penghindaran mekanisme imunitas bawaan, seperti aksi *Antimicrobial peptides* (AMP). Antigen K merupakan antigen yang bertanggung jawab atas pembentukan biofilm pada koloni *K. pneumoniae*, meskipun masih sedikit informasi yang melaporkan hal ini (Benincasa *et al.*, 2016).

K. pneumoniae memiliki fimbriae tipe 1 dan 3 yang berperan sebagai faktor virulensi dan mediator penting sebagai struktur perekat saat proses adhesi. Fimbriae tipe 1 berbentuk tipis dan memiliki tonjolan seperti benang pada permukaan sel bakteri. *K. pneumoniae* menggunakan isyarat lingkungan untuk mengatur ekspresi dari tipe 1 fimbriae-nya. Gen fimbriae tipe 1 ini hanya diekspresikan dalam saluran kemih tetapi tidak dalam saluran GI atau paru-paru, sehingga memiliki peran penting dalam penyakit ISK. Fimbriae tipe 3 berbentuk filamen mirip helix serta dapat memediasi pengikatan pada sel trakea, sel-sel bukal, dan bagian-bagian paru. Fimbriae tipe 3 membantu *K. pneumoniae* dalam kolonisasi tabung endotrakeal dan infeksi paru-paru sehingga berperan penting dalam *ventilator associated pneumonia* (VAP) (Paczosa MK & Mecsas J, 2016).



Gambar 2.1 Empat faktor virulensi klasik dan hipervirulen *K. pneumoniae* (sumber: Paczosa MK & Mecsas J, 2016)

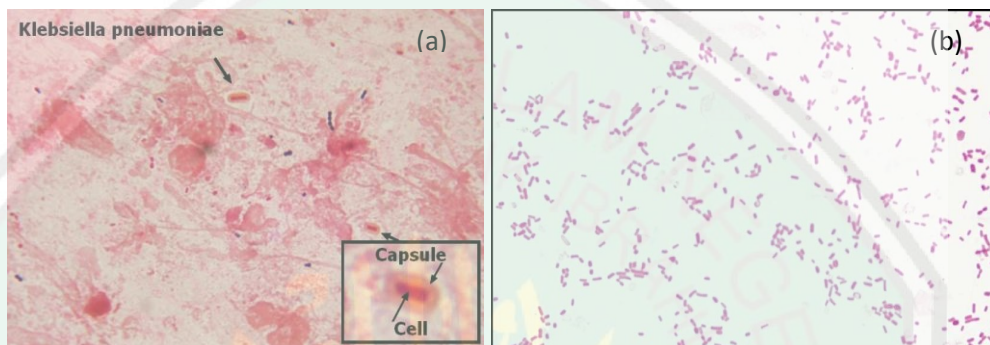
2.2.4 Identifikasi Karakteristik *Klebsiella pneumoniae*

2.2.4.1 Uji Pewarnaan Gram

Terdapat beberapa metode yang dapat dilakukan untuk mengidentifikasi suatu bakteri, yaitu pewarnaan gram, pewarnaan tahan asam dan pewarnaan kapsul. Pewarnaan gram adalah pewarnaan diferensial yang paling sering digunakan dalam identifikasi bakteri di laboratorium mikrobiologi. Sementara itu, salah satu metode untuk mengidentifikasi bakteri yang memiliki sifat tahan asam dikenal dengan pewarnaan tahan asam. Bakteri tahan asam adalah bakteri yang memiliki kandungan lemak yang sangat tebal sehingga harus diwarnai dengan pewarnaan tahan asam karena tidak bisa diwarnai dengan reaksi pewarnaan biasa. Sedangkan pewarnaan kapsul adalah teknik pewarnaan untuk mengetahui adanya kapsul pada tubuh suatu bakteri (Rahayu *dkk*, 2017).

Pewarnaan gram merupakan salah satu metode dalam pengamatan morfologi sel bakteri. Pada pewarnaan gram digunakan beberapa reagen untuk mewarnai bakteri. Setelah prosedur pewarnaan selesai, bakteri diamati pada

mikroskop. Apabila bakteri berwarna violet maka bakteri tersebut termasuk bakteri gram positif dan apabila bakteri berwarna merah maka termasuk bakteri gram negatif. Pada mikroskop juga dapat diamati bentuk sel bakteri termasuk batang (basil), bulat (coccus), ataupun bergelombang (spiral). *Klebsiella pneumoniae* berwarna merah, berukuran kecil dan berbentuk batang/basil. (Baban, 2017; Nurhidayati *dkk*, 2015)



Gambar 2.2 Karakteristik *Klebsiella pneumoniae*
(sumber: Baban, 2017)

Keterangan: (a) Gram stain dari spesimen sputum menampilkan kapsul yang melingkupi bacillus gram negatif (b) Pewarnaan gram dari spesimen urin dengan *Klebsiella pneumoniae*. Pewarnaan Gram dari kultur *MacConkey* positif menunjukkan basil gram negatif panjang berwarna merah hingga merah muda dengan pengaturan tidak beraturan dengan daya pembesaran tinggi (x1000).

2.2.4.2 Uji Biokimia

Uji biokimia bakteri adalah suatu perlakuan yang bertujuan untuk mendeterminasi dan mengidentifikasi suatu biakan murni bakteri hasil isolasi melalui sifat-sifat fisiologinya. Proses biokimia ini memiliki hubungan yang kuat dengan metabolisme sel. Sel menghasilkan energi dan menggunakan energy bertujuan untuk sintesis komponen dari sel dan untuk kegiatan seluler seperti bergerak, yang mana pada proses itu menghasilkan proses kimiawi (Rahayu *dkk*, 2017). Ada beberapa uji biokimia yang dapat dilakukan untuk

mengidentifikasi bakteri, yaitu antara lain *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), *Urea test*, dan *Indol, Methyl red, Voges Preskauer, Simmon's Citrate* (IMViC).

a. *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA)

TSIA adalah media differensial yang bisa mengidentifikasi suatu bakteri sesuai dengan karakter spesifik dari bakteri tersebut. Kandungan media TSIA meliputi 1% laktosa, 1% sukrosa, 0,1% glukosa, ekstrak jaringan (substrat pertumbuhan protein), ferosulfat (untuk mendeteksi produksi H₂S), dan indikator pH (fenol merah). Zat-zat tersebut dimasukkan dalam tabung reaksi sehingga menghasilkan agar miring dengan bagian pangkal yang dalam dan diinokulasi dengan menusukkan pertumbuhan bakteri ke dalam bagian pangkal. Apabila bakteri bersifat memfermentasikan glukosa maka bagian pangkal dan miring akan berubah warna kuning akibat asam yang dihasilkan. Bagian yang miring akan berubah menjadi alkalin (merah) apabila produk fermentasi dioksidasi menjadi CO₂ dan H₂O dan dilepaskan dari agar miring serta dekarbosisasi oksidatif protein masih berlanjut dengan pembentukan amino. *Klebsiella sp.* pada TSIA memberikan reaksi yaitu asam/asam berwarna kuning pada bagian pangkal dan miring, tidak dihasilkan H₂S dan dapat terdeteksi gas (Hart, 2004; Kusuma, 2013; Brooks *et al.*, 2015).

b. *Urea test*

Uji hidrolisis urea akan menunjukkan bakteri dapat menghasilkan enzim urease. Pertama, goreskan pembiakan sebanyak 1 ose pada permukaan agar miring. Setelah itu, inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°. Apabila menghasilkan warna merah muda maka hasil dinyatakan positif dan apabila

warna tidak berubah dinyatakan negatif. Pada pemeriksaan ini, *K. pneumoniae* akan menghasilkan nilai yang positif (Hart, 2004; Brooks *et al.*, 2015).

c. *Indol, Methyl red, Voges Preskauer, Simmon's Citrate* (IMViC)

Uji indol bertujuan untuk menilai pembentukan indol oleh bakteri dari triptopan sebagai sumber karbon. Apabila menghasilkan warna merah maka hasil positif dan apabila menghasilkan warna kuning maka hasil negatif. *K. pneumoniae* adalah bakteri dengan indol negatif (Hart, 2004).

Uji metil merah (*Methyl Red*) bertujuan untuk mendeteksi produksi asam kuat selama proses fermentasi glukosa. Apabila pada fermentasi glukosa memberikan warna merah dengan indikator metil merah maka terjadi pembentukan asam. Sedangkan Uji *Voges – Prokauer* (VP) bertujuan untuk menentukan organisme yang memproduksi dan mengelola asam serta fermentasi glukosa. Uji ini bisa menentukan bakteri yang menghasilkan produk netral (asetil metal karbinol atau aseton) dari hasil fermentasi glukosa dan menunjukkan kemampuan sistem buffer. *K. pneumoniae* menghasilkan warna merah yang memberikan hasil positif terhadap reaksi VP (Hart, 2004).

Uji *Simmon's Citrate* dimulai dengan melakukan inokulasi biakan dengan inokulum yang tipis pada media simmon sitrat agar, kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 35°. Apabila ada perubahan warna indikator dari hijau menjadi biru menunjukkan hasil positif. Hal ini bermakna bahwa pada medium sitrat pertumbuhan bakteri menghasilkan keadaan alkalis dan bakteri telah menggunakan sitrat. *K. pneumoniae* memberikan reaksi positif terhadap penggunaan sitrat (Hart, 2004; Gary W, 2016).

Tabel 2.2 Karakteristik genus *Enterobacteriaceae* pada Uji TSIA

Species	Alk/A gas	Alk/A no gas	A/A Gas	Alk/A H ₂ S	A/A H ₂ S
<i>Klebsiella</i>	-	-	+	-	-
<i>Escherichia</i>	+	+	+	-	-
<i>Enterobacter</i>	+	-	+	-	-
<i>Citrobacter</i>	+	-	+	+	+
<i>Serratia</i>	+	+	-	-	-
<i>Proteus</i>	-	-	-	+	+
<i>Shigella</i>	-	+	-	-	-
<i>Salmonella</i>	+	+	-	+	-

(sumber: Kusuma, 2013)

Tabel 2.3 Karakteristik genus *Enterobacteriaceae*

Species	Laktosa (asam)	Glukosa (gas)	Kapsul	Motilitas	Indol	VP	Sitrat	Urease
<i>Klebsiella</i>	+	+	+	-	-	+	+	+
<i>Escherichia</i>	+	+	-	+	+	-	-	-
<i>Enterobacter</i>	+	+	-	+	-	+	+	D
<i>Citrobacter</i>	+	+	-	+	D	-	+	D
<i>Serratia</i>	-	D	D	+	-	+	+	-
<i>Proteus</i>	-	+	-	+	+	-	D	+
<i>Shigella</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella</i>	-	+	-	+	-	-	-	-

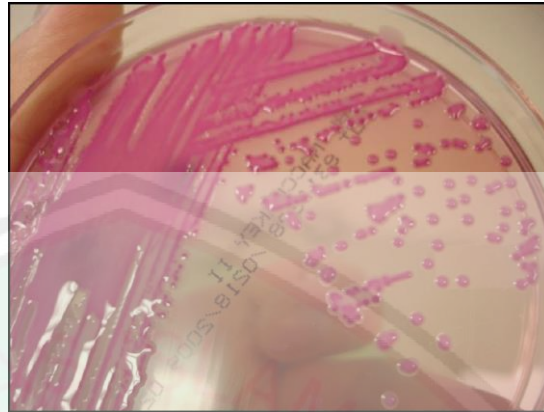
d = beberapa strain negatif, beberapa strain positif

(sumber: Kusuma, 2013)

2.2.4.3 Biakan Pada Medium Differensial

Secara khusus, famili *Enterobacteriaceae* memiliki kemampuan meragikan glukosa, mereduksi nitrat menjadi nitrit, akan tetapi tidak dapat mencairkan alginat. *K. pneumoniae* dapat meragikan laktosa, yang dapat diketahui dengan cara fermentasi laktosa dan diuji pada agar *MacConkey*. Media agar *MacConkey* mengandung garam empedu dan kristal violet yang mampu menghambat pertumbuhan dari bakteri gram positif. Sehingga tidak semua bakteri dapat tumbuh dengan baik pada media ini dan dapat secara khusus digunakan untuk mengidentifikasi bakteri gram negatif, yaitu salah satunya *K. pneumoniae*. Berdasarkan hasil kultur pada media ini, apabila warna berubah menjadi merah maka terbukti bahwa sel melakukan fermentasi

laktosa. Sedangkan apabila tidak berwarna menunjukkan sel tidak memfermentasikan glukosa (Kambuno, 2017).



Gambar 2.3 Morfologi koloni *K. pneumoniae* pada cawan agar MacConkey (sumber: Baban, 2017)

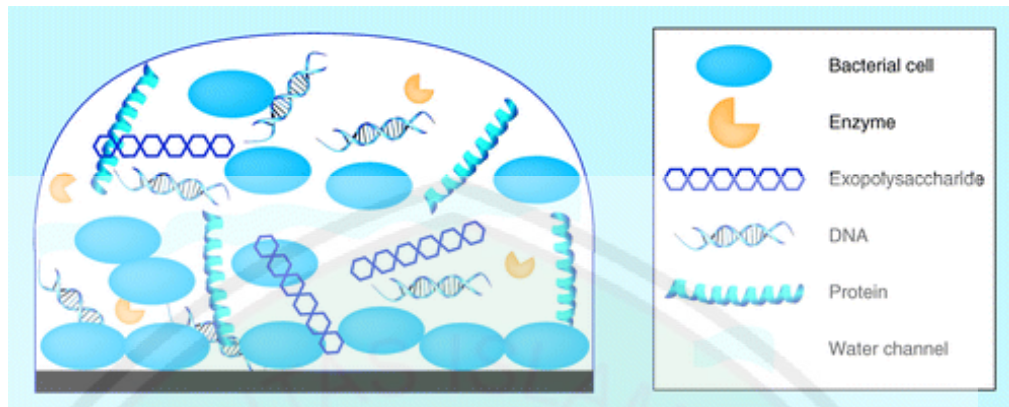
Keterangan: Koloni *K. pneumoniae* berwarna besar mengkilap dan merah muda. Dua karakteristik yang membedakan adalah fermentasi laktosa pada medium dan viskositas koloni. Strain terkapsulasi dari *Klebsiella sp* dan tampak juga mukoid yang merupakan karakteristik dari strain genus ini.

2.3 Biofilm

Ada 2 jenis mode pertumbuhan sel bakteri, yaitu sel planktonik dan agregat sessile yang dikenal sebagai biofilm. Biofilm merupakan asosiasi mikroorganisme di mana terjadi penempelan antar sel bakteri pada permukaan yang terbungkus suatu matriks zat polimer ekstraseluler yang diproduksi oleh suatu bakteri. Biofilm banyak ditemukan di lingkungan, antara lain di kamar mandi, pengaturan rumah sakit, tempat-tempat industri, hotel, saluran air limbah, laboratorium, dan banyak tempat lainnya. Biofilm biasanya terjadi pada permukaan keras yang terendam atau terpapar dengan cairan dan dapat juga dibentuk pada permukaan cair. Pembentukan biofilm dapat terjadi pada permukaan hidup dan tidak hidup (Jamal *et al.*, 2015).

Dalam proses pembentukan biofilm, suatu bakteri juga menghasilkan *extracellular polymeric substances* (EPS) yang terdiri dari DNA (<1%), RNA (<1%), protein (<1-2%), polisakarida (1-2%) dan air (hingga 97%). Suatu biofilm

terdiri dari dua komponen utama yaitu daerah sel padat yang tidak berpori-pori yang menonjol di dalamnya dan saluran air untuk transportasi nutrisi (Jamal *et al.*, 2015).



Gambar 2.4 Struktur Biofilm
(sumber: Rabin *et al.*, 2015).

Sel sel bakteri dalam matriks biofilm seiring perkembangannya akan mengeluarkan sinyal kimia. Molekul sinyal ini berperan dalam koordinasi aktivitas biofilm dan dalam pembentukan karakteristik biofilm sehingga lebih matur. Kemampuan molekul dalam mencetuskan suatu aksi, bergantung pada konsentrasi sinyal dalam lingkungannya. Aksi sinyal ini dan proses komunikasi antar sel disebut sebagai mekanisme *quorum sensing* (Gunardi, 2014).

2.3.1 Mekanisme Pembentukan Biofilm

Pembentukan biofilm merupakan proses yang sangat kompleks karena melibatkan beberapa gen spesifik dan melibatkan perubahan sel mikroorganisme dari fase planktonik (bakteri yang hidup bebas). Proses pembentukan biofilm ini melalui proses adaptasi dalam kondisi nutrisi rendah dan lingkungan yang tidak menguntungkan. Pembentukan biofilm terdiri dari beberapa proses yaitu (a) *attachment* (perlekatan pada permukaan), (b) pembentukan mikro koloni, (c) formasi dan maturasi struktur tiga dimensi (d) *detachment* (pelepasan) biofilm (Jamal *et al.*, 2015).

a. Attachment

Pembentukan biofilm dimulai dari perlekatan beberapa sel planktonik pada suatu permukaan, selanjutnya bermutiplikasi dan membentuk satu lapisan tipis (*monolayer*) biofilm. Pada saat perlekatan tersebut, selama beberapa jam proses pembelahan sel akan berhenti dan sel planktonik mengalami banyak perubahan. Sehingga sel planktonik bertransisi menjadi sel dengan fenotip biofilm yang memiliki perbedaan secara fisiologik dan metabolik dari sel planktoniknya (Gunardi, 2014). Dalam pembentukan biofilm, medium yang padat dan cair bisa mendukung lingkungan yang ideal untuk mikroorganisme melekat dan tumbuh. Struktur lokomotor pada permukaan sel seperti flagella, fili, fimbriae, protein atau polisakarida juga penting dalam pembentukan biofilm (Jamal *et al.*, 2015).

b. Pembentukan mikro koloni

Sel biofilm menghasilkan *extracellular polymeric substances* (EPS) yang melekatkan bakteri satu sama lain pada suatu permukaan untuk membentuk mikrokoloni. *Monolayer* bakteri yang terbentuk ini merupakan suatu substrat yang menjadi tempat sel bakteri mengalami perlekatan dan membentuk mikrokoloni, hal ini dikenal juga sebagai *linking film*. Seiring pertumbuhan sel-sel akan terbentuk lapisan yang semakin tebal, sehingga mikroba yang melekat di permukaan pada lapisan terdalam akan kekurangan zat-zat nutrisi. Kemudian akan terjadi akumulasi produk buangan yang bersifat toksik. Akibat hal ini, mikrokoloni akan berkembang berbentuk seperti jamur yang mempunyai saluran atau pori-pori dan dapat dilewati oleh nutrisi serta produk metabolit dari semua sel (Gunardi, 2014).

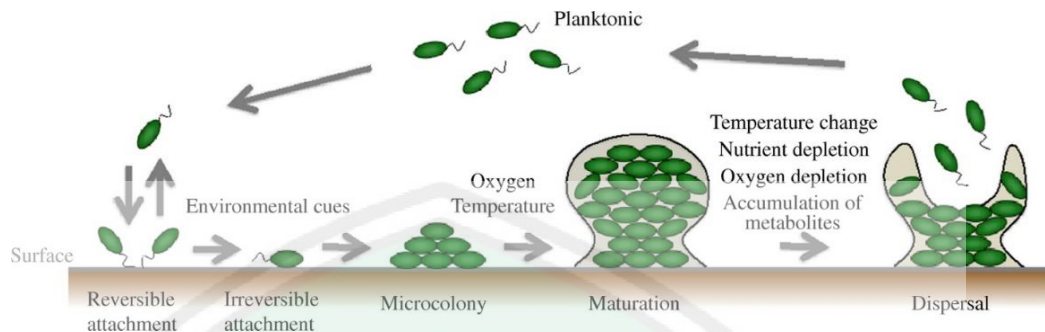
c. Formasi dan maturasi struktur tiga dimensi

Setelah tahap pembentukan mikrokoloni, biofilm bakteri semakin tebal dan membentuk suatu struktur tiga dimensi yang memiliki sel-sel terselubung namun saling terhubung. Setelah itu, ekspresi gen tertentu terkait biofilm terbentuk. Produk gen ini diperlukan untuk EPS (*extracellular polymeric substances*) yang merupakan bahan struktur utama biofilm. Komponen EPS meliputi polisakarida, asam nukleat, protein, lipid, dan biopolimer lainnya. Dalam biofilm, EPS bertanggung jawab untuk adhesi permukaan, perancah sel bersama, dan mempertahankan arsitektur tiga dimensi biofilm. Selain itu, EPS yang mengelilingi biofilm melindungi sel-sel bakteri terhadap berbagai tekanan seperti antimikroba, sistem imun inang, oksidasi dan kation logam. Ditemukan bahwa perlekatan bakteri dengan sendirinya dapat memicu pembentukan matriks ekstraseluler. Pembentukan matriks diikuti oleh pembentukan saluran air untuk transportasi nutrisi dalam biofilm (Jamal *et al.*, 2015; Solano *et al.*, 2014; Toyofuku *et al.*, 2015).

d. Detachment / Dispersal

Setelah biofilm matur, beberapa sel bakteri berpindah ke pertumbuhan planktonik. Sel-sel yang tersebar ini mengeksplorasi permukaan lain dan menempel lagi ke permukaan baru. Sehingga dispersal bukan hanya tahap akhir dari siklus hidup biofilm tetapi juga merupakan awal dari siklus hidup lain. Dispersal dibagi dua menjadi dispersal aktif dan dispersal pasif. Dispersal aktif tergantung pada motilitas sel atau degradasi *extracellular polymeric substances* (EPS), sedangkan dispersal pasif tergantung pada faktor fisik seperti gaya geser dalam kondisi aliran cair. Dispersi aktif dipicu oleh perubahan kondisi

lingkungan seperti perubahan suhu, kelaparan, kekurangan oksigen, dan akumulasi metabolit (Toyofuku *et al.*, 2015).

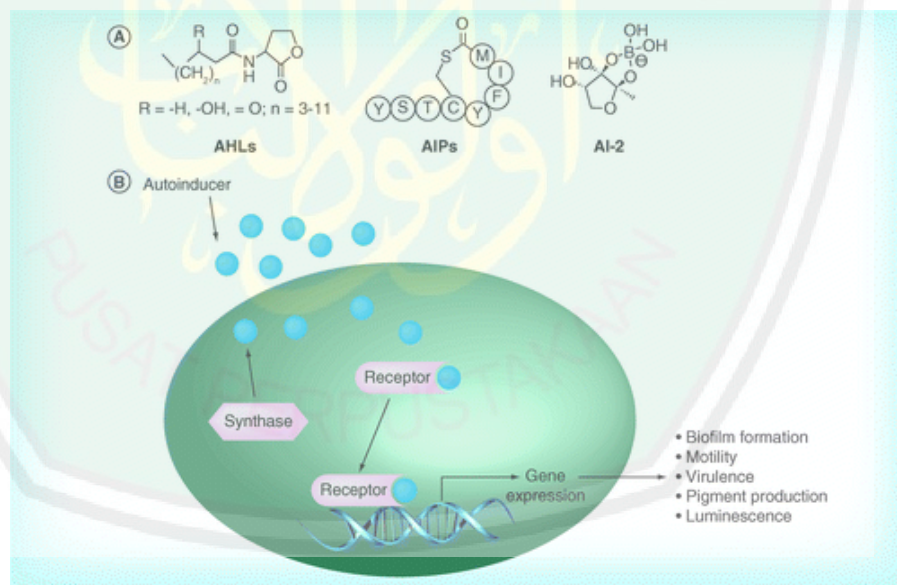


Gambar 2.5 Proses pembentukan formasi biofilm
(sumber: Toyofuku *et al.*, 2015)

2.3.2 Quorum Sensing

Quorum Sensing (QS) adalah mekanisme yang digunakan bakteri untuk berkomunikasi satu sama lain. Mekanisme ini menghasilkan perilaku kolektif dengan menggunakan sinyal kimia berupa *autoinducer* untuk saling berkomunikasi (Turan *et al.*, 2017). *Autoinducer* ini dapat menyampaikan kehadiran mereka satu sama lain dengan memproduksi, mendeteksi, dan menanggapi molekul sinyal difusibel kecil. Ada beberapa peran yang dimiliki oleh QS suatu bakteri. QS berperan dalam mengatur beberapa proses biokimia dalam sel planktonic dan biofilm (Abraham, 2016). QS juga terlibat dalam patogenesis dan virulensi suatu bakteri melalui modifikasi motilitas, sintesis hidrolitik enzim, racun, dan polisakarida, serta pembentukan biofilm (Papenfort, 2016). Formasi atau pembentukan biofilm merupakan mekanisme resistensi utama, karena membuat koloni bakteri tidak dapat ditembus antibiotik, mempromosikan transmisi gen resistensi, meningkatkan ekspresi pompa penghabisan, meningkatkan metabolisme antibiotik, dan membantu sel-sel persisten (Cadavid *et al.*, 2018).

Masing-masing bakteri menggunakan molekul yang berbeda untuk saling berkomunikasi. Penginderaan kuorum bergantung pada interaksi molekul sinyal difusible kecil dengan sensor atau aktivator transkripsional untuk memulai ekspresi gen untuk aktivitas terkoordinasi. Sistem penginderaan kuorum pada bakteri secara umum dibagi menjadi setidaknya tiga kelas: (1) Penginderaan kuorum tipe LuxI / LuxR pada bakteri Gram-negatif, yang menggunakan asil-homoserine lakton (AHL) sebagai molekul sinyal; (2) penginderaan kuorum tipe dua komponen oligopeptida pada bakteri Gram-positif, yang menggunakan peptida kecil sebagai molekul sinyal; dan (3) penginderaan kuorum autoinducer 2 (AI-2) luxS yang dikodekan dalam bakteri Gram-negatif dan Gram-positif. Setiap jenis molekul sinyal terdeteksi dan ditanggapi oleh alat penginderaan yang tepat dan jaringan pengatur (Li Y. & Tian, X., 2012).



Gambar 2.6 Mekanisme *quorum sensing*

(a) *main quorum-sensing autoinducers* (AHL: *Acylhomoserine lactone*; AIP: *Autoinducing peptide*; AI: *Autoinducer*) (b) *sirkuit quorum sensing*
(sumber: Rabin *et al.*, 2015)

2.3.3 Pembentukan Biofilm dan *Quorum Sensing K. pneumoniae*

Pembentukan biofilm pada *K. pneumoniae* didukung oleh factor-faktor virulensi yang memungkinkannya untuk menempel pada sel epitel dan membentuk biofilm pada permukaan abiotik. *K. pneumoniae* memiliki fimbriae tipe 1 dan 3 yang berperan dalam proses adhesi pada pembentukan biofilm. Fimbriae tipe 1 memiliki peran dalam invasi sel serta pembentukan biofilm di kandung kemih dan permukaan abiotic. Sedangkan Fimbriae tipe 3 diperlukan untuk produksi dan pengikatan biofilm *K. pneumoniae* pada alat kesehatan (Paczosa MK & Mecsas J, 2016). *Klebsiella pneumoniae* memiliki beberapa gen yang terlibat dalam produksi exopolysaccharides, keduanya lipopolysaccharides (LPS) dan kapsul (CPS), dan dalam cakupan awal pengembangan arsitektur biofilm yang matang (De Araujo *et al.*, 2010).

Pada pembentukan biofilm *K. pneumoniae* ada kontribusi ketergantungan kepadatan sel regulasi oleh proses yang dikenal sebagai *quorum sensing* (QS), yakni melalui pelepasan QS tipe-2 molekul pengatur (autoinducers, AI-2) di ekstraseluler kompartemen. AI-2 adalah sinyal spesifik bakteri yang digunakan oleh bakteri gram-negatif dan gram-positif yang disintesis oleh lyase S-ribosylhomocysteine (LuxS). LuxS mengubah S-ribosylhomocysteine menjadi homocysteine dan (S) -4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione (DPD), yang terbentuk secara spontan menjadi sebuah molekul AI-2. Molekul AI-2 ini memodulasi biosintesis LPS disel sessile melalui mekanisme yang tidak diketahui dan terlibat di dalam proses pematangan biofilm (De Araujo *et al.*, 2010).

2.3.4 Biofilm Sebagai Penyebab Resistensi Antibiotik

Peningkatan resistensi mikroba terhadap antibiotik dan stressor lainnya merupakan satu aspek yang penting dari pembentukan biofilm suatu bakteri. Biofilm suatu bakteri memiliki fungsi sebagai mekanisme pertahanan dengan cara meningkatkan resistensi terhadap gaya fisik. Peningkatan resistensi ini dapat menyapu bersih sel-sel yang tidak menempel, melindungi dari proses fagositosis oleh sel-sel sistem imun tubuh manusia dan penetrasi antibiotik (Lebeaux *et al.*, 2014).

Bakteri yang menghasilkan EPS (*extracellular polymeric substances*) dapat terlindungi dari sistem imun manusia. Matriks ini berperan sebagai sawar difusi terhadap antimikroba. Beberapa bakteri yang menghasilkan biofilm menunjukkan adanya resistensi terhadap antimikroba dibandingkan dengan bakteri yang tumbuh bebas yang tidak memiliki biofilm (Brooks *et al.*, 2015). Bakteri di dalam biofilm lebih resisten 10-1.000 kali dibandingkan bila tidak di dalam biofilm. Hal ini menyebabkan infeksi yang persisten dan kronis karena bakteri yang menghasilkan biofilm lebih sulit untuk diterapi dan resisten terhadap pengobatan antibiotik (Ming *et al.*, 2017).

2.3.5 Uji Pembentukan Biofilm

a. Metode Tabung

Metode Tabung merupakan salah satu metode untuk mendeteksi biofilm secara kualitatif. Metode ini menggunakan *Triptycase Soy Broth* (TSB) dengan glukosa 1% pada sebuah tabung yang diinokulasi dengan satu ose mikroorganisme. Setelah itu, tabung diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C secara aerobik. Setelah diinkubasi, isi tabung dibuang dan tabung dicuci

menggunakan *Phosphatase Buffer Saline* (PBS) dengan kadar pH 7,3 dan dikeringkan. Tabung kemudian diwarnai dengan kristal violet (0,1 %) selama 15 menit dan kelebihan Kristal violet dicuci dengan *deionized water*. Setelah itu tabung dibiarkan mengering pada posisi terbalik untuk diamati biofilmnya. Pembentukan biofilm dinyatakan positif apabila terbentuk cincin film yang melapisi *airfluid border* (batas antara medium cair dan udara di dalam tabung) pada dinding dan dasar tabung. Jumlah biofilm yang terbentuk diberi skor, yaitu skor 1 apabila tidak ada biofilm atau biofilm lemah, skor 2 apabila ada biofilm sedang, dan skor 3 apabila ada biofilm kuat. Keuntungan dari metode tabung yaitu bisa didapatkan larutan uji antibakteri dengan kadar terkecil yang terlihat tanpa adanya pertumbuhan bakteri uji (Ruchi *et al.*, 2015).

