

**UJI AKTIVITAS ANTIBIOFILM EKSTRAK DAUN  
MURBEI HITAM (*Morus nigra* L.) TERHADAP  
BIOFILM *Escherichia coli***

**SKRIPSI**

Oleh:

**HAFSHAH YASMINA ABIDAH**

**NIM. 16910031**



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

**2020**

**UJI AKTIVITAS ANTIBIOFILM EKSTRAK DAUN  
MURBEI HITAM (*Morus nigra* L.) TERHADAP  
BIOFILM *Escherichia coli***

**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:  
HAFSHAH YASMINA ABIDAH  
NIM. 16910031**

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

**2020**

**UJI AKTIVITAS ANTIBIOFILM EKSTRAK DAUN  
MURBEI HITAM (*Morus nigra* L.) TERHADAP  
BIOFILM *Escherichia coli***

**SKRIPSI**

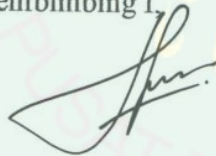
Oleh:

**HAFSHAH YASMINA ABIDAH**

**NIM. 16910031**

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. Zainabur Rahmah, S.Si, M.Si  
NIDT. 19810207 20170101 2 122

Mengetahui,  
Ketua Program Studi Pendidikan Dokter



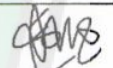
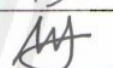
dr. Nurlaili Susanti, M.Biomed  
NIP. 19831024 201101 2 007

# **UJI AKTIVITAS ANTIBIOFILM EKSTRAK DAUN MURBEI HITAM (*Morus nigra* L.) TERHADAP BIOFILM *Escherichia coli***

## **SKRIPSI**

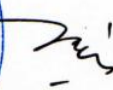
**Oleh:**  
**HAFSHAH YASMINA ABIDAH**  
**NIM. 16910031**

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

|                    |                                                                         |                                                                                       |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Penguji Utama      | <u>dr. Avin Ainur F., M.Biomed</u><br>NIP. 19800203 200912 2 002        |  |
| Ketua Penguji      | <u>Dr. Zainabur Rahmah, S.Si, M.Si</u><br>NIDT. 19810207 20170101 2 122 |  |
| Sekretaris Penguji | <u>dr. Lailia Nur Rahma, M.Biomed</u><br>NIP. 19840623 201101 2 009     |  |
| Penguji Integrasi  | <u>dr. Ana Rahmawati, M.Biomed</u><br>NIP. 19741203 200912 2 001        |  |



Mengesahkan,  
Ketua Program Studi Pendidikan Dokter

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

## PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Hafshah Yasmina Abidah

NIM : 16910031

Program Studi : Pendidikan Dokter

Fakultas : Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan

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, 22 Mei 2020

Yang membuat pernyataan,



Hafshah Yasmina Abidah  
NIM. 16910031

## KATA PENGANTAR

*Assalamua'alaikum Wr. Wb.*

Puji syukur Alhamdulillah penulis haturkan kepada Allah SWT yang telah melimpahkan Rahmat, Hidayah, dan Bimbingan-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan proposal skripsi yang berjudul “Uji Aktivitas Antibiofilm Ekstrak Daun Murbei Hitam (*Morus nigra* L.) terhadap Biofilm *Escherichia coli*” dengan baik.

Selanjutnya penulis haturkan ucapan terima kasih atas semua do'a, dukungan, dan bimbingannya kepada semua pihak yang membantu dalam menyelesaikan proposal skripsi ini. Penulis berharap semoga Allah membalas kebaikan semua pihak dengan balasan yang lebih baik. Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada:

1. Ayah, Ibu, dan keluarga yang senantiasa memberikan doa, nasihat, dan dukungan kepada penulis selama menuntut ilmu di UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Prof. Dr. dr. Bambang Pardjianto, Sp.B, Sp.BP-RE(K) dan dilanjutkan oleh Prof. Dr. dr. Yuyun Yueniwati Prabowowati Wadjib, M. Kes, Sp.Rad (K), selaku dekan Program Studi Pendidikan Dokter FKIK UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. dr. Nurlaili Susanti, M. Biomed, selaku ketua Program Studi Pendidikan Dokter FKIK UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. dr. Lailia Nur Rahma, M. Biomed, selaku dosen pembimbing skripsi I yang telah memberikan pengarahan dan dukungan.

5. Dr. Zainabur Rahmah, S. Si, M. Si, selaku dosen pembimbing skripsi II yang telah memberikan pengarahan dan dukungan.
6. dr. Avin Ainur F., M. Biomed, selaku penguji skripsi yang selalu memberikan kritikan dan saran yang membangun.
7. dr. Ana Rahmawati, M. Biomed, selaku dosen pembimbing akademik dan dosen penguji integrasi islam yang selalu memberikan dukungan.
8. Segenap sivitas akademika Program Studi Pendidikan Dokter, terutama seluruh dosen atas ilmu dan bimbingannya.
9. Teman-teman seperjuangan di PSPD 2016 atas doa dan dukungannya.
10. Semua pihak yang ikut membantuk dalam menyelesaikan skripsi ini baik berupa materiil maupun moril.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini masih terdapat kekurangan dan perlu masukan dari berbagai pihak. Penulis berharap semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat kepada para pembaca khususnya bagi penulis secara pribadi. *Aamiin Yaa Rabbal 'Aalamiin.*

*Wassalamu'alaikum Wr. Wb.*

Malang, 22 Mei 2020  
Penulis,

Hafshah Yasmina Abidah

## DAFTAR ISI

|                                                                     |      |
|---------------------------------------------------------------------|------|
| <b>HALAMAN JUDUL</b> .....                                          | i    |
| <b>HALAMAN PERSETUJUAN</b> .....                                    | ii   |
| <b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....                                     | iii  |
| <b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....                                     | iv   |
| <b>KATA PENGANTAR</b> .....                                         | v    |
| <b>DAFTAR ISI</b> .....                                             | vii  |
| <b>DAFTAR TABEL</b> .....                                           | x    |
| <b>DAFTAR GAMBAR</b> .....                                          | xi   |
| <b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....                                        | xii  |
| <b>ABSTRAK</b> .....                                                | xiii |
| <b>BAB I. PENDAHULUAN</b>                                           |      |
| 1.1 Latar belakang.....                                             | 1    |
| 1.2 Rumusan Masalah Penelitian.....                                 | 4    |
| 1.3 Tujuan Penelitian.....                                          | 5    |
| 1.4 Manfaat Penelitian.....                                         | 6    |
| <b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA</b>                                     |      |
| 2.1 <i>Escherichia coli</i> .....                                   | 7    |
| 2.1.1 Taksonomi <i>Escherichia coli</i> .....                       | 7    |
| 2.1.2 Klasifikasi dan Penyakit Klinis <i>Escherichia coli</i> ..... | 7    |
| 2.1.3 Karakteristik <i>Escherichia coli</i> .....                   | 8    |
| 2.1.4 Faktor Virulensi <i>Escherichia coli</i> .....                | 9    |
| 2.1.5 Identifikasi <i>Escherichia coli</i> .....                    | 11   |
| 2.2 Biofilm.....                                                    |      |
| 2.2.1 Definisi Biofilm.....                                         | 14   |
| 2.2.2 Struktur Pembentuk Biofilm.....                               | 15   |
| 2.2.3 Mekanisme Pembentukan Biofilm.....                            | 15   |
| 2.2.4 Pembentukan biofilm pada <i>Escherichia coli</i> .....        | 18   |
| 2.2.5 Quorum sensing.....                                           | 19   |
| 2.2.5.1 Quorum sensing pada <i>Escherichia coli</i> .....           | 21   |
| 2.2.6 Resistensi Biofilm terhadap Antibiotik.....                   | 22   |
| 2.2.7 Uji Pembentukan Biofilm.....                                  | 23   |
| 2.2.7.1 Metode Tabung.....                                          | 23   |
| 2.2.7.2 Metode <i>Congo Red Agar</i> .....                          | 23   |
| 2.2.7.3 Metode <i>Microtiter Plate Biofilm Assay</i> .....          | 24   |
| 2.2.7.4 Metode PCR).....                                            | 25   |
| 2.3 Infeksi Saluran Kemih (ISK).....                                | 25   |
| 2.3.1 Definisi ISK.....                                             | 25   |
| 2.3.2 Epidemiologi ISK.....                                         | 25   |
| 2.3.3 Etiologi ISK.....                                             | 26   |
| 2.3.4 Faktor risiko ISK.....                                        | 27   |

|                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.3.5 Patogenesis ISK.....                                                 | 27 |
| 2.4 Murbei Hitam ( <i>Morus nigra</i> ) .....                              | 31 |
| 2.4.1 Taksonomi Murbei Hitam.....                                          | 31 |
| 2.4.2 Morfologi Murbei Hitam.....                                          | 31 |
| 2.4.3 Khasiat dan Kegunaan Daun Murbei Hitam.....                          | 32 |
| 2.4.4 Kandungan Daun Murbei Hitam.....                                     | 32 |
| 2.4.5 Daun Murbei Hitam sebagai Antibakteri dan Antibiofilm.....           | 33 |
| 2.4.6 Metode Ekstraksi Daun Murbei Hitam.....                              | 36 |
| <b>BAB III. KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS</b>                              |    |
| 3.1 Kerangka Konsep Penelitian.....                                        | 37 |
| 3.2 Hipotesis Penelitian.....                                              | 39 |
| <b>BAB IV. METODE PENELITIAN</b>                                           |    |
| 4.1 Rancangan penelitian.....                                              | 40 |
| 4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian.....                                       | 40 |
| 4.3 Populasi dan Sampel.....                                               | 40 |
| 4.4 Variabel Penelitian.....                                               | 41 |
| 4.4.1 Variabel Bebas.....                                                  | 41 |
| 4.4.2 Variabel Tergantung.....                                             | 41 |
| 4.5 Kriteria Inklusi dan Eksklusi.....                                     | 42 |
| 4.5.1 Kriteria Inklusi.....                                                | 42 |
| 4.5.2 Kriteria Eksklusi.....                                               | 43 |
| 4.6 Definisi Operasional.....                                              | 43 |
| 4.7 Alat dan Bahan Penelitian.....                                         | 46 |
| 4.7.1 Alat Penelitian.....                                                 | 46 |
| 4.7.2 Bahan Penelitian.....                                                | 46 |
| 4.8 Prosedur Penelitian.....                                               | 47 |
| 4.8.1 Pembuatan Larutan Ekstrak Daun Murbei Hitam.....                     | 47 |
| 4.8.1.1 Determinasi Tanaman Murbei Hitam.....                              | 47 |
| 4.8.1.2 Persiapan Daun Murbei Hitam.....                                   | 47 |
| 4.8.1.3 Ekstraksi Daun Murbei Hitam.....                                   | 48 |
| 4.8.1.4 Uji Fitokimia.....                                                 | 48 |
| 4.8.1.5 Pembuatan Larutan Ekstrak Daun Murbei Hitam.....                   | 50 |
| 4.8.2 Penyiapan Bakteri.....                                               | 51 |
| 4.8.2.1 Identifikasi Bakteri.....                                          | 51 |
| 4.8.2.2 Pembuatan Media Pertumbuhan Bakteri.....                           | 56 |
| 4.8.2.3 Penyiapan Suspensi Bakteri.....                                    | 56 |
| 4.8.3 Pembuatan Kelompok Kontrol .....                                     | 56 |
| 4.8.4 Uji Aktivitas Antibiofilm.....                                       | 57 |
| 4.8.4.1 Uji Deteksi Pembentukan Biofilm <i>Escherichia coli</i> .....      | 57 |
| 4.8.4.2 Uji Pencegahan Perlekatan Biofilm <i>Escherichia coli</i> .....    | 58 |
| 4.8.4.3 Uji Penghambatan Pertumbuhan biofilm <i>Escherichia coli</i> ..... | 60 |
| 4.8.4.4 Uji Penghancuran/Degradasi Biofilm <i>Escherichia coli</i> .....   | 61 |

|                                                                                                                           |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.9 Denah Perlakuan Uji Aktivitas Antibiofilm.....                                                                        | 62  |
| 4.10 Perhitungan Konsentrasi Ekstrak Minimal Antibiofilm.....                                                             | 63  |
| 4.10.1 Perhitungan Konsentrasi EkstrakMinimal Pencegahan Biofilm....                                                      | 63  |
| 4.10.2 Perhitungan Konsentrasi Ekstrak Minimal Penghambatan Biofilm.....                                                  | 63  |
| 4.10.3 Perhitungan Konsentrasi Ekstrak Minimal Penghancuran Biofilm                                                       | 63  |
| 4.11 Alur Penelitian.....                                                                                                 | 64  |
| 4.12 Analisis Data.....                                                                                                   | 65  |
| <b>BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN</b>                                                                                        |     |
| 5.1 Hasil Penelitian.....                                                                                                 | 66  |
| 5.1.1 Hasil Determinasi Daun Murbei Hitam.....                                                                            | 66  |
| 5.1.2 Hasil Ekstraksi Daun Murbei Hitam.....                                                                              | 66  |
| 5.1.3 Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Daun Murbei Hitam.....                                                                  | 66  |
| 5.1.4 Hasil Identifikasi Bakteri Uji.....                                                                                 | 68  |
| 5.1.5 Hasil Uji Deteksi Pertumbuhan Biofilm <i>E. coli</i> .....                                                          | 70  |
| 5.1.6 Hasil Uji Pendahuluan.....                                                                                          | 71  |
| 5.1.7 Aktivitas Antibiofilm Ekstrak Daun Murbei Hitam terhadap Biofilm <i>E. coli</i> .....                               | 72  |
| 5.1.8 Konsentrasi Ekstrak Minimal Antibiofilm.....                                                                        | 79  |
| 5.2 Pembahasan.....                                                                                                       | 85  |
| 5.3 Kajian Integrasi Islam mengenai Aktivitas Antibiofilm Ekstrak Daun Murbei Hitam terhadap Biofilm <i>E. coli</i> ..... | 106 |
| <b>BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN</b> .....                                                                                 | 111 |
| <b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....                                                                                               | 113 |
| <b>LAMPIRAN</b> .....                                                                                                     | 121 |

## DAFTAR TABEL

|                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabel 2.1 Interpretasi Kekuatan Bakteri Pembentuk Biofilm.....                       | 25 |
| Tabel 4.1 Interpretasi Kekuatan Bakteri Pembentuk Biofilm.....                       | 58 |
| Tabel 5.1 Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Daun Murbei Hitam.....                         | 67 |
| Tabel 5.2 Hasil Uji Biokimia IMViC terhadap Bakteri Uji.....                         | 70 |
| Tabel 5.3 Hasil Uji Pertumbuhan Biofilm <i>E. coli</i> .....                         | 71 |
| Tabel 5.4 Hasil Uji <i>Pos Hoc Tukey</i> Data Pencegahan Perlekatan Biofilm.....     | 76 |
| Tabel 5.5 Hasil Uji <i>Pos Hoc Tukey</i> Data Pencegahan Perlekatan Biofilm.....     | 79 |
| Tabel 5.6 Hasil Uji <i>Pos Hoc Tukey</i> Data Pencegahan Perlekatan Biofilm.....     | 82 |
| Tabel 5.7 Hasil MBPC Uji Pencegahan Perlekatan Biofilm <i>E. coli</i> .....          | 83 |
| Tabel 5.8 Hasil MBIC Uji Penghambatan Pertumbuhan Biofilm <i>E. coli</i> .....       | 84 |
| Tabel 5.9 Hasil MBEC Uji Penghancuran Biofilm <i>E. coli</i> .....                   | 84 |
| Tabel 5.10 Karakteristik Uji Biokimia Bakteri Famili <i>Enterobacteriaceae</i> ..... | 92 |

## DAFTAR GAMBAR

|                                                                                                               |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Gambar 2.1 Klasifikasi <i>E. coli</i> .....                                                                   | 8   |
| Gambar 2.2 Faktor Virulensi <i>E. coli</i> .....                                                              | 9   |
| Gambar 2.3 Pewarnaan Gram.....                                                                                | 12  |
| Gambar 2.4 Koloni <i>E. coli</i> pada medium agar EMB.....                                                    | 13  |
| Gambar 2.5 Struktur pembentuk biofilm.....                                                                    | 15  |
| Gambar 2.6 Tahap pembentukan biofilm.....                                                                     | 17  |
| Gambar 2.7 Quorum sensing. (A) Autoinducer utama pada quorum sensing.<br>(B) Jalur quorum sensing.....        | 20  |
| Gambar 2.8 Quorum sensing pada bakteri Gram negatif.....                                                      | 21  |
| Gambar 2.9 Metode Tabung.....                                                                                 | 23  |
| Gambar 2.10 Metode Congo Red Agar.....                                                                        | 24  |
| Gambar 2.11 Metode Microtiter Plate Biofilm Assay .....                                                       | 24  |
| Gambar 2.12 (a) Patogenesis infeksi saluran kemih (b) Pembentukan biofilm<br>pada kateter.....                | 28  |
| Gambar 2.13 Patogenesis UPEC pada ISK.....                                                                    | 29  |
| Gambar 2.14 Daun dan buah murbei hitam.....                                                                   | 32  |
| Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian.....                                                                    | 37  |
| Gambar 4.1 Pewarnaan Gram.....                                                                                | 52  |
| Gambar 4.2 Denah Perlakuan Uji Antibiofilm.....                                                               | 62  |
| Gambar 4.3 Alur Penelitian.....                                                                               | 63  |
| Gambar 5.1 Hasil Pewarnaan Gram Bakteri Uji.....                                                              | 68  |
| Gambar 5.2 Hasil Uji Pertumbuhan Bakteri Uji pada EMB.....                                                    | 69  |
| Gambar 5.3 Hasil Uji Deteksi Pertumbuhan Bakteri Uji pada Media CRA....                                       | 69  |
| Gambar 5.4 Hasil Uji Biokimia IMViC.....                                                                      | 70  |
| Gambar 5.5 Hasil Nilai OD Uji Pendahuluan.....                                                                | 72  |
| Gambar 5.6 Hasil Nilai OD Uji Antibiofilm Ekstrak Daun Murbei Hitam<br>terhadap Biofilm <i>E. coli</i> .....  | 73  |
| Gambar 5.7 Hasil Nilai OD Uji Pencegahan Perlekatan Biofilm <i>E. coli</i> .....                              | 74  |
| Gambar 5.8 Persentase Daya Pencegahan Perlekatan Biofilm <i>E. coli</i> .....                                 | 75  |
| Gambar 5.9 Hasil Nilai OD Uji Penghambatan Pertumbuhan Biofilm <i>E. coli</i>                                 | 77  |
| Gambar 5.10 Persentase Aktivitas Penghambatan Pertumbuhan Biofilm <i>E. coli</i> .....                        | 78  |
| Gambar 5.11 Hasil Nilai OD Uji Penghancuran Biofilm <i>E. coli</i> .....                                      | 80  |
| Gambar 5.12 Persentase Aktivitas Penghancuran Biofilm <i>E. coli</i> .....                                    | 81  |
| Gambar 5.13 Hasil Nilai OD Uji Antibiofilm Ekstrak Daun Murbei Hitam<br>Terhadap Biofilm <i>E. coli</i> ..... | 109 |

## DAFTAR LAMPIRAN

|                                                                                                                             |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Lampiran 1.</b> Hasil Determinasi Tanaman Murbei Hitam.....                                                              | 121 |
| <b>Lampiran 2.</b> Etik Penelitian.....                                                                                     | 122 |
| <b>Lampiran 3.</b> Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Daun Murbei Hitam.....                                                       | 123 |
| <b>Lampiran 4.</b> Hasil Identifikasi Bakteri Uji.....                                                                      | 124 |
| <b>Lampiran 5.</b> Alat yang digunakan pada penelitian.....                                                                 | 125 |
| <b>Lampiran 6.</b> Penyiapan Ekstrak Daun Murbei Hitam.....                                                                 | 126 |
| <b>Lampiran 7.</b> Prosedur Uji Aktivitas Antibiofilm Ekstrak Daun Murbei Hitam terhadap biofilm <i>E. coli</i> .....       | 127 |
| <b>Lampiran 8.</b> Hasil Data Uji Aktivitas Antibiofilm Ekstrak Daun Murbei Hitam terhadap biofilm <i>E. coli</i> .....     | 131 |
| <b>Lampiran 9.</b> Hasil Statistik Uji Aktivitas AntibiofilmEkstrak Daun Murbei Hitam terhadap biofilm <i>E. coli</i> ..... | 133 |

## ABSTRAK

**Abidah, Hafshah Yasmina. 2020. UJI AKTIVITAS ANTIBIOFILM EKSTRAK DAUN MURBEI HITAM (*Morus Nigra* L.) TERHADAP BIOFILM *Escherichia Coli*. 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. Zainabur Rahmah, S.Si, M.Si**

**Kata Kunci:** Daun murbei hitam (*Morus nigra* L.), antibiofilm, *Escherichia coli*

*E. coli* merupakan bakteri utama penyebab infeksi saluran kemih (ISK) yang memiliki kemampuan untuk membentuk biofilm. Terbentuknya biofilm menyebabkan pengobatan ISK menjadi kurang efektif. Daun murbei hitam mengandung senyawa aktif yang memiliki aktivitas antibakteri dan antibiofilm. Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas antibiofilm ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra*) terhadap biofilm *E. coli*. Uji aktivitas antibiofilm terdiri dari uji pencegahan perlekatan biofilm, uji penghambatan pertumbuhan biofilm, dan uji penghancuran biofilm dengan metode *Microtiter Plate Biofilm Assay*. Hasil uji aktivitas antibiofilm menunjukkan bahwa ekstrak daun murbei hitam memiliki aktivitas pencegahan perlekatan, penghambatan pertumbuhan, dan penghancuran biofilm *E. coli* dengan persentase aktivitas tertinggi pada konsentrasi berturut-turut yaitu 0,08 mg/mL, 0,16 mg/mL, dan 0,16 mg/mL. Aktivitas antibiofilm terbaik terjadi pada penghambatan pertumbuhan biofilm *E. coli* pada konsentrasi ekstrak 0,16 mg/mL dengan persentase penghambatan sebesar 65,83%. Semua konsentrasi ekstrak pada uji pencegahan perlekatan biofilm tidak ada yang memenuhi MBPC<sub>50</sub> dan MBPC<sub>90</sub>. MBIC<sub>50</sub> pada uji penghambatan pertumbuhan pada konsentrasi 0,02 mg/mL dan tidak ada konsentrasi ekstrak yang mencapai MBIC<sub>90</sub>. Pada uji penghancuran MBEC<sub>50</sub> pada konsentrasi 0,16 mg/mL dan tidak ada konsentrasi ekstrak yang mencapai MBEC<sub>90</sub>. Berdasarkan penelitian ini, aktivitas antibiofilm ekstrak daun murbei hitam menunjukkan hasil terbaik secara berturut-turut pada uji penghambatan pertumbuhan, uji penghancuran, dan uji pencegahan perlekatan.

## ABSTRACT

**Abidah, Hafshah Yasmina. 2020. ANTIBIOFILM ACTIVITY TEST OF MULBERRY BLACK LEAVES (*Morus Nigra* L.) ON BIOFILM *Escherichia coli*. Thesis. Medical Study Program for the Faculty of Medicine and Health Sciences, Maulana Malik Ibrahim State Islamic University of Malang. Supervisors: (I) dr. Lailia Nur Rahma, M.Biomed (II) Dr. Zainabur Rahmah, S.Si, M.Si**

**Keyword:** Black mulberry leaves (*Morus nigra* L.), antibiofilm, *Escherichia coli*

*E. coli* is the main bacterium that causes urinary tract infections (UTI) which can form biofilms. The formation of biofilms makes UTI treatment less effective. Black mulberry leaves contain active compounds that have antibacterial and antibiofilm activity. This study aims to examine the antibiofilm activity of black mulberry leaf extract (*Morus nigra*) against *E. coli* biofilms. Antibiotic activity test consists of a biofilm attachment prevention test, biofilm growth inhibition test, and biofilm destruction test using Microtiter Plate Biofilm Assay method. The results of the antibiofilm activity test showed that black mulberry leaf extract had the activity of attachment prevention, growth inhibition, and destruction of *E. coli* biofilms with the highest percentage of activity at consecutive concentrations of 0,08 mg/mL, 0,16 mg/mL, and 0,16 mg/mL. The best antibiofilm activity occurred in inhibiting the growth of *E. coli* biofilms at an extract concentration of 0,16 mg/mL with an inhibition percentage of 65.83%. All extract concentrations in the biofilm adhesion prevention test did not meet MBPC<sub>50</sub> and MBPC<sub>90</sub>. MBIC<sub>50</sub> in the growth inhibition test at a concentration of 0,02 mg/mL and no extract concentration reached MBIC<sub>90</sub>. In the MBEC<sub>50</sub> destruction test at a concentration of 0,16 mg/mL and no extract concentration reached MBEC<sub>90</sub>. Based on this study, the antibiotic activity of black mulberry leaf extract showed the best results on growth inhibition test, destruction test, and attachment prevention test, respectively.

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar belakang

*Escherichia coli* merupakan bakteri Gram negatif dari famili *Enterobacteriaceae*. *E. coli* berbentuk batang, fakultatif anaerob, dan tidak membentuk spora (Sharma *et al.*, 2016). *E. coli* termasuk flora normal pada manusia dan binatang. Pada manusia bakteri ini berperan secara simbiotik dalam proses pencernaan dan menghasilkan vitamin K<sub>2</sub> (Sarowska *et al.*, 2019). Namun beberapa strain dari *E. coli* dapat menyebabkan infeksi pada manusia, diantaranya adalah infeksi saluran kemih (ISK).

Infeksi saluran kemih (ISK) adalah infeksi yang terjadi pada saluran kemih, yaitu uretra, kandung kemih, ureter, dan ginjal. Infeksi ini dapat mengenai semua kelompok usia dan lebih banyak terjadi pada wanita (Sari *et al.*, 2015). ISK merupakan infeksi bakteri yang paling sering terjadi yaitu sekitar 150 juta kasus per tahun di seluruh dunia (Suskind *et al.*, 2015). Departemen Kesehatan Republik Indonesia (2016) melaporkan bahwa kejadian ISK di Indonesia sebanyak 90-100 kasus per 100.000 penduduk per tahun atau sekitar 180.000 kasus per tahun. Sekitar 80-90% dari semua kasus ISK disebabkan oleh *E. coli*, yaitu dari strain *uropathogenic E. coli* (UPEC) (Kudinha *et al.*, 2017).

Dalam menyebabkan suatu infeksi, *E. coli* memiliki faktor virulensi yang diperantarai oleh kapsul polisakarida, flagel, *outer membrane vesicle*, adhesin atau pili/fimbria, curli, protektin, toksin, sistem sekresi, *iron acquisition system* (siderofor) (Terlizzi *et al.*, 2017). Faktor virulensi lain dari *E. coli* adalah bakteri tersebut memiliki kemampuan untuk membentuk biofilm. Biofilm merupakan

agregat mikroorganisme (bakteri, jamur, alga, atau protozoa) yang tertutup oleh matriks polimer ekstraseluler yang diproduksi oleh mikroorganisme tersebut (Slobodnikovanikova *et al.*, 2016). Biofilm dapat terbentuk pada permukaan biotik maupun abiotik. Biofilm yang tumbuh pada permukaan abiotik banyak ditemukan pada alat-alat medis seperti kateter uretra dan intravaskular, *prosthetic joint* dan *shunt*, dan *prosthetic graft*. Dengan membentuk biofilm, bakteri di dalamnya dapat terlindung dari berbagai macam gangguan eksternal (Vogeleer *et al.*, 2014).

Bakteri di dalam biofilm diperkirakan 10.000 kali lebih resisten terhadap antibiotik daripada bakteri dalam bentuk planktonik (Rabin *et al.*, 2015). Resistensi antibiotik terjadi karena adanya komponen pembentuk biofilm yang kompleks sehingga penetrasi antibiotik menjadi lebih sulit (Sharma *et al.*, 2016). Adanya resistensi antibiotik menyebabkan terapi untuk mengatasi biofilm menjadi kurang efektif. Namun hingga saat ini belum ada obat yang mampu secara spesifik berperan sebagai antibiofilm bakteri. Maka dari itu diperlukan pengembangan agen antibiofilm lebih lanjut untuk mengatasi masalah tersebut.