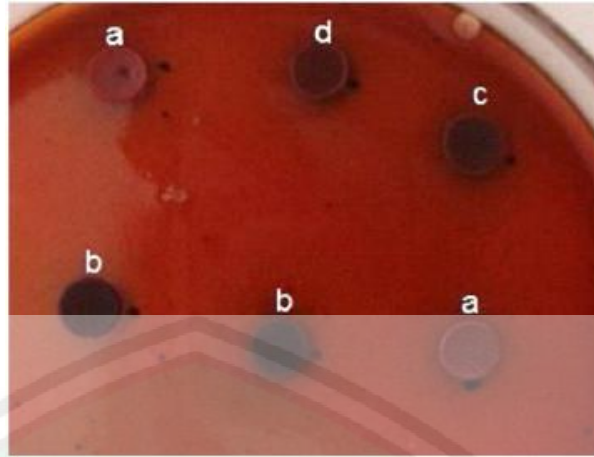


Gambar 2.7 Pertumbuhan bakteri penghasil biofilm dengan metode tabung (sumber: Ruchi *et al.*, 2015)

Keterangan: Perbedaan ketebalan biofilm pada dinding tabung. Pada gambar menunjukkan tidak ada biofilm (*negative*), produsen biofilm lemah (*weak*), sedang (*moderate*), dan kuat (*strong*) yang dibedakan oleh ketebalan cincin film yang melapisi *airfluid border* pada dinding dan dasar tabung.

b. Metode Congo Red Agar

Metode *Congo Red Agar* (CRA) merupakan metode uji biofilm fenotipik yang mudah dan cukup murah. Metode ini memiliki kriteria evaluasi berdasarkan pada analisis visual warna koloni yang tumbuh pada media agar (Purbowati, 2017). Metode *Congo Red Agar* (CRA) ini juga merupakan metode sederhana yang dapat mendeteksi produksi biofilm secara kualitatif. Medium yang digunakan terdiri dari kaldu *Brain Heart Infusion* (BHI) sebanyak 37 g/L ditambah dengan sukrosa (50 g/L), agar-agar No 1 (10 g / l) dan *Congo Red* (0,8 g / l). Pertama pewarna *Congo Red* dipersiapkan sebagai larutan air pekat dan diautoklaf pada 121°C selama 15 menit terpisah dari konstituen media lainnya. Kemudian ditambahkan ke agar *Brain Heart Infusion* (BHI) yang telah diautoklaf dengan sukrosa pada suhu 55°C. *Plate* CRA diinokulasi dengan bakteri uji dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam secara aerobik. Apabila warna agar tampak hitam, kering, dan terdapat koloni kristalin, maka bakteri uji tergolong sebagai *biofilm producer*. Apabila warna agar tampak merah atau merah muda dan terdapat koloni bordeaux, maka bakteri uji tergolong sebagai *non-biofilm producer*. Sedangkan apabila warna agar tampak kehitaman tanpa tekstur kering dan koloni kristalin, maka bakteri uji tergolong sebagai *intermediate biofilm producer* (Ruchi *et al.*, 2015).



Gambar 2.8 Pertumbuhan bakteri penghasil biofilm pada *Congo Red Agar* (sumber: Kaiser *et al.*, 2013).

Keterangan: Perbedaan warna koloni bakteri *biofilm producer* dan *non-biofilm producer* pada *congo red agar*. Pada gambar (a) terlihat koloni yang berwarna merah dan (d) menunjukkan koloni berwarna merah tua. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri tersebut merupakan bakteri yang tidak menghasilkan biofilm (*non-biofilm producer*). Sedangkan (b) menunjukkan koloni berwarna hitam dan (c) menunjukkan koloni berwarna coklat tua. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri tersebut merupakan bakteri yang menghasilkan biofilm (*biofilm producer*).

c. Metode *Tissue Culture Plate*

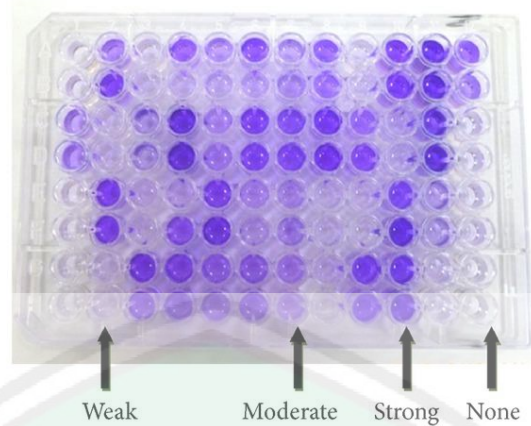
Menurut jurnal yang ditulis oleh Ruchi *et al.*, (2015), metode *tissue culture plate* atau metode dilusi pada *microtiter plate* merupakan salah satu metode untuk mengetahui hambatan pembentukan biofilm secara kuantitatif. dimulai dengan mengisolasi kultur bakteri uji semalaman, selanjutnya diinokulasi pada *96-well tissue culture plate* yang mengandung campuran 10 ml *trypticase soy broth* (TSB) dengan glukosa 1% dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Plate kemudian diisi dengan 200 µl suspensi bakteri sesuai dengan 0,5 *McFarland* setelah dilakukan pengenceran 1:100 dengan *fresh medium* dan organisme kontrol. Hanya campuran yang disajikan sebagai kontrol yang dapat diuji sterilitas dan ikatan tidak spesifik terhadap medium. *Plate* diinokulasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya, isi dari masing-masing *plate* dibuang dan *plate* dicuci sebanyak tiga kali dengan 300 µl steril saline. Bakteri

tersisa yang masih menempel kemudian difiksasi dengan udara panas pada suhu 60°C selama 60 menit. Kemudian, ditambahkan pewarna kristal violet (2%) ke setiap plate sebanyak 150 µl. Setelah 15 menit, pewarna yang berlebih dibilas dengan proses dekantasi, lalu *plate* dicuci (Ruchi *et al.*, 2015).

Etanol 95% sebanyak 150 µl ditambahkan ke masing-masing *plate* dan dibiarkan selama 30 menit untuk melihat *optical densities* (OD) dari film bakteri yang telah diwarnai. OD dapat dilihat menggunakan *microtitre plate reader* pada 600nm. Nilai OD dihitung untuk semua strain yang diuji dan kontrol negatif. Dalam penilaiannya dibutuhkan nilai *optical densities cut-off* (ODc) yaitu nilai yang didapat dari rata-rata OD kontrol negatif + (3 kali standar deviasi kontrol negatif). Nilai OD akhir didapat dari nilai rata-rata OD sebuah strain - ODc. Apabila didapatkan nilai negatif, maka nilai ditulis sebagai angka nol, sementara nilai positif menunjukkan adanya produksi biofilm (Ruchi *et al.*, 2015). Hasil dari perhitungan diinterpretasikan sebagai berikut.

- a. Bukan pembentuk biofilm (0), $OD \leq ODc$
- b. Pembentuk biofilm lemah (+ atau 1), $ODc < OD \leq 2 \times ODc$
- c. Pembentuk biofilm sedang (++ atau 2), $2 \times ODc < OD \leq 4 \times ODc$
- d. Pembentuk biofilm kuat (+++ atau 3), $4 \times ODc < OD$



Gambar 2.9 Pembentukan biofilm bakteri pada *Tissue Culture Plate* (sumber: Darwish *et al.*, 2013).

Keterangan: Perbedaan ketebalan biofilm pada *tissue culture plate* menunjukkan tidak ada biofilm (*none*), produsen biofilm kuat (*strong*), sedang (*moderate*), dan lemah (*weak*) yang dibedakan dengan pewarnaan kristal violet pada 96-well *tissue culture plate*.

2.4 Tanaman Murbei Hitam

2.4.1 Taksonomi Murbei Hitam

Murbei hitam merupakan salah satu spesies dari genus *Morus* dan termasuk ke dalam famili *Moraceae* (Naftalie, 2011). Tanaman murbei terdiri dari beberapa spesies, diantaranya adalah *Morus alba*, *Morus nigra*, *Morus macroura*, *Morus multicaulis*, *Morus indica*, *Morus cathayana*, *Morus khunpai*, *Morus canva*, *Morus husan*, serta *Morus lembang*. Tanaman murbei memiliki berbagai macam sebutan sesuai asal dari daerah di Indonesia, seperti *murbai*, *besaran* (Jawa Tengah, Jawa Timur dan Bali), *kerta*, *kitau* (Sumatera), *gertu* (Sulawesi), dan *kitau* (Lampung). Tanaman ini juga memiliki sebutan lain dari beberapa negara di dunia, yaitu *gelsa* (Italia), *maymon*, *tam* (Vietnam), *murles* (Perancis), *mourbei* (Belanda), *sangye* (Cina), serta *mulberry* (Inggris) (Dalimartha, 2000). Menurut *United States Department of Agriculture/USDA* (2012), taksonomi tanaman murbei hitam adalah sebagai berikut.

Kingdom	= Plantae
Subkingdom	= Tracheobionta
Superdivisi	= Spermatophyta
Divisi	= Magnoliophyta
Kelas	= Magnoliopsida
Subkelas	= Hamamelididae
Ordo	= Urticales
Famili	= Moraceae
Genus	= Morus L.
Species	= <i>Morus nigra</i> L.

2.4.2 Morfologi Murbei Hitam

Morus nigra L. dikenal dengan nama “murbei hitam” dan banyak dibudidayakan di provinsi Jawa. Tanaman ini tumbuh dengan baik pada ketinggian 300–800 meter di atas permukaan laut dan dapat tumbuh dengan tinggi hingga 10-12 m (Naftalie, 2011; Thabti *et al.*, 2013). Selain itu, tanaman ini memiliki percabangan yang banyak. Cabang muda memiliki ciri yaitu berambut halus, daunnya tunggal dengan letak berseling dan memiliki tangkai dengan panjang 4 cm. Ukuran lingkaran batang murbei hitam memiliki ukuran 1-2 m dengan kulit yang kasar dan pecah-pecah. Ranting murbei hitam tidak kasar dan berwarna merah kecoklatan (Arshad *et al.*, 2014).

Daun *Morus nigra* L. memiliki panjang 4,5-11,7 cm dan lebar 4,2-8,1 cm. Daun murbei hitam dapat berbentuk hati, atau bulat memanjang, atau lonjong dengan ujung lancip tergantung dari daerah tumbuhnya. Daun murbei hitam berwarna hijau tua dengan yang permukaan halus dan berbulu, terkadang juga bercelah atau sedikit

melekuk dalam. Daun terdiri dari tangkai daun, berbentuk bulat telur dan berbunga (lamina), tulang daun daun berbentuk hati dan kadang-kadang berbulu (Arshad *et al.*, 2014; Tiaraswara *dkk*, 2015). Pada bulan April hingga Mei tumbuhan ini berbunga, sedangkan pada bulan Juli hingga September buahnya matang. Buah murbei hitam terasa memiliki panjang 2-3 cm, berat 5-6 gram dan warnanya yang berwarna ungu kehitaman dan rasanya yang enak (Koyuncu *et al.*, 2014).



Gambar 2.10 Anatomi epidermis daun *Morus nigra* L.
(sumber: Abbas *et al.*, 2014; Tiaraswara *dkk*, 2015)

2.4.3 Manfaat Daun Murbei

Murbei hitam merupakan tanaman yang banyak dimanfaatkan sebagai obat. Kandungan senyawa bioaktif murbei hitam cukup banyak, terutama senyawa turunan fenolik. Hal ini membuat murbei hitam banyak dimanfaatkan sebagai pengobatan penyakit, antara lain iritasi tenggorokan, diabetes mellitus, anemia, dan kerusakan pada gigi (Khaira, 2018). Selain itu, di Cina daun murbei hitam dan bagian organ lainnya telah digunakan sejak dulu secara farmakologis (Gundogdu *et al.*, 2011).

Daun murbei banyak dikonsumsi oleh orang Jepang dan Korea sebagai makanan antihiperqlikemi pada pasien diabetes mellitus karena mengandung senyawa 1-*deoxynojirimycin* yang berpotensi sebagai inhibitor α -glikosidase (Padilha *et al.*, 2009). Hal ini didukung juga oleh penelitian Assano dalam Laelasari

(2015), yang menyatakan bahwa terdapat kandungan sekitar 15 polyhydroxylated alkaloids, salah satunya yaitu 1- Deoxynojirimycin (DNJ) pada daun mulberry. Senyawa DNJ ini memiliki fungsi sebagai penghambat enzim alpha-glucosidase yang memiliki peran untuk mengkatalis hidrolisis ikatan pada maltosa sehingga menghasilkan dua molekul glukosa. Oleh karena itu DNJ dapat mengakibatkan usus tidak dapat menyerap maltose. Berdasarkan mekanisme tersebut teh daun mulberry ini memiliki khasiat sebagai anti-diabetes.

Menurut penelitian Laelasari (2015), teh herbal dari daun mulberry memiliki aktivitas antioksidan yang kuat ditandai dengan nilai IC50 sebesar 51,13 ppm pada varietas nigra. Daun varietas nigra ini memiliki aktivitas sebagai antioksidan yang lebih kuat dibandingkan dengan varietas khunpai dan cathayana. Sedangkan menurut De Freitas *et al.*, (2016), ekstrak daun murbei hitam yang telah terstandarisasi bisa memiliki potensi yang baik dalam industri farmasi dan kosmetik karena bisa digunakan sebagai agen depigmentasi kulit. Aktivitas ini muncul pada dosis penggunaan yaitu sebesar 15,625 µg/mL. Daun murbei hitam juga memiliki fungsi lain yaitu sebagai bahan *anti-browning* dari sayuran, buah-buahan dan minuman dalam industry makanan.

Selain itu, daun murbei hitam diketahui memiliki senyawa fenol yang lebih tinggi dibandingkan dengan daun murbei putih (*Morus alba*) (Sánchez-Salcedo *et al.*, 2015). Daun murbei hitam juga mengandung senyawa steroid dan terpenoid yang diduga memiliki efek antiinflamasi (Padilha *et al.*, 2010). Daun murbei hitam juga kaya senyawa mineral seperti kalium, natrium dan potassium (Koyuncu *et al.*, 2014).

2.4.4 Mekanisme Antibiofilm Kandungan Senyawa Murbei Hitam

Beberapa penelitian sebelumnya telah melaporkan bahwa daun murbei hitam mempunyai senyawa-senyawa antioksidan, antibakteri dan antibiofilm yang berperan dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Murbei hitam mengandung senyawa utama seperti flavonoid, polifenol, alkaloid, terpenoid, dan steroid (Andallu *et al.*, 2014). Diantara senyawa yang terkandung dan diidentifikasi dalam daun murbei yaitu antara lain senyawa polifenol, tanin, flavonoid, alkaloid, karotenoid, antosianidin, kumarin dan beberapa senyawa bioaktif lainnya (Thabti *et al.*, 2013; Djamil, 2015; Ahlawat, 2016). Diantara senyawa-senyawa tersebut, senyawa yang terkandung dalam daun murbei hitam yang berfungsi sebagai antibakteri dan antibiofilm adalah flavonol, asam fenolat, antosianin, tanin, terpenoid dan steroid (Wutsqo, 2018).

2.4.4.1 Tanin

Tanin adalah senyawa kimia yang tergolong dalam senyawa polifenol. Pada tanaman, tanin diklasifikasikan menjadi dua yaitu, tanin terhidrolisis dan tanin terkondensasi. Tanin terhidrolisis merupakan jenis tanin yang mempunyai struktur poliester yang mudah dihidrolisis oleh asam atau enzim, sedangkan tanin terkondensasi (proantosianidin) adalah polimer katekin dan epikatekin (Fathurrahman, 2018).

Mekanisme kerja tanin dengan menghambat enzim *reverse transkriptase* dan DNA *topoisomerase*. Hal ini menyebabkan perubahan struktur protein yang membuat denaturasi dari EPS sehingga biofilm terdegradasi. Selain itu, tanin memiliki kemampuan untuk mengikat langsung peptidoglikan dinding sel

dan mengganggu integritasnya sehingga dapat menghambat pembentukan biofilm. (Nuria *dkk*, 2009; Kining *dkk*, 2016; Slobodníková *et al.*, 2016).

Tanin memiliki aktivitas antibakteri baik terhadap bakteri Gram-positif dan Gram-negatif. Misalnya, katekin mampu menembus dan berinteraksi dengan lipid bilayer atau mereka dapat menyebabkan fusi membran, yaitu suatu proses yang menghasilkan kebocoran bahan intramembran dan agregasi (Slobodníková *et al.*, 2016)

2.4.4.2 Fenolik

Murbei hitam (*Morus nigra* L.) mengandung senyawa fenol yang tinggi sehingga memiliki aktivitas antioksidan dan antibakteri yang tinggi (Gundogdu *et al.*, 2011). Apabila dibandingkan dengan spesies dari genus *Morus* lainnya, murbei hitam memiliki senyawa fenol total yang lebih besar (Sofia, 2014; Radojkovic *et al.*, 2016).

Beberapa mekanisme aktivitas antibakteri fenolik yaitu dapat berinteraksi dengan protein bakteri dan struktur dinding sel, mengurangi fluiditas membran, menghambat sintesis asam nukleat, menyebabkan kerusakan membran sitoplasma, sintesis dinding sel, atau metabolisme energi (Daglia, 2011; Cushnie *et al.*, 2011; Gyawali *et al.*, 2014). Di sisi lain, penelitian aktivitas antibiofilm pada fenolat tumbuhan telah mengungkapkan, selain aktivitas destruktif pada bakteri, terdapat juga aktivitas yang mengarah pada penekanan biofilm. Hal ini dilakukan dengan mempengaruhi mekanisme pengaturan bakteri seperti *quorum sensing* atau sistem pengatur global lainnya akan tetapi tidak ada efek pada pertumbuhan bakteri (Silva *et al.*, 2016).

2.4.4.3 Antosianin

Antosianin merupakan metabolit sekunder yang berasal dari famili flavonoid. Antosianin bisa ditemukan dalam jumlah besar pada buah-buahan dan sayur-sayuran. Antosianin memiliki sifat sebagai pigmen larut air yang secara alami terakumulasi pada akar, daun dan sel epidermis buah-buahan. Secara kimia, antosianin adalah turunan struktur aromatik tunggal, yaitu sianidin. Antosianin terbentuk dari pigmen sianidin dengan pengurangan atau penambahan dari gugus hidroksil, metilasi dan glikosilasi (Samber *dkk*, 2013). Beberapa senyawa dari antosianin yang paling banyak ditemukan adalah malvidin, peonidin, pelargonidin, petunidin, sianidin, dan delphinidin (Welch *et al.*, 2008).

Antosianin telah dibuktikan dapat menghambat produksi AHL, dan *quorum sensing* yang diatur fenotip seperti produksi EPS dan pembentukan biofilm pada *K. pneumoniae*. Dalam penelitiannya malvidin sebagai salah satu antosianin dari *S. cumini* menunjukkan efek penghambatan yang nyata terhadap produksi violacein yang diatur QS (85,40%), pembentukan biofilm (72,70%) dan produksi EPS (81,16%) di *K. pneumoniae* (Gopu *et al.*, 2015).

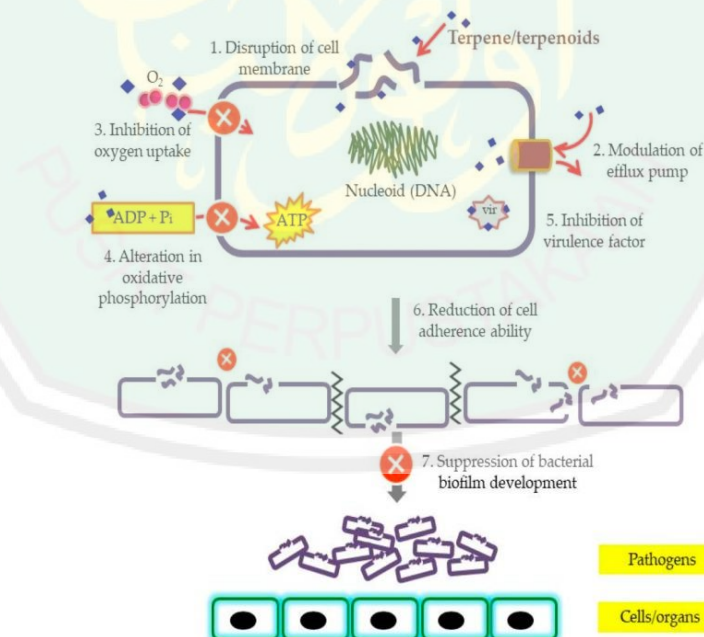
2.4.4.4 Terpenoid

Terpenoid merupakan senyawa kimia yang terdiri dari beberapa unit isopren. Terpenoid disebut juga isoprenoid karena kerangka penyusun terpenoid adalah isoprena (C_5H_8). Kebanyakan terpenoid mempunyai struktur siklik dan mempunyai satu gugus fungsi atau lebih. Senyawa terpenoid dapat diklasifikasikan berdasarkan jumlah unit isopren yang menyusunnya seperti monoterpenoid, seskuiterpenoid, diterpenoid, triterpenoid, tetraterpenoid, dan

politerpenoid. Terpenoid umumnya larut dalam lemak dan terdapat dalam sitoplasma sel tumbuhan. Senyawa terpenoid ini adalah salah satu senyawa kimia bahan alam yang banyak digunakan sebagai obat (Ramadani, 2016).

Salah satu senyawa monoterpena, yaitu linalool yang diekstraksi dari minyak esensial lavender menunjukkan aktivitas antimikroba yang kuat terhadap resisten *K. pneumoniae*. Mekanisme aksi yang diusulkan untuk senyawa tersebut adalah melalui distrupsi membran (Yang *et al.*, 2019).

Sebagian besar terpenoid mampu menghambat dua proses penting untuk kelangsungan hidup mikroba, ini termasuk pengambilan oksigen dan fosforilasi oksidatif. Mikroba aerob membutuhkan oksigen untuk menghasilkan energi untuk pertumbuhannya. Sebelumnya, terbukti bahwa konsentrasi oksigen yang rendah menyebabkan keterbatasan dalam tingkat respirasi bakteri (Mahizan *et al.*, 2019).

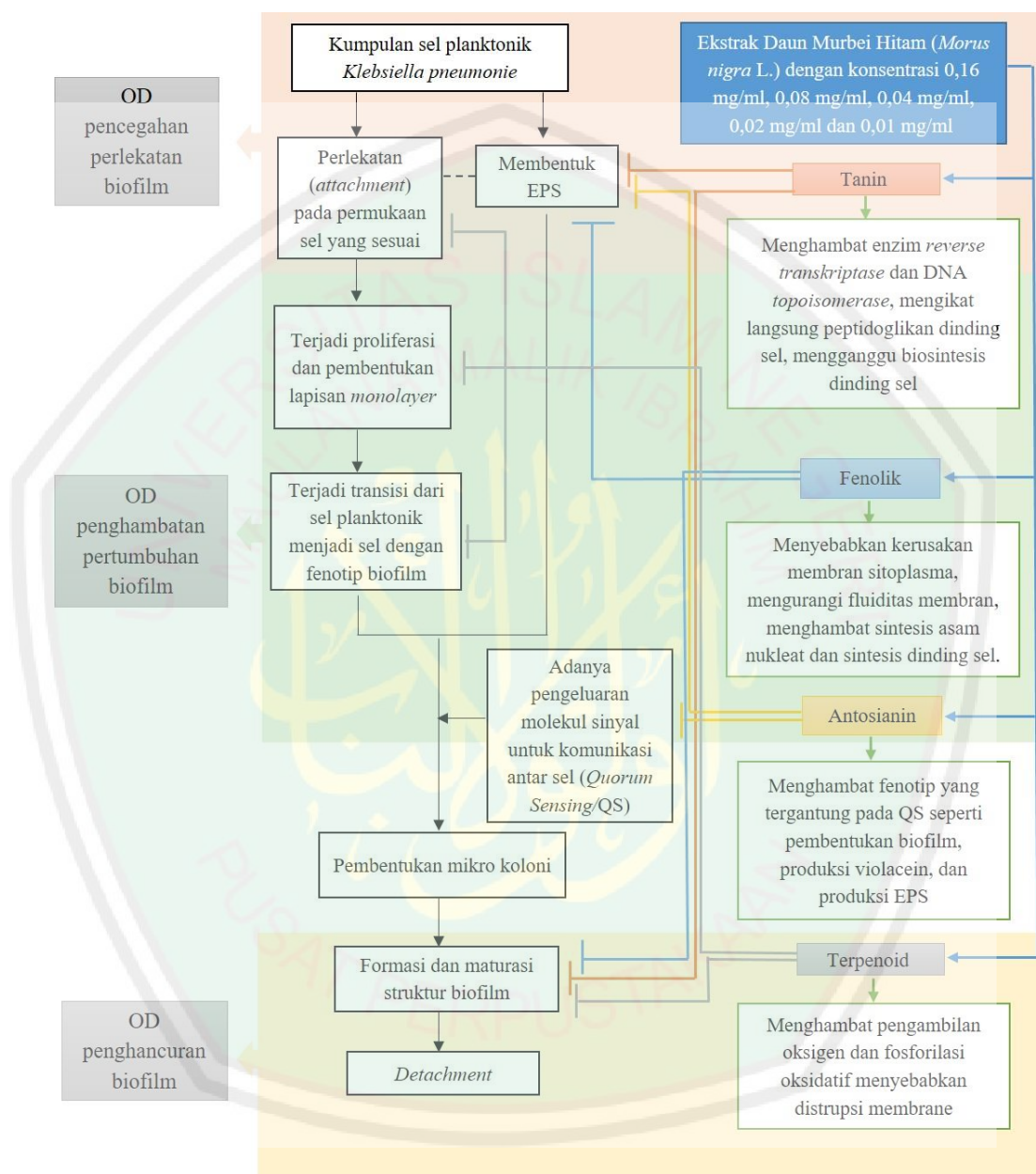


Gambar 2.11 Cara kerja postulat terpena / terpenoid pada patogen resistensi antibiotik dan sebagai terapi kombinasi.
(sumber: Mahizan *et al.*, 2019).

BAB III











KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan

	: <i>Independent variable</i>		: mekanisme pencegahan perlekatan biofilm
	: <i>Dependent variable</i>		: mekanisme penghambatan pertumbuhan biofilm
	: Menginduksi		: mekanisme penghancuran biofilm
	: Menghambat	EPS	: <i>extracellular polymeric substances</i>
	: Mempengaruhi	QS	: <i>quorum sensing</i>
	: Mengandung	AI-2	: <i>autoinducer-2</i>
	: Mekanisme antibiofilm	OD	: <i>optical density</i>

Saat menemukan permukaan yang sesuai, *K. pneumoniae* masuk dan planktonik akan melekat pada permukaan tersebut. Kemudian, *K. pneumoniae* memperbanyak diri dan membentuk satu lapisan tipis (*monolayer*) biofilm. *Monolayer* juga sebagai *linking film* yaitu suatu substrat sebagai tempat sel bakteri melekat yang berperan dalam pembentukan mikrokoloni. Setelah terbentuk *monolayer*, pembelahan akan berhenti selama beberapa jam dan terjadi transisi dari sel planktonik menjadi sel dengan fenotip biofilm.

Dalam membuat biofilm, *K. pneumoniae* juga memproduksi EPS yang bertanggung jawab pada adhesi permukaan dan bioraga tiga dimensi biofilm. Keseluruhan proses tersebut akan membantu perlekatan bakteri pada suatu permukaan yang sesuai dan pembentukan suatu mikrokoloni. Dalam pembentukan mikrokoloni, terjadi proses biokimia berupa molekul sinyal yang berfungsi untuk komunikasi antar sel yang disebut dengan *quorum sensing* (QS).

Morus nigra L. memiliki kandungan metabolit sekunder seperti tanin, fenolik, antosianin dan terpenoid yang memiliki kemampuan untuk menghambat proses pembentukan biofilm pada *K. pneumoniae*. Tanin dapat menghambat enzim *reverse*

transkriptase dan DNA *topoisomerase*. Hal ini menyebabkan perubahan struktur protein yang membuat denaturasi dari EPS sehingga biofilm terdegradasi. Selain itu, tanin memiliki kemampuan untuk mengikat langsung peptidoglikan dinding sel dan mengganggu integritasnya sehingga dapat menghambat pembentukan biofilm (Nuria *dkk*, 2009; Kining *dkk*, 2016; Slobodníková *et al.*, 2016). Selanjutnya, senyawa fenolik bisa menyebabkan kerusakan membran sitoplasma, mengurangi fluiditas membran, menghambat sintesis asam nukleat dan sintesis dinding sel. Hal ini bersifat destruktif pada bakteri dan bisa mengganggu proses terbentuknya biofilm (Daglia, 2011; Cushnie *et al.*, 2011; Gyawali *et al.*, 2014).

Senyawa berikutnya, antosianin telah dibuktikan dapat menghambat produksi AHL dan *quorum sensing* pada pembentukan biofilm *K. pneumoniae*. Malvidin sebagai salah satu bagian senyawa antosianin dapat menghambat fenotip yang tergantung pada QS seperti pembentukan biofilm, produksi violacein, dan produksi EPS (Gopu *et al.*, 2015). Kemudian, terpenoid mampu menghambat dua proses penting untuk kelangsungan hidup mikroba, yaitu menghambat pengambilan oksigen dan fosforilasi oksidatif. Konsentrasi oksigen yang rendah menyebabkan keterbatasan dalam tingkat respirasi bakteri. Hal ini dapat menyebabkan distrupsi membrane bakteri sehingga menurunkan kemampuan perlekatan bakteri dan menekan perkembangan biofilm bakteri (Mahizan *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2019).

Aktivitas antibiofilm ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra* L.) ini dapat diketahui dengan menghitung *optical density* (OD), yaitu konsentrasi biofilm yang terbentuk akibat infeksi *K. pneumoniae*. Pada penelitian akan diukur 3 jenis OD, yaitu OD pencegahan perlekatan biofilm, OD penghambatan pertumbuhan biofilm, dan OD penghancuran biofilm.

3.2 Hipotesis Penelitian

H₀: Ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra* L.) tidak memiliki aktivitas sebagai antibiofilm *Klebsiella pneumoniae*.

H₁: Ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra* L.) memiliki aktivitas sebagai antibiofilm *Klebsiella pneumoniae*.



BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini termasuk jenis penelitian *experimental laboratorium*. Metode yang digunakan untuk mengetahui aktivitas ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra* L.) sebagai antibiofilm *Klebsiella pneumoniae* yaitu menggunakan metode *tissue culture plate*. Pada penelitian ini terdapat beberapa kelompok, yaitu lima kelompok uji dengan pemberian ekstrak yang memiliki konsentrasi 0,16 mg/ml, 0,08 mg/ml, 0,04 mg/ml, 0,02 mg/ml dan 0,01 mg/ml, serta kelompok kontrol yang terdiri dari kontrol positif, kontrol negatif dan kontrol media. Kontrol positif yang digunakan pada penelitian ini adalah antibiotik ciprofloksasin dengan konsentrasi 65 µg/ml ditambah dengan bakteri (Pletzer *et al.*, 2018; Monirzadeh *et al.*, 2019). Kontrol negatif menggunakan media TSB + glukosa 1% ditambah bakteri (Putri, 2019). Sedangkan kontrol media hanya menggunakan media TSB + glukosa 1% saja (Tutar *et al.*, 2016; Putri, 2019).

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Ekstraksi bahan penelitian daun *Morus nigra* L. dilakukan di Laboratorium Fitokimia Prodi Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang dan Laboratorium Prodi Kimia Fakultas SAINTEK Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Penelitian uji aktivitas antibiofilm daun murbei hitam (*Morus nigra* L.) terhadap *Klebsiella pneumoniae* dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Penelitian dilakukan dalam rentang waktu bulan Januari - Maret 2020.

4.3 Populasi dan Sampel Penelitian

4.3.1 Populasi Penelitian

Pada penelitian ini populasi yang digunakan adalah biakan *Klebsiella pneumoniae*.

4.3.2 Sampel Penelitian

Pada penelitian ini sampel yang digunakan adalah biakan *Klebsiella pneumoniae* pembentuk biofilm yang diperoleh dari Laboratorium Wiyasa Mandiri Malang.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas atau *independent variable* pada penelitian ini adalah besar nilai konsentrasi ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra* L.) yaitu 0,16 mg/ml, 0,08 mg/ml, 0,04 mg/ml, 0,02 mg/ml dan 0,01 mg/ml.

4.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat atau *dependent variable* pada penelitian ini adalah potensi antibiofilm yang dapat dinilai menggunakan *optical density* (OD). Nilai OD yang diukur ada tiga, yaitu nilai OD pencegahan perlekatan biofilm *K. pneumoniae*, nilai OD penghambatan pertumbuhan biofilm *K. pneumoniae*, dan nilai OD penghancuran biofilm *K. pneumoniae*.

4.5 Pengulangan

Pada penelitian ini jumlah perlakuan yang digunakan yaitu sebanyak delapan jenis perlakuan. Dalam menentukan jumlah pengulangan yang perlu dilakukan maka dapat dihitung menggunakan rumus Federer sebagai berikut (Samdal *et al.*, 2003).

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

$$(8-1)(n-1) \geq 15$$

$$7n - 7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 3,142$$

$$n = 3$$

Berdasarkan hasil perhitungan diatas, dapat diketahui bahwa jumlah pengulangan yang perlu dilakukan yaitu minimal sebanyak 3 kali pada setiap perlakuan.

4.6 Definisi Operasional

1. Daun murbei hitam yang digunakan adalah daun tanpa hama tanaman, masih muda dan segar yang dipetik 5-7 daun dari pucuk. Daun murbei hitam diperoleh dari kebun di daerah Wagir, Kab. Malang.
2. Ekstak daun murbei hitam (*Morus nigra* L.) adalah hasil ekstraksi cair daun murbei hitam dengan pelarut etanol 96% yang diperoleh menggunakan metode ekstraksi ultrasonik. Ekstak ini dibuat di Laboratorium Fitokimia Prodi Farmasi Fakultas Kedokteran UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. *Klebsiella pneumoniae* yang digunakan adalah *K. pneumoniae* pembentuk biofilm yang diperoleh dari Laboratorium Wiyasa Mandiri Malang. *K. pneumoniae* tersebut telah dilakukan identifikasi karakterisasi meliputi pewarnaan gram, uji biokimia, dan uji biofilm dengan hasil yang sesuai seperti ciri-ciri *K. pneumoniae* pada masing-masing jenis uji identifikasi.

4. Kontrol positif pada penelitian ini menggunakan campuran antibiotik ciprofloksasin konsentrasi 65 µg/ml yang ditambahkan dengan suspensi bakteri *K. pneumoniae*.
5. Kontrol negatif pada penelitian ini menggunakan campuran media TSB + glukosa 1% ditambah dengan suspensi bakteri *K. pneumoniae*.
6. Kontrol media pada penelitian ini menggunakan media TSB + glukosa 1%.
7. Konsentrasi ekstrak daun murbei yang digunakan pada penelitian ini adalah 0,16 mg/ml, 0,08 mg/ml, 0,04 mg/ml, 0,02 mg/ml dan 0,01 mg/ml. Konsentrasi diperoleh melalui pengenceran bertingkat dari larutan stok yang telah dibuat sebelumnya.
8. *Optical Density* (OD) merupakan suatu nilai kuantitatif yang diperoleh melalui pembacaan hasil pengukuran pada alat *microplate reader*. Nilai OD ini menunjukkan ketebalan dari biofilm yang dibentuk oleh *K. pneumoniae*.
9. Uji pertumbuhan biofilm pada penelitian ini menggunakan metode *tissue culture plate* (TCP). Metode ini merupakan uji kuantitatif dengan menggunakan *plate* jenis *96 well plate*. Metode TCP ini dapat mengelompokkan bakteri sesuai dengan kemampuannya dalam membentuk biofilm sesuai dengan nilai OD pada *microplate reader*. Bakteri pembentuk biofilm dikelompokkan menjadi empat, yaitu bukan pembentuk biofilm/*non-biofilm producer*, pembentuk biofilm lemah /*weak-biofilm producer*, pembentuk biofilm sedang/*moderate-biofilm producer*, dan pembentuk biofilm kuat/*strong-biofilm producer*.
10. Uji pencegahan perlekatan biofilm adalah uji yang dilakukan untuk mengetahui kekuatan ekstrak daun murbei hitam dalam mencegah proses

perlekatan biofilm *K. pneumoniae* pada permukaan benda yang dapat diketahui dengan mengukur nilai OD pada *microplate reader*.

11. Uji penghambatan pembentukan biofilm merupakan uji yang dilakukan untuk mengetahui kekuatan ekstrak daun murbei hitam dalam menghambat proses pembentukan biofilm *K. pneumoniae* pada permukaan benda yang dapat diketahui dengan mengukur nilai OD pada *microplate reader*.
12. Uji penghancuran biofilm merupakan uji yang dilakukan untuk mengetahui kekuatan ekstrak daun murbei hitam dalam menghancurkan/mendegradasi biofilm yang telah dibentuk oleh *K. pneumoniae* pada permukaan benda yang dapat diketahui dengan mengukur nilai OD pada *microplate reader*.

4.7 Kriteria Penelitian

4.7.1 Kriteria Inklusi

1. Daun murbei hitam spesies *Morus nigra* L. berwarna hijau, tanpa hama tanaman, masih muda dan segar yang dipetik 5-7 daun dari pucuk yang diperoleh dari kebun di daerah Wagir, Kab. Malang.
2. *Klebsiella pneumoniae* pembentuk biofilm yang diperoleh dari Laboratorium Wiyasa Mandiri Malang.
3. Koloni *Klebsiella pneumoniae* yang tumbuh pada media *MacConkey* dan berwarna merah muda mengkilap setelah diinkubasi selama 18-24 jam dengan suhu 37°C.
4. Koloni *Klebsiella pneumoniae* yang berwarna merah, berukuran kecil serta berbentuk batang/basil pada uji pewarnaan gram.
5. Koloni *Klebsiella pneumoniae* yang menghasilkan nilai positif dan negatif sesuai karakteristiknya pada uji biokimia TSIA, Urea dan IMVIC.

6. Koloni *Klebsiella pneumoniae* yang membentuk biofilm pada uji pertumbuhan biofilm dengan metode *tissue culture plate*.

4.7.2 Kriteria Eksklusi

1. Daun murbei hitam yang tidak berwarna hijau, memiliki hama tanaman, sudah tua dan rusak.
2. *Klebsiella pneumoniae* yang tidak tumbuh pada media *MacConkey*.
3. *Klebsiella pneumoniae* yang tidak berwarna merah, berukuran kecil serta berbentuk batang/basil pada uji pewarnaan gram.
4. Koloni *Klebsiella pneumoniae* yang menghasilkan nilai positif dan negatif tidak sesuai karakteristiknya pada uji biokimia TSIA, Urea dan IMVIC.
5. *Klebsiella pneumoniae* yang tidak dapat membentuk biofilm pada uji pertumbuhan biofilm dengan metode *tissue culture plate*.

4.8 Alat dan Bahan Penelitian

4.8.1 Alat-alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah timbangan analitik, gelas kimia, labu penampung, cawan petri, penjepit cawan petri, desikator, spatula, pemanas aquades, kertas saring, *rotary evaporator*, blender, oven, tabung reaksi, ose, lampu spiritus, *erlenmeyer*, bunsen, inkubator, spektrofotometer, korek api, kertas label, objek glass, *cover glass*, mikroskop, pipet, *beaker glass*, *microplate 96 well* merk *biologix*, *microplate reader*, *timer* dan mesin ultrasonik.

4.8.2 Bahan Penelitian

4.8.2.1 Daun Murbei Hitam (*Morus nigra* L.)

Daun murbei hitam (*Morus nigra* L.) diperoleh dengan cara memanen dari kebun di daerah Wagir, Kab. Malang. Daun yang digunakan merupakan daun

yang tanpa hama tanaman, masih muda dan segar yang dipetik 5-7 daun dari pucuk. Daun diambil dari tanaman murbei dewasa yang tumbuh pada kondisi tanah yang gembur, tanpa pemberian pestisida, dan pengairan langsung dari air hujan serta sungai di dekat kebun.

4.8.2.2 Bahan Uji

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah pelarut etanol 96%, medium agar *MacConkey*, kristal violet 0,1%, lugol, alkohol, safranin, aquades steril, kertas penghisap atau tissue, minyak emersi, *Phosphate-Buffered Saline* (PBS), *Trypticase Soy Broth* (TSB) dengan 1% glukosa (TSBglu), dan antibiotik ciprofloksasin.

4.8.2.3 Bakteri Uji

Bakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah isolat *Klebsiella pneumoniae* pembentuk biofilm berasal dari isolat pasien pneumonia yang diperoleh dari Laboratorium Wiyasa Mandiri Malang.

4.9 Prosedur Penelitian

4.9.1 Persiapan Daun Murbei Hitam

Daun murbei hitam dipilih daun yang berwarna hijau, tanpa hama, masih muda dan segar yang dipetik 5-7 daun dari pucuk untuk digunakan. Setelah itu daun dicuci sampai bersih dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Daun murbei hitam yang telah kering, dimasukkan ke oven dengan suhu 40°C hingga daun benar-benar kering. Kemudian daun dihaluskan menggunakan blender hingga menjadi bubuk (simplisia).

4.9.2 Pembuatan Ekstrak Daun Murbei Hitam

Ekstrak dibuat menggunakan pelarut etanol 96% dengan metode ekstraksi ultrasonic/sonokimia. Ekstraksi dengan bantuan ultrasonik ini memiliki keunggulan lebih aman, sederhana, efisien, dan waktu ekstraksi yang lebih cepat dibandingkan dengan teknik ekstraksi konvensional. Bubuk murbei hitam ditimbang sebanyak 300 gram dan ditambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 3000 ml. Kemudian dilakukan sonikasi selama 2 menit sebanyak 3 kali. Setelah itu campuran larutan ekstrak disaring menggunakan kertas saring dan filtratnya ditampung. Kemudian filtrat tersebut diuapkan menggunakan *Rotary Vacuum Evaporator* pada tekanan 24 kPa dan suhu 40°C sehingga didapatkan ekstrak kental. Selanjutnya ekstrak dimasukkan ke dalam oven untuk pengeringan selama 24 jam pada suhu 50 °C, kemudian berat ekstrak ditimbang menggunakan timbangan analitik.

4.9.3 Uji Fitokimia Ekstrak Daun Murbei (Modifikasi Latifah, 2015)

4.9.3.1 Uji Flavonoid

Ekstrak daun murbei hitam sebanyak 1 mg dimasukkan ke dalam tabung reaksi, setelah itu dilarutkan dalam etanol panas 50% sebanyak 1-2 mL. Kemudian, serbuk Mg dan 4-5 tetes HCl pekat ditambahkan ke dalam tabung. Apabila terbentuk larutan berwarna merah atau jingga maka menunjukkan hasil positif adanya kandungan flavonoid.

4.9.3.2 Uji Triterpenoid

Ekstrak daun murbei hitam 1 mg dimasukkan dalam tabung reaksi, setelah itu dilarutkan dalam kloroform 0,5 mL dan ditambahkan asetat anhidrat 0,5 mL. Kemudian, H₂SO₄ pekat ditambahkan sebanyak 1-2 mL melalui dinding

tabung. Apabila terbentuk cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan dua pelarut menunjukkan hasil positif adanya kandungan triterpenoid.

4.9.3.3 Uji Alkaloid

Ekstrak daun murbei hitam sebanyak 1 mg dimasukkan dalam tabung reaksi, kemudian 0,5 mL HCl 2% ditambahkan dan larutan dibagi menjadi dua tabung. Tabung I ditambahkan reagen Dragendroff 2-3 tetes, sedangkan tabung II ditambahkan reagen Mayer 2-3 tetes. Apabila terbentuk endapan berwarna jingga pada tabung I dan endapan berwarna putih atau kekuningan pada tabung II maka menunjukkan hasil positif adanya kandungan alkaloid.

4.9.3.4 Uji Steroid

Ekstrak daun murbei hitam 1 mg dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian dilarutkan dalam kloroform 0,5 mL, setelah itu ditambahkan asam asetat anhidrat 0,5 mL. Kemudian, 1-2 mL H₂SO₄ pekat ditambahkan melalui dinding tersebut. Apabila terbentuk cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan dua pelarut menunjukkan hasil positif adanya kandungan steroid.

4.9.3.5 Uji Saponin

Ekstrak daun murbei hitam pekat 1 ml dimasukkan ke dalam tabung reaksi, setelah itu ditambah aquades 5 mL dan dikocok selama 30 detik. Hasil positif adanya kandungan saponin ditunjukkan dengan adanya busa yang terbentuk dan bertahan selama 30 detik. Setelah itu untuk mempertahankan busa bisa ditambahkan HCl 1 M.

4.9.3.6 Uji Fenolik

Ekstrak daun murbei hitam dimasukkan 1 ml dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan larutan FeCl₃ 1% sebanyak 10 tetes. Apabila terbentuk

larutan yang berwarna hijau, merah, ungu, biru atau hitam pekat maka menunjukkan hasil positif adanya kandungan fenol.

4.9.3.7 Uji Tanin

Ekstrak daun murbei pekat 1,5 ml dimasukkan dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan aquades panas beberapa tetes. Setelah itu biarkan dingin kemudian disaring dan tambahkan NaCl 10% 3 tetes lalu disaring. Selanjutnya tambahkan FeCl₃ 2 tetes. Apabila menghasilkan warna hijau kehitaman atau biru tua, maka sampel positif mengandung tanin.

4.9.4 Persiapan Larutan Ekstrak

Pada penelitian ini pembuatan serial konsentrasi diawali dengan pembuatan larutan stok dilanjutkan dengan pengenceran bertingkat atau *serial dilution*. Larutan stok dibuat sebesar 0,64 mg/ml dengan cara melarutkan 6,4 mg ekstrak daun murbei hitam ke dalam tabung I berisi 10 ml DMSO 10% (1 ml DMSO dan 9 ml aquades). Setelah tabung I divortex, kemudian diambil sebanyak 5 ml dari tabung tersebut dan dilarutkan ke dalam tabung II berisi 5 ml DMSO 10% (0,5 ml DMSO dan 4,5 aquades). Dengan metode yang sama dilakukan pengenceran bertingkat dengan kelipatan setengahnya hingga didapat serial konsentrasi 0,16 mg/ml, 0,08 mg/ml, 0,04 mg/ml, 0,02 mg/ml dan 0,01 mg/ml.

4.9.5 Kultur *Klebsiella pneumoniae* pada Agar MacConkey

Bakteri *K. pneumoniae* diinokulasi pada medium agar MacConkey kemudian diinkubasi pada inkubator selama 18-24 jam dengan suhu 37°C. Setelah itu, dilakukan pengamatan terhadap perubahan warna pada media agar. Pada medium agar akan terlihat koloni *K. pneumoniae* berwarna merah muda, besar, dan mengkilap.

4.9.6 Persiapan Media Pertumbuhan Biofilm

Media yang digunakan pada penelitian ini adalah *Trypticase Soy Broth* (TSB) yang ditambahkan glukosa 1%. Pertama, media TSB sebanyak 2,4 gram dilarutkan dalam 30 ml aquades dengan cara dipanaskan dan dihomogenkan. Selanjutnya larutan disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Kemudian media TSB yang telah steril ditambahkan glukosa 1%.

4.9.7 Penyiapan Suspensi Bakteri Uji

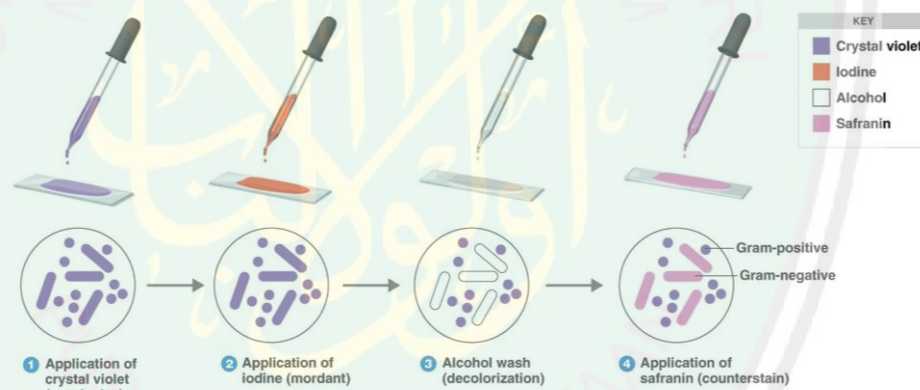
K. pneumoniae yang telah diremajakan pada media *MacConkey* diambil satu ose dan diinokulasi pada tabung reaksi yang berisi media TSB 1% glukosa. Selanjutnya tabung reaksi dihomogenkan dan diinkubasi pada 37°C selama 24 jam. Kemudian kepadatan bakteri diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 595 nm (Diana, 2013).

4.9.8 Identifikasi Bakteri dengan Pewarnaan Gram (Modifikasi Baban, 2017; Nurhidayati *dkk*, 2015)

Pewarnaan gram bertujuan untuk mengetahui *K. pneumoniae* termasuk gram positif atau gram negatif. Langkah pertama yang dilakukan yaitu meneteskan aquades steril 1–2 tetes di atas kaca objek, selanjutnya koloni bakteri diambil satu ose dari media dan diletakkan di atas aquades steril serta disebar hingga merata, biarkan kering oleh udara. Setelah olesan benar-benar kering, panaskan kaca objek tersebut beberapa kali di atas nyala api dengan cara diayunkan sampai kaca objek terasa agak panas bila ditempelkan pada punggung tangan. Kemudian tetesi kaca objek tersebut dengan larutan kristal violet (Gram A), dan diamkan selama satu menit, selanjutnya cuci menggunakan aquades dan keringkan. Langkah berikutnya tetesi kaca objek dengan larutan iodium (Gram B) dan biarkan selama 2 menit,

kemudian cuci menggunakan aquades dan keringkan. Selanjutnya kaca objek ditetesi dengan larutan etanol 96% (Gram C) dan tunggu selama 30 detik, kemudian cuci menggunakan aquades dan keringkan. Selanjutnya tetesi dengan larutan safranin (Gram D) atau zat penutup dan diamkan selama 30 detik, kemudian cuci kaca objek menggunakan aquades dan keringkan. Langkah terakhir amati menggunakan mikroskop pada pembesaran kuat.

Apabila bakteri berwarna violet maka bakteri itu termasuk bakteri gram positif dan apabila bakteri berwarna merah maka termasuk bakteri gram negatif. Pada mikroskop juga dapat diamati bentuk dari sel bakteri termasuk bulat (coccus), batang (basil), ataupun bergelombang (spiral). *Klebsiella pneumoniae* berwarna merah, berukuran kecil dan berbentuk batang/basil.



Gambar 4.1 Prosedur Pewarnaan Gram
(sumber: laboratoryinfo.com)

4.9.9 Identifikasi Bakteri dengan Uji Biokimia

4.9.9.1 Uji Biokimia pada media *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA)

Koloni murni pada media Agar Darah atau *Mac Conkey* diambil menggunakan jarum lurus kemudian ditusuk dan digores pada media TSIA. Hasil diamati setelah inkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Data yang

didapat dari percobaan ini yaitu fermentasi glukosa, produksi gas, dan hidrogen sulfide (Gary W, 2016).

4.9.9.2 Uji Urease

Uji ini dilakukan dengan cara menggosokkan pembiakan 1 ose pada permukaan agar miring. Setelah itu diinkubasi pada suhu 37° selama 24 jam. Hasil dinyatakan positif apabila menghasilkan warna merah muda dan negatif apabila warna tidak berubah. *Klebsiella pneumoniae* menghasilkan nilai positif pada pemeriksaan ini (Hart, 2004; Brooks *et al.*, 2015).

4.9.9.3 Uji *Indol, Methyl red, Voges Preskauer, Simmon's Citrate* (IMViC)

a. **Indol**

Uji indol bertujuan untuk mengetahui apakah bakteri dapat membentuk Indol dari degradasi asam amino tryptophan. Medium yang digunakan yaitu *tryptone broth*. Uji ini dimulai dengan menginokulasi isolat bakteri ke dalam *tryptone broth* dan diinkubasi selama 24 jam. Setelah itu, menambahkan beberapa tetes *reagen Kovac's* pada kultur broth dan tidak perlu dihomogenkan. Hasil positif menunjukkan warna merah muda pada permukaan *broth* (Arifin, 2013).

b. ***Methyl red***

Uji *Methyl Red* (MR) digunakan untuk menentukan apakah glukosa dapat diubah menjadi produk asam seperti asam laktat, asam asetat, atau asam format. Medium yang digunakan untuk pengujian ini adalah medium MR-VP *broth*. Uji ini dilakukan dengan cara menginokulasikan masing-masing isolat bakteri ke dalam MR-VP broth lalu diinkubasi selama 24 jam. Setelah diinkubasi kemudian ditambahkan 3-5 tetes *methyl red* pada masing-masing

tabung reaksi lalu dihomogenkan. Hasil positif menunjukkan warna merah muda pada *broth*. Hasil negatif menunjukkan warna kuning (Arifin, 2013).

c. *Voges Proskauer*

Uji *Voges-Proskauer* (VP) digunakan untuk menentukan apakah glukosa dapat diubah menjadi asetil metil karbinol. Medium yang digunakan untuk pengujian ini adalah medium MR-VP *broth*. Uji ini dilakukan dengan cara menginokulasi masing-masing isolat bakteri ke dalam medium MR-VP *broth* lalu diinkubasi selama 24 jam. Setelah diinkubasi kemudian ditambahkan 5 tetes reagen VP A (yang mengandung naphthol) dan ditambahkan pula 5 tetes reagen VP B (yang mengandung KOH), kemudian dikocok hingga homogen. Sebelum memastikan hasilnya, dibiarkan dahulu selama 15-20 menit agar bereaksi. Reaksi positif ditunjukkan dengan adanya perubahan warna menjadi *pink* atau merah yang mengindikasikan adanya kehadiran aseton. Sedangkan reaksi negatif pada *broth* adalah tidak berubahnya warna medium atau menjadi warna tembaga (Arifin, 2013).

d. *Simmon's Citrate*

Uji *Simmon's Citrate* dilakukan untuk mengetahui apakah bakteri tersebut dapat mengonversi sitrat (salah satu senyawa antara dalam siklus Kreb's) menjadi oksaloasetat. Medium yang digunakan untuk pengujian ini adalah medium Simmon sitrat agar. Satu ose isolat murni digesekkan pada agar miring sitrat lalu diinkubasi selama 24-48 jam. Setelah inkubasi reaksi positif ditunjukkan dengan berubahnya warna hijau medium menjadi warna biru. Sedangkan reaksi negatif ditunjukkan dengan tidak terjadinya perubahan warna pada medium (tetap hijau) (Arifin, 2013).

4.9.10 Uji Pertumbuhan Biofilm (Modifikasi Ruchi *et al.*, 2015; AlFattah, 2015)

Pada penelitian ini menggunakan metode *tissue culture plate* untuk mengetahui pembentukan biofilm secara kuantitatif. Metode ini dimulai dengan memasukkan 200 μL suspensi bakteri pada *microplate* dan 200 μL TSB + glukosa 1% pada *microplate* sebagai kontrol negatif. Selanjutnya *plate* diinkubasi pada suhu 37°C selama 72 jam. Kemudian, isi dari masing-masing *plate* dibuang dan *plate* dicuci menggunakan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) sebanyak tiga kali lalu dikeringkan. Kemudian, ditambahkan pewarna kristal violet 0,1% ke setiap *plate* sebanyak 200 μl dan diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit. Setelah 15 menit, isi *plate* dibuang dan dibilas dengan PBS sebanyak tiga kali kemudian ditunggu hingga kering. Selanjutnya 200 μl etanol 96% ditambahkan ke masing-masing *plate* dan dibiarkan selama 15 menit. Kemudian untuk melihat nilai *optical densities* (OD) dari biofilm *K. pneumoniae* yang telah terbentuk, dapat dilihat menggunakan *microtitre plate reader* pada 595 nm. Dalam penilaian uji pertumbuhan biofilm bakteri dibutuhkan nilai *optical densities cut-off* (OD_{cut}) yaitu nilai yang didapat dari rata-rata OD kontrol negatif + (3 kali standar deviasi kontrol negatif). Nilai OD akhir didapat dari nilai rata-rata $\text{OD}_{\text{suspensi}}$ dibandingkan dengan OD_{cut} . Hasil dari perhitungan diinterpretasikan sebagai berikut.

- a. *Non-biofilm producer* / Bukan pembentuk biofilm (0), $\text{OD}_{\text{suspensi}} \leq \text{OD}_{\text{cut}}$
- b. *Weak-biofilm producer* / Pembentuk biofilm lemah (+ atau 1), $\text{OD}_{\text{cut}} < \text{OD}_{\text{suspensi}} \leq 2 \times \text{OD}_{\text{cut}}$
- c. *Moderate-biofilm producer* / Pembentuk biofilm sedang (++ atau 2), $2 \times \text{OD}_{\text{cut}} < \text{OD}_{\text{suspensi}} \leq 4 \times \text{OD}_{\text{cut}}$

- d. *Strong-biofilm producer* / Pembentuk biofilm kuat (+++ atau 3), $4 \times OD_{cut}$
< $OD_{suspensi}$

4.9.11 Uji Aktivitas Antibiofilm Murbei Hitam Terhadap Bakteri Uji

4.9.11.1 Uji Aktivitas Pencegahan Perlekatan Biofilm (Modifikasi Merrit *et al.*, 2005; Kining *et al.*, 2016; AlFattah, 2015)

Ekstrak daun murbei hitam sebanyak 200 μ L dengan variasi konsentrasi dimasukkan ke dalam *plate*. Antibiotik ciprofloksasin sebanyak 200 μ L dimasukkan ke dalam *plate* kontrol positif pada *microplate 96 well*. Kemudian *microplate* ditutup dan diinkubasi dalam inkubator selama 60 menit pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi, buang isi *microplate* dan cuci sebanyak tiga kali menggunakan *Phospate Buffer Saline* (PBS) kemudian dikeringkan. Setelah itu, masukkan 200 μ L suspensi bakteri *K. pneumoniae* ke dalam *plate* uji, *plate* kontrol positif dan *plate* kontrol negatif, kemudian masukkan TSB + glukosa 1% ke dalam *plate* kontrol media. Setelah itu, *microplate* diinkubasi pada suhu 37°C selama 72 jam. Setelah 72 jam, keluarkan isi *microplate* dan cuci menggunakan PBS sebanyak tiga kali kemudian keringkan. Setelah itu, pewarna kristal violet 0,1% sebanyak 200 μ L ditambahkan kedalam semua *plate* dan inkubasi *plate* pada suhu kamar selama 15 menit. Selanjutnya isi *microplate* dicuci menggunakan PBS sebanyak tiga kali dan dikeringkan. Larutan etanol 96% sebanyak 200 μ L dimasukkan kedalam semua *plate* dan diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit. Kemudian *microplate 96 well* diamati menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 595 nm. Rumus untuk menghitung nilai pencegahan perlekatan biofilm sebagai berikut.

$$\% \text{PPB}_1 = \frac{OD_{kn} - OD_{se}}{OD_{kn}} \times 100\%$$

Keterangan :

PPB₁ = Pencegah Perlekatan Biofilm

OD_{kn} = OD kontrol negatif

OD_{se} = OD sampel eksperimental

4.9.11.2 Uji Aktivitas Penghambatan Pertumbuhan Biofilm (Modifikasi Merrit *et al.*, 2005; Kining *et al.*, 2014; AlFattah, 2015)

Suspensi bakteri *K. pneumoniae* sebanyak 100 µL dan ekstrak daun murbei hitam sebanyak 100 µL dengan variasi konsentrasi dimasukkan kedalam *microplate*. Selanjutnya untuk pembuatan kontrol negatif, masukkan 100 µL suspensi bakteri dan 100 µL media TSB + glukosa 1% pada *microplate*. Pembuatan kontrol media cukup dengan memasukkan 200 µL TSB + glukosa 1% pada *microplate*. Sedangkan untuk pembuatan kontrol positif masukkan 100 µL suspensi bakteri dan 100 µL antibiotik ciprofloksasin pada *microplate*. Kemudian inkubasi *microplate* selama 72 jam pada suhu 37°C. Setelah itu *microplate* dicuci sebanyak tiga kali dengan PBS (*Phosphate Buffer Saline*) dan dikeringkan. Kemudian masukkan kristal violet 0,1% sebanyak 200 µL ke dalam semua *microplate* dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruangan. Setelah itu *microplate* dicuci lagi dengan PBS sebanyak tiga kali dan dikeringkan. Selanjutnya tambahkan etanol 96% sebanyak 200 µL ke semua *plate* dan inkubasi selama 15 menit pada suhu ruangan. Kemudian *microplate 96 well* diamati menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 595 nm. Rumus untuk menghitung nilai penghambatan pertumbuhan biofilm sebagai berikut.

$$\% \text{PPB}_2 = \frac{OD_{kn} - OD_{se}}{OD_{kn}} \times 100\%$$

Keterangan :

PPB₂ = Penghambatan Pertumbuhan Biofilm

OD_{kn} = OD kontrol negatif

OD_{se} = OD sampel eksperimental

4.9.11.3 Uji Aktivitas Penghancuran Biofilm (Modifikasi Merrit *et al.*, 2005; Kining *et al.*, 2014; AlFattah, 2015)

Suspensi bakteri *K. pneumoniae* sebanyak 200 µL dimasukkan ke *plate* uji, *plate* kontrol positif dan *plate* kontrol negatif pada *microplate* 96 well. Selain itu media TSB + glukosa 1% juga dimasukkan ke dalam *plate* kontrol media sebanyak 200 µL. Kemudian tutup *microplate* dan inkubasi dalam inkubator selama 72 jam dengan suhu 37°C. Setelah itu, keluarkan isi *microplate* dan cuci sebanyak tiga kali dengan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) dan dikeringkan. Kemudian, ekstrak daun murbei hitam sebanyak 200 µL dengan variasi konsentrasi dimasukkan ke dalam *plate* uji. Antibiotik ciprofloxacin sebanyak 200 µL dimasukkan ke dalam *plate* kontrol positif. Media TSB + glukosa 1% sebanyak 200 µL juga dimasukkan ke dalam *plate* kontrol media. Suspensi bakteri *K. pneumoniae* sebanyak 200 µL dimasukkan *plate* kontrol negatif. Selanjutnya *microplate* ditutup dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah itu keluarkan isi *microplate* dan cuci dengan PBS sebanyak tiga kali dan dikeringkan. Kemudian pewarna kristal violet 0,1% sebanyak 200 µL dimasukkan ke dalam semua *plate* dan diinkubasi pada suhu kamar selama 15 menit. Setelah itu cuci isi *microplate* menggunakan PBS sebanyak tiga kali dan dikeringkan. Larutan etanol 96% sebanyak 200 µL dimasukkan ke dalam semua *plate* dan diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit. Kemudian *microplate*