Disebutkan dalam hadits shahih riwayat Imam Bukhari, bahwa Rasulullah *shallallahu ‘alaihi wa sallam* bersabda: “*Tidaklah Allah menurunkan penyakit kecuali Dia juga menurunkan penawarnya*”. Berdasarkan hadits tersebut, Rasulullah menjelaskan bahwa semua penyakit ada obatnya. Tugas manusia adalah mencari dan meneliti obat yang tepat untuk mengatasi suatu penyakit. Allah juga berfirman dalam Qur’an Surat Asy-Syuara ayat 7 yang artinya “*Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik?*”. Ayat

tersebut mengandung perintah bagi manusia untuk mengamati tumbuh-tumbuhan yang telah Allah ciptakan, karena Allah tidak akan menciptakan sesuatu dengan sia-sia. Maka dari itu pengembangan obat berbahan dasar tumbuhan merupakan salah satu cara untuk menemukan obat yang berpotensi memiliki aktivitas sebagai antibiofilm (Haney *et al.*, 2018).

Saat ini banyak peneliti yang melakukan penelitian mengenai bahan alam yang memiliki aktivitas sebagai antibiofilm. Bahan alam tersebut diantaranya adalah murbei hitam. Ekstrak, fraksi, dan konstituen aktif dari tanaman ini memperlihatkan potensi dan kegunaannya sebagai sumber terapeutik (Lim *et al.*, 2019). Murbei hitam (*Morus nigra*) umumnya digunakan dalam budidaya ulat sutera, namun banyak masyarakat yang memanfaatkannya sebagai obat (Isnain *et al.*, 2015). Di China daun murbei hitam digunakan sebagai penurun tekanan darah, antihiperglikemia, diuretik, antioksidan, antihelminthes, antiparasit, dan antibakteri (Aulifa *et al.*, 2018). Sedangkan di Indonesia, daun murbei dimanfaatkan sebagai obat demam, flu, malaria, batuk, diabetes melitus, rematik, anemia, hipertensi, dan memperbanyak produksi ASI (Isnain *et al.*, 2015). Senyawa aktif daun murbei banyak digunakan sebagai antiinflamasi pada penderita diabetes mellitus, karena pada daun murbei hitam terdapat kandungan 1-deoxynojirimycin dan inhibitor  $\alpha$ -glikosidase (Hussain *et al.*, 2017).

Murbei hitam termasuk salah satu jenis tanaman polifenol. Senyawa aktif yang dapat ditemukan pada daun murbei hitam terdiri dari tanin, terpenoid, fenolik, dan steroid. Senyawa aktif tersebut diketahui memiliki aktivitas sebagai antibakteri dan antibiofilm. Tanin berperan sebagai senyawa antiadhesif yang dapat mencegah perlekatan bakteri pada permukaan. Tanin juga dapat merusak

membran bakteri dan menghancurkan matriks EPS pada maturasi biofilm (Kining *et al.*, 2016; Trentin *et al.*, 2013). Sedangkan asam fenolat dapat menurunkan motilitas *E. coli* yang diperantarai oleh flagel (*swimming* dan *swarming*) (Borges *et al.*, 2012). Steroid memiliki hubungan dengan membran lipid bakteri yang mampu menyebabkan kebocoran liposom. Terpenoid dapat menyebabkan kerusakan membran sel bakteri, memodulasi pompa efluks bakteri, menekan pertumbuhan biofilm atau menghambat beberapa faktor virulensi seperti enzim dan toksin (Mahizan *et al.*, 2019). Terpenoid juga memiliki efek antiadhesif sel dan dapat menyebabkan stress kalsium pada sepanjang membrane sel bakteri (Lahiri, 2019).

Murbei hitam memiliki kandungan total fenol yang paling tinggi diantara semua spesies dari Genus *Morus* (Budiman *et al.*, 2017). Tingginya kandungan total fenol tersebut menjadikan tanaman murbei hitam potensial untuk digunakan sebagai alternatif terapi pada infeksi akibat *E. coli*. Maka peneliti tertarik melakukan penelitian untuk mengetahui aktivitas antibiofilm ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra*) terhadap biofilm *Escherichia coli*.

## **1.2 Rumusan Masalah Penelitian**

### **1.2.1 Rumusan Masalah Umum Penelitian**

Bagaimana aktivitas antibiofilm ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra*) terhadap biofilm *Escherichia coli*?

### **1.2.2 Rumusan Masalah Khusus Penelitian**

- a. Bagaimana aktivitas antibiofilm ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra*) terhadap adhesi biofilm *Escherichia coli*?

- b. Bagaimana aktivitas antibiofilm ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra*) terhadap pertumbuhan biofilm *Escherichia coli*?
- c. Bagaimana aktivitas antibiofilm ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra*) terhadap degradasi biofilm *Escherichia coli*?
- d. Berapakah konsentrasi minimal antibiofilm untuk pencegahan perlekatan (MBPC), penghambatan pertumbuhan (MBIC), dan penghancuran (MBEC) biofilm *Escherichia coli*?

### 1.3 Tujuan Penelitian

#### 1.3.1 Tujuan Umum Penelitian

Untuk mengetahui aktivitas antibiofilm ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra*) terhadap biofilm *Escherichia coli*.

#### 1.3.2 Tujuan Khusus Penelitian

- a. Untuk mengetahui aktivitas antibiofilm ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra*) terhadap adhesi biofilm *Escherichia coli*.
- b. Untuk mengetahui aktivitas antibiofilm ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra*) terhadap pertumbuhan biofilm *Escherichia coli*.
- c. Untuk mengetahui aktivitas antibiofilm ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra*) terhadap degradasi biofilm *Escherichia coli*.
- d. Untuk mengetahui konsentrasi minimal antibiofilm untuk pencegahan perlekatan (MBPC), penghambatan pertumbuhan (MBIC), dan penghancuran (MBEC) biofilm *Escherichia coli*.

## 1.4 Manfaat Penelitian

### 1.4.1 Manfaat Akademis

- a. Penelitian ini dapat menjadi tambahan pengetahuan mengenai aktivitas antibiofilm ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra*) terhadap biofilm *Escherichia coli*.
- b. Penelitian ini dapat menjadi sumber literatur dalam pengembangan ilmu kesehatan khususnya mengenai bahan antibiofilm dalam pengobatan ISK akibat infeksi *Escherichia coli* pembentuk biofilm.

### 1.4.2 Manfaat Aplikatif

Penelitian ini dapat dijadikan sumber informasi bagi masyarakat terkait terapi antibiofilm *adjuvant* terhadap biofilm *Escherichia coli*.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 *Escherichia coli*

##### 2.1.1 Taksonomi *Escherichia coli*

Taksonomi *Escherichia coli* adalah sebagai berikut (Brooks, 2013).

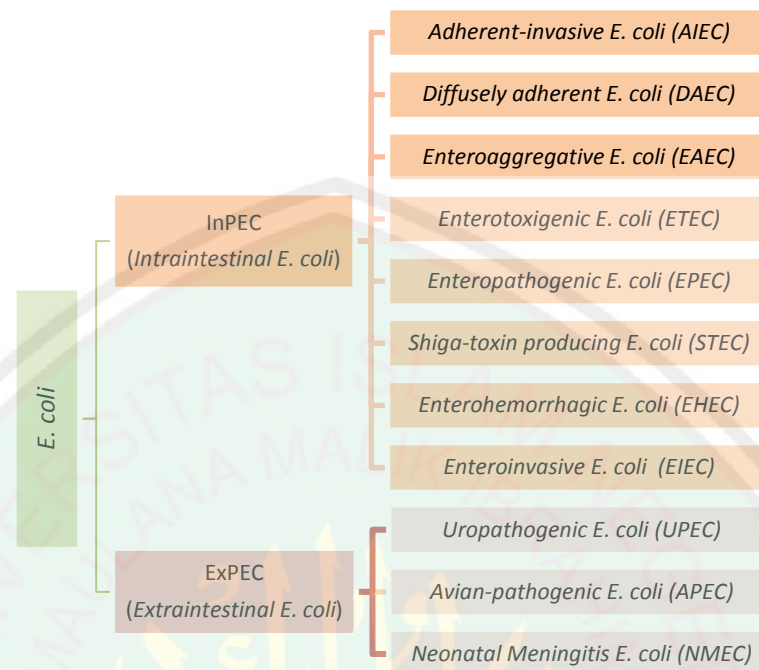
|         |                              |
|---------|------------------------------|
| Kingdom | : <i>Bacteria</i>            |
| Filum   | : <i>Proteobacteria</i>      |
| Kelas   | : <i>Gammaproteobacteria</i> |
| Ordo    | : <i>Enterobacteriales</i>   |
| Familia | : <i>Enterobacteriaceae</i>  |
| Genus   | : <i>Escherichia</i>         |
| Spesies | : <i>Escherichia coli</i>    |

##### 2.1.2 Klasifikasi dan Penyakit Klinis *Escherichia coli*

Strain *E. coli* diklasifikasikan menjadi dua tipe yaitu *intestinal E. coli* (InPEC) dan *extraintestinal E. coli* (ExPEC). Grup InPEC terdiri dari *adherent-invasive E. coli* (AIEC), *diffusely adherent E. coli* (DAEC), *enteroaggregative E. coli* (EAEC), *enterotoxigenic E. coli* (ETEC), *enteropathogenic E. coli* (EPEC), *Shiga-toxin producing E. coli* (STEC), *enterohemorrhagic E. coli* (EHEC), dan *enteroinvasive E. coli* (EIEC) (Vogeleer *et al.*, 2014). Grup InPEC umumnya menyebabkan gastroenteritis (Murray *et al.*, 2013).

Grup ExPEC terdiri dari *avian pathogenic E. coli* (APEC), *neonatal meningitis E. coli* (NMEC), dan *uropathogenic E. coli* (UPEC) (Nielsen *et al.*, 2018). Grup tersebut umumnya menyebabkan infeksi saluran kemih, sepsis

neonatal, dan meningitis. *E. coli* juga menyebabkan infeksi yang berkaitan dengan alat-alat medis seperti alat prostetik dan kateter (Sharma *et al.*, 2016).



**Gambar 2.1** Klasifikasi *E. coli*

Sumber: Vogelee *et al.*, 2014; Nielsen *et al.*, 2018

### 2.1.3 Karakteristik *Escherichia coli*

*E. coli* adalah bakteri Gram negatif dari famili *Enterobacteriaceae*. Bakteri ini berbentuk batang, berukuran panjang 1.0–3.0  $\mu\text{m}$  dan lebar 0.5  $\mu\text{m}$ . *E. coli* merupakan flora normal pada manusia, namun beberapa strain mampu menyebabkan infeksi oportunistik (Murray *et al.*, 2013). *E. coli* dapat tumbuh pada temperatur 15°-48°C dan mencapai pertumbuhan maksimal pada suhu 37°-42°C. Kadar pH untuk pertumbuhan *E. coli* adalah 5.5-8.0 dengan pH netral untuk mencapai pertumbuhan optimal (Welch *et al.*, 2006).

*E. coli* bersifat fakultatif anaerob. *E. coli* mampu memfermentasikan glukosa dan mereduksi nitrat menjadi nitrit. *E. coli* memberikan hasil positif pada tes

indole. Sebagian besar strain *E. coli* termasuk bakteri katalase positif dan oksidase, sitrat, urease, hidrogen sulfida negatif (Welch *et al.*, 2006).

#### 2.1.4 Faktor Virulensi *Escherichia coli*

Faktor virulensi UPEC dapat dibagi menjadi dua grup yaitu faktor virulensi permukaan sel bakteri dan faktor virulensi yang disekresikan. Faktor virulensi permukaan terdiri dari kapsul polisakarida, flagel, *outer membrane vesicle*, adhesin atau pili/fimbria, curli, *non-pilus adhesin*, dan protektin. Sedangkan faktor virulensi yang disekresi atau diekspresikan adalah toksin, sistem sekresi, *iron acquisition system* (siderofor) (Terlizzi *et al.*, 2017).



**Gambar 2.2** Faktor Virulensi *E. coli*. *E. coli* memiliki faktor virulensi diantaranya: toksin/adhesin, *curli*, OMP, siderofor, pili tipe 1, LPS, pili tipe-P, flagela, *TonB-dependent iron-uptake receptor*, *outer-membrane vesicle*.