96 well diamati menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 595 nm. Rumus untuk menghitung penghancuran biofilm adalah sebagai berikut.

$$\% \text{ PB} = \frac{OD_{kn} - OD_{se}}{OD_{kn}} \times 100\%$$

Keterangan :

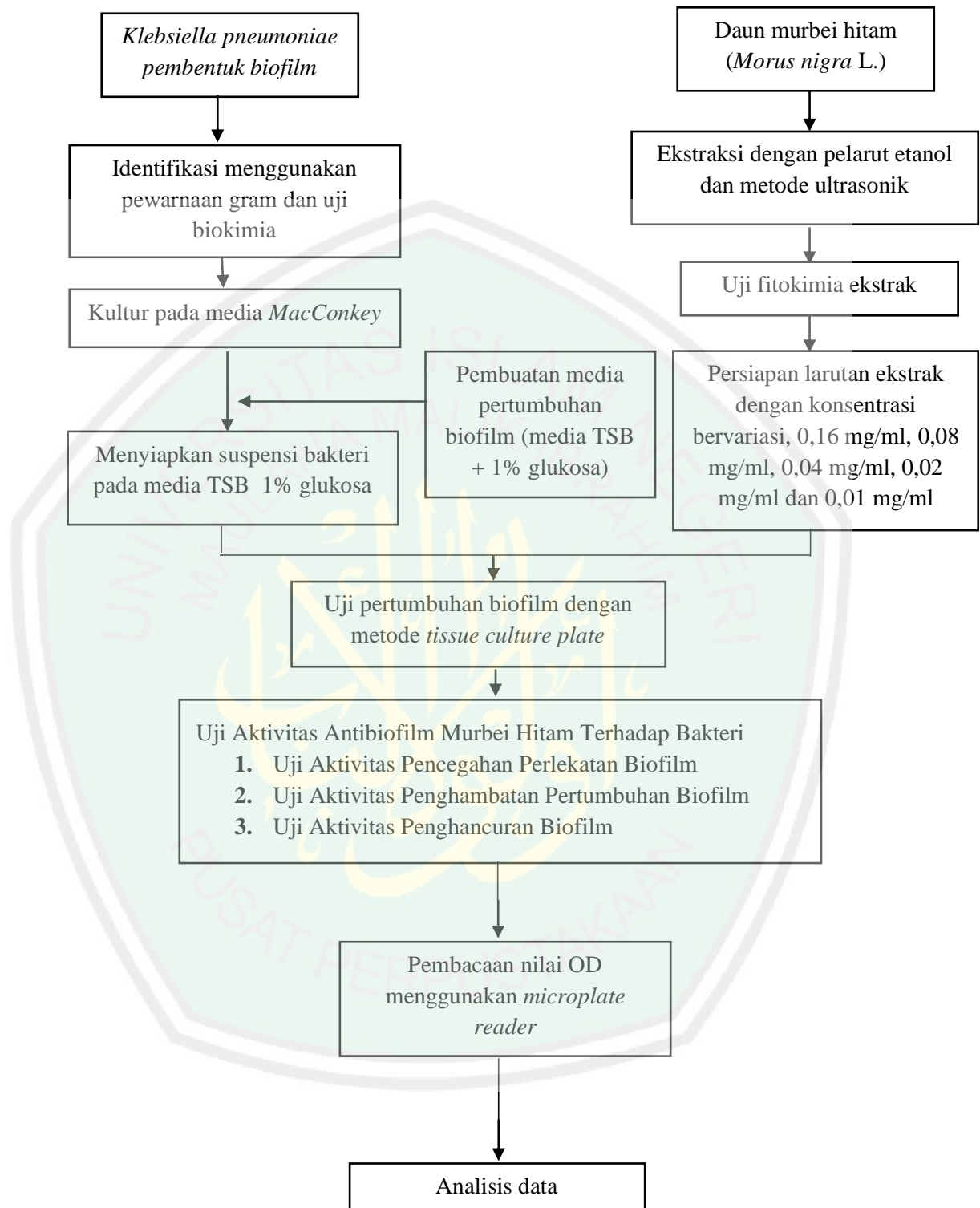
PB = Penghancuran Biofilm

OD_{kn} = OD kontrol negatif

OD_{se} = OD sampel eksperimental



4.10 Alur Penelitian



Gambar 4.2 Alur Penelitian

4.11 Analisis Data

Pada penelitian ini analisis data hasil penelitian dilakukan menggunakan aplikasi *IBM SPSS Statistics* versi 22. Setelah diperoleh hasil penelitian, dilakukan uji normalitas distribusi data menggunakan *Shapiro-Wilk* dan ditentukan apakah data termasuk data yang terdistribusi normal dengan $p\text{-value} > 0,05$ atau data tidak terdistribusi normal dengan $p\text{-value} < 0,05$. Setelah itu dilakukan uji homogenitas data menggunakan *Lavene Test*. Apabila hasil data memiliki distribusi data yang normal dan varians data yang sama atau homogen maka dilanjutkan menggunakan uji *oneway ANOVA*. Akan tetapi apabila hasil data tidak terdistribusi normal atau tidak homogen maka pengujian data dilanjutkan menggunakan *Kruskall Wallis Test*. Adanya perbedaan signifikan antar konsentrasi ditunjukkan dengan nilai $p\text{ value} < 0,05$. Apabila ada perbedaan yang signifikan, pengujian data dilanjutkan dengan *Post-Hoc Tukey HSD* untuk mengetahui signifikansi perbedaan masing-masing kelompok data satu dengan yang lainnya. Selanjutnya, dilakukan uji korelasi *Pearson* untuk mengetahui hubungan antara konsentrasi ekstrak dengan besarnya nilai *optical density* (OD) dalam mencegah perlekatan biofilm, menghambat pertumbuhan biofilm, dan menghancurkan biofilm.

BAB V

HASIL DAN PEMBAHASAN

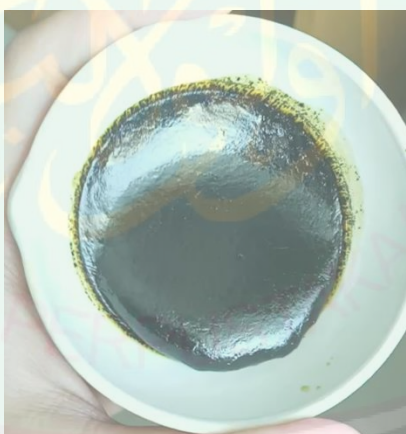
5.1 Hasil

5.1.1 Determinasi Tanaman

Hasil determinasi sampel tanaman dari UPT Laboratorium Herbal Materia Medica Batu pada 22 Januari 2020 membuktikan bahwa sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah benar daun murbei hitam spesies *Morus nigra* L. (Lampiran 2)

5.1.2 Pembuatan Ekstrak

Simplisia daun murbei hitam sebanyak 300 gram dicampur dengan pelarut etanol 96% sebanyak 3000 ml, kemudian dilakukan proses ekstraksi menggunakan alat *ultrasonic* dan *rotary evaporator*. Ekstrak yang dihasilkan berupa ekstrak kental daun murbei yang berwarna coklat tua dan berbau khas daun murbei hitam.

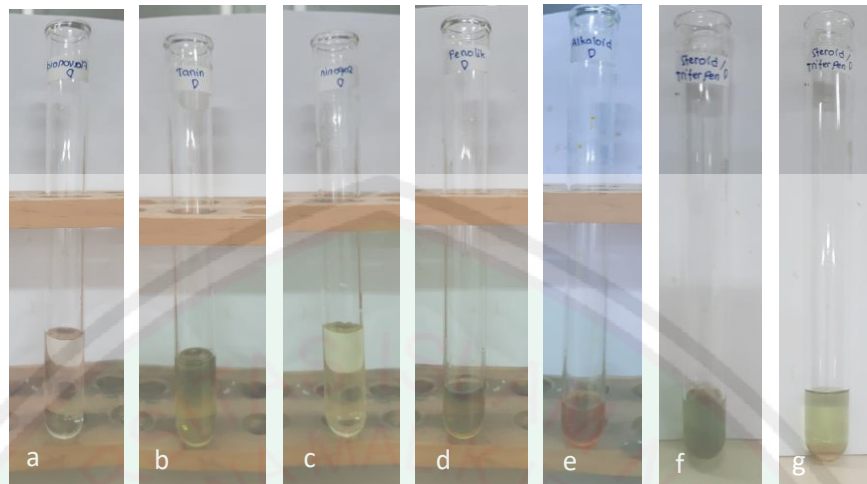


Gambar 5.1 Ekstrak kental daun murbei hitam (*Morus nigra* L.)

5.1.3 Uji Fitokimia

Kandungan metabolit sekunder hasil ekstrak kental daun murbei hitam diidentifikasi dengan uji fitokimia yang dilakukan di Laboratorium Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Malang. Hasil uji fitokimia menyatakan positif

adanya kandungan tannin, fenolik, terpenoid, dan steroid pada sampel ekstrak kental daun murbei hitam pada penelitian ini. (Lampiran 3)

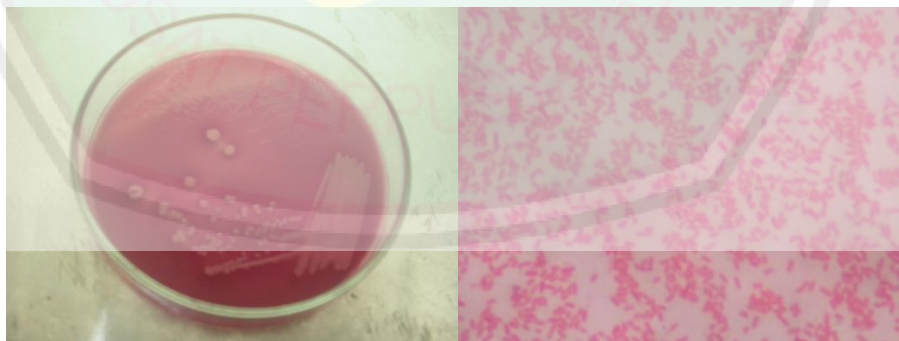


Gambar 5.2 Hasil uji fitokimia ekstrak kental daun murbei hitam

Keterangan: (a) flavonoid (b) tannin (c) saponin (d) fenolik (e) alkaloid (f) terpenoid (g) steroid. Uji fitokimia bernilai negatif pada flavonoid, saponin, dan alkaloid. Uji bernilai positif pada tannin, fenolik, terpenoid dan steroid.

5.1.4 Karakterisasi *Klebsiella pneumoniae*

Uji fenotip karakterisasi *K. pneumoniae* dilakukan di Laboratorium Wiyasa Mandiri Malang dengan spesifikasi metode antara lain pengamatan secara makroskopis, mikroskopis, IMViC dan CRA. (Lampiran 4)



Gambar 5.3 Koloni *Klebsiella pneumoniae* pada media *Mac Conkey Agar* (MCA) dan pewarnaan gram *Klebsiella pneumoniae* dengan daya pembesaran tinggi (x1000).

Pada media *Mac Conkey Agar* (MCA) dapat diamati secara makroskopis koloni *K. pneumoniae* berbentuk bulat, berwarna merah muda dengan tepi koloninya yang rata. Selain itu elevansi koloni berbentuk cembung dan koloni berkonsistensi mucoid. Pengamatan secara mikroskopis dilakukan dengan pewarnaan gram dan diperoleh hasil *K. pneumoniae* berbentuk basil dengan warna merah yang menunjukkan bakteri gram negatif. Sedangkan hasil uji biokimia *K. pneumoniae* dilakukan menggunakan metode IMViC dengan hasil sebagai berikut.

Tabel 5.1 Hasil Uji Biokimia IMViC *K. pneumoniae*

No	Uji Biokimia	Hasil
1	<i>Triple Sugar Iron Agar</i> (TSIA)	As/As H ₂ S (-) G (+)
2	Indol	Negatif (-)
3	MR	Negatif (-)
4	VP	Positif (+)
5	Sitrat	Positif (+)
6	Urease	Positif (+)

Berdasarkan hasil uji biokimia yang telah dilakukan menunjukkan ciri-ciri yang dimiliki oleh *Klebsiella pneumoniae*. Pada TSIA *Klebsiella sp.* memiliki reaksi yaitu asam/asam berwarna kuning pada bagian pangkal dan miring, dapat terdeteksi gas, tidak dihasilkan H₂S. *Klebsiella pneumoniae* merupakan bakteri dengan indol negatif yang menghasilkan reaksi warna kuning pada pemeriksaan. *Klebsiella pneumoniae* menghasilkan warna merah yang memberikan hasil positif terhadap reaksi VP. *Klebsiella pneumoniae* memberikan reaksi positif terhadap penggunaan sitrat yaitu dengan adanya perubahan warna indikator dari hijau menjadi biru.

Selain itu, *Klebsiella pneumoniae* juga menghasilkan nilai urease positif dengan reaksi menghasilkan warna merah muda pada pemeriksaan.

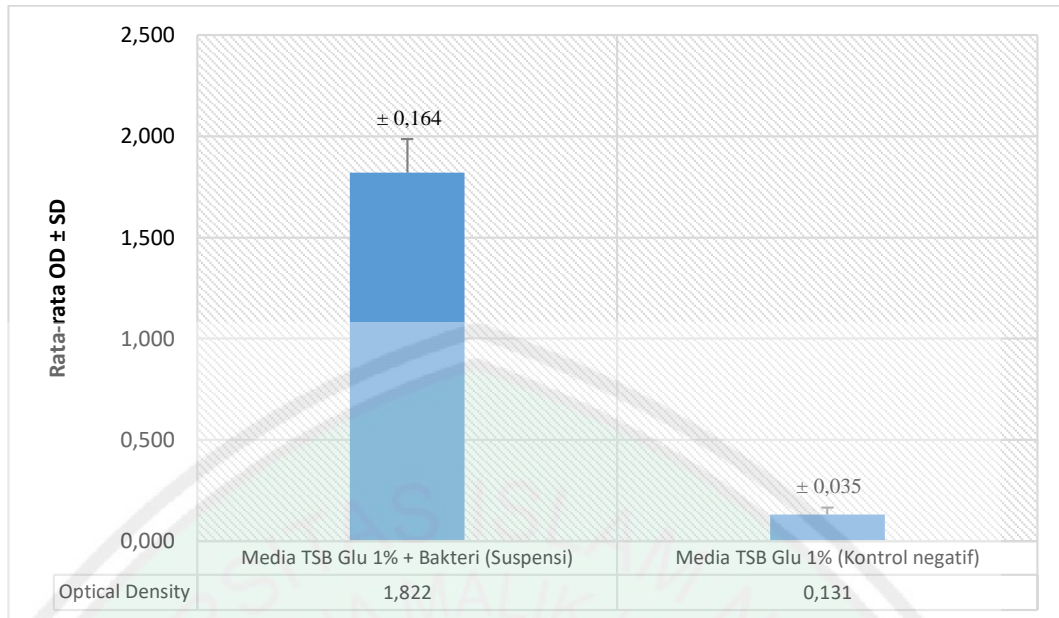
Selanjutnya dilakukan uji *Congo Red Agar* (CRA) untuk mendeteksi produksi biofilm *K. pneumoniae* secara kualitatif dengan menganalisis secara visual warna koloni yang tumbuh pada media agar. Berdasarkan hasil uji CRA *K. pneumoniae* menunjukkan warna hitam, kering, dan terdapat koloni kristalin, maka bakteri uji tergolong sebagai *biofilm producer* atau positif menghasilkan biofilm.



Gambar 5.4 Koloni *Klebsiella pneumoniae* pada media *Congo Red Agar* (CRA) berwarna hitam positif menghasilkan biofilm

5.1.5 Hasil Uji Pertumbuhan Biofilm *Klebsiella pneumoniae*

Pertumbuhan biofilm *K. pneumoniae* dengan *optical density* (OD) suspensi bakteri uji 0,2 yang diinkubasi selama 72 jam pada suhu 37°C. Pengukuran OD dilakukan pada panjang gelombang 595 nm. Selanjutnya nilai hasil pertumbuhan biofilm *K. pneumoniae* (OD_{suspensi}) dibandingkan dengan nilai hasil hitung OD_{cut} dan diklasifikasikan sesuai jenis biofilm *K. pneumoniae*.

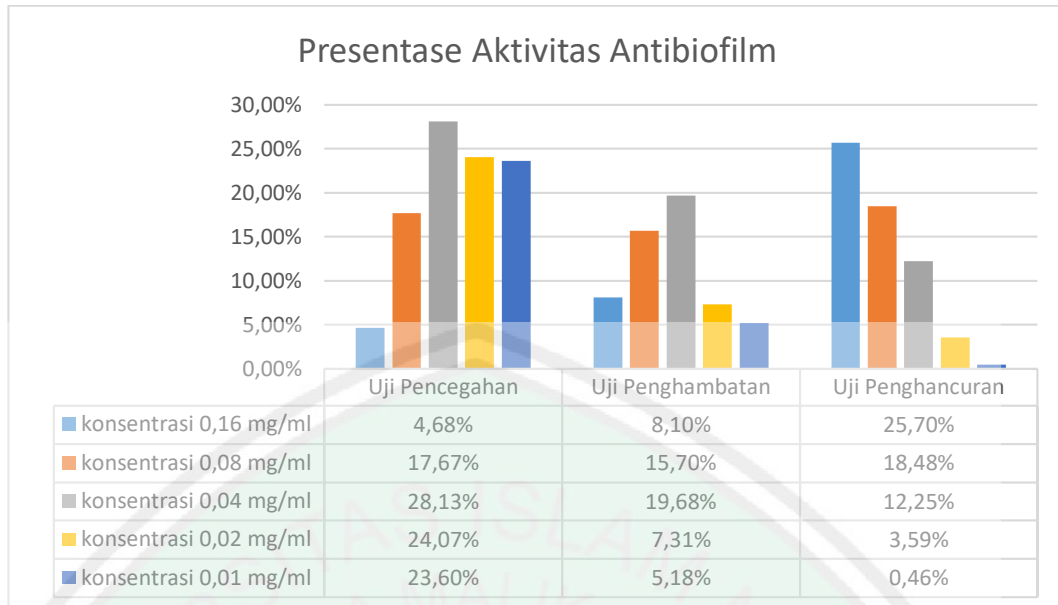


Gambar 5.5 Uji pertumbuhan biofilm *K. pneumoniae*

Pada uji pertumbuhan biofilm, kontrol negatif yang digunakan adalah sama dengan kontrol media pada uji aktivitas antibiofilm ekstrak yaitu media TSB + glukosa 1%. Sehingga dapat diperoleh hasil perhitungan OD_{cut} dengan rumus dasar $OD_{cut} = OD_{kontrol\ negatif} + 3(standar\ deviasi\ OD_{kontrol\ negatif})$ adalah sebesar 0,236 dan $OD_{suspensi}$ adalah 1,822. Kemudian dapat disimpulkan bahwa $4 \times OD_{cut} \leq OD_{suspensi}$, hal ini menunjukkan bahwa uji pertumbuhan biofilm *K. pneumoniae* termasuk dalam kelompok *strong biofilm producer* atau produsen biofilm yang kuat. (Lampiran 5)

5.1.6 Hasil Presentase Uji Aktivitas Antibiofilm Daun Murbei Hitam

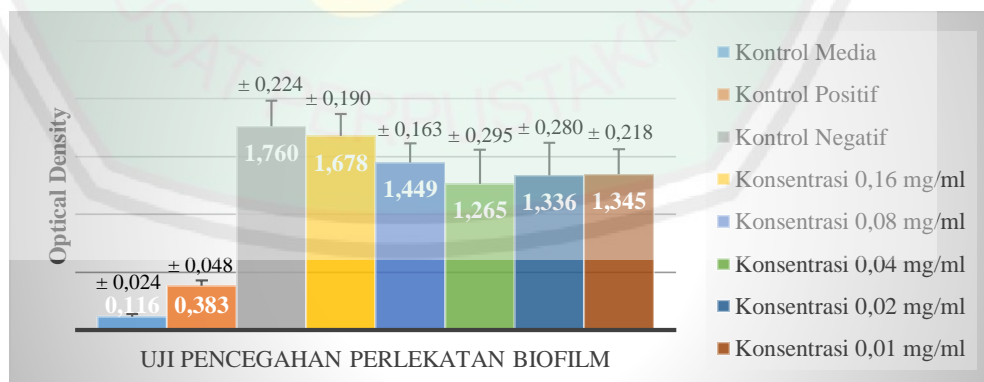
Aktivitas antibiofilm yang diuji pada penelitian ada tiga, yaitu pencegahan pertumbuhan biofilm, penghambatan pertumbuhan biofilm dan penghancuran biofilm. Hasil presentase uji aktivitas antibiofilm daun murbei hitam terhadap biofilm *K. pneumoniae* dapat dilihat pada grafik berikut.



Gambar 5.6 Presentase aktivitas antibiofilm daun murbei terhadap biofilm *K. pneumoniae*

5.1.6.1 Uji Pencegahan Perlekatan Biofilm *K. pneumoniae*

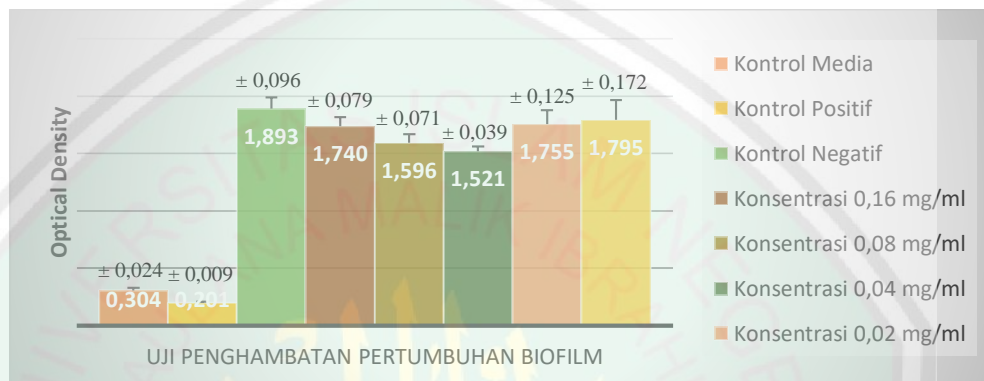
Hasil *optical density* (OD) uji aktivitas antibiofilm daun murbei hitam terhadap pencegahan perlekatan biofilm *K. pneumoniae* dibandingkan dengan nilai kontrol media, kontrol positif, dan kontrol negatif dapat dilihat pada lampiran 6 dan grafik berikut.



Gambar 5.7 Uji aktivitas pencegahan perlekatan biofilm *K. pneumoniae*

5.1.6.2 Uji Penghambatan Pertumbuhan Biofilm *K. pneumoniae*

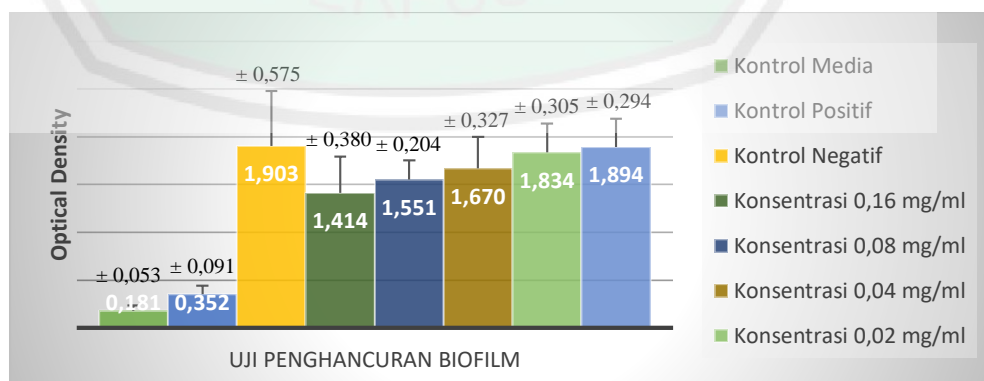
Hasil *optical density* (OD) uji aktivitas antibiofilm daun murbei hitam terhadap penghambatan pertumbuhan biofilm *K. pneumoniae* dibandingkan dengan nilai kontrol media, kontrol positif, dan kontrol negatif dapat dilihat pada lampiran 7 dan grafik berikut.



Gambar 5.8 Uji aktivitas penghambatan pertumbuhan biofilm *K. pneumoniae*

5.1.6.3 Uji Penghancuran Biofilm *K. pneumoniae*

Hasil *optical density* (OD) uji aktivitas antibiofilm daun murbei hitam terhadap penghancuran biofilm *K. pneumoniae* dibandingkan dengan nilai kontrol media, kontrol positif, dan kontrol negatif dapat dilihat pada lampiran 8 dan grafik berikut.



Gambar 5.9 Uji aktivitas penghancuran biofilm *K. pneumoniae*

5.1.7 Hasil Analisis Data

Pada penelitian ini analisis data hasil penelitian dilakukan menggunakan aplikasi *IBM SPSS Statistics* versi 22. Analisis data dilakukan pada masing-masing uji antibiofilm, yaitu uji pencegahan perlekatan biofilm (Lampiran 12), uji penghambatan pertumbuhan biofilm (Lampiran 13) dan uji penghancuran biofilm *K. pneumoniae* (Lampiran 14). Langkah pertama adalah melakukan uji normalitas dan homogenitas dari hasil nilai *optical density* (OD) pada setiap kelompok uji dan kelompok kontrol dalam masing-masing uji antibiofilm. Selanjutnya apabila data normal dan homogen, dilanjutkan dengan uji *One Way Anova* untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan data secara bermakna/signifikan. Kemudian, dilakukan uji *Post Hoc Tukey HSD* untuk mengetahui signifikansi perbedaan masing-masing kelompok data satu dengan yang lainnya. Langkah terakhir yaitu melakukan uji korelasi *pearson* untuk mengetahui tingkat kekuatan hubungan dan arah hubungan antara konsentrasi ekstrak daun murbei hitam dengan besar nilai *optical density* pada masing-masing uji antibiofilm.

5.1.7.1 Uji Normalitas dan Homogenitas

Pada penelitian ini menggunakan uji normalitas *Shapiro-Wilk* untuk mengetahui normalitas data dan uji homogenitas *Lavene* untuk mengetahui homogenitas distribusi data. Pengambilan kesimpulan berdasarkan nilai signifikansi (*p-value*), apabila $p\text{-value} > 0,05$ maka data termasuk data yang terdistribusi normal dan homogen, sedangkan apabila $p\text{-value} < 0,05$ maka data tidak terdistribusi normal dan tidak homogen. Hasil data uji normalitas dan homogenitas setiap kelompok uji dan kelompok kontrol dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel 5.2 Hasil Uji Normalitas dan Homogenitas

Kelompok	Uji Pencegahan Perlekatan Biofilm		Uji Penghambatan Pertumbuhan Biofilm		Uji Penghancuran Biofilm	
	Normalitas	Homogenitas	Normalitas	Homogenitas	Normalitas	Homogenitas
Kon- 0,16	0,599	0,079	0,268	0,069	0,423	0,061
Kon- 0,08	0,548		0,556		0,708	
Kon- 0,04	0,644		0,900		0,379	
Kon- 0,02	0,409		0,448		0,132	
Kon- 0,01	0,379		0,888		0,666	
K+	0,119		0,679		0,903	
K-	0,321		0,419		0,613	
Km	0,284		0,681		0,090	

Keterangan: Kon- (konsentrasi); K+ (kontrol positif); K- (kontrol negatif); Km (kontrol media)

Hasil uji normalitas pada tabel diatas menunjukkan nilai $p > 0,05$ sehingga data *optical density* aktivitas pencegahan perlekatan biofilm, penghambatan pertumbuhan biofilm, dan penghancuran biofilm *K. pneumoniae* terdistribusi normal. Sedangkan, hasil uji homogenitas pada masing-masing uji pencegahan perlekatan biofilm, uji penghambatan pertumbuhan biofilm dan uji penghancuran biofilm menunjukkan nilai $p = 0,079$; $p = 0,069$; dan $p = 0,061$. Sehingga data *optical density* aktivitas pencegahan perlekatan biofilm, penghambatan pertumbuhan biofilm, dan penghancuran biofilm *K. pneumoniae* bervariasi homogen karena nilai $p > 0,05$.

5.1.7.2 Uji One Way Anova

Uji *One Way Anova* bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan data secara bermakna/signifikan. Pengambilan kesimpulan berdasarkan nilai signifikansi (*p-value*), apabila $p\text{-value} < 0,05$ maka data memiliki perbedaan yang bermakna/signifikan, sedangkan apabila $p\text{-value} > 0,05$ maka data tidak

memiliki perbedaan yang bermakna/signifikan. Pada uji antibiofilm pencegahan perlekatan, penghambatan pertumbuhan dan penghancuran biofilm *K. pneumoniae* nilai *p value* berturut-turut adalah $p=0,000$ (Lampiran 12); $p=0,000$ (Lampiran 13); dan $p=0,000$ (Lampiran 14). Sehingga data *optical density* pada tiga aktivitas antibiofilm *K. pneumoniae* tersebut memiliki perbedaan yang signifikan karena nilai $p<0,05$.

5.1.7.3 Uji Post Hoc Tukey HSD

Uji *Post Hoc Tukey HSD* bertujuan untuk mengetahui signifikansi perbedaan masing-masing kelompok data satu dengan yang lainnya. Perbedaan dianggap signifikan apabila nilai $p<0,05$ pada masing-masing kelompok data.

a. Uji Pencegahan Perlekatan Biofilm *K. pneumoniae*

Tabel 5.3 Hasil Uji *Post Hoc Tukey HSD* Pencegahan Perlekatan Biofilm

Kelompok	Kon- 0,16	Kon- 0,08	Kon- 0,04	Kon- 0,02	Kon- 0,01	K+	K-	Km
Kon- 0,16		0,852	0,264	0,474	0,502	0,000	1,000	0,000
Kon- 0,08	0,852		0,945	0,996	0,998	0,000	0,581	0,000
Kon- 0,04	0,264	0,945		1,000	1,000	0,001	0,117	0,000
Kon- 0,02	0,474	0,996	1,000		1,000	0,001	0,238	0,000
Kon- 0,01	0,502	0,998	1,000	1,000		0,001	0,258	0,000
K+	0,000	0,000	0,001	0,001	0,001		0,000	0,735
K-	1,000	0,581	0,117	0,238	0,258	0,000		0,000
Km	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,735	0,000	

Keterangan: Kon- (konsentrasi); K+ (kontrol positif); K- (kontrol negatif); Km (kontrol media). Warna latar biru muda menandakan data signifikan ($p<0,05$).

Hasil uji *post hoc* pada tabel diatas menunjukkan bahwa perbedaaan nilai *optical density* (OD) yang signifikan terjadi antara 5 konsentrasi uji yaitu konsentrasi 0,16 mg/ml, 0,08 mg/ml, 0,04 mg/ml, 0,02 mg/ml dan 0,01 mg/ml dengan kontrol positif dan kontrol media. Kontrol positif dan kontrol media juga memiliki perbedaan nilai OD yang signifikan terhadap 5 konsentrasi uji dan kontrol negatif. Sedangkan, kontrol negatif hanya memiliki perbedaan nilai OD yang signifikan terhadap kontrol positif dan kontrol media saja.

b. Uji Penghambatan Pertumbuhan Biofilm *K. pneumoniae*

Tabel 5.4 Hasil Uji *Post Hoc* Tukey HSD Penghambatan Pertumbuhan Biofilm

Kelompok	Kon- 0,16	Kon- 0,08	Kon- 0,04	Kon- 0,02	Kon- 0,01	K+	K-	Km
Kon- 0,16		0,560	0,133	1,000	0,994	0,000	0,488	0,000
Kon- 0,08	0,560		0,967	0,446	0,207	0,000	0,019	0,000
Kon- 0,04	0,133	0,967		0,094	0,035	0,000	0,003	0,000
Kon- 0,02	1,000	0,446	0,094		0,999	0,000	0,605	0,000
Kon- 0,01	0,994	0,207	0,035	0,999		0,000	0,885	0,000
K+	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,854
K-	0,488	0,019	0,003	0,605	0,885	0,000		0,000
Km	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,854	0,000	

Keterangan: Kon- (konsentrasi); K+ (kontrol positif); K- (kontrol negatif); Km (kontrol media). Warna latar oranye muda menandakan data signifikan ($p < 0,05$).

Hasil uji *post hoc* pada tabel diatas menunjukkan bahwa perbedaaan nilai *optical density* (OD) yang signifikan terjadi antara 5 konsentrasi uji yaitu konsentrasi 0,16 mg/ml, 0,08 mg/ml, 0,04 mg/ml, 0,02 mg/ml dan 0,01 mg/ml

dengan kontrol positif dan kontrol media. Kontrol positif dan kontrol media juga memiliki perbedaan nilai OD yang signifikan terhadap 5 konsentrasi uji dan kontrol negatif. Antara kontrol negatif dengan konsentrasi 0,08 mg/ml, konsentrasi 0,04 mg/ml, kontrol positif dan kontrol media masing-masing memiliki perbedaan nilai OD yang signifikan. Selain itu, antara konsentrasi 0,04 mg/ml dan konsentrasi 0,01 mg/ml juga memiliki perbedaan nilai OD yang signifikan.

c. Uji Penghancuran Biofilm *K. pneumoniae*

Tabel 5.5 Hasil Uji *Post Hoc* Tukey HSD Penghancuran Biofilm

Kelompok	Kon- 0,16	Kon- 0,08	Kon- 0,04	Kon- 0,02	Kon- 0,01	K+	K-	Km
Kon- 0,16		0,999	0,971	0,736	0,603	0,016	0,583	0,004
Kon- 0,08	0,999		1,000	0,951	0,880	0,006	0,866	0,002
Kon- 0,04	0,971	1,000		0,998	0,986	0,002	0,982	0,001
Kon- 0,02	0,736	0,951	0,998		1,000	0,001	1,000	0,000
Kon- 0,01	0,603	0,880	0,986	1,000		0,000	1,000	0,000
K+	0,016	0,006	0,002	0,001	0,000		0,000	0,997
K-	0,583	0,866	0,982	1,000	1,000	0,000		0,000
Km	0,004	0,002	0,001	0,000	0,000	0,997	0,000	

Keterangan: Kon- (konsentrasi); K+ (kontrol positif); K- (kontrol negatif); Km (kontrol media). Warna latar hijau muda menandakan data signifikan ($p < 0,05$).

Hasil uji *post hoc* pada tabel diatas menunjukkan bahwa perbedaan nilai *optical density* (OD) yang signifikan terjadi antara 5 konsentrasi uji yaitu konsentrasi 0,16 mg/ml, 0,08 mg/ml, 0,04 mg/ml, 0,02 mg/ml dan 0,01 mg/ml

dengan kontrol positif dan kontrol media. Kontrol positif dan kontrol media juga memiliki perbedaan nilai OD yang signifikan terhadap 5 konsentrasi uji dan kontrol negatif. Sedangkan, kontrol negatif hanya memiliki perbedaan nilai OD yang signifikan terhadap kontrol positif dan kontrol media saja.

5.1.7.4 Uji Korelasi *Pearson*

Uji korelasi *pearson* bertujuan untuk mengetahui tingkat kekuatan hubungan dan arah hubungan antara konsentrasi ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra* L.) dan besar nilai *optical density* (OD) pada masing-masing uji antibiofilm *K. pneumoniae*. Signifikan atau tidaknya hubungan korelasi ditentukan berdasarkan nilai signifikansi (*p-value*), apabila $p\text{-value} < 0,05$ menunjukkan hubungan korelasi yang signifikan. Sedangkan $p\text{-value} > 0,05$ menunjukkan hubungan korelasi yang tidak signifikan. Penentuan tingkat kekuatan/derajat hubungan uji korelasi *pearson* yaitu sebagai berikut.

- a) Nilai *Pearson Correlation* 0,00 s/d 0,20 = tidak ada korelasi
- b) Nilai *Pearson Correlation* 0,21 s/d 0,40 = korelasi lemah
- c) Nilai *Pearson Correlation* 0,41 s/d 0,60 = korelasi sedang
- d) Nilai *Pearson Correlation* 0,61 s/d 0,80 = korelasi kuat
- e) Nilai *Pearson Correlation* 0,81 s/d 1,00 = korelasi sangat kuat

Hasil korelasi dapat memiliki tanda positif atau negatif. Korelasi yang memiliki tanda positif menunjukkan arah yang searah atau berbanding lurus antar variabel. Sedangkan, korelasi dengan tanda negatif menunjukkan arah yang berlawanan atau berbanding terbalik antar variabel.

a. Uji Pencegahan Perlekatan Biofilm *K. pneumoniae*

Berdasarkan uji korelasi *pearson* yang telah dilakukan, diperoleh hasil nilai signifikansi atau *p value* adalah 0,021 dan nilai *pearson correlation* adalah 0,932 (Lampiran 12). Nilai $p= 0,021$ menunjukkan bahwa hubungan korelasi antara konsentrasi ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra* L.) dengan besar nilai *optical density* (OD) memiliki korelasi yang signifikan karena nilai $p<0,05$. Nilai *pearson correlation* = 0,932 menunjukkan bahwa antara konsentrasi ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra* L.) dan besar nilai *optical density* (OD) memiliki derajat korelasi yang sangat kuat. Arah korelasi bertanda positif menunjukkan arah korelasi searah yang berarti semakin besar tingkat konsentrasi ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra* L.) maka besar nilai OD juga semakin besar. Sehingga dapat disimpulkan bahwa besar nilai *optical density* uji pencegahan perlekatan biofilm *K. pneumoniae* tidak dipengaruhi secara signifikan dengan derajat korelasi yang sangat kuat oleh besar konsentrasi ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra* L.).

b. Uji Penghambatan Pertumbuhan Biofilm *K. pneumoniae*

Berdasarkan uji korelasi *pearson* yang telah dilakukan, diperoleh hasil nilai signifikansi atau *p value* adalah 0,994 dan nilai *pearson correlation* adalah (-) 0,044 (Lampiran 13). Nilai $p= 0,994$ menunjukkan bahwa hubungan korelasi antara konsentrasi ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra* L.) dengan besar nilai *optical density* (OD) memiliki korelasi yang tidak signifikan karena nilai $p>0,05$. Nilai *pearson correlation* = (-) 0,044 menunjukkan bahwa antara konsentrasi ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra* L.) dan besar nilai *optical density* (OD) memiliki derajat korelasi yang lemah. Arah korelasi bertanda

negatif menunjukkan arah korelasi berlawanan yang berarti semakin besar tingkat konsentrasi ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra* L.) maka besar nilai OD semakin kecil. Sehingga dapat disimpulkan bahwa besar nilai *optical density* uji penghambatan perlekatan biofilm *K. pneumoniae* dipengaruhi secara tidak signifikan dengan derajat korelasi yang lemah oleh besar konsentrasi ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra* L.).

c. Uji Penghancuran Biofilm *K. pneumoniae*

Berdasarkan uji korelasi *pearson* yang telah dilakukan, diperoleh hasil nilai signifikansi atau *p value* adalah 0,014 dan nilai *pearson correlation* adalah (-) 0,948 (Lampiran 14). Nilai $p=0,014$ menunjukkan bahwa hubungan korelasi antara konsentrasi ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra* L.) dengan besar nilai *optical density* (OD) memiliki korelasi yang signifikan karena nilai $p<0,05$. Nilai *pearson correlation* = (-) 0,948 menunjukkan bahwa antara konsentrasi ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra* L.) dan besar nilai *optical density* (OD) memiliki derajat korelasi yang sangat kuat. Arah korelasi bertanda negatif menunjukkan arah korelasi berlawanan yang berarti semakin besar tingkat konsentrasi ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra* L.) maka besar nilai OD semakin kecil. Sehingga dapat disimpulkan bahwa besar nilai *optical density* uji penghancuran biofilm *K. pneumoniae* dipengaruhi secara signifikan dengan derajat korelasi yang sangat kuat oleh besar konsentrasi ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra* L.).

5.2 Pembahasan

Ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra* L.) didapat dengan cara ekstraksi ultrasonik/sonokimia. Ekstraksi dengan bantuan ultrasonik dipilih karena memiliki keunggulan lebih aman, sederhana, efisien, waktu ekstraksi yang lebih cepat, rendemen lebih maksimal dan lebih hemat pelarut (Winata dan Yuniarta, 2015). Metode ini juga pernah dilakukan untuk mengekstraksi daun dan buah-buahan dari tiga spesies mulberry *M. laevigata* W. *M. alba* L. dan *M. nigra* L. (Memon *et al.*, 2010).

Hasil ekstrak daun murbei hitam yang telah diperoleh kemudian dilakukan analisis kandungan fitokimianya. Hasil uji fitokimia ekstrak daun murbei hitam pada penelitian ini yaitu positif mengandung senyawa tanin, fenolik, terpenoid dan steroid. Hal ini sesuai dengan penelitian Aulifa *dkk* (2017) bahwa daun murbei hitam memiliki kandungan positif senyawa flavonoid, tannin, monoterpen, dan quinone. Hal ini juga didukung oleh (Rodrigues *et al.*, 2019) yang menerangkan bahwa daun murbei hitam memiliki kandungan flavonoid, tanin, kumarin, polifenol, dan triterpen dan steroid yang tinggi. Adanya kandungan senyawa total fenolik yang tinggi pada daun murbei hitam. Sejumlah besar senyawa fenolik, mungkin bertanggung jawab terhadap aktivitas antibakteri dan antioksidan daun murbei hitam (Memon *et al.*, 2010; Souza *et al.*, 2017).

Pemilihan konsentrasi pada kelompok uji berdasarkan penelitian pendahuluan yang sebelumnya telah dilakukan peneliti untuk mengetahui konsentrasi ekstrak daun murbei yang sesuai dalam aktivitas antibiofilm terhadap *K. pneumoniae*. Cara pembuatan konsentrasi ekstrak yaitu dengan membuat larutan stok terlebih dahulu, kemudian diencerkan menggunakan DMSO 10% hingga didapat konsentrasi 0,16

mg/ml, 0,08 mg/ml, 0,04 mg/ml, 0,02 mg/ml dan 0,01 mg/ml. DMSO digunakan sebagai pelarut karena dapat melarutkan hampir semua senyawa polar dan non polar. Selain itu, DMSO juga dapat digunakan sebagai pengencer ekstrak. DMSO merupakan pelarut yang bersifat organik dan non-bakterisidal hingga konsentrasi tertentu (Assidqi, 2012).

Bakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah *K. pneumoniae* yang diperoleh dari Laboratorium Wiyasa Mandiri Malang. *K. pneumoniae* yang digunakan telah diuji pada kultur media *Mac Conkey Agar* (MCA), uji pewarnaan gram *Klebsiella pneumoniae*, uji biokimia menggunakan metode IMViC, dan uji *Congo Red Agar* (CRA) untuk mendeteksi produksi biofilm *K. pneumoniae* secara kualitatif. Pada media *Mac Conkey Agar* dapat diamati secara makroskopis koloni *K. pneumoniae* berbentuk bulat, berwarna merah muda dengan tepi koloninya yang rata. Selain itu elevansi koloni berbentuk cembung dan koloni berkonsistensi mucoid. Pengamatan secara mikroskopis dilakukan dengan pewarnaan gram dan diperoleh hasil *K. pneumoniae* berbentuk basil dengan warna merah yang menunjukkan bakteri gram negatif. Berdasarkan pengamatan makroskopis dan mikroskopis yang telah dilakukan maka sesuai dengan ciri dari *K. pneumoniae*.

Berdasarkan hasil uji biokimia yang telah dilakukan menunjukkan ciri-ciri yang dimiliki oleh *Klebsiella pneumoniae*. Pada TSIA *Klebsiella sp.* memiliki reaksi yaitu asam/asam berwarna kuning pada bagian pangkal dan miring, dapat terdeteksi gas, tidak dihasilkan H₂S. *Klebsiella pneumoniae* merupakan bakteri dengan indol negatif yang menghasilkan reaksi warna kuning pada pemeriksaan. *Klebsiella pneumoniae* menghasilkan warna merah yang memberikan hasil positif terhadap reaksi VP. *Klebsiella pneumoniae* memberikan reaksi positif terhadap penggunaan

sitrat yaitu dengan adanya perubahan warna indikator dari hijau menjadi biru. Selain itu, *Klebsiella pneumoniae* juga menghasilkan nilai urease positif dengan reaksi menghasilkan warna merah muda pada pemeriksaan. Kemudian, berdasarkan hasil uji CRA yang telah dilakukan, *K. pneumoniae* menunjukkan warna hitam, kering, dan terdapat koloni kristalin, maka bakteri uji tergolong sebagai *biofilm producer* atau positif menghasilkan biofilm.

Setelah semua uji karakterisasi bakteri menunjukkan ciri-ciri yang sesuai dengan *K. pneumoniae*, selanjutnya dilakukan uji pertumbuhan biofilm. Hal ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri uji dalam membentuk biofilm. Suspensi *K. pneumoniae* diukur menggunakan spektrofometer dengan densitas optik 0.220 pada panjang gelombang 595 nm. Pada uji pertumbuhan biofilm, diperoleh hasil perhitungan OD_{cut} adalah sebesar 0,236 dan $OD_{suspensi}$ adalah 1,822. Berdasarkan klasifikasinya *K. pneumoniae* termasuk dalam kelompok *strong biofilm producer* karena nilai $4 \times OD_{cut} \leq OD_{suspensi}$. Hal ini didukung oleh penelitian Galdiero *et al.*, (2020) yang menunjukkan bahwa *Klebsiella pneumoniae* adalah produsen biofilm yang kuat. Seifi *et al.*, (2016) juga melaporkan bahwa mayoritas *K. pneumoniae* (93,6%) adalah produsen biofilm dan hanya 6,4% bukan produsen biofilm. Di antara strain produsen biofilm, 33% dikategorikan sebagai produsen biofilm yang kuat. Pada penelitian Nirwati *et al.*, (2019) juga menunjukkan bahwa di antara 167 isolat *K. pneumoniae* yang diuji, terdapat 143 (85,63%) isolat sebagai produsen biofilm dan di antara produsen biofilm tersebut sebanyak 45 (26,95%) isolat diidentifikasi sebagai produsen biofilm yang kuat.

Prosedure yang digunakan pada penelitian ini telah disesuaikan dengan protokol penelitian terhadap biofilm oleh Merrit *et al.*, (2005) dengan adanya sedikit

modifikasi. Awalnya dilakukan pembuatan suspensi *K. pneumoniae* yang dilakukan dengan cara inkubasi pada suhu 37°C. Suhu inkubasi 37°C merupakan suhu yang optimal untuk pertumbuhan biofilm. Berdasarkan penelitian Mladenović *et al.*, (2019) suhu 37°C dan 44°C dapat merangsang pertumbuhan bakteri planktonic dengan baik.

Selanjutnya, isi dari masing-masing plate dibuang dan *plate* dicuci sebanyak tiga kali dengan 300 µl PBS. *Phosphate-Buffered Saline* (PBS) dipilih untuk pencucian karena bersifat *isotonic* dan *non-toxic* sehingga dapat menjaga jaringan sel bakteri tetap utuh serta mencegahnya pecah. Selain itu, PBS juga mempertahankan nilai pH buffer yang netral (7), sehingga tidak mempengaruhi bakteri selama proses pencucian dalam kaitannya dengan proses difusi dan osmosis dalam sel. PBS juga menyediakan sel-sel dengan air dan ion anorganik massal tertentu yang penting untuk metabolisme sel normal sehingga proses pencucian tidak merusak biofilm (Rosdiana, 2016).

Kemudian untuk pewarnaan biofilm ditambahkan pewarna kristal violet 0.1% ke setiap plate dan diinkubasi pada suhu kamar selama 15 menit. Pada penelitian ini, pewarnaan biofilm menggunakan kristal violet karena telah umum digunakan untuk kuantifikasi pembentukan biofilm (Ommen *et al.*, 2017). Penggunaan kristal violet 0,1% selama 15 menit juga telah dilakukan di beberapa penelitian lainnya yaitu pada penelitian Kining *et al.*, (2016) dan protokol penelitian oral biofilm oleh Lemos *et al.*, (2010). Alasan pemilihan kristal violet sebagai pewarna biofilm pada penelitian karena mudah didapat dan harganya yang terjangkau. Akan tetapi kristal violet memiliki kekurangan yaitu bersifat karsinogen dan mudah meninggalkan noda pada kulit, pakaian, maupun melalui kontak dan tidak mudah dilepas.

Selanjutnya ditambahkan ethanol 96% ke setiap plate dan diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit. Penggunaan etanol bertujuan untuk melarutkan zat pewarna kristal violet sebelum dilakukan pembacaan OD menggunakan *microplate reader*. Penggunaan etanol 96% setelah pewarnaan kristal violet telah umum digunakan pada penelitian biofilm (Reisner *et al.*, 2006; Weisskopf, 2017; Garcia-Aljaro *et al.*, 2020).

Pada setiap uji aktivitas antibiofilm, terdapat jumlah total 8 perlakuan yaitu terdiri dari 5 jenis konsentrasi pada kelompok uji, kontrol positif, kontrol media, dan kontrol negatif. Kontrol positif pada penelitian ini menggunakan antibiotik ciprofloxacin dengan konsentrasi 65 µg/ml. Ciprofloxacin masih dipercaya memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan *K. pneumoniae* secara optimal baik pada masa planktonik maupun biofilm. Singla *et al.*, (2013) menyatakan bahwa ciprofloxacin menunjukkan efektivitas untuk biofilm muda pada 6 µg/ml. Berdasarkan penelitian Abdulhasan *et al.*, (2016) rata-rata MIC untuk ciprofloxacin adalah 0,25 µg/ml. Sedangkan konsentrasi terendah ciprofloxacin yang menghambat pertumbuhan setelah 24 jam inkubasi pada *K. pneumoniae* dalam kondisi biofilm adalah 65 µg/ml dan planktonik adalah 16 µg/ml (Monirzadeh *et al.*, 2019).

Kontrol media pada penelitian ini menggunakan media TSB + glukosa 1%, sedangkan kontrol negatif yang digunakan adalah campuran media TSB + glukosa 1% ditambah dengan suspensi bakteri *K. pneumoniae*. Menurut penelitian Stepanović *et al.*, (2007) dan Mladenović *et al.*, (2019) media TSB yang tidak ditambahkan glukosa tetap dapat mendukung pertumbuhan biofilm karena media TSB sudah memiliki kandungan glukosa sebesar 0,25%. Akan tetapi pada media

TSB yang ditambahkan glukosa 1%, biofilm bakteri yang terbentuk lebih tinggi apabila dibandingkan dengan media TSB tanpa penambahan glukosa (Putri, 2019). Berdasarkan penelitian Mladenović *et al.*, (2019) menunjukkan bahwa berbagai konsentrasi glukosa akan merangsang pertumbuhan biofilm yang terbentuk dari *K. pneumoniae*. Penambahan glukosa 1% pada media TSB sering dilakukan dalam penelitian efek antibiofilm. Shahwany *et al.*, (2016) menggunakan TSB + 1% glukosa untuk menginduksi pertumbuhan biofilm pada *S. aureus* dan *K. pneumoniae*. TSB + 1% glukosa juga merupakan media pertumbuhan biofilm yang baik pada lima strain MDR yaitu *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* dan *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (Farrag *et al.*, 2019).

Pembentukan biofilm terdiri dari beberapa tahap, yaitu *attachment* (perlekatan pada permukaan), pembentukan mikro koloni, formasi dan maturasi struktur tiga dimensi, dan *detachment* (pelepasan) biofilm (Jamal *et al.*, 2015). Pada tahap *attachment* atau penempelan terdapat pengaruh dari protein-protein adhesi yang berada pada permukaan bakteri. Sedangkan pada proses maturasi dipengaruhi oleh *polysaccharide intercellular adhesion* (PIA) atau biasa juga disebut dengan poly- β -linked N-acetylglucosamine (PNAG) (Chen *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2017). Oleh karena itu, dalam aktivitas ekstrak sebagai antibiofilm dapat dilakukan dengan cara mencegah proses penempelan dan menghambat maturasi atau pembentukan biofilm dengan mengganggu komponen-komponen yang berperan pada proses tersebut.

Proses penempelan interseluler pada tahap maturasi biofilm dipengaruhi oleh *polysaccharide intercellular adhesion* (PIA). PIA merupakan polimer dari beta 1-6 linked N-acetyl glucosamine yang diproduksi melalui regulasi dari operon gen

icaABCD pada *Staphylococcus* atau pgaABCD pada *K. pneumoniae* (Otto, 2008; Chen *et al.*, 2014). *K. pneumoniae* memiliki locus gen pgaABCD yang mengkodekan untuk sintesis dan sekresi poly- β -linked N-acetylglucosamine (PNAG). PNAG berperan dalam pembentukan biofilm dan memiliki peran dalam interaksi antara bakteri dan sel host (Chen *et al.*, 2014).

Menurut Slobodníková *et al.*, (2016) bahwa senyawa fenolik tanaman khususnya tanin dan flavonoid, memiliki kemampuan menekan regulasi dari gen *icaA* dan *icaD* pada *S. Aureus* sehingga proses produksi polisakarida interseluler menurun. Hal ini menyebabkan menurunnya produksi PIA atau PNAG sehingga proses agregasi interseluler pada tahap maturasi biofilm terganggu dan siklus pembentukan biofilm pun terganggu. Gen yang paling berpengaruh pada pembentukan biofilm *K. pneumoniae* adalah gen pgaC. Gen pgaC berpartisipasi dalam garam empedu yang menginduksi pembentukan biofilm dan diperlukan untuk virulensi *K. pneumoniae*. Hilangnya pgaC akan mempengaruhi produksi PNAG dan melemahkan peningkatan pembentukan biofilm (Chen *et al.*, 2014).

Beberapa mekanisme aktivitas antibakteri fenolik yaitu dapat berinteraksi dengan protein bakteri dan struktur dinding sel, mengurangi fluiditas membran, menyebabkan kerusakan membran sitoplasma, menghambat sintesis dinding sel, sintesis asam nukleat, atau metabolisme energi (Daglia, 2011; Cushnie *et al.*, 2011; Gyawali *et al.*, 2014). Penelitian aktivitas antibiofilm pada fenolat tumbuhan menunjukkan adanya aktivitas destruktif pada bakteri dan aktivitas yang mengarah pada penghambatan biofilm. Hal ini dilakukan dengan mempengaruhi mekanisme pengaturan bakteri seperti *quorum sensing* atau sistem pengatur global lainnya akan tetapi tidak ada efek pada pertumbuhan bakteri (Silva *et al.*, 2016).

Mekanisme kerja tanin dengan menghambat enzim *reverse transkriptase* dan DNA *topoisomerase*. Hal ini menyebabkan perubahan struktur protein yang membuat denaturasi dari EPS sehingga biofilm terdegradasi. Selain itu, tanin memiliki kemampuan untuk mengikat langsung peptidoglikan dinding sel dan mengganggu integritasnya sehingga dapat menghambat pembentukan biofilm. (Nuria *dkk*, 2009; Kining *dkk*, 2016; Slobodníková *et al.*, 2016).

Sebagian besar terpenoid mampu menghambat dua proses penting untuk kelangsungan hidup mikroba, ini termasuk pengambilan oksigen dan fosforilasi oksidatif. Mikroba aerob membutuhkan oksigen untuk menghasilkan energi untuk pertumbuhannya. Sebelumnya, terbukti bahwa konsentrasi oksigen yang rendah menyebabkan keterbatasan dalam tingkat respirasi bakteri (Mahizan *et al.*, 2019).

Pada penelitian ini terdapat 3 macam uji aktivitas antibiofilm ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra* L.), yaitu pencegahan perlekatan biofilm, penghambatan pertumbuhan biofilm dan penghancuran biofilm pada *K. pneumoniae*. Hasil uji aktivitas antibiofilm ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra* L.) terhadap biofilm *K. pneumoniae* menunjukkan model grafik yang berbeda antara masing-masing uji pencegahan perlekatan biofilm, penghambatan pertumbuhan biofilm dan penghancuran biofilm.

Hasil uji pencegahan perlekatan biofilm *K. pneumoniae* dapat dilihat pada gambar 5.6 yang menunjukkan grafik dengan skema sigmoid. Aktivitas pencegahan terbaik berada di tengah yaitu pada konsentrasi 0,04 mg/ml dengan presentase pencegahan sebesar 28,13%. Aktivitas pencegahan terendah pada konsentrasi 0,16 mg/ml dengan presentase pencegahan sebesar 4,68%. Kemudian, berdasarkan gambar 5.7 diketahui bahwa nilai OD pada konsentrasi ekstrak 0,16 mg/ml, 0,08

mg/ml, 0,04 mg/ml, 0,02 mg/ml dan 0,01 mg/ml secara berturut-turut adalah 1,678; 1,449; 1,265; 1,336; dan 1,345. Hasil ini menunjukkan bahwa nilai OD terendah kelompok uji adalah pada konsentrasi 0,04 mg/ml. Jika dibandingkan dengan nilai OD kontrol negatif sebesar 1,760; ekstrak daun murbei dan antibiotik ciprofloksasin sebagai kontrol positif memiliki nilai OD yang lebih rendah. Penurunan nilai OD ini berarti adanya pengurangan intensitas warna biru hasil pewarnaan kristal violet yang menunjukkan adanya penurunan ketebalan matriks biofilm. Hal ini membuktikan bahwa ekstrak daun murbei memiliki aktivitas antibiofilm dalam mencegah perlekatan biofilm *K. pneumoniae*.

Nilai OD yang diperoleh kemudian dilakukan analisis secara statistik (lampiran 12). Hasil uji statistik menunjukkan bahwa data pencegahan perlekatan biofilm terdistribusi normal ($p \geq 0,05$) dan homogen ($p \geq 0,05$). Oleh karena itu, analisis data dilanjutkan dengan *One Way Anova*. Hasil uji *One Way Anova* menunjukkan nilai $p = 0,000 \leq 0,05$ sehingga aktivitas pencegahan perlekatan biofilm *K. pneumoniae* berbeda secara bermakna/signifikan. Kemudian dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tukey HSD* yang menunjukkan bahwa perbedaaan nilai *optical density* (OD) yang signifikan terjadi antara 5 konsentrasi uji yaitu konsentrasi 0,16 mg/ml, 0,08 mg/ml, 0,04 mg/ml, 0,02 mg/ml dan 0,01 mg/ml dengan kontrol positif dan kontrol media. Kontrol positif dan kontrol media juga memiliki perbedaan nilai OD yang signifikan terhadap 5 konsentrasi uji dan kontrol negatif. Sedangkan, kontrol negatif hanya memiliki perbedaan nilai OD yang signifikan terhadap kontrol positif dan kontrol media saja.

Selanjutnya untuk mengetahui tingkat kekuatan hubungan dan arah hubungan dilakukan uji korelasi *pearson*. Berdasarkan uji korelasi *pearson* yang telah

dilakukan, diperoleh hasil nilai signifikansi atau *p value* adalah 0,021 dan nilai *pearson correlation* adalah 0,932 (Lampiran 12). Nilai $p = 0,021$ menunjukkan bahwa hubungan korelasi antara konsentrasi ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra* L.) dengan besar nilai *optical density* (OD) memiliki korelasi yang signifikan karena nilai $p < 0,05$. Nilai *pearson correlation* = 0,932 menunjukkan bahwa antara konsentrasi ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra* L.) dan besar nilai *optical density* (OD) memiliki derajat korelasi yang sangat kuat. Arah korelasi bertanda positif menunjukkan arah korelasi searah yang berarti semakin besar tingkat konsentrasi ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra* L.) maka besar nilai OD juga semakin besar. Sehingga dapat disimpulkan bahwa besar nilai *optical density* uji pencegahan perlekatan biofilm *K. pneumoniae* tidak dipengaruhi secara signifikan dengan derajat korelasi yang sangat kuat oleh besar konsentrasi ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra* L.).

Hasil uji penghambatan pertumbuhan biofilm *K. pneumoniae* dapat dilihat pada gambar 5.6 yang menunjukkan grafik dengan skema sigmoid. Aktivitas penghambatan terbaik berada di tengah yaitu pada konsentrasi 0,04 mg/ml dengan presentase penghambatan sebesar 19,68%. Aktivitas penghambatan terendah pada konsentrasi 0,01 mg/ml dengan presentase penghambatan sebesar 5,18%. Kemudian, berdasarkan gambar 5.8 diketahui bahwa nilai OD pada konsentrasi ekstrak 0,16 mg/ml, 0,08 mg/ml, 0,04 mg/ml, 0,02 mg/ml dan 0,01 mg/ml secara berturut-turut adalah 1,740; 1,596; 1,521; 1,755; dan 1,795. Hasil ini menunjukkan bahwa nilai OD terendah kelompok uji adalah pada konsentrasi 0,04 mg/ml. Jika dibandingkan dengan nilai OD kontrol negatif sebesar 1,893; ekstrak daun murbei dan antibiotik ciprofloksasin sebagai kontrol positif memiliki nilai OD yang lebih

rendah. Penurunan nilai OD ini berarti adanya pengurangan intensitas warna biru hasil pewarnaan kristal violet yang menunjukkan adanya penurunan ketebalan matriks biofilm. Hal ini membuktikan bahwa ekstrak daun murbei memiliki aktivitas antibiofilm dalam menghambat pertumbuhan biofilm *K. pneumoniae*.