Sumber: Terlizzi *et al.*, 2017

##### a. Kapsul polisakarida

Sebagian besar ExPEC termasuk UPEC menghasilkan kapsul tipe II. Fungsi utama kapsul polisakarida adalah untuk melindungi bakteri dari sistem imun pejamu. Selain itu, kapsul berperan pada resistensi antimikroba (Parvez *et al.*, 2018).

b. Adhesin

Adhesin atau fimbria/pili berperan dalam memfasilitasi kolonisasi *E. coli* pada sel epitel saluran kemih pejamu. Fimbria pada UPEC terdiri dari fimbria tipe 1, fimbria P, fimbria S dan FIC, dan adhesin Dr/Afa. Fimbria tipe 1 terlibat dalam pembentukan biofilm (Sarowska *et al.*, 2019).

c. Flagela

Flagela berperan sebagai organel motilitas bakteri, sehingga bakteri dapat bermigrasi secara *ascenden* dari kandung kemih menuju ginjal (Parvez *et al.*, 2018).

d. Curli

Curli merupakan bagian dari permukaan bakteri yang menyekresikan protein monomer terlarut yang memiliki karakteristik fisik dari fibril amiloid (Terlizzi, 2017). Curli berperan dalam pembentukan biofilm yaitu dengan memicu perlekatan UPEC pada sel epitel kandung kemih dan ginjal (Subashchandrabose *et al.*, 2015).

e. Toksin

Toksin penting yang disekresikan UPEC adalah hemolisin alfa (HlyA). HlyA mampu melisiskan sel darah merah dan bersifat toksik pada sel pejamu sehingga menyebabkan inflamasi, kerusakan jaringan, dan melemahkan sistem imun. HlyA juga dapat melisiskan sel pejamu melalui pembentukan lubang. Toksin lain yang disekresikan adalah *cytotoxic necrotising factor 1* (CNF-1) dan *secreted autotransporter toxin* (SAT) (Kudinha *et al.*, 2017; Bien *et al.*, 2012).

f. *Iron acquisition system*

Bakteri dan pejamu saling berkompetisi untuk memperoleh zat besi. Zat besi ini diperlukan untuk transpor dan penyimpanan oksigen, sintesis DNA, transpor elektron, dan metabolisme peroksida. UPEC mendapatkan zat besi dengan menghasilkan siderofor. Siderofor merupakan molekul yang memiliki afinitas tinggi terhadap *ferric* ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Terdapat 4 jenis siderofor pada *E. coli* yaitu *yersiniabactin*, *aerobactin*, *enterobactin*, dan *salmochelin* (Parvez *et al.*, 2018). Pada UPEC, *aerobactin* dan *yernisiabactin* berperan penting dalam menyebabkan ISK. *Aerobaction* dieskpresikan dalam kadar yang tinggi, stabil pada pH yang rendah, dan mampu mengikat zat besi dalam jumlah yang lebih tinggi daripada *yernisiabactin*. Sedangkan *yernisiabactin* berperan dalam pembentukan biofilm dan sebagai pelindung terhadap *copper stress* yang dapat mematikan bakteri (Flores-Mireles *et al.*, 2015).

g. *Protektin*

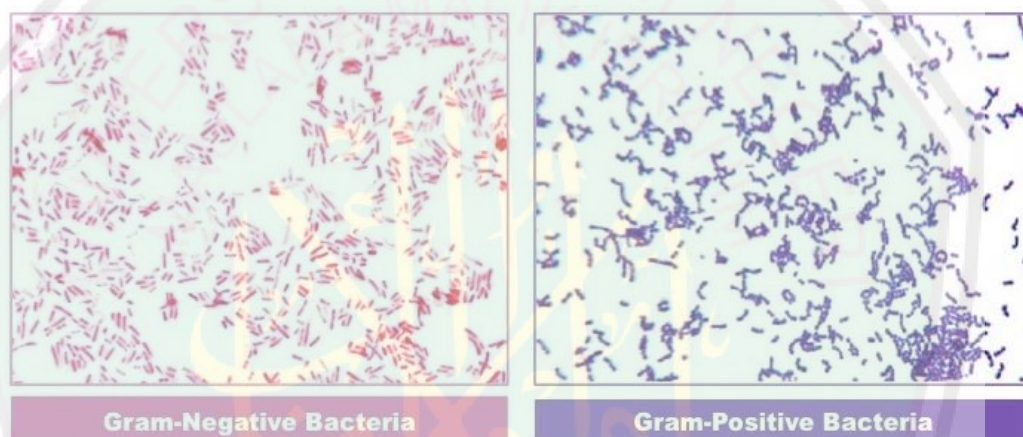
UPEC menghasilkan protein *outer membrane* seperti *traT* dan *Iss* untuk menghindari sistem imun. Protektin yang dimiliki *E. coli* diantaranya adalah *Outer membrane protease T* (OmpT) dan *Uropathogenic specific protein* (Usp) (Kudinha *et al.*, 2017).

## 2.1.5 Identifikasi *Escherichia coli*

### 2.1.5.1 Mikroskopis

Identifikasi bakteri secara mikroskopis dilakukan dengan pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram bertujuan untuk mengidentifikasi bentuk, ukuran, dan susunan bakteri. Pewarnaan Gram pada bakteri *E. coli* menunjukkan bahwa bakteri

tersebut berwarna merah dan berbentuk batang pendek. Bakteri Gram negatif memiliki lapisan peptidoglikan yang lebih tipis sehingga pada saat diberi *decolorization agent* (alkohol), kompleks kristal violet mudah terlepas dari ikatannya dan bakteri akan kehilangan warna. Bakteri tersebut akan menyerap pewarna lain seperti safranin sehingga akan terlihat berwarna kemerahan atau pink. Sedangkan pada bakteri Gram positif, sel akan tampak berwarna ungu. Bakteri Gram positif memiliki lapisan peptidoglikan yang lebih tebal sehingga mampu untuk mempertahankan pewarna kristal violet (Post dan Songer, 2005).



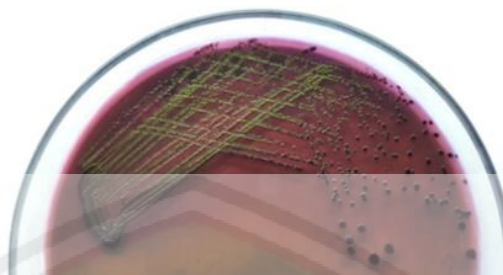
**Gambar 2.3** Hasil Pewarnaan Gram. Bakteri Gram negatif (kiri) terlihat berwarna kemerahan. Bakteri Gram positif (kanan) terlihat berwarna keunguan.

Sumber: [www.medicalabscientist.org](http://www.medicalabscientist.org)

#### 2.1.5.2 Biakan pada Medium Diferensial

Medium diferensial adalah medium yang menyebabkan suatu koloni dari jenis organisme tertentu memberikan suatu tampilan yang khas. Medium diferensial seperti agar MacConkey, agar *Eosin Methylene Blue* (EMB), agar *Desoxycholate* merupakan medium yang mengandung zat pewarna khusus dan karbohidrat. Medium tersebut digunakan untuk membedakan antara koloni yang memfermentasi laktosa (berwarna) dengan yang tidak memfermentasi laktosa

(tidak berwarna). Pada agar EMB, *E. coli* menunjukkan morfologi koloni yang tampak seperti tetesan tinta atau *metallic sheen* (Jawetz *et al.*, 2004).



**Gambar 2.4** Koloni *E. coli* pada medium agar EMB terlihat seperti tetesan tinta atau *metallic sheen*

Sumber: Antony, *et al.*, 2016

#### 2.1.5.3 Uji Biokimia

Beberapa jenis uji biokimia untuk mengidentifikasi *E. coli* diantaranya yaitu uji IMViC (*Indole, Methyl Red, Voges-Proskauer, Citrate*), uji *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), uji urease, uji katalase, dan uji oksidase. Uji IMViC bertujuan untuk membedakan *E. coli* dengan bakteri lain pada Famili *Enterobacteriaceae* dan bakteri Gram negatif lainnya. Uji *Indole* digunakan untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam menggunakan sitrat sebagai sumber karbon. Uji *Methyl Red* untuk mengetahui kemampuan organisme dalam menghasilkan asam dari fermentasi glukosa, sedangkan uji *Voges Proskauer* untuk organisme yang mampu memfermentasikan glukosa, tetapi dengan cepat mengubah produk asam menjadi asetil dan 2,3-butadienol. Medium *Sulfid Indol Motility* (SIM) merupakan medium untuk mengetahui kemampuan mereduksi sulfur, menghasilkan *indole* dari triptofan, dan motilitas. Organisme motil dapat bergerak di sekitar medium semisolid dan dapat dideteksi dari pola pertumbuhan bakteri tersebut (Leboffe dan Pierre, 2012).

*Triple Sugar Iron Agar* (TSIA) merupakan medium diperkaya untuk membedakan bakteri berdasarkan kemampuan memfermentasi glukosa, laktosa, sukrosa, dan mereduksi sulfur. Medium ini dapat membedakan antibakteri dalam Famili *Enterobacteriaceae* dan bakteri Gram negatif lainnya. Uji urease digunakan untuk membedakan bakteri berdasarkan kemampuannya dalam menghidrolisis urea dengan enzim urease. Uji katalase untuk mengetahui organisme yang menghasilkan enzim katalase, sedangkan uji oksidase untuk mengetahui organisme yang memiliki *respiratory enzyme cytochrome c oksidase* (Leboffe dan Pierre, 2012).

Jenis uji biokimia lain yang dapat digunakan adalah *microbact*. *Microbact* merupakan suatu mikrosistem untuk mengidentifikasi isolat klinis *Enterobacteriaceae* dan basil Gram negatif. Identifikasi tersebut menggunakan dasar perubahan pH pada berbagai substrat yang berbeda. Terdapat dua jenis strip substrat yaitu 12A dan 12B. Masing-masing strip terdiri dari 12 biokimia yang berbeda. Strip 12A untuk mengidentifikasi bakteri oksidase negatif dan nitrit positif fermenter glukosa. Sedangkan strip 12B digunakan untuk bakteri oksidase positif dan nitrat negatif non-fermenter glukosa (O'hara, 2005).

## 2.2 Biofilm

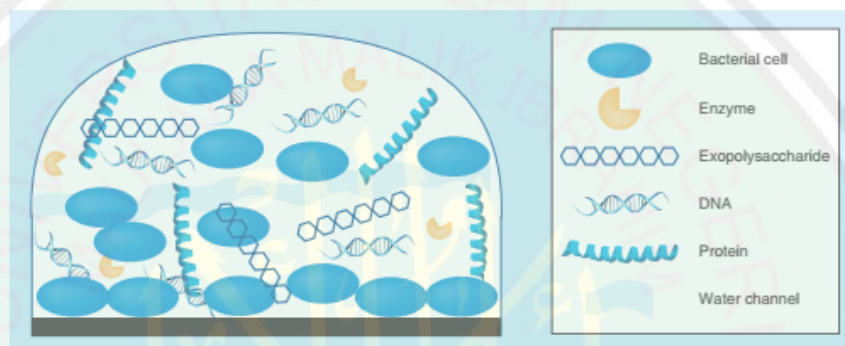
### 2.2.1 Definisi Biofilm

Biofilm merupakan agregat mikroorganisme (bakteri, jamur, alga, atau protozoa) yang tertutup dalam matriks polimer ekstraseluler yang diproduksi oleh mikroorganisme tersebut. Bakteri dalam biofilm dapat terlindung dari berbagai gangguan seperti pengeringan, bakteriofag, amoeba, dan biosida yang digunakan dalam industri (Vogeleer *et al.*, 2014). Selain itu sel di dalam biofilm cenderung

lebih resisten terhadap antibiotik dibanding sel dalam bentuk planktonik. Biofilm juga dapat terbentuk pada alat-alat medis seperti kateter urin. Maka dari itu biofilm menjadi salah satu masalah besar pada kesehatan (Subashchandrabose *et al.*, 2015).

### 2.2.2 Struktur Pembentuk Biofilm

Struktur pembentuk biofilm terdiri dari sel mikroba, DNA dan RNA, polisakarida, protein, dan air (Jamal *et al.*, 2015; Rabin *et al.*, 2015).



**Gambar 2.5** Struktur pembentuk biofilm. Biofilm tersusun dari sel bakteri, enzim, eksopolisakarida, DNA, protein, saluran air  
Sumber: Rabin *et al.*, 2015

### 2.2.3 Mekanisme Pembentukan Biofilm

Biofilm dapat terbentuk pada permukaan abiotik maupun biotik. Permukaan abiotik diantaranya adalah baja, kaca, plastik, implan medis, stainless steel. Sedangkan permukaan biotik seperti sel epitel, kulit manusia, dan jaringan binatang (Sharma *et al.*, 2016). Tahap awal dari pembentukan biofilm pada permukaan abiotik adalah adanya gaya elektrostatis antara substratum dan permukaan bakteri yang diperantarai oleh adanya adhesin. Sedangkan perlekatan bakteri pada permukaan biotik sebagian besar diperantarai oleh interaksi protein bakteri dengan protein ekstraseluler atau karbohidrat pada permukaan sel/jaringan

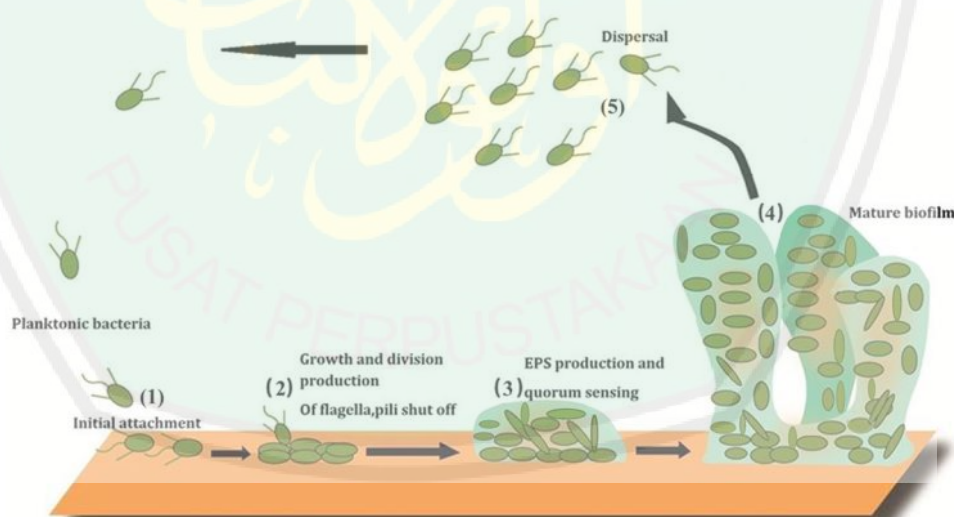
dan bergantung pada hidrofobisitas dari membran sel tersebut (Kumar *et al.*, 2017).

Pada fase awal perlekatan, bakteri melakukan agregasi secara longgar dan saling berinteraksi melalui interaksi yang lemah (*gaya van der Waals*) sehingga dapat berpisah dan kembali pada bentuk planktonik (reversibel). Interaksi antar bakteri dapat terjadi dalam spesies yang sama maupun spesies berbeda. Selanjutnya akan terjadi interaksi hidrofilik atau hidrofobik yang diperantarai oleh adhesi spesifik antara organel perlekatan (flagela, fimbria, lipopolisakarida, atau protein adhesif) dengan permukaan. Interaksi tersebut menyebabkan perlekatan yang ireversibel bakteri pada permukaan. Selanjutnya bakteri akan mengalami perubahan genotip maupun fenotip untuk memastikan perkembangan dan maturasi biofilm (Gupta *et al.*, 2015).