Nilai OD yang diperoleh kemudian dilakukan analisis secara statistik (lampiran 13). Hasil uji statistik menunjukkan bahwa data penghambatan pertumbuhan biofilm terdistribusi normal ($p \geq 0,05$) dan homogen ($p \geq 0,05$). Oleh karena itu, analisis data dilanjutkan dengan *One Way Anova*. Hasil uji *One Way Anova* menunjukkan nilai $p = 0,000 \leq 0,05$ sehingga aktivitas penghambatan pertumbuhan biofilm *K. pneumoniae* berbeda secara bermakna/signifikan. Kemudian dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tukey HSD* yang menunjukkan bahwa perbedaan nilai *optical density* (OD) yang signifikan terjadi antara 5 konsentrasi uji yaitu konsentrasi 0,16 mg/ml, 0,08 mg/ml, 0,04 mg/ml, 0,02 mg/ml dan 0,01 mg/ml dengan kontrol positif dan kontrol media. Kontrol positif dan kontrol media juga memiliki perbedaan nilai OD yang signifikan terhadap 5 konsentrasi uji dan kontrol negatif. Antara kontrol negatif dengan konsentrasi 0,08 mg/ml, konsentrasi 0,04 mg/ml, kontrol positif dan kontrol media masing-masing memiliki perbedaan nilai OD yang signifikan. Selain itu, antara konsentrasi 0,04 mg/ml dan konsentrasi 0,01 mg/ml juga memiliki perbedaan nilai OD yang signifikan.

Selanjutnya untuk mengetahui tingkat kekuatan hubungan dan arah hubungan dilakukan uji korelasi *pearson*. Berdasarkan uji korelasi *pearson* yang telah dilakukan, diperoleh hasil nilai signifikansi atau *p value* adalah 0,994 dan nilai *pearson correlation* adalah (-) 0,044 (Lampiran 13). Nilai $p = 0,994$ menunjukkan bahwa hubungan korelasi antara konsentrasi ekstrak daun murbei hitam (*Morus*

nigra L.) dengan besar nilai *optical density* (OD) memiliki korelasi yang tidak signifikan karena nilai $p > 0,05$. Nilai *pearson correlation* = (-) 0,044 menunjukkan bahwa antara konsentrasi ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra* L.) dan besar nilai *optical density* (OD) memiliki derajat korelasi yang lemah. Arah korelasi bertanda negatif menunjukkan arah korelasi berlawanan yang berarti semakin besar tingkat konsentrasi ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra* L.) maka besar nilai OD semakin kecil. Sehingga dapat disimpulkan bahwa besar nilai *optical density* uji penghambatan perlekatan biofilm *K. pneumoniae* dipengaruhi secara tidak signifikan dengan derajat korelasi yang lemah oleh besar konsentrasi ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra* L.).

Pada uji penghambatan pertumbuhan biofilm *K. pneumoniae* didapatkan derajat korelasi yang lemah. Hal ini kemungkinan diakibatkan oleh banyaknya faktor lain yang ikut mempengaruhi besarnya nilai OD. Pengukuran menggunakan nilai OD tidak melihat penyebab kekeruhan apakah diakibatkan oleh biofilm yang banyak atau akibat penambahan konsentrasi ekstrak. Sehingga nilai OD tidak konsisten dan nilai OD terukur baik hanya pada batas jenuh yaitu konsentrasi 0,04 mg/ml. Kemudian, seiring penambahan konsentrasi diatas batas jenuh akan membuat korelasi antara nilai OD dan tingkat konsentrasi menjadi jelek.

Pada uji pencegahan perlekatan dan penghambatan pertumbuhan biofilm menunjukkan skema bentuk grafik sigmoid. Hal ini bisa disebabkan oleh dosis konsentrasi ekstrak daun murbei hitam. Hal ini berkaitan dengan kadar jenuh ekstrak terhadap pertumbuhan bakteri. Pada uji pencegahan perlekatan dan penghambatan pertumbuhan biofilm, saat mencapai konsentrasi 0,04 mg/ml terjadi pertumbuhan biofilm bakteri terendah. Hal ini menunjukkan batas jenuh dari

ekstrak daun murbei hitam dalam menghambat biofilm adalah pada konsentrasi 0,04 mg/ml, karena pada konsentrasi selanjutnya kemungkinan ekstrak tidak bereaksi terhadap biofilm bakteri secara optimal lagi. Sehingga aktivitas pencegahan perlekatan dan penghambatan pertumbuhan biofilm yang paling baik pada penelitian ini dihasilkan pada batas jenuh konsentrasi ekstrak daun murbei hitam dengan konsentrasi 0,04 mg/ml.

Kemudian, hasil dengan skema bentuk grafik sigmoid juga ditemui pada penelitian yang dilakukan oleh Aghazadeh *et al.*, (2016) yang meneliti efek ekstrak jahe (*Zingiber officinale*) terhadap beberapa bakteri yaitu *K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. aureus* dan *P. aeruginosa* menunjukkan hasil nilai OD yang fluktuatif seiring bertambahnya konsentrasi ekstrak. Penelitian Keerthiga (2015) dan Khanifah (2015) pada uji penghambatan pertumbuhan biofilm *S. aureus* menggunakan anggrek tanah dan menggunakan air perasan jeruk nipis juga menunjukkan pola data grafik sigmoid dengan kadar hambat terbaik berada di tengah. Pada penelitian AlFattah (2015) grafik pada uji penghancuran biofilm *E. coli* dan uji penghambatan pertumbuhan biofilm *P. aeruginosa* menggunakan minyak atsiri herba kemangi juga memiliki pola grafik sigmoid.

Hasil dengan skema sigmoid diduga terjadi karena senyawa aktif pada ekstrak dengan konsentrasi yang kecil memiliki kemampuan penetrasi dengan baik ke dalam bakteri, namun memiliki daya hambat yang kurang kuat. Sedangkan, pada konsentrasi besar, senyawa aktif dari ekstrak memiliki daya cegah dan daya hambat yang lebih kuat akan tetapi tidak dapat berpenetrasi dengan baik ke dalam bakteri. Sehingga aktivitas pencegahan perlekatan dan penghambatan pertumbuhan biofilm yang paling baik dihasilkan pada konsentrasi yang tidak terlalu kecil dan tidak

terlalu besar. Hasil tersebut juga mungkin berkaitan dengan permeabilitas membran luar *K. pneumoniae* sebagai bakteri gram negatif. Secara umum pada bakteri gram negatif membran luarnya berfungsi sebagai penghalang permeabilitas yang hanya memungkinkan molekul hidrofilik kecil untuk masuk ke dalam sel. Selain itu membran luar juga berfungsi membatasi laju penetrasi molekul untuk senyawa antimikroba tertentu dan tidak termasuk molekul yang lebih besar. Selain itu, mereka juga memiliki pompa resisten multi-obat yang mengecualikan beberapa senyawa antibakteri melintasi penghalang. Bangunan khusus ini membuat bakteri gram negatif lebih toleran terhadap asupan senyawa asing (Lambert, 2002; Ramli *et al.*, 2017).

Bakteri gram positif lebih mudah dihambat dibandingkan dengan bakteri gram negatif. Bakteri gram negatif memiliki membran luar hidrofilik yang kaya akan molekul lipopolisakarida. Oleh karena itu berfungsi sebagai penghalang penetrasi terhadap makromolekul (Witkowska *et al.*, 2013). Meskipun deskripsi ini diterima secara luas, dan diterima untuk banyak minyak atsiri, beberapa peneliti telah menyatakan bahwa perbedaan gram mungkin memiliki sedikit hubungan dengan hambatan pertumbuhan dan beberapa herbal yang sama-sama efektif terhadap kedua kelompok bakteri (Kotzekidou *et al.*, 2008). Namun, membran luar tidak sepenuhnya kedap air karena ada protein porin yang ada di lapisan ini yang dapat membuat saluran yang cukup besar untuk memungkinkan lewatnya molekul dengan massa molekul di bawah 600 Da, seperti fenolat tersubstitusi dalam ekstrak herba dan minyak atsiri, memungkinkan penetrasi lambat mereka ke ruang periplasma dan membran sitoplasma. Dengan demikian dimungkinkan bahwa dalam waktu kontak yang lebih lama senyawa aktif yang ada dalam ekstrak daun akan memiliki

efek yang sama pada bakteri gram negatif dan gram positif (Abee *et al.*, 1995; Ramli *et al.*, 2017). Selain itu, tidak ada standar efek antimikroba untuk bahan antimikroba seperti ekstrak herbal (Aghazadeh *et al.*, 2016).

Hasil uji penghancuran biofilm *K. pneumoniae* dapat dilihat pada gambar 5.6 yang menunjukkan grafik dengan skema eksponensial. Pada skema eksponensial terjadi peningkatan aktivitas penghancuran biofilm seiring dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak daun murbei hitam. Aktivitas penghancuran terbaik yaitu pada konsentrasi 0,16 mg/ml dengan presentase penghancuran sebesar 25,70%. Aktivitas penghancuran terendah pada konsentrasi 0,01 mg/ml dengan presentase penghancuran sebesar 0,46%. Kemudian, berdasarkan gambar 5.9 diketahui bahwa nilai OD pada konsentrasi ekstrak 0,16 mg/ml, 0,08 mg/ml, 0,04 mg/ml, 0,02 mg/ml dan 0,01 mg/ml secara berturut-turut adalah 1,414; 1,551; 1,670; 1,834; dan 1,894. Hasil ini menunjukkan bahwa nilai OD terendah kelompok uji adalah pada konsentrasi 0,16 mg/ml. Jika dibandingkan dengan nilai OD kontrol negatif sebesar 1,903; ekstrak daun murbei dan antibiotik ciprofloksasin sebagai kontrol positif memiliki nilai OD yang lebih rendah. Penurunan nilai OD ini berarti adanya pengurangan intensitas warna biru hasil pewarnaan kristal violet yang menunjukkan adanya penurunan ketebalan matriks biofilm. Hal ini membuktikan bahwa ekstrak daun murbei memiliki aktivitas antibiofilm dalam menghancurkan biofilm *K. pneumoniae*.

Nilai OD yang diperoleh kemudian dilakukan analisis secara statistik (lampiran 14). Hasil uji statistik menunjukkan bahwa data penghancuran biofilm terdistribusi normal ($p \geq 0,05$) dan homogen ($p \geq 0,05$). Oleh karena itu, analisis data dilanjutkan dengan *One Way Anova*. Hasil uji *One Way Anova* menunjukkan nilai $p = 0,000 \leq$

0,05 sehingga aktivitas penghancuran biofilm *K. pneumoniae* berbeda secara bermakna/signifikan. Kemudian dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Tukey HSD* yang menunjukkan bahwa perbedaan nilai *optical density* (OD) yang signifikan terjadi antara 5 konsentrasi uji yaitu konsentrasi 0,16 mg/ml, 0,08 mg/ml, 0,04 mg/ml, 0,02 mg/ml dan 0,01 mg/ml dengan kontrol positif dan kontrol media. Kontrol positif dan kontrol media juga memiliki perbedaan nilai OD yang signifikan terhadap 5 konsentrasi uji dan kontrol negatif. Sedangkan, kontrol negatif hanya memiliki perbedaan nilai OD yang signifikan terhadap kontrol positif dan kontrol media saja.

Selanjutnya untuk mengetahui tingkat kekuatan hubungan dan arah hubungan dilakukan uji korelasi *pearson*. Berdasarkan uji korelasi *pearson* yang telah dilakukan, diperoleh hasil nilai signifikansi atau *p value* adalah 0,014 dan nilai *pearson correlation* adalah (-) 0,948 (Lampiran 14). Nilai $p = 0,014$ menunjukkan bahwa hubungan korelasi antara konsentrasi ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra* L.) dengan besar nilai *optical density* (OD) memiliki korelasi yang signifikan karena nilai $p < 0,05$. Nilai *pearson correlation* = (-) 0,948 menunjukkan bahwa antara konsentrasi ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra* L.) dan besar nilai *optical density* (OD) memiliki derajat korelasi yang sangat kuat. Arah korelasi bertanda negatif menunjukkan arah korelasi berlawanan yang berarti semakin besar tingkat konsentrasi ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra* L.) maka besar nilai OD semakin kecil. Sehingga dapat disimpulkan bahwa besar nilai *optical density* uji penghancuran biofilm *K. pneumoniae* dipengaruhi secara signifikan dengan derajat korelasi yang sangat kuat oleh besar konsentrasi ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra* L.).

Berdasarkan uraian pembahasan di atas, maka dapat disimpulkan bahwa aktivitas antibiofilm ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra* L.) diperoleh dari mekanisme senyawa metabolit yang dikandungnya terhadap penghambatan proses terbentuknya biofilm. Senyawa yang berperan penting yaitu senyawa terpenoid, fenolik dan tanin. Pada proses pembentukan biofilm, terpenoid mampu menghambat dua proses penting yaitu pengambilan oksigen dan fosforilasi oksidatif. Hal ini menyebabkan bakteri kekurangan oksigen untuk pertumbuhannya dan mengganggu proses terbentuknya biofilm. Selanjutnya, fenolik juga dapat berinteraksi dengan protein bakteri dan struktur dinding sel sehingga membuat kerusakan membran sitoplasma, mengurangi fluiditas membran, menghambat sintesis asam nukleat, dan sintesis dinding sel. Sedangkan pada proses maturasi biofilm, senyawa tanin berperan penting karena memiliki kemampuan menekan regulasi dari gen *pgaC* sehingga proses agregasi interseluler pada tahap maturasi biofilm terganggu dan siklus pembentukan biofilm pun terganggu. Selain itu tannin juga menghambat enzim *reverse transkriptase* dan DNA *topoisomerase* sehingga terjadi perubahan struktur protein yang membuat denaturasi dari EPS yang membuat biofilm terdegradasi.

Terdapat keterbatasan pada penelitian ini yaitu peneliti tidak bisa menentukan *Minimal Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC). MBIC didefinisikan sebagai konsentrasi yang lebih rendah dari antibiotik/antimikroba yang menunjukkan 50% (MBIC₅₀) dan pengurangan 90% (MBIC₉₀) dalam pembentukan biofilm (Gupta, 2015). Penentuan MBIC telah disarankan sebagai panduan untuk pengobatan infeksi terkait biofilm (Thieme *et al.*, 2019). Pada penelitian ini ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra* L.) hanya memiliki persentase antibiofilm tertinggi sebesar

28,13% sehingga tidak memenuhi syarat untuk penentuan MBIC. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui konsentrasi ekstrak daun murbei (*Morus nigra* L.) yang paling efektif dan dapat menghambat minimal 50% dalam pembentukan biofilm *K. pneumoniae* agar dapat dijadikan sebagai salah satu pilihan terapi infeksi terkait biofilm yang berasal dari bahan alami.

5.3 Kajian Integrasi Islam dalam Uji Aktivitas Ekstrak Daun Murbei Hitam (*Morus nigra* L.) sebagai antibiofilm *Klebsiella pneumoniae*

Pneumonia merupakan masalah kesehatan berupa infeksi pada paru-paru dengan angka kematian yang tinggi. Kasus pneumonia yang paling sering terjadi pada unit pelayanan intensif adalah *Ventilator Associated Pneumonia* (VAP). VAP merupakan infeksi nosokomial akibat adanya pembentukan biofilm bakteri yang sering menyerang penderita dengan bantuan alat ventilasi mekanik. Adanya suatu masalah kesehatan atau penyakit sering membuat penderita putus asa. Akan tetapi hendaknya penyakit itu tidak boleh menyurutkan semangat seseorang untuk mencari pengobatan. Rasulullah SAW bersabda bahwa setiap penyakit pasti ada obatnya dan setiap orang beriman wajib mempercayainya. Hal ini diterangkan pada hadist berikut.

حَدَّثَنَا هَارُونُ بْنُ مَعْرُوفٍ وَأَبُو الطَّاهِرِ وَأَحْمَدُ بْنُ عَيْسَى قَالُوا حَدَّثَنَا ابْنُ وَهْبٍ أَخْبَرَنِي عَمْرُو وَهُوَ ابْنُ الْحَارِثِ عَنْ عَبْدِ رَبِّهِ بْنِ سَعِيدٍ عَنْ أَبِي الزُّبَيْرِ عَنْ جَابِرٍ عَنْ رَسُولِ اللَّهِ صَلَّى اللَّهُ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ أَنَّهُ قَالَ لِكُلِّ دَاءٍ دَوَاءٌ فَإِذَا أُصِيبَ دَوَاءُ الدَّاءِ بَرَأَ بِإِذْنِ اللَّهِ عَزَّ وَجَلَّ

Telah menceritakan kepada kami Harun bin Ma'ruf dan Abu Ath Thahir serta Ahmad bin 'Isa mereka berkata; Telah menceritakan kepada kami Ibnu Wahb;

Telah mengabarkan kepadaku 'Amru, yaitu Ibnu al-Harits dari 'Abdu Rabbih bin Sa'id dari Abu Az Zubair dari Jabir dari Rasulullah shallallahu 'alaihi wasallam, beliau bersabda: "Setiap penyakit ada obatnya. Apabila ditemukan obat yang tepat untuk suatu penyakit, akan sembuhlah penyakit itu dengan izin Allah 'azza wajalla." (HR Muslim no 4084) (Baqi, 2017).

Ibnu Qayyim al-Jauziyyah menjelaskan dalam kitabnya yang berjudul *Ath-Thibb an Nabawi* (Pengobatan Cara Nabi), bahwa Allah telah menciptakan obat untuk menyembuhkan semua penyakit. Namun, pengetahuan tentang hal tersebut tidak ditampakkan kepada umat manusia. Sebab, makhluk tidak memiliki ilmu pengetahuan kecuali apa yang telah diajarkan Allah kepada mereka. Oleh karena itu, Rasulullah menyatakan bahwa kesembuhan dari penyakit itu bergantung pada cocoknya obat dengan penyakit tersebut (Al-Jauziyyah, 1999). Menurut kajian hadist ini menunjukkan betapa pentingnya untuk mempelajari ilmu pengobatan/ ilmu kedokteran untuk mengetahui obat dari suatu penyakit. Bagi seorang dokter atau seseorang dengan kompetensi khusus, memiliki kewajiban untuk berikhtiyar dalam meneliti tentang penyembuhan penyakit dengan berbagai macam terapi dan obat- obatan. Selain itu, bagi seorang pasien memiliki kewajiban untuk bersabar dalam sakitnya serta berikhtiyar dalam mencari pengobatan untuk menyembuhkan masalah kesehatannya hingga ditemukan obat yang sesuai.

Allah SWT telah memberikan anugerahnya kepada manusia dengan kenikmatan berupa akal dan pikiran. Sehingga sebagai manusia kita hendaknya mengkaji dan meneliti tentang segala sesuatu yang telah Allah ciptakan. Allah menciptakan berbagai kekayaan alam yang bermanfaat, dan tidaklah ada ciptaan Allah yang sia-sia. Allah telah berfirman terkait hal ini dalam Al Quran surat Ali Imran ayat 190 dan 191 yang berbunyi:

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَاخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لَآيَاتٍ لِّأُولِي الْأَلْبَابِ ۗ ﴿١٩٠﴾

عمران : ١٩٠ ﴿﴾

Artinya: "Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan pergantian malam dan siang terdapat tanda-tanda (kebesaran Allah) bagi orang yang berakal," (QS. Ali 'Imran: 190) (Dusturuna, 2018).

الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَامًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ

﴿١٩١﴾ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَاطِلًا ۗ سُبْحٰنَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ ﴿١٩١﴾ آل عمران : ١٩١ ﴿﴾

Artinya: "(yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri, duduk atau dalam keadaan berbaring, dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata), "Ya Tuhan kami, tidaklah Engkau menciptakan semua ini sia-sia; Mahasuci Engkau, lindungilah kami dari azab neraka." (QS. Ali 'Imran: 191) (Dusturuna, 2018).

Menurut tafsir M. Quraish Shihab pada ayat 190 menyebutkan bahwa ayat ini mengajak manusia untuk berpikir. Sesungguhnya dalam penciptaan benda-benda angkasa seperti matahari, bulan, dan jutaan gugusan bintang yang terdapat di langit atau dalam pengaturan sistem kerja langit yang sangat teliti terdapat tanda kuasa Allah. Kemudian perputaran bumi pada porosnya yang melahirkan pergantian malam dan siang, baik dalam masa maupun dalam panjang dan pendeknya, terdapat tanda-tanda kemahakuasaan Allah bagi ulūl-albāb (orang-orang yang memiliki akal yang murni). Kemudian pada ayat 191, beliau menjelaskan sebagian dari ciri-ciri siapa yang dinamai Ulūl-albāb, yaitu orang baik laki-laki atau perempuan yang terus menerus mengingat Allah, dengan ucapan dan atau hati dalam seluruh situasi dan kondisi apapun. Obyek dzikir adalah Allah, sedangkan obyek akal pikiran adalah seluruh makhluk ciptaan-Nya. Akal diberi kebebasan seluas-luasnya untuk

memikirkan fenomena alam, akan tetapi terdapat keterbatasan dalam memikirkan dzat Allah (Shihab, 2002).

Salah satu ciptaan Allah yang terhampar luas di bumi adalah bahan-bahan alami terutama tumbuhan. Tumbuhan telah banyak digunakan oleh masyarakat sebagai salah satu upaya untuk menanggulangi masalah kesehatan. Beberapa tumbuhan memiliki senyawa metabolit sekunder yang bervariasi dan unik pada setiap spesiesnya. Hal ini merupakan salah satu tanda kebesaran dan kekuasaan Allah yang telah menciptakan tumbuhan beraneka ragam beserta manfaatnya. Allah SWT berfirman dalam Al Quran surat Asy Syu'ara ayat 7 sebagai berikut.

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿الشعراء : ٧﴾

Artinya: “Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, betapa banyak Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam pasangan (tumbuh-tumbuhan) yang baik?” (QS. Asy-Syu'ara': 7) (Dusturuna, 2018).

Berdasarkan ayat tersebut, M. Quraish Shihab (2002) menafsirkan apakah manusia akan terus mempertahankan kekufuran dan pendustaan serta tidak merenungi dan mengamati sebagian ciptaan Allah di bumi ini. Sebenarnya, jika manusia bersedia merenungi dan mengamati hal itu, niscaya mereka akan mendapatkan petunjuk. Allah yang mengeluarkan dari bumi ini beraneka ragam tumbuh-tumbuhan yang mendatangkan manfaat. Itu semua hanya dapat dilakukan oleh Tuhan yang Mahaesa dan Mahakuasa yaitu Allah SWT.

Salah satu contoh tumbuhan yang banyak dimanfaatkan sebagai obat adalah daun murbei hitam (*Morus nigra* L.). Daun murbei hitam sering digunakan pada pengobatan iritasi tenggorokan, diabetes mellitus, anemia, dan kerusakan pada gigi (Khaira, 2018). Berdasarkan hal itu, penulis mencoba untuk meneliti terkait

manfaat dari daun murbei hitam untuk menanggulangi penyakit pneumonia yang sering disebabkan dan diperparah oleh biofilm *K. pneumoniae*. Daun murbei hitam (*Morus nigra* L.) memiliki senyawa metabolit sekunder antara lain yaitu tannin, fenolik, terpenoid dan steroid yang memiliki manfaat dalam pencegahan, penghambatan dan penghancuran biofilm *K. pneumoniae*.

Berdasarkan penelitian ini, daun murbei hitam terbukti memiliki aktivitas antibiofilm terhadap *K. pneumoniae* dalam mencegah perlekatan, menghambat pertumbuhan dan menghancurkan biofilm. Penulis berharap penelitian ini dapat menjadi sumbangsih terhadap kemajuan ilmu pengobatan khususnya pengobatan dari bahan alam di kemudian hari. Pengobatan dari bahan alam merupakan salah satu contoh upaya untuk meneladani pengobatan ala Rasulullah SAW.

Selama ini terapi yang digunakan dalam pengobatan pneumonia adalah antibiotik. Antibiotik merupakan senyawa kimia yang memiliki efek kuat dalam membunuh bakteri. Akan tetapi seringkali menimbulkan resistensi akibat penggunaan yang berlebihan atau tidak sesuai dengan anjuran dokter. Oleh karena itu, dengan berbagai pengembangan penelitian lainnya diharapkan obat yang bersifat alami dan berasal dari bahan alam akan dapat membunuh bakteri sebaik antibiotik di kemudian hari. Sehingga obat dari bahan alam ini menjadi pilihan terapi utama untuk mengatasi masalah kesehatan dibandingkan obat dari bahan kimia.

Penulis berharap penelitian ini dapat memberikan manfaat kepada masyarakat dengan meningkatkan nilai tambah bahan-bahan alam terutama daun murbei hitam. Penulis juga berharap penelitian ini dapat menjadi landasan ilmu yang memberikan peluang kesempatan kerja dengan cara pengembangan bahan-bahan alam. Sehingga

hal ini akan meningkatkan pertumbuhan ekonomi masyarakat dan mengurangi kemiskinan dengan pembentukan unit usaha obat tradisional.



BAB VI

KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

1. Ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra* L.) memiliki aktivitas pencegahan perlekatan, penghambatan pertumbuhan, dan penghancuran biofilm *K. pneumoniae* dengan aktivitas tertinggi pada konsentrasi berturut-turut yaitu 0,04 mg/ml, 0,04 mg/ml, dan 0,016 mg/ml. Presentase aktivitas antibiofilm pada konsentrasi tersebut berturut-turut yaitu 28,13%, 19,68% dan 25,70%.
2. Uji pencegahan perlekatan dan penghambatan pertumbuhan biofilm *K. pneumoniae* memiliki skema sigmoid yaitu aktivitas antibiofilm terbaik berada di tengah. Sedangkan uji penghancuran biofilm *K. pneumoniae* memiliki skema eksponensial.
3. Pada uji pencegahan perlekatan dan penghambatan pertumbuhan biofilm besar nilai *optical density* tidak dipengaruhi oleh besar konsentrasi ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra* L.). Sedangkan pada penghancuran biofilm besar nilai *optical density* dipengaruhi secara signifikan oleh besar konsentrasi ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra* L.).

6.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk menentukan *Minimal Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC) ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra* L.) sehingga dapat dijadikan sebagai salah satu pilihan terapi infeksi terkait biofilm yang alami.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, G. M., Abdel Bar F. M., Baraka H. N., Gohar A. A., Lahloub M. F. 2014. A new antioxidant stilbene and other constituents from the stem bark of *Morus nigra* L. *Natural Product Research*. 28(13). pp. 952–959. doi:10.1080/14786419.2014.900770
- Abdulhasan GA, Alzubaidy SK, Abed IJ. 2016. Effect of sub-inhibitory and inhibitory concentrations of some antibiotics and rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis* L.) on biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae*. *World J Exp Biosci* 4: 130 – 135.
- Abee T, Krockel L, Hill C. 1995. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Int J Food Microbiol*. 28(2):169-85.
- Abraham, W.R. 2016. Going beyond the control of quorum-sensing to combat biofilm infections. *Antibiotics*. 5, 3.
- Aghazadeh M, Zahedi Bialvaei A, Aghazadeh M, Kabiri F, Saliani N. 2016. Survey of the Antibiofilm and Antimicrobial Effects of *Zingiber officinale* (in Vitro Study). *Jundishapur J Microbiol*. 9(2):e30167. doi: 10.5812/jjm.30167
- Ahlawat, Timur., Patel, N.L., Agnihotri, Roshni., Patel, C.R., Tandel, Yatin. 2016. Black mulberry (*Morus nigra*). *Underutilized Fruit Crops: Importance and Cultivation* pg 197
- AlFattah, M. 2015. *Uji Aktivitas Antibiofilm In Vitro Minyak Atsiri Herba Kemangi terhadap Bakteri Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, dan Staphylococcus aureus*. Tugas Akhir. Prodi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Syarif Hidayatullah Jakarta
- Al-Jauziyyah, Ibnu al-Qayyim. 1999. *al-Thibb al-Nabawi*. t.t: Dar al-Taqwa al-Turats
- Andallu, B., Shankaran, M., Ullagaddi, R., Iyer, S. 2014. *In Vitro* Free Radical Scavenging and *In Vivo* Antioxidant Potential of Mulberry (*Morus Indica* L.) Leaves. *Journal of Herbal Medicine*. 4(1), 10–17. doi:10.1016/j.hermed.2013.10.002
- Arifin, B. Ibrahim, S. 2018. Structure, Bioactivity and Antioxidan of Flavonoid. *Jurnal Zarah*. Vol. 6 No. 1, Halaman 21-29
- Arshad, M. A., Mir, A. K., Mushtaq, A., Mamoona, M., Muhammad, Z., Shazai, S., Zahid, U. 2014. Ethnobotanical and taxonomic screening of genus *Morus* for wild edible fruits used by the inhabitants of Lesser Himalayas-Pakistan. *Journal of Medicinal Plants Research*. 8(25), pp. 889–898. doi: 10.5897/JMPR2010.733.
- Assidqi, K., Tjahjaningsih W., Sigit S. 2012. Potensi Ekstrak Daun Patikan Kebo (*Euphorbia Hirta*) Sebagai Antibakteri Terhadap *Aeromonas Hydrophila* Secara In Vitro. *Journal of Marine and Coastal Science*, 1(2), 113 – 124
- Aulifa, D., Fitriansyah, S., Ardiansyah, S., Wibowo, D., Julata, Y., Christy, D. 2017. Phytochemical Screening, Antibacterial Activity, and Mode of Action on *Morus nigra*. *Pharmacognosy Journal*. 10. 167-171. 10.5530/pj.2018.1.28.
- Baban, Soza. 2017. Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of Extended Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from Urinary Tract Infection.

- Baqi, Muhammad Fuad Abdul. 2017. *Kumpulan Hadist Shahih Bukhari-Muslim, 20th ed.* Solo: Insan Kamil
- Barr J. G. 1977. Klebsiella: taxonomy, nomenclature, and communication. *Journal of clinical pathology*. 30(10), 943–944. doi:10.1136/jcp.30.10.943.
- Benincasa, M., Lagatolla, C., Dolzani, L., Milan, A., Pacor, S., Liut, G., Rizzo, R. 2016. Biofilms from *Klebsiella pneumoniae*: Matrix Polysaccharide Structure and Interactions with Antimicrobial Peptides. *Microorganisms*. 4(3), 26. doi:10.3390/microorganisms4030026
- Brooks, G. F., Carroll, K. C., Butel, J. S., Morse, S. A., Mietzner, T. A. 2015. *Jawetz Melnick & Adelbergs Medical Microbiology 27 E.* McGraw Hill Professional.
- Cadavid, E., Robledo, S. M., Quiñones, W., Echeverri, F. 2018. Induction of Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13884 by Several Drugs: The Possible Role of *Quorum Sensing* Modulation. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*. 7(4), 103. doi:10.3390/antibiotics7040103
- Chedea, V., Vicaș, S., Socaciu, C. Nagaya, T., Ogola, H., Yokota, K., Nishimura, K., Jisaka, M. 2012. Lipoxygenase-Quercetin Interaction: A Kinetic Study Through Biochemical and Spectroscopy Approaches. *Biochemical Testing*. doi:10.5772/35782
- Chen, K.-M., Chiang, M.-K., Wang, M., Ho, H.-C., Lu, M.-C., & Lai, Y.-C. 2014. The role of *pgaC* in *Klebsiella pneumoniae* virulence and biofilm formation. *Microbial Pathogenesis*, 77, 89–99. doi:10.1016/j.micpath.2014.11.005
- Cushnie T.P., Lamb A.J. 2011. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 38:99–107. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2011.02.014.
- Daglia M. 2011. Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr. Opin. Biotechnol.* 23:174–181. doi: 10.1016/j.copbio.2011.08.007.
- Dalimartha S. 2000. *Atlas Tumbuhan Obat Indonesia Jilid I.* Jakarta: Trubus Agriwidya
- Darwish, S., Asfour, H. 2013. Investigation of Biofilm Forming Ability in Staphylococci Causing Bovine Mastitis Using Phenotypic and Genotypic Assays. *The Scientific World Journal*. 378492. 10.1155/2013/378492.
- De Araujo, C., Balestrino, D., Roth, L., Charbonnel, N., Forestier, C. 2010. Quorum sensing affects biofilm formation through lipopolysaccharide synthesis in *Klebsiella pneumoniae*. *Research in microbiology*. 161. 595-603. 10.1016/j.resmic.2010.05.014.
- De Freitas, M. M., Fontes, P. R., Souza, P. M., William Fagg, C., Neves Silva Guerra, E., de Medeiros Nóbrega, Y. K., Oliveira Magalhães, P. 2016. Extracts of *Morus nigra* L Leaves Standardized in chlorogenic acid, rutin and isoquercitrin: Tyrosinase inhibition and cytotoxicity. *PLoS ONE*. 11(9). doi: 10.1371/journal.pone.0163130.
- Diana, Nur. 2013. *Potensi bakteri Enterobacter agglomerans sebagai biosorben logam berat timbal (Pb).* Tugas Akhir. Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim
- Djamil, R. dan Fatimah, B. 2015. Isolasi dan Identifikasi Jenis Senyawa Flavonoid dalam Fase n-Butanol Daun Murbei (*Morus alba* L.) secara Spektrofotometri.

- Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*. Vol. 13, No. 2. Universitas Pancasila Jakarta Selatan
- Dusturuna. 2018. *Pusat Riset Al-Quran: Ali 'Imran ayat 190*. (<https://www.dusturuna.com/quran/3-190>). Diakses 19 Mei 2020
- Dusturuna. 2018. *Pusat Riset Al-Quran: Ali 'Imran ayat 191*. (<https://www.dusturuna.com/quran/3-191>). Diakses 19 Mei 2020
- Dusturuna. 2018. *Pusat Riset Al-Quran: Asy-Syu'ara' ayat 7*. (<https://www.dusturuna.com/quran/42-7>). Diakses 19 Mei 2020
- Farrag, H. A., Hosny, A. E.-D. M. S., Hawas, A. M., Hagra, S. A. A., & Helmy, O. M. 2019. Potential efficacy of garlic lock therapy in combating biofilm and catheter-associated infections; experimental studies on an animal model with focus on toxicological aspects. *Saudi Pharmaceutical Journal*. doi:10.1016/j.jsps.05.004
- Fathurrahman, N. R., Musfiroh I. 2018. Artikel Tinjauan: Teknik Analisis Instrumentasi Senyawa Tanin. *Farmaka Suplemen*. Volume 16 Nomor 2
- Ferreira, A. A., Tette, P. A. S., Mendonça, R. C. S., Soares, A. de S., & Carvalho, M. M. D. 2014. Detection of exopolysaccharide production and biofilm-related genes in *Staphylococcus* spp. isolated from a poultry processing plant. *Food Science and Technology (Campinas)*, 34(4), 710–716. doi:10.1590/1678-457x.6446
- Galdiero, E., Di Onofrio, V., Maione, A., Gambino, E., Gesuele, R., Menale, B., Ciaravolo, M., Carraturo, F., & Guida, M. 2020. *Allium ursinum* and *Allium oschaninii* against *Klebsiella pneumoniae* and *Candida albicans* Mono- and Polymicrobial Biofilms in In Vitro Static and Dynamic Models. *Microorganisms*, 8(3), 336. doi.org/10.3390/microorganisms8030336
- Garcia-Aljaro, C., Otero, A., Defoirdt, T., eds. 2020. *Fundamentals of, and Applications Based on, Quorum Sensing and Quorum Sensing Interference*. Lausanne: Frontiers Media SA
- Gopu V, Kothandapani S, Shetty PH. 2015. Quorum quenching activity of *Syzygium cumini* (L.) Skeels and its anthocyanin malvidin against *Klebsiella pneumoniae*. *Microb Pathog*. 79:61-69. doi:10.1016/j.micpath.2015.01.010
- Gunardi, W. 2014. Peranan Biofilm dalam Kaitannya dengan Penyakit Infeksi. *Jurnal Kedokteran Meditek*. 15(39A)
- Gundogdu, M., Muradoğlu, F., Sensoy, R. 2011. Determination of fruit chemical properties of *Morus nigra* L., *Morus alba* L. and *Morus rubra* L. by HPLC. *Scientia Horticulturae - SCI HORT-AMSTERDAM*. 132. 10.1016/j.scienta.2011.09.035.
- Gupta, Ankit. 2015. Biofilm Quantification and Comparative Analysis of MIC (Minimum Inhibitory Concentration) & MBIC (Minimum Biofilm Inhibitory Concentration) Value for Different Antibiotics against *E. coli*. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* 4(2): 198-224
- Gyawali R., Ibrahim S.A. 2014. Natural products as antimicrobial agents. *Food Control*. 46:412–429. doi: 10.1016/j.foodcont.2014.05.047.
- Hasan, S.; Singh, K.; Danisuddin, M.; Verma, P.K.; Khan, A.U. 2014. Inhibition of major virulence pathways of *Streptococcus mutans* by quercitrin and deoxynojirimycin: A synergistic approach of infection control. *PLoS ONE* 9, e91736.

- Jamal, M., Tasneem, U., Hussain, T., Andleeb, S. 2015. Bacterial Biofilm: Its Composition, Formation and Role in Human Infections. *Research & Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology*. 4. 1-14.
- Kaiser, T. D. L., Pereira, E. M., Santos, K. R., Maciel, E. L. N., Schuenck, R. P., & Nunes, A. P. F. 2013. Modification of the Congo red agar method to detect biofilm production by *Staphylococcus epidermidis*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 75(3),235-239. doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.11.014
- Kambuno, Norma Tiku dan Fanggidae, Dicky. 2017. Identifikasi Bakteri Gram Negatif Galur Extended Spectrum Beta Lactamase Pada Ruang NICU RSUD Prof. DR. W. Z. Johannes Kupang. *Jurnal Info Kesehatan*. Vol 15, No.2, pp. 333-345 P-ISSN 0216-504X, E-ISSN 2620-536X
- Keerthiga M. and Anand S. P. 2015. Anti-infective and anti-biofilm activity of *Geodorum densiflorum* (Lam.) Schltr. against Methicillin resistant and sensitive *Staphylococcus aureus*. *Advance in Applied Science Research*, 6(5):43-46
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2018. *Profil Kesehatan Indonesia Tahun 2017*. Jakarta: Kementerian Kesehatan RI
- Khaira, N. Ramadhania Z. M. 2018. Review: Kandungan Senyawa Kimia Murbei Hitam (*Morus nigra* L.) dan Efek Farmakologinya. *Farmaka*. Suplemen Volume 16 Nomor 2 doi.org/10.24198/jf.v16i2.17530.g8759
- Khanifah, Firda. 2015. *Efek Pemberian Air Perasan Jeruk Nipis (Citrus aurantifolia (Christm) Swingle) Terhadap Pembentukan, Pertumbuhan dan Penghancuran Biofilm Staphylococcus aureus Secara In Vitro*. Tugas Akhir. Prodi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Syarif Hidayatullah Jakarta
- Kining, E., Falah S., Nurhidayat N. 2016. The In Vitro Antibiofilm Activity of Water Leaf Extract of Papaya (*Carica papaya* L.) against *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Biochemistry* Volume 2 (3): 150 - 163
- Kotzekidou P., Giannakidis P., Boulamatsis A. 2008. Antimicrobial activity of some plant extracts and essential oils against foodborne pathogens in vitro and on the fate of inoculated pathogens in chocolate. *LWT - Food Science and Technology*. 41(1):119–127. doi: 10.1016/j.lwt.2007.01.016.
- Koyuncu, F., Çetinbaş, M., Ibrahim, E. 2014. Nutritional Constituents of Wild-Grown Black Mulberry (*Morus nigra* L.). *Journal of Applied Botany and Food Quality*. 87, pp. 93–96. doi: 10.5073/JABFQ.2014.087.014.
- Laelasari, W. 2015. *Kajian Karakteristik Seduhan Teh Herbal Dari Daun Murbei (Morus sp) yang Diproses Dengan Metode Pengolahan dan Suhu Pengeringan yang Berbeda*. Tugas Akhir. Fakultas Teknik Universitas Pasundan
- Lambert PA. 2002. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria. *J Appl Microbiol*. 92 Suppl():46S-54S.
- Lebeaux, D., Ghigo, J. M., and Beloin, C. 2014. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 78, 510–543. doi: 10.1128/MMBR.00013-14
- Lemos, J. A., Abranches, J., Koo, H., Marquis, R. E., & Burne, R. A. 2010. Protocols to study the physiology of oral biofilms. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 666, 87–102. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-820-1_7

- Li, Y. H., & Tian, X. 2012. Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. *Sensors (Basel, Switzerland)*. 12(3),2519–2538. doi:10.3390/s120302519
- Mahizan, N. A., Yang, S.-K., Moo, C.-L., Song, A. A.-L., Chong, C.-M., Chong, C.-W., ... Lai, K.-S. 2019. Terpene Derivatives as a Potential Agent against Antimicrobial Resistance (AMR) Pathogens. *Molecules*, 24(14), 2631. doi:10.3390/molecules24142631
- Maisonneuve E, Cateau E, Delouche M, Quellard N, Rodier MH. 2017. An observational study of phagocytes and *Klebsiella pneumoniae* relationships: different behaviors. *Microbes Infect.* 19(4-5):259-266. doi: 10.1016/j.micinf.2016.12.005.
- Martin, R. M., & Bachman, M. A. 2018. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 8, 4. doi:10.3389/fcimb.2018.00004
- Memariani, H. Memariani M. Ghasemian A. 2019. An overview on anti-biofilm properties of quercetin against bacterial pathogens. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 35:143 <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2719-5>
- Memon A. A. , Memon N. , Luthria D. L. , Bhangar M. I. , Pitafi A. A. 2010. Phenolic acids profiling and antioxidant potential of mulberry (*Morus laevigata* W., *Morus nigra* L., *Morus alba* L.) leaves and fruits grown in Pakistan. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* Vol. 60, No. 1, pp. 25-32
- Merritt, J. H., Kadouri, D. E., & O'Toole, G. A. 2005. Growing and analyzing static biofilms. *Current protocols in microbiology, Chapter 1, Unit–1B.1.* <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc01b01s00>
- Ming, D., Wang, D., Cao, F., Xiang, H., Mu, D., Cao, J., Wang, T. 2017. Kaempferol Inhibits the Primary Attachment Phase of Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus*. *Front Microbiol.* 8:2263. doi:10.3389/fmicb.2017.02263
- Minhas M.A., Begum A., Hamid S., Babar M., Ilyas R., Ali S., Latif F., Andleeb S. 2016. Evaluation of Antibiotic and Antioxidant Activity of *Morus nigra* (Black Mulberry) Extracts Against Soil Borne, Food Borne and Clinical Human Pathogens. *Pak. J. Zool.* 48:1381–1388.
- Mishra, B., and Wang, G. 2017. Individual and combined effects of engineered peptides and antibiotics on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Pharmaceuticals* 10: E58. doi: 10.3390/ph10030058
- Mladenović, Katarina & Grujović, Mirjana & Vasić, Sava & Čomić, Ljiljana. 2019. The simbiotic effect of temperature and sugars on the planktonic growth and biofilm formation of *Klebsiella* spp. isolated from traditionally made cheese. *Romanian Biotechnological Letters*. 24. 400-406. 10.25083/rbl/24.3/400.406.
- Monirzadeh, Fatemeh & shakibaie, mohammad reza & Gholamrezazadeh, Melika & Masoumi, Shalaleh. 2019. Susceptibility of catheter-related *Klebsiella pneumoniae* strains to quaternary ammonium compounds under biofilm and planktonic conditions. *Canadian Journal of Infection Control* 33. 215-219.
- Naftalie, N. A. K. 2011. *Pengaruh Perbedaan Proporsi Susu Sapi UHT dan Ekstrak Murbei Hitam Terhadap Sifat Fisikokimia Dan Organoleptik Yogurt Murbei Hitam*. Tugas Akhir. Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya

- Nirwati, H., Sinanjung, K., Fahrurrisa, F., Wijaya, F., Napitupulu, S., Hati, V. P., Hakim, M. S., Meliala, A., Aman, A. T., & Nuryastuti, T. 2019. Biofilm formation and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* isolated from clinical samples in a tertiary care hospital, Klaten, Indonesia. *BMC proceedings*, 13 (Suppl 11), 20. <https://doi.org/10.1186/s12919-019-0176-7>
- Nurhidayati, S., Faturrahman, Ghazali, M. 2015. Deteksi Bakteri Patogen Yang Berasosiasi Dengan *Kappaphycus Alvarezii* (Doty) Bergejala Penyakit Ice-Ice. *Jurnal Sains Teknologi & Lingkungan*. Vol. 1 No. 2. ISSN: 2477-039
- Nuria M. C., Faizatun A., Sumantri D. 2009. Antibacterial activity of *Jatropha curcas* L ethanol extract against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 bacteria, *Escherichia coli* ATCC 25922, and *Salmonella typhi* ATCC 1408. *J. Ilmu Ilmu Pertanian*. 5, 26-37.
- Otto, M., 2008. Staphylococcal Biofilms, In: Bacterial Biofilms. *Springer*. 208-22
- Paczosa MK, Meccas J. 2016. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. *Microbiol Mol Biol Rev* 80:629 – 661. doi:10.1128/MMBR.00078-15.
- Padilha, M. M., Vilela, F. C., Rocha, C. Q., Dias, M. J., Soncini, R., dos Santos, M. H., Giusti-Paiva, A. 2010. Antiinflammatory properties of *Morus nigra* leaves. *Phytotherapy Research*. 24(10), pp. 1496–1500. doi: 10.1002/ptr.3134.
- Padilha, M., Vilela, F. Silva, M., Santos, M., Alves-da-Silva, G., Giusti-Paiva, A. 2009. Antinociceptive Effect of the Extract of *Morus nigra* Leaves in Mice. *Journal of medicinal food*. 12. 1381-5. 10.1089/jmf.2009.0012.
- Panche, A. N., Diwan, A. D., Chandra, S. R. 2016. Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*. 5, e47. doi:10.1017/jns.2016.41
- Papenfort, K., Bassler, B.L. 2016. Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Microbiol*. 14, 576–588.
- Patel, I., Patel, V., Thakkar, A., Kothari, V. 2014. Microbial Biofilms: Microbes in Social Mode. *International Journal of Agricultural and Food Research*. ISSN 1929-0969. Vol. 3 No. 2, pp. 34-49
- Pletzer D, Mansour SC, Hancock REW. 2018. Synergy between conventional antibiotics and anti-biofilm peptides in a murine, sub-cutaneous abscess model caused by recalcitrant ESKAPE pathogens. *PLoS Pathog*. 14(6): e1007084. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007084>
- Purbowati, Rini. 2017. Kemampuan Pembentukan Slime Pada *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, MRSA dan *Escherichia coli*. *Florea: Jurnal Biologi dan Pembelajarannya*. 4. 1. 10.25273/florea.v4i2.1647.
- Putri, F. E. 2019. Aktivitas Penghambatan Pembentukan Biofilm Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) Terhadap *Staphylococcus aureus*. Tugas Akhir. Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma Yogyakarta
- Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E., Sintim, H. O. 2015. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Medicinal Chemistry*. 7(4), 493–512. doi:10.4155/fmc.15.6
- Radojkovic, Marija, Zoran Zekovic, Pevle Maskovi, Senka Vidovic, Anamarija Mandic, Aleksandra Misan dan Sasa Durovic. 2016. Biological Activities and

- Chemical Composition of Morus Leaves Extracts Obtained by Maceration and Supercritical Fluid Extraction. *J. of Supercritical Fluids*. 117, 50-58.
- Rahajoe, Nastiti N., Supriyatno, B., Setyanto, Darmawan B. 2013. *Buku Ajar Respiriologi Anak Edisi: 1*. Jakarta: Ikatan Dokter Anak Indonesia (IDAI) ISBN: 978-979-8421-31-0
- Rahayu, S. A., Gumilar. 2017. *Uji Cemaran Air Minum Masyarakat Sekitar Margahayu Raya Bandung Dengan Identifikasi Bakteri Escherichia coli*. JPST, Volume 4, Nomor 2
- Ramadan, E. M., Abou-Taleb, K. A., Galal, G. F., & Abdel-Hamid, N. S. 2017. Antibacterial, antibiofilm and antitumor activities of grape and mulberry leaves ethanolic extracts towards bacterial clinical strains. *Annals of Agricultural Sciences*, 62(2), 151–159. doi:10.1016/j.aos.2017.11.002
- Ramadani. 2016. *Senyawa Kimia Bahan Alam Terpenoid*. Tarbawi Jurnal Ilmu Pendidikan
- Ramli, S., Radu, S., Shaari, K., & Rukayadi, Y. 2017. Antibacterial Activity of Ethanolic Extract of *Syzygium polyanthum* L. (*Salam*) Leaves against Foodborne Pathogens and Application as Food Sanitizer. *BioMed research international*, 9024246. <https://doi.org/10.1155/2017/9024246>
- Reisner, A., Krogfelt, K. A., Klein, B. M., Zechner, E. L., & Molin, S. 2006. In Vitro Biofilm Formation of Commensal and Pathogenic *Escherichia coli* Strains: Impact of Environmental and Genetic Factors. *Journal of Bacteriology*, 188(10), 3572–3581. doi:10.1128/jb.188.10.3572-3581.2006
- Rock, C., Thom, K. A., Masnick, M., Johnson, J. K., Harris, A. D., Morgan, D. J. 2014. Frequency of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)–Producing and Non-KPC-Producing *Klebsiella* Species Contamination of Healthcare Workers and the Environment. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 35(04), 426–429. doi:10.1086/675598
- Rodrigues, E.L.; Marcelino, G.; Silva, G.T.; Figueiredo, P.S.; Garcez, W.S.; Corsino, J.; Guimarães, R.C.A.; Freitas, K.C. 2019. Nutraceutical and Medicinal Potential of the *Morus* Species in Metabolic Dysfunctions. *Int. J. Mol. Sci*, 20, 301.
- Ruchi T., Sujata B., Anuradha D. 2015. Comparison of Phenotypic Methods for the Detection of Biofilm in Uro-Pathogens in a Tertiary Care Hospital in India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*., 4(9):840-849
- Salukanan, R. T., Zulfariansyah, A., Sitanggang, R. H. 2018. Pola Pneumonia Nosokomial di Unit Perawatan Intensif Rumah Sakit Umum Pusat Dr. Hasan Sadikin Bandung Periode Januari–Desember 2017. *Jurnal Anestesi Perioperatif (JAP)*. 2018;6(2):126–36
- Samber L. N., Semangun H., Prasetyo B., 2013. *Karakteristik Antosianin Sebagai Pewarna Alami*. Seminar Nasional X Pendidikan Biologi FKIP UNS
- Sánchez-Salcedo, E. M. *et al.* 2015. Polyphenolic compounds and antioxidant activity of white (*Morus alba*) and black (*Morus nigra*) mulberry leaves: Their potential for new products rich in phytochemicals. *Journal of Functional Foods*. Elsevier Ltd, 18, pp. 1039–1046. doi: 10.1016/j.jff.2015.03.053.

- Seifi K, Kazemian H, Heidari H, Rezagholizadeh F, Saeed Y, Shirvani F, Hourri H. 2016. Evaluation of Biofilm Formation Among *Klebsiella pneumoniae* Isolates and Molecular Characterization by ERIC-PCR. *Jundishapur J Microbiol.* 9(1):e30682.
- Setiati S, Alwi I, Sudoyo AW, Stiyohadi B, Syam AF. 2014. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam Jilid I*. VI. Jakarta: InternaPublishing:1132-53
- Shahwany, A. W. A., Tawfeeq, H. K., Hamed, S. E. 2016. Antibacterial and Anti-biofilm Activity of Three Phenolic Plant Extracts and Silver Nanoparticles on *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*. *Biomedicine and Biotechnology*, 4(1), 12-18.
- Shakib, P., Kalani, M., Ramazanzadeh, R., Ahmadi, A., Rouhi, S. 2018. Molecular detection of virulence genes in *Klebsiella Pneumoniae* clinical isolates from Kurdistan Province, Iran. *Biomedical Research and Therapy*. 5(8), 2581-2589. doi.org/10.15419/bmrat.v5i8.467
- Shihab, M. Quraish. 2002. *Tafsir Al-Misbah: Pesan, Kesan, dan Keserasian Al-Qur'an*, Jilid 2. Jakarta: Lentera Hati hlm. 370-273.
- Silva LN, Zimmer KR, Macedo AJ, Trentin D. 2016. Plant Natural Products Targeting Bacterial Virulence Factors. *Chem Rev.* 2016 Aug 24; 116(16):9162-236.
- Singla, S., Harjai, K. & Chhibber, S. 2013. Susceptibility of different phases of biofilm of *Klebsiella pneumoniae* to three different antibiotics. *J Antibiot* 66, 61–66. <https://doi.org/10.1038/ja.2012.101>
- Slobodníková, L., Fialová, S., Rendeková, K., Kováč, J., & Mučaji, P. 2016. Antibiofilm Activity of Plant Polyphenols. *Molecules*, 21(12), 1717. doi:10.3390/molecules21121717
- Sofia P. G. 2014. Chemical characterisation of white (*Morus alba*), and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. *J. Horticultural Fore. Biotech.* Vol. 18(3):133-5.
- Solano C, Echeverz M, Lasa I. 2014. Biofilm dispersion and quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology.* 18:96-104. doi: 10.1016/j.mib.2014.02.008.
- Souza, G.R.; Oliveira-Junior, R.G.; Diniz, T.C.; Branco, A.; Lima-Saraiva, S.R.G.; Guimarães, A.L.; Oliveira, A.P.; Pacheco, A.G.M.; Silva, M.G.; Moraes-Filho, M.O. 2017. Assessment of the antibacterial, cytotoxic and antioxidant activities of *Morus nigra* L. (Moraceae). *Braz. J. Biol.* 78, 248–254
- Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Bonaventura, G. D., Djukić, S., Ćirković, I., & Ruzicka, F. 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*, 115(8), 891–899. doi:10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
- Stewart, P. S. 2002. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *International Journal of Medical Microbiology*, 292(2), 107–113. doi:10.1078/1438-4221-00196
- Sun, S. *et al.* 2016. The metabolic flux regulation of *Klebsiella pneumoniae* based on quorum sensing system. *Sci. Rep.* 6, 38725; doi: 10.1038/srep38725
- Syamsudin, Keban, S. A. 2013. *Buku Ajar Farmakoterapi Gangguan Saluran Pernapasan*. Jakarta: Salemba Medika.

- Taufik Y, T Widiantera and Y Garnida. 2016. The Effect of Drying Temperature on the Antioxidant Activity of Black Mulberry Leaf Tea (*Morus nigra*). *J. Chem. Rasayan* Vol. 9 No. 4 889-895.
- Thabti, I., Elfalleh, W., Tlili, N., Ziadi, M., Campos, M. G., Ferchichi, A. 2013. Phenols, flavonoids, and antioxidant and antibacterial activity of leaves and stem bark of morus species. *International Journal of Food Properties*, 17(4), pp. 842–854. doi: 10.1080/10942912.2012.660722.
- Thieme, L., Hartung, A., Tramm, K., Klinger-Strobel, M., Jandt, K. D., Makarewicz, O., & Pletz, M. W. 2019. MBEC Versus MBIC: the Lack of Differentiation between Biofilm Reducing and Inhibitory Effects as a Current Problem in Biofilm Methodology. *Biological procedures online*, 21, 18. <https://doi.org/10.1186/s12575-019-0106-0>
- Tiaraswara, R. A., Taufik, Y., Afriant, L. H. 2015. *Optimalisasi Formulasi Hard Candy Ekstrak Daun Mulberry (Morus sp.) Dengan Menggunakan Design Expert Metode D-Optimal*. Tugas Akhir. Fakultas Teknik Universitas Pasundan
- Toyofuku, M., Inaba, T., Kiyokawa, T., Obana, N., Yawata, Y., Nomura, N. 2015. Environmental factors that shape biofilm formation. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 80. 1-6. 10.1080/09168451.2015.1058701.
- Turan, N. B., Chormey, D. S., Büyükpınar, Ç., Engin, G. O., Bakirdere, S. 2017. Quorum sensing: Little talks for an effective bacterial coordination. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 91, 1–11. doi:10.1016/j.trac.2017.03.007
- UNICEF. 2018. *Pneumonia in Children*. Geneva: The United Nations Children’s Fund
- USDA (United States Department of Agriculture). 2012. *Taxonomy of Morus nigra*. (<https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=MONI#>. USDA NRCS National Plant Data Team). Diakses: 27 Oktober 2019
- Vasav I, Arun A, Rekha P. 2014. Anti-quorum sensing activity of flavonoid-rich fraction from *Centella asiatica* L. against *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and *Chromobacterium violaceum*. *J of Microb, Immun and Infct*. 7(1): 139-46.
- Vikram, A., Jayaprakasha, G. K., Jesudhasan, P. R., Pillai, S. D., Patil, B. S. 2010. Suppression of bacterial cell-cell signalling, biofilm formation and type III secretion system by citrus flavonoids. *Journal of Applied Microbiology*. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04677.x
- Weisskopf, L. 2017. *Smelly Fumes: Volatile-Mediated Communication between Bacteria and Other Organisms*. Place of publication not identified: Frontiers Media SA.
- Welch, Cara & Wu, Qingli & Simon, James. 2008. Recent Advances in Anthocyanin Analysis and Characterization. *Current analytical chemistry*. 4. 75-101. 10.2174/157341108784587795.
- Winata, E. W. dan Yunianta. 2015. Ekstaksi Antosianin Bah Murbei (*Morus alba* L.) Metode Ultrasonic Bath (Kajian Waktu dan Rasio Bahan: Pelarut). *Jurnal Pangan dan Agroindustri*, 3 (2): 773-783.
- Witkowska A. M., Hickey D. K., Alonso-Gomez M., Wilkinson M. 2013. Evaluation of antimicrobial activities of commercial herb and spice extracts against selected food-borne bacteria. *Journal of Food Research (JFR)*;2(4):p. 37. doi: 10.5539/jfr.v2n4p37.

- Wutsqo, L. U., Budiman, A. 2018. *Review Artikel: Aktivitas Antibakteri, Antioksidan, dan Antiinflamasi Murbei Hitam (Morus nigra L.)*. Farmaka Suplemen Volume 16 Nomor 2
- Yang SK, Yusoff K, Ajat M, Thomas W, Abushelaibi A, Akseer R, Lim SE, Lai KS. 2019. Disruption of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* membrane via induction of oxidative stress by cinnamon bark (*Cinnamomum verum* J. Presl) essential oil. *PLoS One*. 14(4):e0214326.
- Zhao, X., Zhao, F., Wang, J., & Zhong, N. 2017. Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: food safety perspectives. *RSC Advances*, 7(58), 36670–36683. doi:10.1039/c7ra02497e



Lampiran 1. Etik Penelitian

	<p style="text-align: center;">FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN</p> <p style="text-align: center;">Gedung Klinik UMMI II 2 Jalan Gajayana No. 50, Dineya, Kec. Lowokwaru, Kota Malang E-mail: kepk.fkik@uin-malang.ac.id - Website : http://www.kepk.fkik.uin-malang.ac.id</p>
	<p style="text-align: center;">KETERANGAN KELAIKAN ETIK <i>(ETHICAL CLEARANCE)</i> No. 004/EC/KEPK-FKIK/2020</p>

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN (KEPK) FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN UIN MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG TELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN :

Judul Uji Aktivitas Antibiofilm Ekstrak Daun Murbei Hitam (*Morus nigra*) terhadap Biofilm *Escherichia coli* dan *Klebsiella pneumoniae*

Sub Judul

1. Uji Aktivitas Antibiofilm Ekstrak Daun Murbei Hitam (*Morus nigra*) terhadap Biofilm *Escherichia coli*
2. Uji Aktivitas Antibiofilm Ekstrak Daun Murbei Hitam (*Morus nigra*) terhadap Biofilm *Klebsiella pneumoniae*

Peneliti

1. Hafshah Yasminta Abidah
2. Alif Raudhah Husnul Khotimah

Unit / Lembaga Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan

Tempat Penelitian Laboratorium Mikrobiologi FKIK UIN Maulana Malik Ibrahim Malang

DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN TERSEBUT TELAH MEMENUHI SYARAT ATAU LAIK ETIK.

Mengetahui
Dekan FKIK UIN Maulana Malik Ibrahim Malang

Malang, 13 JAN 2020
Ketua

Prof. Dr. Bambang Pardjanto, SpB, SpBP-RE(K)
NIPT. 201612011515

dr. Avin Ainur F. M. Biomed
NIP. 198002032009122002

Keterangan :

- Keterangan Laik Etik Ini berlaku 1 (satu) tahun sejak tanggal dikeluarkan.
- Pada akhir penelitian, laporan Pelaksanaan Penelitian harus diserahkan kepada KEPK-FKIK dalam bentuk *soft copy*.
- Apabila ada perubahan protokol dan/atau Perpanjangan penelitian, harus mengajukan kembali permohonan Kajian Etik Penelitian (Amandemen Protokol).

Lampiran 2. Determinasi Tanaman



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

Nomor : 074/087A/102.7/2020
 Sifat : Biasa
 Perihal : **Determinasi Tanaman Murbei Hitam**

Memenuhi permohonan saudara :

Nama / NIM : ALIF RAUDHAH HUSNUL KHOTIMAH / 16910026
 HAFSAH YASMINA ABIDAH / 16910031
 Fakultas : FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN
 UIN MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG

1. Perihal determinasi tanaman murbei/ besaran
 - Kingdom : Plantae (Tumbuhan)
 - Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
 - Super Divisi : Spermatophyta (Menghasilkan biji)
 - Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
 - Kelas : Magnoliopsida (berkeping dua / dikotil)
 - Sub Kelas : Dilleniidae
 - Ordo : Urticales
 - Famili : Moraceae (suku nangka-nangkaan)
 - Genus : Morus
 - Spesies : *Morus nigra* L.
 - Nama Daerah : Besaran (Indonesia); Kerta, kitau (Sumatera); murbai, besaran (Jawa).
 - Kunci determinasi : 1b-2b-3b-4b-6b-7b-9b-10b-11b-12b-13b-14b-15a-109b-119b-120a-121b-124a.
2. Morfologi : Habitus: Pohon, tinggi ± 9 m. Batang: Berkayu, bulat, masih muda ungu setelah tua coklat. Daun: Tunggal, bulat telur, panjang ± 20 cm, lebar ± 11cm, tepi bergerigi, ujung runcing, pangkal tumpul, pertulangan menyirip, tangkai panjang ± 5.5 cm, hijau. Bunga: Majemuk, bentuk tandan, kelopak segitiga, benang sari dan putik kecil, putih, mahkota bentuk taju, kecil, putih. Buah: Buni, masih muda hijau, setelah tua hitam. Biji: Kecil, hitam. Akar: Tunggang, putih kekuningan.
3. Bagian yang digunakan : Daun.
4. Penggunaan : Penelitian
5. Daftar Pustaka
 - Syamsuhidayat, Sri Sugati dan Johny Ria Hutapea. 1991. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia I*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
 - Van Steenis, CGGJ. 2008. *FLORA*. Pradnya Paramita, Jakarta.