Ketika perlekatan telah bersifat ireversibel maka akan terjadi pembentukan mikro-koloni. Perubahan bakteri dari sel tunggal menjadi mikro-koloni tersebut memerlukan sebuah komunikasi untuk mengoordinasikan pertumbuhan. Komunikasi ini dilakukan dengan sistem quorum sensing yaitu komunikasi melalui sinyal peptida dan molekul seperti *competence stimulating peptide*, *3,5-cyclic diguanylic acid* (c-di-GMP), farnesol, rhamnolipid, modulin yang larut dalam fenol, dan lain sebagainya (Kumar *et al.*, 2017). Ketika intensitas sinyal tersebut telah mencapai level threshold, mekanisme genetik yang mendasari produksi eksopolisakarida akan teraktivasi. Bakteri akan mulai memproduksi matriks *extracellular polysaccharide* (EPS) hingga membentuk mikro koloni. Mikro koloni selanjutnya akan berkembang menjadi makro koloni yang telah

memiliki *fluid-filled channel* sebagai saluran pertukaran produk buangan dalam biofilm (Gupta *et al.*, 2015).

Mikro koloni akan semakin berkembang dan mengalami maturasi. Maturasi tersebut dipengaruhi oleh pH, oksigen, sumber karbon, osmolaritas, suhu, konsentrasi elektrolit, dan tipe permukaan. Maturasi ditandai dengan meningkatnya kepadatan dan kompleksitas biofilm. Ketika biofilm telah mencapai titik kritis dan keseimbangan dinamik, maka persediaan nutrisi dan pH akan semakin menurun, serta akumulasi  $pO_2$  atau toksik metabolik. Hal tersebut memicu terjadinya dispersi biofilm. Pada tahap ini bakteri akan berhenti mengode gen ekspopolisakarida atau fimbria dan secara simultan meningkatkan regulasi gen pengode protein kemotaktik dan flagela yang dibutuhkan untuk kehidupan sel planktonik. Selanjutnya bakteri akan kembali ke bentuk planktonik dan terlepas dari biofilm (Kumar *et al.*, 2017).



**Gambar 2.6** Tahap pembentukan biofilm. 1) Perlekatan awal, 2) Pertumbuhan dan ekspresi faktor perlekatan, 3) Produksi EPS dan proses quorum sensing, 4) Maturasi biofilm, 5) Dispersi biofilm

Sumber: Sadekuzzaman *et al.*, 2015

#### 2.2.4 Pembentukan biofilm pada *Escherichia coli*

Pembentukan biofilm pada *E. coli* terjadi melalui empat tahapan utama yaitu perlekatan awal (*early adherence*), perkembangan awal struktur biofilm, maturasi biofilm, dan dispersi.

a. Perlekatan awal (*early adherence*)

Biofilm *E. coli* dapat terbentuk apabila terdapat lingkungan yang mendukung, yaitu tersedianya nutrisi yang sesuai. Pertumbuhan juga bergantung pada suhu, pH dan gaya ion medium. Flagel sebagai organel motilitas pada *E. coli* dapat membantu untuk mengatasi gaya ion medium sehingga interaksi antara *E. coli* dan permukaan dapat ditingkatkan (Sharma *et al.*, 2016). Pada tahap perlekatan awal, bakteri saling melekat secara reversibel dan dapat kembali ke bentuk planktonik.

b. Perlekatan ireversibel

Organel perlekatan seperti fimbria tipe 1 dan fimbria curli berperan dalam perlekatan ireversibel *E. coli* pada permukaan. Fimbria tipe 1 pada *E. coli*, dikode oleh gen *fim*, berperan untuk perlekatan awal pada permukaan. Fimbria curli, dikode oleh gen *csg*, akan meningkatkan interaksi antar sel dan memfasilitasi komunikasi antar sel. Perlekatan *E. coli* pada permukaan akan merubah bentuk sel bakteri dari bentuk planktonik menjadi bentuk sesil. Perubahan tersebut diperantarai oleh beberapa molekul kecil seperti *cyclic-diguanylic acid* (c-di-GMP) (Sharma *et al.*, 2016).

c. Maturasi biofilm

Maturasi biofilm diperantarai oleh adanya autotransporter untuk interaksi antarsel dan ekspopolisakarida (EPS) untuk pembentukan matriks. Matriks

tersebut akan menyebabkan struktur biofilm menjadi tiga dimensi. EPS utama pada biofilm *E. coli* yaitu  $\beta$ -1,6-*N*-acetyl-*D*-glucosamine polymer (PGA), selulosa dan asam kolanik. PGA memediasi adhesi antar sel dan perlekatan pada permukaan serta menyediakan adhesin untuk menstabilkan biofilm *E. coli*. Selulosa menyebabkan biofilm menjadi kaku. Asam kolanik membentuk kapsul di sekitar sel bakteri dan melindunginya dari kondisi lingkungan spesifik. Kandungan lain dari EPS adalah lipopolisakarida (antigen LPS O) dan polisakarida kapsular (antigen LPS K). Quorum sensing (QS) digunakan bakteri untuk berkomunikasi dan berkoordinasi antar sesama spesies bakteri. QS juga membantu mengontrol ekspresi gen saat maturasi biofilm (Sharma *et al.*, 2016). Biofilm yang telah matang sempurna akan memiliki struktur tiga dimensi, dengan beberapa saluran kecil sebagai jalur transportasi nutrisi, air, dan zat sisa. Bagian atas biofilm terdapat lubang kecil untuk menyediakan perlindungan untuk bakteri planktonik (Roy *et al.*, 2018).

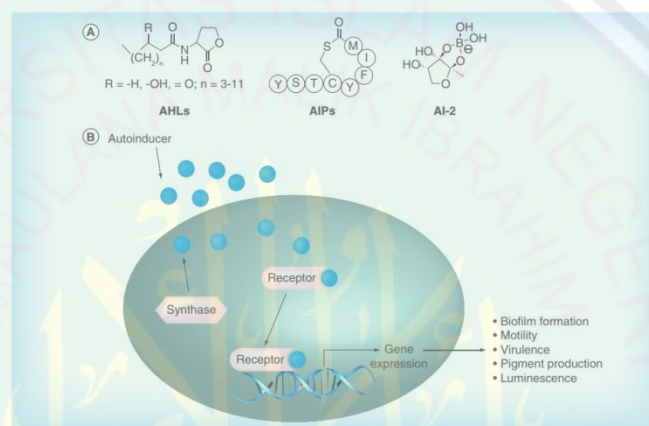
d. Dispersi

Tahap terakhir adalah dispersi atau pelepasan bakteri dari biofilm yang sudah matur sehingga bentuk bakteri akan kembali menjadi planktonik. Dispersi terjadi akibat adanya degradasi enzimatis dari matriks biofilm dan QS, sebagai respon terhadap perubahan lingkungan yang berkaitan dengan level nutrisi dan depleksi oksigen (Sharma *et al.*, 2016).

### 2.2.5 Quorum sensing

Komunikasi antarsel berperan penting dalam proses pembentukan biofilm. Sel bakteri berkomunikasi melalui sistem quorum sensing (QS). Dalam proses

tersebut sel bakteri menyekresi suatu molekul sinyal ekstraselular yaitu *autoinducer* (AI) untuk mengatur proses biologis pada sel bakteri. Ketika konsentrasi sinyal kimia mencapai *threshold level*, sinyal tersebut akan dikenali oleh reseptor yang terdapat pada membran sel atau sitoplasma yang kemudian mengaktifkan ekspresi gen tertentu sesuai target sinyal tersebut (Toyofuku *et al.*, 2015). QS dapat mengatur produksi faktor virulensi, bioluminesen, pembentukan biofilm, dan resistensi antibiotik (Lixa *et al.*, 2015).



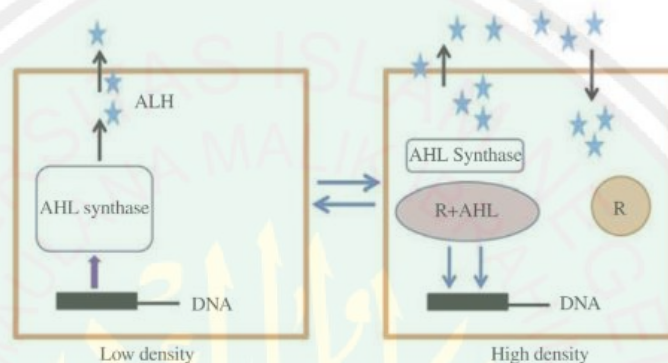
**Gambar 2.7** Quorum sensing. **(A)** Autoinducer utama pada quorum sensing, yaitu AHL, AIP, dan AI-2. **(B)** Jalur quorum sensing. *Autoinducer* ekstrasel dan intrasel (disintesis oleh enzim *synthase*) akan berikatan pada reseptornya. Ikatan tersebut akan mengaktifkan ekspresi gen tertentu yang mengatur berbagai fungsi biologis sel, diantaranya pembentukan biofilm, motilitas, virulensi, produksi pigmen, dan luminesensi.

Sumber: Rabin *et al.*, 2015

Bakteri Gram positif dan Gram negatif memiliki molekul sinyal yang berbeda. Molekul sinyal pada bakteri gram positif berupa peptida yang disebut *autoinducing peptides* (AIP) dan *actinomycete produce A-factor*. Sedangkan bakteri Gram negatif menghasilkan *acyl-homoserine lactone* (AHL) dan turunan *S-adenosyl methionine* (SAM) seperti *autoinducer-2* (AI-2) (Toyofuku *et al.*, 2015). Karakteristik QS pada bakteri Gram negatif yaitu (Ng dan Bassler, 2009):

- a. *Autoinducer*, seperti AHL dan molekul lain yang disintesis dari SAM, mampu berdifusi secara bebas melalui membran sel bakteri.

- b. *Autoinducer* terikat pada reseptor spesifik pada membran dalam maupun sitoplasma.
- c. Quorum sensing mampu mengubah ratusan sampai ribuan gen yang mengatur proses biologis bakteri.
- d. Pada proses autoinduksi, sintesis *autoinducer* akan meningkat dan akan memicu ekspresi gen sinkronisasi pada kelompok bakteri.



**Gambar 2.8** Quorum sensing pada bakteri Gram negatif. Bakteri menghasilkan *autoinducer*, AHL, melalui AHL-synthase. Pada konsentrasi rendah, molekul AHL dari ekstrasel masuk ke dalam sitoplasma melalui *ATP-dependent transport*. Sedangkan pada konsentrasi tinggi, molekul AHL dapat berdifusi pasif masuk ke dalam sel. Ketika konsentrasi AHL mencapai ambang batas (*Quorum state*), molekul AHL akan berinteraksi dengan protein regulator R, yang dikenal sebagai regulator transkripsi. Kompleks R-AHL kemudian akan berikatan dengan promotor pada gen target dan memulai proses transkripsi.

Sumber: Bouyahya *et al.*, 2017

#### 2.2.5.1 Quorum sensing pada *Escherichia coli*

AI-2 merupakan molekul sinyal QS yang disintesis oleh *LuxS*. Sebagai molekul sinyal komunikasi, AI-2 dikeluarkan dari sel oleh transporter sinyal quorum sensing *TqsA* dan akan dimasukkan dalam sel oleh *lsr operon-encoded system*. Kemudian AI-2 akan mengontrol berbagai gen dalam sel bakteri. Pada *E. coli*, AI-2 digunakan untuk berkomunikasi interspesies maupun intraspesies dan secara langsung memicu pembentukan biofilm. AI-2 akan menstimulasi ekspresi gen *mqsR* pada *E. coli*. Gen *mqsR* berperan pada ekspresi gen flagel, biosintesis,

dan fungsi motoris, sehingga dapat memperantarai perlekatan pada permukaan dan motilitas bakteri (Silva *et al.*, 2017; Wood *et al.*, 2009).

Sinyal interspesies lain adalah *acylhomoserine lactone* (AHL). Pada *E. coli*, AHL dari spesies bakteri lain dapat terdeteksi melalui *SdiA*, sehingga *E. coli* dapat mendeteksi sinyal yang tidak dihasilkannya. *E. coli* menghasilkan sinyal lain yaitu *indole*, sebagai sinyal komunikasi intraspesies yang memiliki mekanisme kerja berlawanan dengan AI-2. *Indole* merupakan sinyal yang menghambat pembentukan biofilm *E. coli*. *Indole* menurunkan pembentukan biofilm *E. coli* dengan cara mengurangi motilitas, menekan gen resisten asam, mengurangi kemotaksis, dan mengurangi perlekatan pada sel epitel. *E. coli* cenderung menggunakan sinyal utama *indole* saat berada di luar tubuh pejamu dan sinyal AI-2 saat berada di dalam tubuh pejamu (Wood *et al.*, 2009).

#### **2.2.6 Resistensi Biofilm terhadap Antibiotik**

Bakteri di dalam biofilm cenderung resisten terhadap antibiotik di bandingkan bakteri dalam bentuk planktonik. Resistensi ini diperantarai oleh adanya matriks EPS yang menyebabkan penetrasi antibiotik ke dalam biofilm menjadi lebih sulit. Beberapa bakteri dapat melakukan mutasi genetik secara acak pada plasmid. Plasmid tersebut dapat dipindahkan ke sel bakteri lain dengan mudah melalui transfer gen horizontal. Pada biofilm, frekuensi transfer gen horizontal terjadi lebih tinggi di banding pada sel planktonik. Keterbatasan oksigen dan nutrisi di dalam biofilm, terutama pada lapisan terdalam dapat menyebabkan laju metabolisme, pertumbuhan, dan pembelahan sel lebih lambat. Hal ini menyebabkan bakteri lebih tidak sensitif terhadap antibiotik yang menargetkan pembelahan sel. Antibiotik juga tidak dapat mempengaruhi sel persister, yaitu

subpopulasi sel dengan laju pertumbuhan nol atau sangat lambat. Sel bakteri juga dapat mengeluarkan toksin, termasuk antibiotik, keluar dari sel melalui *efflux pump* (Rabin *et al.*, 2015).