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



Bat, 22 Januari 2020
 An. Kepala UPT Lab. Herbal Materia Medica Batu
 Kepala Seksi Pelayanan Laboratorium Herbal,

Fitria Rahmawati, S.Farm., Apt.
 NIP.19900430 201403 2 002

Lampiran 3. Uji Fitokimia



KEMENTERIAN AGAMA
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
JURUSAN KIMIA

Gedung Sains dan Teknologi UIN Malang Lt.2 Jl. Gajayana 50 Malang Telp./Fax +62341558933
www.uin-malang.ac.id Email: info_uin@uin-malang.ac.id, kimia@uin-malang.ac.id

LAPORAN HASIL PENGUJIAN

Nama konsumen : Alif Raudhah Husnul K.
Instansi Asal/Jurusan : UIN/Pendidikan Dokter
Nama sampel : Ekstrak daun Murbei
Jumlah sampel : 1 (satu)
Jenis Uji : Fitokimia
Tgl Penyerahan sampel : 28 Januari 2020
Tanggal pengujian : 31 Januari 2020

Sampel tersebut di atas telah dilarutkan dengan pelarut methanol, dan diuji kandungan fitokimia di Laboratorium Jurusan Kimia UIN Maliki Malang dengan hasil sebagai berikut:

No	Uji Fitokimia	Hasil	Keterangan
1.	Flavonoid	-	Kuning jernih
2.	Tanin	+	Hijau kehitaman
3.	Saponin	-	Tidak ada busa
4.	Fenolik	+	Hijau kehitaman
5.	Alkaloid	-	Tidak ada endapan jingga
6.	Terpenoid	+	Cincin coklat
7.	Steroid	+	Hijau kehitaman

Demikian laporan hasil pengujian ini dikeluarkan untuk diketahui dan di gunakan seperlunya, atas perhatian dan kepercayaanya diucapkan terima kasih.

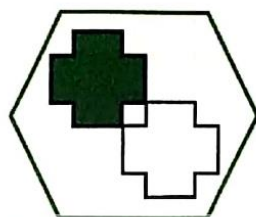
Malang, 31 Januari 2020

 Met Rhamawati, S.Si



Kedalaman Spiritual, Keagungan Akhlaq, Keluasan Ilmu dan Kematangan Profesional

Lampiran 4. Identifikasi Karakteristik Bakteri



CV WIYASA MANDIRI

Mitra Sejati Laboratorium Pendidikan & Kesehatan
Perum Bumi Mondoroko Raya blok AJ 97 Singosari
Email : wiyasamandiri@gmail.com Telp. 08125274511

LAPORAN HASIL UJI

No:017/IB /Lab.Wiyasa Mandiri /2020

KODE SAMPEL : 017/ IB
NAMA/JENIS SAMPEL : Isolat Bakteri
NAMA PELANGGAN : Alif Roudhoh Khusnul Khotimah
ALAMAT : Mahasiswa FK UIN
TANGGAL PENERIMAAN : 10/02/2020
TANGGAL ANALISA : 10/02/2020
PARAMETER ANALISA : Uji Fenotip
SPESIFIKASI METODE : Mikroskopis, Makroskopis, dan IMViC, CRA
HASIL ANALISA :

I. MIKROSKOPIS

Bentuk : Basil
Warna : Merah
Sifat Gram : Negatif

II. MAKROSKOPIS

Bentuk Koloni : Bulat
Warna Koloni : Pink
Tepi Koloni : Rata
Elevansi Koloni : Cembung
Konsistensi Koloni : Mukoid

III. UJI BIOKIMIA

TSI : As/As, H₂S (-), G (+)
Indol : Negatif
MR : Negatif
VP : Positif
Citrat : Positif
Urease : Positif

CRA Produksi Biofilm : Positif

KESIMPULAN : Berdasarkan Hasil Identifikasi secara fenotip, sampel Isolat Bakteri tersebut adalah bergenus Klebsiella positif produksi Biofilm

CATATAN :

Hasil uji ini berlaku untuk sampel yang diuji

Malang, 18 Februari 2020

Director

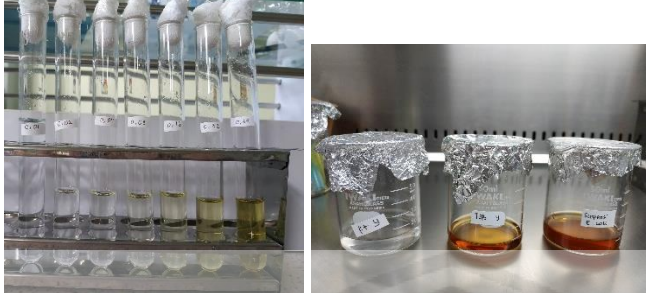




Dyah Rokhmayanti, S.Si




































Lampiran 5. Ekstraksi Daun Murbei Hitam (*Morus nigra* L.)

Proses Kegiatan	Keterangan
	<p>Daun murbei hitam yang telah dipanen, dicuci dengan air hingga bersih. Kemudian daun dikeringkan dengan cara diangin-anginkan</p>
	<p>Daun murbei hitam yang telah kering, dimasukkan ke oven dengan suhu 40°C hingga daun benar-benar kering</p>
	<p>Kemudian daun dihaluskan menggunakan blender hingga menjadi bubuk (simplisia)</p>
	<p>Bubuk murbei hitam ditimbang sebanyak 300 gram dan ditambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 3000 ml. Kemudian dilakukan sonikasi selama 2 menit sebanyak 3 kali.</p>
	<p>Setelah itu campuran larutan ekstrak disaring menggunakan kertas saring dan filtratnya ditampung.</p>
	<p>Kemudian filtrat tersebut diuapkan menggunakan <i>Rotary Vacum Evaporator</i> pada tekanan 24 kPa dan suhu 40°C sehingga didapatkan ekstrak kental.</p>









Lampiran 6. Pengujian Aktivitas Antibiofilm pada *Microplate*

	<p>Persiapan kelompok uji dengan 5 macam konsentrasi, kontrol positif, kontrol negatif, kontrol media dan suspensi.</p>
	<p>Masing-masing dimasukkan kedalam microplate menggunakan micropipet sesuai desain yang telah dirancang sebelumnya, kemudian dimasukkan inkubator untuk diinkubasi selama 72 jam.</p>
	<p>Microplate yang telah diinkubasi 72 jam, dilakukan pencucian dengan PBS, pewarnaan menggunakan kristal violet dan pemberian etanol 96%. Setelah itu dilakukan pembacaan hasil menggunakan <i>microplate reader</i></p>

Lampiran 7. Denah *Microplate* pada Uji Antibiofilm

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	i	ii	iii	iv	v							
B	i	ii	iii	iv	v							
C	i	ii	iii	iv	v							
D	i	ii	iii	iv	v							
E	i	ii	iii	iv	v							
F	i	ii	iii	iv	v							
G	i	ii	iii	iv	v							
H	i	ii	iii	iv	v							

Keterangan:

- | | | | |
|---|--------------------------|---|-------------------|
|  | = Konsentrasi 0,16 mg/ml |  | = Kontrol positif |
|  | = Konsentrasi 0,08 mg/ml |  | = Kontrol negatif |
|  | = Konsentrasi 0,04 mg/ml |  | = Kontrol media |
|  | = Konsentrasi 0,02 mg/ml | | |
|  | = Konsentrasi 0,01 mg/ml | | |

Lampiran 8. Uji Pertumbuhan Biofilm *K. pneumoniae*

a. Suspensi

Replikasi	OD	Rata-rata OD	sd
1	1,980	1,822	0,164
2	1,753		
3	1,625		
4	1,930		

b. Kontrol negatif

Replikasi	OD	Rata-rata OD	sd
1	0,106	0,131	0,035
2	0,143		
3	0,099		
4	0,174		

c. Perhitungan

- $OD_{cut} = OD_{kontrol\ negatif} + 3(\text{standar deviasi } OD_{kontrol\ negatif})$
 $OD_{cut} = 0,131 + 3(0,035)$
 $OD_{cut} = 0,131 + 0,105$
 $OD_{cut} = 0,236$
- $OD_{suspensi}$ adalah 1,822

Sehingga dapat disimpulkan $4 \times OD_{cut} \leq OD_{suspensi}$ sehingga *K. pneumoniae* pada penelitian ini termasuk *strong biofilm former*.

Lampiran 9. Uji Pencegahan Perlekatan Biofilm *K. pneumoniae*

Perlakuan	Replikasi	OD	Rata-rata	Sd	%pencegahan
Konsentrasi ekstrak 0,16 mg/ml	1	1,886	1,678	0,190	4,68%
	2	1,632			
	3	1,515			
Konsentrasi ekstrak 0,08 mg/ml	1	1,585	1,449	0,163	17,67%
	2	1,269			
	3	1,493			
Konsentrasi ekstrak 0,04 mg/ml	1	1,586	1,265	0,295	28,13%
	2	1,202			
	3	1,007			
Konsentrasi ekstrak 0,02 mg/ml	1	1,652	1,336	0,280	24,07%
	2	1,119			
	3	1,238			
Konsentrasi ekstrak 0,01 mg/ml	1	1,425	1,345	0,218	23,60%
	2	1,098			
	3	1,511			
Kontrol positif	1	0,328	0,383	0,048	-
	2	0,408			
	3	0,414			
Kontrol negatif	1	1,925	1,760	0,224	-
	2	1,850			
	3	1,505			
Kontrol media	1	0,106	0,116	0,024	-
	2	0,143			
	3	0,099			

Lampiran 10. Uji Penghambatan Pertumbuhan Biofilm *K. pneumoniae*

Perlakuan	Replikasi	OD	Rata-rata	sd	%penghambatan
Konsentrasi ekstrak 0,16 mg/ml	1	1,706	1,740	0,079	8,10%
	2	1,684			
	3	1,830			
Konsentrasi ekstrak 0,08 mg/ml	1	1,536	1,596	0,071	15,70%
	2	1,675			
	3	1,577			
Konsentrasi ekstrak 0,04 mg/ml	1	1,558	1,521	0,039	19,68%
	2	1,523			
	3	1,481			
Konsentrasi ekstrak 0,02 mg/ml	1	1,854	1,755	0,125	7,31%
	2	1,615			
	3	1,796			
Konsentrasi ekstrak 0,01 mg/ml	1	1,618	1,795	0,172	5,18%
	2	1,961			
	3	1,807			
Kontrol positif	1	0,199	0,201	0,009	-
	2	0,193			
	3	0,210			
Kontrol negatif	1	2,002	1,893	0,096	-
	2	1,818			
	3	1,860			
Kontrol media	1	0,326	0,304	0,024	-
	2	0,278			
	3	0,309			

Lampiran 11. Uji Penghancuran Biofilm *K. pneumoniae*

Perlakuan	Replikasi	OD	Rata-rata	sd	%penghancuran
Konsentrasi ekstrak 0,16 mg/ml	1	1,116	1,414	0,380	25,70%
	2	1,283			
	3	1,842			
Konsentrasi ekstrak 0,08 mg/ml	1	1,587	1,551	0,204	18,48%
	2	1,735			
	3	1,331			
Konsentrasi ekstrak 0,04 mg/ml	1	1,420	1,670	0,327	12,25%
	2	1,549			
	3	2,040			
Konsentrasi ekstrak 0,02 mg/ml	1	1,483	1,834	0,305	3,59%
	2	2,031			
	3	1,989			
Konsentrasi ekstrak 0,01 mg/ml	1	1,634	1,894	0,294	0,46%
	2	2,213			
	3	1,835			
Kontrol positif	1	0,446	0,352	0,091	-
	2	0,347			
	3	0,264			
Kontrol negatif	1	2,533	1,903	0,575	-
	2	1,406			
	3	1,769			
Kontrol media	1	0,148	0,181	0,053	-
	2	0,153			
	3	0,242			

Lampiran 12. Analisis Data Uji Pencegahan Perlekatan Biofilm *K. pneumoniae*

1. Uji Normalitas *Shapiro-Wilk*

Tests of Normality							
	Nilai	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Optical Density	Konsentrasi 0,16	.262	3	.	.957	3	.599
	Konsentrasi 0,08	.273	3	.	.945	3	.548
	Konsentrasi 0,04	.251	3	.	.966	3	.644
	Konsentrasi 0,02	.304	3	.	.907	3	.409
	Konsentrasi 0,01	.310	3	.	.898	3	.379
	Kontrol Positif	.363	3	.	.802	3	.119
	Kontrol Negatif	.323	3	.	.879	3	.321
	Kontrol Media	.331	3	.	.866	3	.284

a. Lilliefors Significance Correction

2. Uji Homogenitas *Lavene*

Test of Homogeneity of Variances

Optical Density

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.306	7	16	.079

3. Uji *One Way Anova*

ANOVA

Optical Density

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7.442	7	1.063	25.931	.000
Within Groups	.656	16	.041		
Total	8.098	23			

4. Uji Post Hoc Tukey HSD

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Optical Density

Tukey HSD

(I) Nilai	(J) Nilai	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Konsentrasi 0,16	Konsentrasi 0,08	.228667	.165321	.852	-.34370	.80103
	Konsentrasi 0,04	.412667	.165321	.264	-.15970	.98503
	Konsentrasi 0,02	.341333	.165321	.474	-.23103	.91370
	Konsentrasi 0,01	.333000	.165321	.502	-.23937	.90537
	Kontrol Positif	1.294333*	.165321	.000	.72197	1.86670
	Kontrol Negatif	-.082333	.165321	1.000	-.65470	.49003
	Kontrol Media	1.561667*	.165321	.000	.98930	2.13403
Konsentrasi 0,08	Konsentrasi 0,16	-.228667	.165321	.852	-.80103	.34370
	Konsentrasi 0,04	.184000	.165321	.945	-.38837	.75637
	Konsentrasi 0,02	.112667	.165321	.996	-.45970	.68503
	Konsentrasi 0,01	.104333	.165321	.998	-.46803	.67670
	Kontrol Positif	1.065667*	.165321	.000	.49330	1.63803
	Kontrol Negatif	-.311000	.165321	.581	-.88337	.26137
	Kontrol Media	1.333000*	.165321	.000	.76063	1.90537
Konsentrasi 0,04	Konsentrasi 0,16	-.412667	.165321	.264	-.98503	.15970
	Konsentrasi 0,08	-.184000	.165321	.945	-.75637	.38837
	Konsentrasi 0,02	-.071333	.165321	1.000	-.64370	.50103
	Konsentrasi 0,01	-.079667	.165321	1.000	-.65203	.49270
	Kontrol Positif	.881667*	.165321	.001	.30930	1.45403
	Kontrol Negatif	-.495000	.165321	.117	-1.06737	.07737
	Kontrol Media	1.149000*	.165321	.000	.57663	1.72137
Konsentrasi 0,02	Konsentrasi 0,16	-.341333	.165321	.474	-.91370	.23103
	Konsentrasi 0,08	-.112667	.165321	.996	-.68503	.45970
	Konsentrasi 0,04	.071333	.165321	1.000	-.50103	.64370
	Konsentrasi 0,01	-.008333	.165321	1.000	-.58070	.56403
	Kontrol Positif	.953000*	.165321	.001	.38063	1.52537
	Kontrol Negatif	-.423667	.165321	.238	-.99603	.14870
	Kontrol Media	1.220333*	.165321	.000	.64797	1.79270
Konsentrasi 0,01	Konsentrasi 0,16	-.333000	.165321	.502	-.90537	.23937
	Konsentrasi 0,08	-.104333	.165321	.998	-.67670	.46803
	Konsentrasi 0,04	.079667	.165321	1.000	-.49270	.65203
	Konsentrasi 0,02	.008333	.165321	1.000	-.56403	.58070

	Kontrol Positif	.961333*	.165321	.001	.38897	1.53370
	Kontrol Negatif	-.415333	.165321	.258	-.98770	.15703
	Kontrol Media	1.228667*	.165321	.000	.65630	1.80103
Kontrol Positif	Konsentrasi 0,16	-1.294333*	.165321	.000	-1.86670	-.72197
	Konsentrasi 0,08	-1.065667*	.165321	.000	-1.63803	-.49330
	Konsentrasi 0,04	-.881667*	.165321	.001	-1.45403	-.30930
	Konsentrasi 0,02	-.953000*	.165321	.001	-1.52537	-.38063
	Konsentrasi 0,01	-.961333*	.165321	.001	-1.53370	-.38897
	Kontrol Negatif	-1.376667*	.165321	.000	-1.94903	-.80430
	Kontrol Media	.267333	.165321	.735	-.30503	.83970
Kontrol Negatif	Konsentrasi 0,16	.082333	.165321	1.000	-.49003	.65470
	Konsentrasi 0,08	.311000	.165321	.581	-.26137	.88337
	Konsentrasi 0,04	.495000	.165321	.117	-.07737	1.06737
	Konsentrasi 0,02	.423667	.165321	.238	-.14870	.99603
	Konsentrasi 0,01	.415333	.165321	.258	-.15703	.98770
	Kontrol Positif	1.376667*	.165321	.000	.80430	1.94903
	Kontrol Media	1.644000*	.165321	.000	1.07163	2.21637
Kontrol Media	Konsentrasi 0,16	-1.561667*	.165321	.000	-2.13403	-.98930
	Konsentrasi 0,08	-1.333000*	.165321	.000	-1.90537	-.76063
	Konsentrasi 0,04	-1.149000*	.165321	.000	-1.72137	-.57663
	Konsentrasi 0,02	-1.220333*	.165321	.000	-1.79270	-.64797
	Konsentrasi 0,01	-1.228667*	.165321	.000	-1.80103	-.65630
	Kontrol Positif	-.267333	.165321	.735	-.83970	.30503
	Kontrol Negatif	-1.644000*	.165321	.000	-2.21637	-1.07163

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

5. Uji Korelasi Pearson

		Correlations	
		Optical Density	Konsentrasi Ekstrak
Optical Density	Pearson Correlation	1	.932*
	Sig. (2-tailed)		.021
	N	5	5
Konsentrasi Ekstrak	Pearson Correlation	.932*	1
	Sig. (2-tailed)	.021	
	N	5	5

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

Lampiran 13. Analisis Penghambatan Pertumbuhan Biofilm *K. pneumoniae*

1. Uji Normalitas Shapiro-Wilk

Tests of Normality							
	Nilai	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Optical Density	Konsentrasi 0,16	.334	3	.	.860	3	.268
	Konsentrasi 0,08	.272	3	.	.947	3	.556
	Konsentrasi 0,04	.191	3	.	.997	3	.900
	Konsentrasi 0,02	.296	3	.	.919	3	.448
	Konsentrasi 0,01	.194	3	.	.997	3	.888
	Kontrol Positif	.243	3	.	.972	3	.679
	Kontrol Negatif	.302	3	.	.910	3	.419
	Kontrol Media	.243	3	.	.972	3	.681

a. Lilliefors Significance Correction

2. Uji Homogenitas *Lavene*

Test of Homogeneity of Variances

Optical Density

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.412	7	16	.069

3. Uji *One Way Anova*

ANOVA

Optical Density

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	9.941	7	1.420	167.563	.000
Within Groups	.136	16	.008		
Total	10.077	23			

4. Uji Post Hoc Tukey HSD

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Optical Density

Tukey HSD

(I) Nilai	(J) Nilai	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Konsentrasi 0,16	Konsentrasi 0,08	.144000	.075168	.560	-.11624	.40424
	Konsentrasi 0,04	.219333	.075168	.133	-.04091	.47958
	Konsentrasi 0,02	-.015000	.075168	1.000	-.27524	.24524
	Konsentrasi 0,01	-.055333	.075168	.994	-.31558	.20491
	Kontrol Positif	1.539333*	.075168	.000	1.27909	1.79958
	Kontrol Negatif	-.153333	.075168	.488	-.41358	.10691
	Kontrol Media	1.435667*	.075168	.000	1.17542	1.69591
Konsentrasi 0,08	Konsentrasi 0,16	-.144000	.075168	.560	-.40424	.11624
	Konsentrasi 0,04	.075333	.075168	.967	-.18491	.33558
	Konsentrasi 0,02	-.159000	.075168	.446	-.41924	.10124
	Konsentrasi 0,01	-.199333	.075168	.207	-.45958	.06091
	Kontrol Positif	1.395333*	.075168	.000	1.13509	1.65558
	Kontrol Negatif	-.297333*	.075168	.019	-.55758	-.03709
	Kontrol Media	1.291667*	.075168	.000	1.03142	1.55191
Konsentrasi 0,04	Konsentrasi 0,16	-.219333	.075168	.133	-.47958	.04091
	Konsentrasi 0,08	-.075333	.075168	.967	-.33558	.18491
	Konsentrasi 0,02	-.234333	.075168	.094	-.49458	.02591
	Konsentrasi 0,01	-.274667*	.075168	.035	-.53491	-.01442
	Kontrol Positif	1.320000*	.075168	.000	1.05976	1.58024
	Kontrol Negatif	-.372667*	.075168	.003	-.63291	-.11242
	Kontrol Media	1.216333*	.075168	.000	.95609	1.47658
Konsentrasi 0,02	Konsentrasi 0,16	.015000	.075168	1.000	-.24524	.27524
	Konsentrasi 0,08	.159000	.075168	.446	-.10124	.41924
	Konsentrasi 0,04	.234333	.075168	.094	-.02591	.49458
	Konsentrasi 0,01	-.040333	.075168	.999	-.30058	.21991
	Kontrol Positif	1.554333*	.075168	.000	1.29409	1.81458
	Kontrol Negatif	-.138333	.075168	.605	-.39858	.12191
	Kontrol Media	1.450667*	.075168	.000	1.19042	1.71091
Konsentrasi 0,01	Konsentrasi 0,16	.055333	.075168	.994	-.20491	.31558
	Konsentrasi 0,08	.199333	.075168	.207	-.06091	.45958
	Konsentrasi 0,04	.274667*	.075168	.035	.01442	.53491
	Konsentrasi 0,02	.040333	.075168	.999	-.21991	.30058

	Kontrol Positif	1.594667*	.075168	.000	1.33442	1.85491
	Kontrol Negatif	-.098000	.075168	.885	-.35824	.16224
	Kontrol Media	1.491000*	.075168	.000	1.23076	1.75124
Kontrol Positif	Konsentrasi 0,16	-1.539333*	.075168	.000	-1.79958	-1.27909
	Konsentrasi 0,08	-1.395333*	.075168	.000	-1.65558	-1.13509
	Konsentrasi 0,04	-1.320000*	.075168	.000	-1.58024	-1.05976
	Konsentrasi 0,02	-1.554333*	.075168	.000	-1.81458	-1.29409
	Konsentrasi 0,01	-1.594667*	.075168	.000	-1.85491	-1.33442
	Kontrol Negatif	-1.692667*	.075168	.000	-1.95291	-1.43242
	Kontrol Media	-.103667	.075168	.854	-.36391	.15658
Kontrol Negatif	Konsentrasi 0,16	.153333	.075168	.488	-.10691	.41358
	Konsentrasi 0,08	.297333*	.075168	.019	.03709	.55758
	Konsentrasi 0,04	.372667*	.075168	.003	.11242	.63291
	Konsentrasi 0,02	.138333	.075168	.605	-.12191	.39858
	Konsentrasi 0,01	.098000	.075168	.885	-.16224	.35824
	Kontrol Positif	1.692667*	.075168	.000	1.43242	1.95291
	Kontrol Media	1.589000*	.075168	.000	1.32876	1.84924
Kontrol Media	Konsentrasi 0,16	-1.435667*	.075168	.000	-1.69591	-1.17542
	Konsentrasi 0,08	-1.291667*	.075168	.000	-1.55191	-1.03142
	Konsentrasi 0,04	-1.216333*	.075168	.000	-1.47658	-.95609
	Konsentrasi 0,02	-1.450667*	.075168	.000	-1.71091	-1.19042
	Konsentrasi 0,01	-1.491000*	.075168	.000	-1.75124	-1.23076
	Kontrol Positif	.103667	.075168	.854	-.15658	.36391
	Kontrol Negatif	-1.589000*	.075168	.000	-1.84924	-1.32876

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

5. Uji Korelasi Pearson

		Correlations	
		Optical Density	Konsentrasi Ekstrak
Optical Density	Pearson Correlation	1	-.044
	Sig. (2-tailed)		.944
	N	5	5
Konsentrasi Ekstrak	Pearson Correlation	-.044	1
	Sig. (2-tailed)	.944	
	N	5	5

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

Lampiran 14. Analisis Data Uji Penghancuran Biofilm *K. pneumoniae*

1. Uji Normalitas *Shapiro-Wilk*

Tests of Normality							
	Nilai	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Optical Density	Konsentrasi 0,16	.301	3	.	.911	3	.423
	Konsentrasi 0,08	.237	3	.	.977	3	.708
	Konsentrasi 0,04	.311	3	.	.898	3	.379
	Konsentrasi 0,02	.361	3	.	.807	3	.132
	Konsentrasi 0,01	.246	3	.	.970	3	.666
	Kontrol Positif	.190	3	.	.997	3	.903
	Kontrol Negatif	.259	3	.	.960	3	.613
	Kontrol Media	.368	3	.	.790	3	.090

a. Lilliefors Significance Correction

2. Uji Homogenitas *Lavene*

Test of Homogeneity of Variances

Optical Density

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.503	7	16	.061

3. Uji *One Way Anova*

ANOVA

Optical Density

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10.033	7	1.433	14.072	.000
Within Groups	1.630	16	.102		
Total	11.663	23			

4. Uji Post Hoc Tukey HSD

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Optical Density

Tukey HSD

(I) Nilai	(J) Nilai	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Konsentrasi 0,16	Konsentrasi 0,08	-.137333	.260583	.999	-1.03951	.76484
	Konsentrasi 0,04	-.256000	.260583	.971	-1.15818	.64618
	Konsentrasi 0,02	-.420667	.260583	.736	-1.32284	.48151
	Konsentrasi 0,01	-.480333	.260583	.603	-1.38251	.42184
	Kontrol Positif	1.061333*	.260583	.016	.15916	1.96351
	Kontrol Negatif	-.489000	.260583	.583	-1.39118	.41318
	Kontrol Media	1.232667*	.260583	.004	.33049	2.13484
Konsentrasi 0,08	Konsentrasi 0,16	.137333	.260583	.999	-.76484	1.03951
	Konsentrasi 0,04	-.118667	.260583	1.000	-1.02084	.78351
	Konsentrasi 0,02	-.283333	.260583	.951	-1.18551	.61884
	Konsentrasi 0,01	-.343000	.260583	.880	-1.24518	.55918
	Kontrol Positif	1.198667*	.260583	.006	.29649	2.10084
	Kontrol Negatif	-.351667	.260583	.866	-1.25384	.55051
	Kontrol Media	1.370000*	.260583	.002	.46782	2.27218
Konsentrasi 0,04	Konsentrasi 0,16	.256000	.260583	.971	-.64618	1.15818
	Konsentrasi 0,08	.118667	.260583	1.000	-.78351	1.02084
	Konsentrasi 0,02	-.164667	.260583	.998	-1.06684	.73751
	Konsentrasi 0,01	-.224333	.260583	.986	-1.12651	.67784
	Kontrol Positif	1.317333*	.260583	.002	.41516	2.21951
	Kontrol Negatif	-.233000	.260583	.982	-1.13518	.66918
	Kontrol Media	1.488667*	.260583	.001	.58649	2.39084
Konsentrasi 0,02	Konsentrasi 0,16	.420667	.260583	.736	-.48151	1.32284
	Konsentrasi 0,08	.283333	.260583	.951	-.61884	1.18551
	Konsentrasi 0,04	.164667	.260583	.998	-.73751	1.06684
	Konsentrasi 0,01	-.059667	.260583	1.000	-.96184	.84251
	Kontrol Positif	1.482000*	.260583	.001	.57982	2.38418
	Kontrol Negatif	-.068333	.260583	1.000	-.97051	.83384
	Kontrol Media	1.653333*	.260583	.000	.75116	2.55551
Konsentrasi 0,01	Konsentrasi 0,16	.480333	.260583	.603	-.42184	1.38251
	Konsentrasi 0,08	.343000	.260583	.880	-.55918	1.24518
	Konsentrasi 0,04	.224333	.260583	.986	-.67784	1.12651
	Konsentrasi 0,02	.059667	.260583	1.000	-.84251	.96184

	Kontrol Positif	1.541667*	.260583	.000	.63949	2.44384
	Kontrol Negatif	-.008667	.260583	1.000	-.91084	.89351
	Kontrol Media	1.713000*	.260583	.000	.81082	2.61518
Kontrol Positif	Konsentrasi 0,16	-1.061333*	.260583	.016	-1.96351	-.15916
	Konsentrasi 0,08	-1.198667*	.260583	.006	-2.10084	-.29649
	Konsentrasi 0,04	-1.317333*	.260583	.002	-2.21951	-.41516
	Konsentrasi 0,02	-1.482000*	.260583	.001	-2.38418	-.57982
	Konsentrasi 0,01	-1.541667*	.260583	.000	-2.44384	-.63949
	Kontrol Negatif	-1.550333*	.260583	.000	-2.45251	-.64816
	Kontrol Media	.171333	.260583	.997	-.73084	1.07351
Kontrol Negatif	Konsentrasi 0,16	.489000	.260583	.583	-.41318	1.39118
	Konsentrasi 0,08	.351667	.260583	.866	-.55051	1.25384
	Konsentrasi 0,04	.233000	.260583	.982	-.66918	1.13518
	Konsentrasi 0,02	.068333	.260583	1.000	-.83384	.97051
	Konsentrasi 0,01	.008667	.260583	1.000	-.89351	.91084
	Kontrol Positif	1.550333*	.260583	.000	.64816	2.45251
	Kontrol Media	1.721667*	.260583	.000	.81949	2.62384
Kontrol Media	Konsentrasi 0,16	-1.232667*	.260583	.004	-2.13484	-.33049
	Konsentrasi 0,08	-1.370000*	.260583	.002	-2.27218	-.46782
	Konsentrasi 0,04	-1.488667*	.260583	.001	-2.39084	-.58649
	Konsentrasi 0,02	-1.653333*	.260583	.000	-2.55551	-.75116
	Konsentrasi 0,01	-1.713000*	.260583	.000	-2.61518	-.81082
	Kontrol Positif	-.171333	.260583	.997	-1.07351	.73084
	Kontrol Negatif	-1.721667*	.260583	.000	-2.62384	-.81949

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

5. Uji Korelasi Pearson

		Correlations	
		Optical Density	Konsentrasi Ekstrak
Optical Density	Pearson Correlation	1	-.948*
	Sig. (2-tailed)		.014
	N	5	5
Konsentrasi Ekstrak	Pearson Correlation	-.948*	1
	Sig. (2-tailed)	.014	
	N	5	5

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