## 2.2.7 Uji Pembentukan Biofilm

### 2.2.7.1 Metode Tabung

Metode tabung merupakan metode kualitatif untuk mendeteksi biofilm yang dilakukan dengan cara mengamati garis biofilm yang terbentuk pada bagian dasar dan dinding tabung. Pembentukan biofilm positif apabila terlihat garis pada dinding tabung dan di dasar tabung. Jumlah biofilm yang terbentuk dinilai dengan angka 1 apabila lemah/tidak terbentuk biofilm, 2 apabila sedang, dan 3 apabila kuat/tinggi (Kirmusaoglu, 2019).



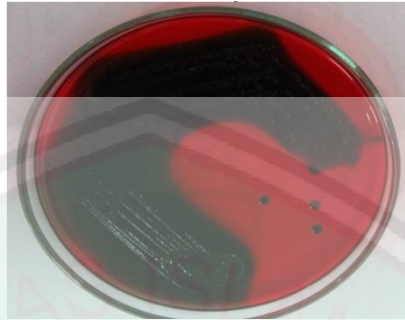
**Gambar 2.9** Metode Tabung. Tabung paling kiri menunjukkan *strong-biofilm producer*, tabung tengah menunjukkan *weak-biofilm producer*, tabung paling kanan menunjukkan *non-biofilm producer*

Sumber: Ruchi *et al.*, 2015

### 2.2.7.2 Metode Congo Red Agar

Metode *Congo Red Agar* (CRA) termasuk metode deteksi biofilm secara kualitatif dengan cara mengamati perubahan warna pada koloni bakteri. Medium CRA terdiri dari *brain heart infusion broth* 37 g/L, sukrosa 50 g/L, agar nomor 1 10 g/L, dan indikator *Congo Red* 8 g/L. Bakteri diinokulasikan pada *plate* CRA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dalam keadaan aerob. Koloni

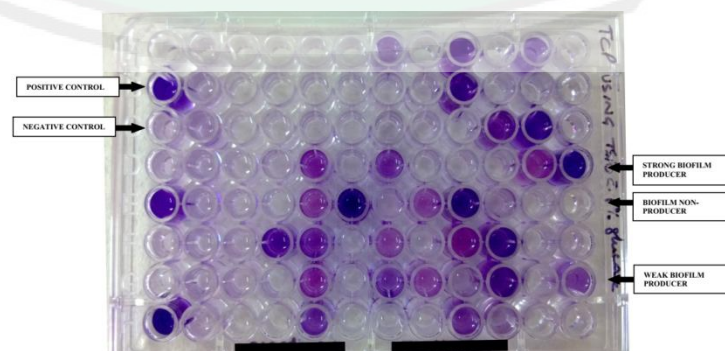
pembentuk biofilm ditandai dengan koloni berwarna hitam dengan konsistensi kristal kering. Sedangkan koloni bukan penghasil biofilm ditandai dengan warna pink atau merah (Kirmusaoglu, 2019).



**Gambar 2.10** Metode *Congo Red Agar*. Terlihat koloni berwarna hitam yang menandakan bakteri mampu membentuk biofilm.  
Sumber: Ruchi *et al.*, 2015

### 2.2.7.3 Metode *Microtiter plate* (MtP)

Metode *microtiter plate* termasuk metode kuantitatif yang merupakan baku emas dalam deteksi biofilm. Biofilm yang terbentuk diukur melalui *microplate reader* (microELISA). Metode ini dapat digunakan untuk skrining aktivitas agen antibiofilm terhadap biofilm yang dihasilkan oleh bakteri. Kontrol negatif yang berisi media digunakan sebagai blank. Nilai OD blank digunakan untuk mengidentifikasi apakah isolat menghasilkan biofilm. apabila nilai OD isolat lebih tinggi daripada nilai OD blank, maka isolat digolongkan sebagai bakteri pembentuk biofilm (Kirmusaoglu, 2019).



**Gambar 2.11** Metode *Tissue Culture Plate*  
Sumber: Ruchi *et al.*, 2015

Interpretasi hasil OD terhadap produksi biofilm sesuai tabel 2.1 berikut.

**Tabel 2.1** Interpretasi kekuatan bakteri pembentuk biofilm

| Rata-rata nilai OD                           | Kekuatan penghasil biofilm        |
|----------------------------------------------|-----------------------------------|
| $OD_{isolat} \leq OD_{cut}$                  | <i>Non-biofilm producer</i>       |
| $OD_{cut} < OD_{isolat} \leq 2x OD_{cut}$    | <i>Weak-biofilm producer</i>      |
| $2x OD_{cut} < OD_{isolat} \leq 4x OD_{cut}$ | <i>Moderate- biofilm producer</i> |
| $4x OD_{cut} < OD_{isolat}$                  | <i>Strong- biofilm producer</i>   |

$OD_{cut}$  = *Optical Density Cut-off value* = rata-rata OD kontrol negatif + 3x standar deviasi (SD) kontrol negatif

Sumber: Ramadan *et al.*, 2017

#### 2.2.7.4 PCR

Metode PCR dapat dilakukan dengan *real-time* PCR, *conventional* PCR, atau *multiplex* PCR. Metode ini dapat mendeteksi apakah pada bakteri uji mengekspresikan *biofilm-associated gene* (Kirmusaoglu, 2019).

### 2.3 Infeksi Saluran Kemih (ISK)

#### 2.3.1 Definisi ISK

Infeksi saluran kemih (ISK) adalah infeksi yang terjadi pada saluran kemih, yaitu uretra, kandung kemih, ureter, dan ginjal (Sari *et al.*, 2015). ISK dapat diklasifikasikan berdasar lokasi infeksi yaitu sistitis (kandung kemih), pyelonefritis (ginjal), dan bakteriuria (urin) (Bien *et al.*, 2012).

#### 2.3.2 Epidemiologi ISK

Berdasarkan data dari CDC, ISK termasuk infeksi bakteri tersering yang membutuhkan perawatan medis. Pada tahun 2007, kejadian ISK mencapai sekitar 8,6 juta kasus, 23% diantaranya terjadi di *Emergency Department* (CDC, 2011). *National Healthcare Safety Network* melaporkan bahwa ISK yang disebabkan oleh pemakaian kateter atau *Catheter-associated UTIs* (CAUTIs) merupakan tipe

ISK yang paling sering ditemui di tempat pelayanan kesehatan, yaitu dua pertiga dari seluruh kasus ISK (CDC, 2017).

Departemen Kesehatan Republik Indonesia (2016) melaporkan bahwa kejadian ISK di Indonesia sebanyak 90-100 kasus per 100.000 penduduk per tahun atau sekitar 180.000 kasus per tahun. Sedangkan di Jawa Timur jumlah kasus ISK adalah 3-4 kasus per 100.000 penduduk per tahun (Kemenkes RI, 2016). Sekitar 39%-60% kasus ISK terjadi karena infeksi nosokomial (Musdalipah, 2018). Angka kejadian ISK yang tinggi menyebabkan morbiditas dan mortalitas pada pasien semakin meningkat. *National Healthcare Safety Network* melaporkan bahwa angka kematian akibat ISK mencapai lebih dari 13.000 kasus (Sari *et al.*, 2015).

Prevalensi ISK pada laki-laki cenderung lebih rendah dari wanita. Pada laki-laki, ISK umumnya terjadi akibat abnormalitas struktur urologi atau faktor usia yang tua. Sedangkan pada wanita, dilaporkan sekitar 50% wanita dewasa pernah mengalami ISK sedikitnya sekali selama hidupnya (Singh *et al.*, 2018).

### 2.3.3 Etiologi ISK

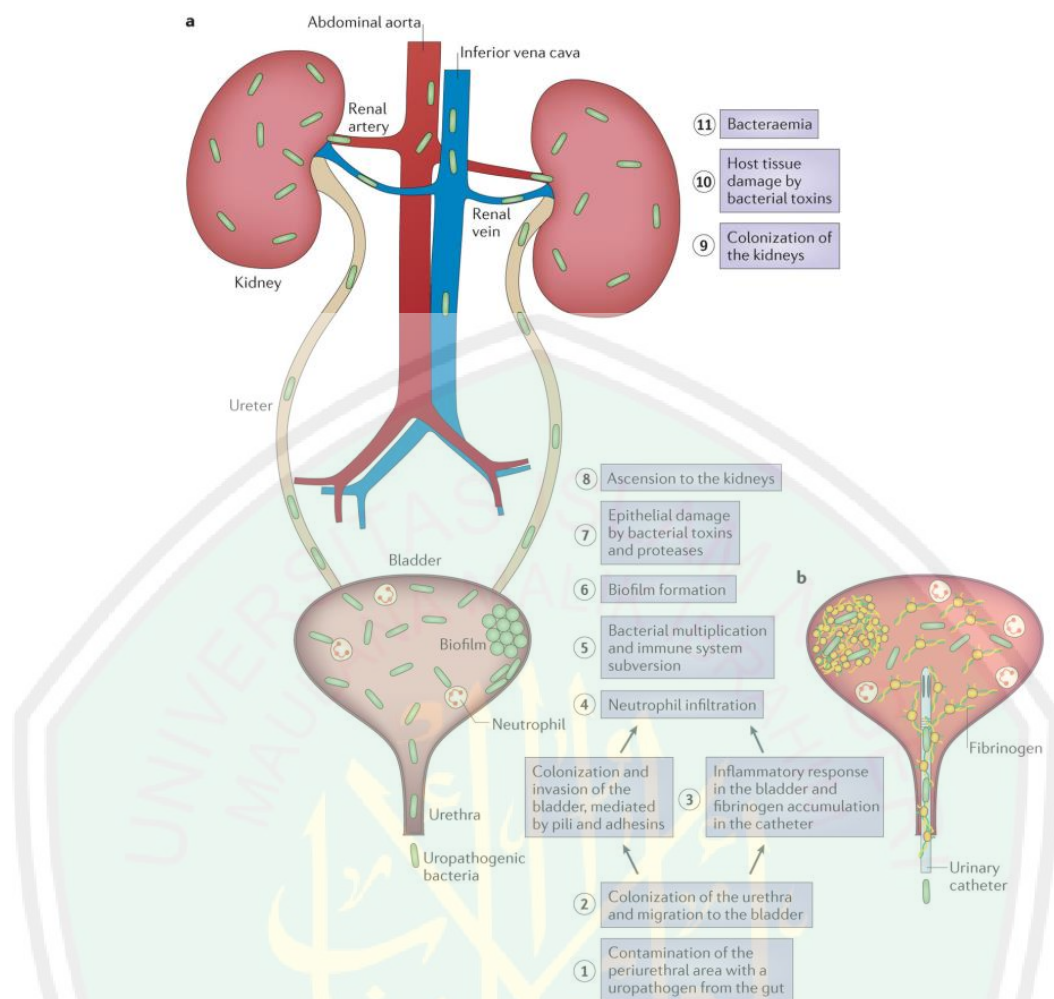
Sebagian besar ISK disebabkan oleh bakteri, meskipun beberapa jenis jamur dan virus juga mampu menyebabkan ISK. Patogen utama yang berperan adalah bakteri Gram negatif dari Famili *Enterobacteriaceae*, yaitu *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, dan *Proteus sp.* Sedangkan dari bakteri Gram positif diantaranya *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, dan *Streptococcus agalactiae*. Sekitar 80-90% dari semua kasus ISK disebabkan oleh *E. coli*, yaitu dari strain *uropathogenic E. coli* (UPEC) (Kudinha *et al.*, 2017).

#### 2.3.4 Faktor risiko ISK

Individu yang dirawat di rumah sakit atau pasien imunokompromais berisiko tinggi mengalami ISK (Cristea *et al.*, 2017). ISK dapat dipengaruhi oleh faktor penyakit seperti HIV, DM tipe 2, inkontinensia urine. Pada anak-anak, faktor risiko ISK disebabkan oleh penggunaan popok dalam waktu yang lama, kebiasaan *hygiene* yang kurang baik dan belum melakukan sirkumsisi (Irawan dan Mulyana, 2018). Pasien wanita, anak-anak, memakai kateter urine atau memiliki penyakit neurologis cenderung berisiko mengalami CAUTI (Letica-Kriegel *et al.*, 2018).

#### 2.3.5 Patogenesis ISK

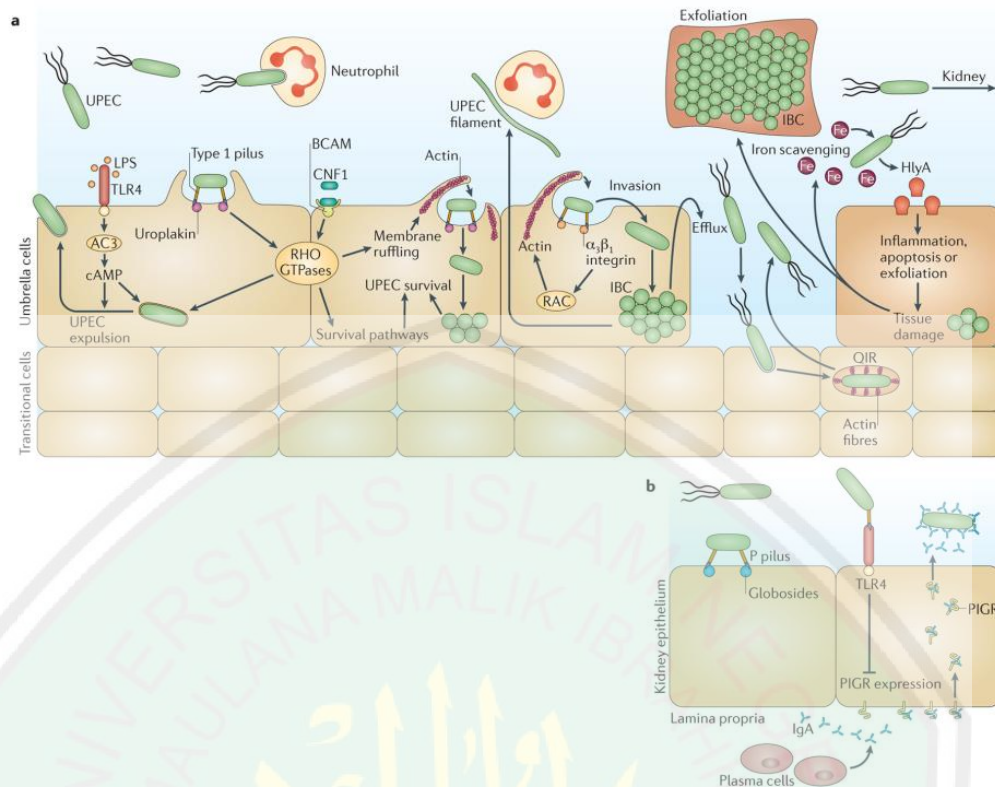
ISK non-komplikata terjadi ketika uropatogen yang berasal dari saluran pencernaan mengontaminasi area periuretra dan uretra, kemudian bermigrasi ke kandung kemih. Patogen utama pada ISK adalah *E. coli* dari strain UPEC. UPEC mampu berikatan secara langsung dengan sel payung (*superficial facet cells*), sel intermediet, dan sel basal pada uroepitel. Dalam kandung kemih, UPEC mengekspresikan pili tipe 1 untuk melakukan kolonisasi dan invasi. Adhesin pili tipe 1, *FimH*, berikatan dengan *mannosylated uroplakin* dan integrin yang merupakan reseptor UPEC di permukaan sel payung. Ikatan antara uroplakin dengan *FimH* akan menginduksi pembentukan aktin dan internalisasi bakteri ke dalam sel. Interaksi antara  $\alpha_3\beta_1$  dan *FimH* menginduksi pembentukan aktin melalui aktivasi *RHO-family GTPase* dan terjadilah invasi bakteri (Flores-Mireles *et al.*, 2015).



**Gambar 2.12** (a) Patogenesis infeksi saluran kemih (b) Pembentukan biofilm pada kateter. 1) Kontaminasi UPEC pada area periuretra, 2) Kolonisasi UPEC pada uretra dan migrasi ke kandung kemih, 3) kolonisasi dan invasi kandung kemih, respon inflamasi pada kandung kemih dan akumulasi fibrinogen pada kateter, 4) Infiltrasi neutrofil, 5) Multiplikasi bakteri dan penghindaran sistem imun, 6) Pembentukan biofilm, 7) Kerusakan epitel melalui toksin dan protease, 8) Migrasi ke ginjal, 9) Kolonisasi pada ginjal, 10) Kerusakan sel pejamu oleh toksin, 11) Bakteremia

Sumber: Flores-Mireles *et al.*, 2015

UPEC dapat melakukan ekspulsi (keluar dari sel uroepitel) dengan melepaskan lipopolisakarida (LPS). LPS akan dikenali oleh *Toll-like receptor 4* (TLR4) yang diekspresikan oleh sel uroepitel. Ikatan antara LPS dengan TLR4 akan menstimulasi adenil siklase 3 (AC3) untuk menghasilkan siklik AMP sehingga terbentuk vesikel eksositosis UPEC melewati membran plasma apikal sel payung (Flores-Mireles *et al.*, 2015).



**Gambar 2.13 Patogenesis UPEC pada ISK. a)** Patogenesis UPEC pada kandung kemih. Pada kandung kemih, UPEC mengekspresikan pili tipe 1 yang berperan dalam kolonisasi, invasi, dan pertahanan. UPEC juga dapat menghindari sistem imun pejamu dengan cara masuk pada sitoplasma sel uroepitel dan membentuk IBC. IBC matur akan terdispersi sehingga memungkinkan terjadinya invasi pada sel pejamu lain. UPEC juga dapat mengubah morfologinya dari basil menjadi filamen yang bersifat lebih resistan terhadap neutrofil. UPEC dapat bertahan pada kandung kemih dengan menyekresi berbagai faktor seperti HlyA, siderofor, dan CNF1 yang dapat memfasilitasi masuknya nutrisi ke dalam sel bakteri. **b)** Patogenesis UPEC pada ginjal. Kolonisasi UPEC pada ginjal bergantung pada ekspresi P-pili yang akan berikatan dengan globoside-containing glycolipids. Adhesin pili P, PapG, dapat berinteraksi dengan TLR4 yang akan menurunkan ekspresi polimeric immunoglobulin receptor (PIGR) sehingga terjadi ketidakseimbangan transport IgA melewati epitel. Hal ini akan melindungi UPEC dari proses sel imun.

Sumber: Flores-Mireles *et al.*, 2015

Infeksi oleh UPEC akan memicu infiltrasi neutrofil. Namun UPEC dapat menghindari sistem imun pejamu dengan cara memasuki sitoplasma sel uroepitel, kemudian membentuk *intracellular bacterial communities* (IBC). Setelah IBC matang, bakteri akan terdispersi dan melakukan invasi pada sel pejamu lainnya untuk memulai siklus IBC kembali. Untuk menghindari sistem imun pejamu ketika berada di luar sel, UPEC mengubah morfologinya menjadi filamen.

Dengan berbentuk filamen, UPEC menjadi lebih resisten terhadap neutrofil daripada berbentuk basil. UPEC kemudian melakukan multiplikasi dan mulai membentuk biofilm (Flores-Mireles *et al.*, 2015).

UPEC mampu membentuk *quiescent intracellular reservoir* (QIR) yang terdiri dari 4-10 bakteri non-replikasi di dalam kompartemen yang terbungkus oleh *F-actin* sehingga mampu bertahan hingga beberapa bulan. UPEC juga mampu menyekresi beberapa faktor untuk mendapatkan nutrisi. *Toxin  $\alpha$ -hemolysin* (HlyA) dapat melisiskan sel pejamu melalui pembentukan lubang, sehingga zat besi akan keluar dan bakteri mendapatkan nutrisi. HlyA juga memicu eksfoliasi epitel sehingga UPEC dapat menyebar ke pejamu lain melalui aliran urin. Siderofor membantu bakteri mendapatkan zat besi untuk bertahan selama infeksi. *Cytotoxic necrotizing factor 1* (CNF1) berperan penting dalam remodeling sel pejamu dengan berikatan dengan reseptor *basal cell adhesion molecule* (BCAM) pada sel pejamu untuk menginduksi aktivasi *RHO GTPase* RAC1, RHOA, dan *cell division control 42* (CDC42). Hal tersebut menyebabkan terbentuknya aktin sitoskeletal dan gangguan pada membran sel. RAC1 yang teraktivasi juga memicu apoptosis sel pejamu, namun mencegah apoptosis sel pejamu tempat bakteri tersebut berkoloni (Flores-Mireles *et al.*, 2015).

Bakteri dapat bermigrasi secara *ascending* menuju ke ginjal. Bakteri yang berkoloni pada ginjal memproduksi toksin yang memicu kerusakan jaringan. Apabila patogen melewati *tubular epithelial barrier* pada ginjal, akan memicu terjadinya bakteremia. Pada orang yang menggunakan kateter urine, keadaan kandung kemih cenderung lemah. Hal tersebut memicu akumulasi fibrinogen pada

kateter, yang menyediakan lingkungan baik bagi perlekatan uropatogen yang mengekspresikan *fibrinogen-binding protein* (Flores-Mireles *et al.*, 2015).

## 2.4 Murbei Hitam (*Morus nigra*)

### 2.4.1 Taksonomi Murbei Hitam

Taksonomi murbei hitam adalah sebagai berikut (Hussain *et al.*, 2017).

|          |                                     |
|----------|-------------------------------------|
| Kingdom  | : <i>Plantae</i>                    |
| Divisi   | : <i>Magnoliophyta</i>              |
| Kelas    | : <i>Magnoliopsida-Dicotyledons</i> |
| Subkelas | : <i>Hamamelididae</i>              |
| Ordo     | : <i>Urticales</i>                  |
| Familia  | : <i>Moraceae</i>                   |
| Genus    | : <i>Morus</i>                      |
| Species  | : <i>Morus nigra</i>                |

### 2.4.2 Morfologi Murbei Hitam

*Morus nigra* atau yang dikenal sebagai murbei hitam dapat ditemukan hampir di seluruh dunia dengan berbagai kondisi suhu, iklim, topografi, dan tanah (Khrisna *et al.*, 2018). Murbei hitam merupakan tumbuhan asli China, namun telah menyebar ke berbagai negara termasuk Indonesia (Aulifa *et al.*, 2018). Tumbuhan murbei hitam dapat mencapai ketinggian 3-15 meter dengan struktur mahkota yang terentang, bulat, dan berkelompok. Cabang tumbuhan murbei lebih banyak dan lebih pendek daripada spesies murbei lainnya (Okatan *et al.*, 2018).

Tanaman murbei hitam dapat tumbuh mencapai 10 meter. Daun murbei hitam berbentuk seperti hati memanjang, berwarna hijau dengan permukaan yang

berbulu. Daunnya memiliki panjang 4,5-11,7 cm dan lebar 4,2-8,1 cm. Tepi daun murbei hitam adalah crenate, bergigi, dan berbulu (Arshad *et al.*, 2014).



**Gambar 2.14** Daun murbei hitam tampak berwarna hijau, berbentuk seperti hati memanjang, tepi bergerigi, dan permukaan berbulu  
Sumber: Arshad *et al.*, 2014

#### 2.4.3 Khasiat dan Kegunaan Daun Murbei Hitam

Murbei hitam merupakan tumbuhan multiguna dan memiliki nilai ekonomi yang potensial. Murbei hitam juga memiliki aktivitas farmakologis yang luas, diantaranya adalah sebagai antinosiseptif, antiinflamasi, antimikroba, antimelanogenik, antidiabetik, antiobesitas, antihiperlipidemia, dan antikanker. Di negara-negara Asia, daun murbei hitam dijadikan sebagai pakan ulat sutera (*Bombyx mori*) (Lim *et al.*, 2019). Selain itu daun murbei hitam juga digunakan untuk mengontrol kadar glukosa darah karena daunnya mengandung 1-deoxynojirimycin dan *inhibitor  $\alpha$ -glycosidase* (Hussain *et al.*, 2017).

#### 2.4.4 Kandungan Daun Murbei Hitam

Genus *Morus* termasuk diantaranya *Morus nigra* memiliki kandungan utama berupa senyawa turunan fenol (Ferlinahayati *et al.*, 2012). Daun murbei hitam mengandung flavonoid, tanin, monoterpenoid, quinone, steroid, alkaloid, dan triterpenoid (Aulifa *et al.*, 2018; Hussain *et al.*, 2017; Padilha *et al.*, 2010),

#### 2.4.5 Daun Murbei Hitam sebagai Antibakteri dan Antibiofilm

Metabolit sekunder tumbuhan dari polifenol memiliki efek biologis yang luas, diantaranya sebagai antibakteri dan antibiofilm. Aktivitas antibiofilm pada tumbuhan fenol adalah melalui efek destruktif terhadap bakteri, menekan pembentukan biofilm dengan mempengaruhi mekanisme quorum sensing atau sistem lain tanpa mempengaruhi pertumbuhan bakteri (Slobodnikovanikova *et al.*, 2016).

##### 2.4.5.1 Tanin

Tanin termasuk salah satu kandungan terbesar tumbuhan polifenol. Tanin merupakan senyawa polifenol larut air yang umumnya terdapat pada tumbuhan herbal. Tanin diklasifikasikan menjadi dua kategori yaitu terhidrolisis dan tidak terhidrolisis (terkondesasi) (Akiyama *et al.*, 2001). Tanin memiliki aktivitas sebagai antimikroba, antioksidan, antikarsinogenik, antimutagenik, dan antiadhesif (Kyaw *et al.*, 2011). Tanin dapat berikatan langsung dengan peptidoglikan pada dinding sel dan merusak integritasnya (Dong *et al.*, 2017). Sebagai senyawa antiadhesif, tanin dapat mengikat reseptor permukaan bakteri berupa protein adhesin, sehingga kemampuan bakteri untuk melekat menjadi menurun (Kining *et al.*, 2016). Tanin dapat menghambat pembentukan biofilm melalui efek bakteriostatik dengan merusak membran bakteri. Apabila sel bakteri berhasil melekat pada permukaan, tanin dapat mengganggu produksi EPS sehingga menghasilkan *matrix-deficient cell cluster*. Tanin juga dapat menghancurkan matriks EPS biofilm polimikrobial (Trentin *et al.*, 2013).

#### 2.4.5.2 Asam fenolat (Fenolik)

Asam fenolat memiliki satu asam karboksil fungsional dan terhidroksilasi turunan benzoikum (misalnya asam galat, *protocatechuic*, dan *p-hydroxybenzoicacids*) dan turunan asam sinamat (misalnya asam kafeat, *p-coumaric*, dan asam ferulat) (Borges *et al.*, 2013). Daun murbei dapat mengandung sepuluh jenis asam fenolat, yaitu asam galat, asam ferulat, asam klorogenik, asam protokatekuat, asam vanilat, asam p-kumarat, asam siringat, asam p-hidroksibenzoat, dan asam m-kumarat. Secara umum asam fenolat dapat menghambat sintesis fimbria dan menurunkan produksi EPS (Elshahat *et al.*, 2017). Asam galat dan asam ferulat dapat menyebabkan perubahan yang ireversibel pada sifat membran sel bakteri, meliputi muatan, permeabilitas intraseluler dan ekstraseluler, dan sifat fisikokimia. Perubahan ini terjadi melalui perubahan hidrofobisitas, penurunan muatan negatif permukaan, dan terjadinya ruptur lokal atau pembentukan pori dalam membran sel sehingga terjadi kebocoran konstituen esensial intraseluler (Borges *et al.*, 2013). Asam galat dan asam ferulat juga berpotensi untuk menghambat motilitas sel pada *E. coli* yang diperantarai oleh flagel bakteri, yaitu pergerakan berenang (*swimming*) dan berkerumun (*swarming*) sehingga akan menurunkan kemampuan bakteri untuk membentuk biofilm. Asam fenolat dapat menghambat sintesis fimbria dan menurunkan produksi EPS. Asam fenolat juga merupakan senyawa yang dapat mengganggu proses quorum sensing (Borges 2012).

#### 2.4.5.3 Steroid

Steroid memiliki kemampuan berinteraksi dengan membran sel yang bersifat permeabel terhadap senyawa lipofilik. Hal ini dapat menurunkan integritas

membran sel dan menyebabkan perubahan morfologi membran sel sehingga terjadi lisis sel (Ahmed, 2007).

#### 2.4.5.4 Terpenoid

Terpenoid merupakan kelompok hidrokarbon besar yang terdiri dari unit 5-karbon isoprene ( $C_5H_8$ ) sebagai pembentuk dasarnya. Senyawa ini disintesis melalui dua cara yaitu melalui jalur non-mevalonat (*methylerythritol phosphate*) dan jalur mevalonat dari prekursor asetil CoA. Terpenoid terbagi menjadi 8 kelas yaitu hemiterpenoid, monoterpenoid, sesquiterpenoid, diterpenoid, sesterpenoid, triterpenoid, tertrapenoid, dan politerpenoid. Kelas monoterpenoid, diterpenoid, dan triterpenoid menunjukkan potensi yang besar sebagai obat antibakteri (Mahizan *et al.*, 2019). Terpenoid memiliki beberapa bahan kimia yang berbeda fungsi, yaitu alkohol (sitral dan sitronelal), fenol (timol dan karvakrol), keton (karvon dan kamfor), eter (eukaliptol), dan hidrokarbon (simen, pinen, limonen, dan pelandren) (Guaimaraes *et al.*, 2019).

Terpenoid dan turunannya telah dibuktikan berpotensi sebagai agen antimikroba terhadap patogen resisten obat, termasuk bakteri dan jamur. Namun mekanisme kerja terpenoid belum sepenuhnya diketahui. Beberapa penelitian menyatakan bahwa terpenoid mampu menghambat dua proses penting dari mikroba, yaitu pengambilan oksigen dan fosforilasi oksidatif. Oksigen diperlukan mikroba aerob sebagai energi untuk pertumbuhannya. Konsentrasi oksigen yang rendah menyebabkan terbatasnya laju respirasi bakteri. Fosforilasi oksidatif berperan dalam respirasi seluler yang terjadi pada membran sitoplasma. Terpenoid menyebabkan perubahan pada respirasi seluler yang kemudian menyebabkan terjadinya *uncoupling* fosforilasi oksidatif pada mikroba (Mahizan *et al.*, 2019).

Beberapa mekanisme kerja terpenoid yang diperkirakan adalah menyebabkan kerusakan membran sel bakteri, memodulasi pompa efluks bakteri, menekan pertumbuhan biofilm atau menghambat beberapa faktor virulensi seperti enzim dan toksin. Karvakrol mampu menyebabkan kerusakan sub-lethal pada sel bakteri akibat perubahan komposisi asam lemak, namun beberapa penelitian lain menyebutkan bahwa karvakrol dan timol menyebabkan disintegrasi *outer membrane* dan gangguan pada membran sitoplasma bakteri Gram negatif. Terpenoid juga memiliki efek antiadhesif sel dan dapat menyebabkan stress kalsium pada sepanjang membrane sel bakteri (Lahiri, 2019). Terpenoid menunjukkan efek sinergisitas ketika dikombinasikan dengan antibiotik sebagai terapi (Mahizan *et al.*, 2019).

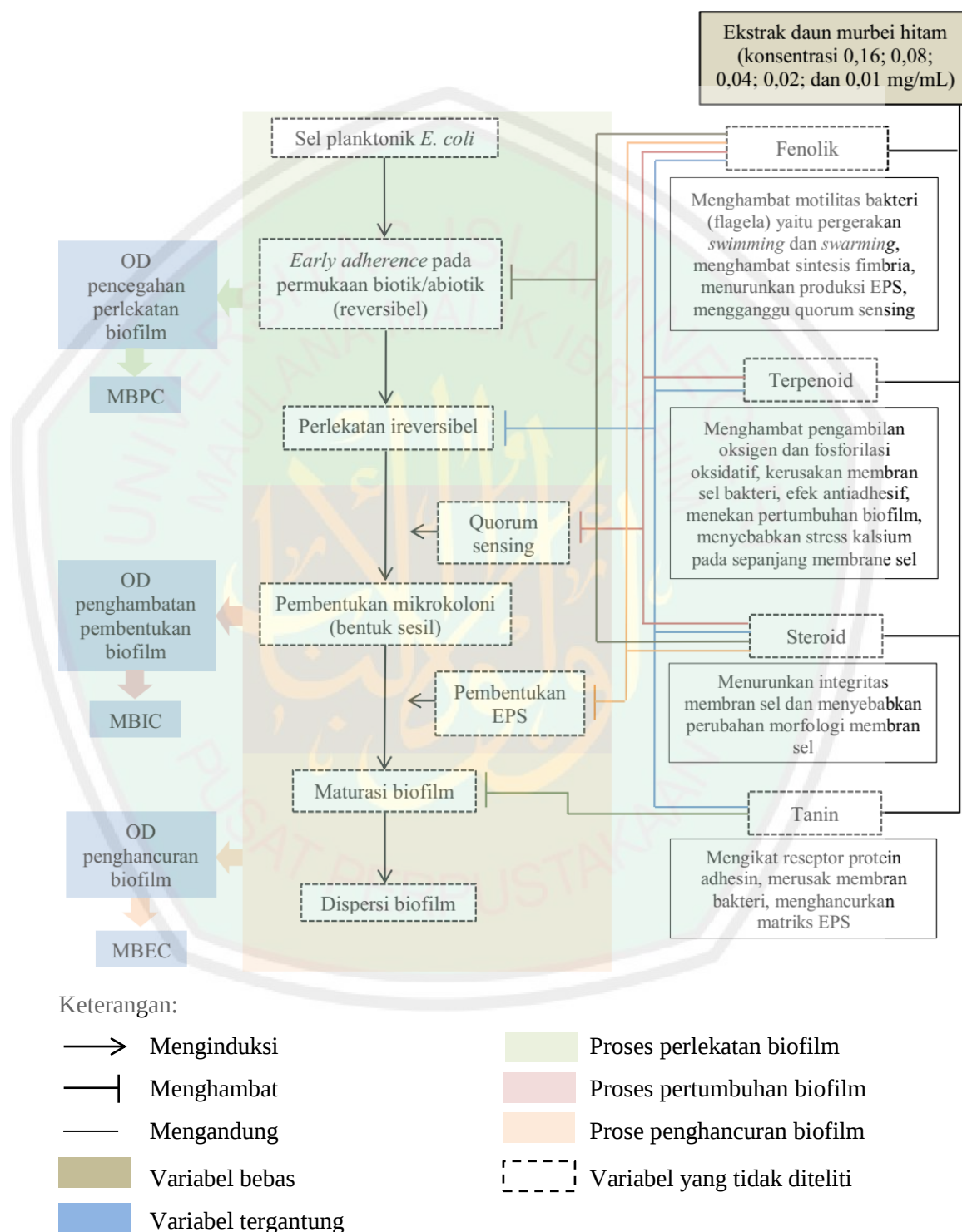
#### **2.4.6 Metode Ekstraksi Daun Murbei Hitam**

*Ultrasonic Assisted Extraction* (UAE) merupakan metode ekstraksi menggunakan gelombang ultrasonik, yaitu gelombang akustik yang memiliki frekuensi di atas pendengaran manusia yaitu 16-20 kHz (Handayani *et al.*, 2016). UAE termasuk metode ekstraksi yang efisien untuk mengekstrak senyawa bioaktif murbei. Keuntungan menggunakan metode ultrasonik yaitu berkurangnya waktu, energi dan jumlah pelarut yang diperlukan. Energi ultrasonik untuk ekstraksi juga mampu memfasilitasi pencampuran yang lebih efektif, transfer energi lebih cepat, menurunkan gradien suhu dan suhu ekstraksi, ekstraksi bersifat selektif, mengurangi ukuran bahan, kontrol proses ekstraksi lebih cepat, meningkatkan produktivitas, dan mengurangi langkah proses ekstraksi (Wen *et al.*, 2019).

## BAB III

## KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

## 3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Sel planktonik *E. coli* melakukan perlekatan awal (*early adherence*) ketika menemukan permukaan abiotik atau biotik yang sesuai. Pada tahap tersebut, sel planktonik *E. coli* yang melekat saling beragregasi secara longgar sehingga dapat terpisah dan kembali pada bentuk planktonik (reversibel). Ketika sel planktonik *E. coli* mengekspresikan organel perlekatan seperti pili tipe 1 dan protein curli, sel planktonik *E. coli* tersebut akan melekat pada permukaan secara ireversibel. Kumpulan sel *E. coli* yang telah melekat secara ireversibel akan melakukan komunikasi antarsel (quorum sensing) sehingga akan terjadi koordinasi pertumbuhan biofilm dan terbentuklah mikro-koloni.

Di dalam mikro-koloni sel planktonik *E. coli* berubah menjadi bentuk sesil. Sel di dalam biofilm mulai memproduksi matriks ekopolisakarida (EPS). Mikro-koloni tersebut akan berkembang hingga menjadi biofilm matur yang tampak seperti struktur tiga dimensi. Pada waktu tertentu ketika terjadi deplesi nutrisi dan oksigen atau keadaan lain yang tidak mendukung adanya biofilm, biofilm tersebut akan terdispersi. Dispersi menyebabkan sel *E. coli* kembali ke bentuk planktonik.

Ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra*) memiliki senyawa antibiofilm, diantaranya adalah fenolik, terpenoid, steroid, dan tanin. Senyawa fenolik yakni asam galat dan asam ferulat dapat menghambat motilitas sel pada *E. coli* yang diperantarai oleh flagel bakteri, yaitu pergerakan berenang (*swimming*) dan berkerumun (*swarming*) sehingga akan menurunkan kemampuan bakteri untuk membentuk biofilm. Asam fenolat juga dapat menghambat sintesis fimbria, menurunkan produksi EPS, dan dapat mengganggu proses quorum sensing. Terpenoid mampu menyebabkan kerusakan membran sel bakteri, memodulasi

pompa efluks bakteri, menekan pertumbuhan biofilm atau menghambat beberapa faktor virulensi seperti enzim dan toksin. Terpenoid juga memiliki efek antiadhesif pada sel dan dapat menyebabkan stress kalsium pada sepanjang membrane sel bakteri. Steroid memiliki kemampuan berinteraksi dengan membran sel yang bersifat permeabel terhadap senyawa lipofilik. Hal ini dapat menurunkan integritas membran sel dan menyebabkan perubahan morfologi membran sel sehingga terjadi lisis sel. Tanin berperan sebagai zat antiadhesif yang dapat menghambat perlekatan bakteri pada permukaan (*early adherence*). Tanin juga dapat merusak membran bakteri dan menghancurkan matriks EPS pada maturasi biofilm.

Adanya berbagai jenis senyawa antibiofilm pada ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra*) diharapkan ekstrak tersebut mampu mencegah perlekatan biofilm, menghambat pertumbuhan biofilm, menghancurkan biofilm bakteri *E. coli*. Hal tersebut dapat diketahui dengan mengukur *optical density* (OD) masing-masing uji dengan metode *microtiter plate biofilm assay*. Selanjutnya diukur konsentrasi minimal antibiofilm untuk uji pencegahan perlekatan biofilm (MBPC), uji penghambatan pertumbuhan biofilm (MBIC), dan uji penghancuran biofilm (MBEC).

### 3.2 Hipotesis Penelitian

Ho: Ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra*) tidak memiliki aktivitas antibiofilm terhadap biofilm *Escherichia coli*.

H<sub>1</sub>: Ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra*) memiliki aktivitas antibiofilm terhadap biofilm *Escherichia coli*.

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental murni (*trueexperimental design*) dengan pendekatan *posttest-only control grup design*. Uji aktivitas antibiofilm ekstrak daun murbei hitam dilakukan dengan metode *tissue culture plate/microtiter plate biofilm assay*. Metode ini dilakukan untuk memperoleh nilai *Optical Density* (OD) masing-masing uji yang diukur melalui *Microplate Reader*. Pada penelitian ini terdapat 8 kelompok yang terdiri dari 5 kelompok uji dan 3 kelompok kontrol.

#### 4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Ekstraksi daun *Morus nigra* dilakukan di laboratorium Fitokimia Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Maulana Malik Ibrahim Malang. Penelitian uji antibiofilm dilakukan di laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Maulana Malik Ibrahim Malang. Penelitian dilakukan selama rentang waktu Januari sampai Maret 2020.

#### 4.3 Populasi dan Sampel

Penelitian ini menggunakan populasi *Escherichia coli* pembentuk biofilm. Sampel yang digunakan adalah *Escherichia coli* pembentuk biofilm yang diisolasi dari pasien infeksi saluran kemih (ISK). Banyaknya pengulangan pada penelitian ini dihitung berdasarkan Rumus Federer, sebagai berikut:

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

Keterangan:

t = kelompok perlakuan

n = jumlah pengulangan tiap kelompok perlakuan

Pada penelitian ini terdapat 8 kelompok perlakuan yaitu, 5 kelompok uji (konsentrasi ekstrak daun murbei hitam 0,16 mg/mL, 0,08 mg/mL, 0,04 mg/mL, 0,02 mg/mL, dan 0,01 mg/mL), kelompok kontrol positif, kelompok kontrol negatif, dan kelompok kontrol media.

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

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

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

$$7n - 7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 3,14$$

Berdasarkan hasil perhitungan menggunakan rumus Federer, diperoleh jumlah pengulangan masing-masing kelompok perlakuan adalah sebanyak 3 kali.

#### 4.4 Variabel Penelitian

##### 4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dari penelitian ini adalah besarnya konsentrasi ekstrak etanol daun murbei hitam, yaitu konsentrasi 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 Tergantung

Variabel tergantung dari penelitian ini adalah OD pencegahan perlekatan biofilm *E. coli*, OD penghambatan pertumbuhan biofilm *E. coli*, OD

penghancuran biofilm *E. coli*, konsentrasi minimal pencegahan perlekatan biofilm *E. coli* (MBPC<sub>50</sub> dan MBPC<sub>90</sub>), konsentrasi minimal penghambatan pertumbuhan biofilm *E. coli* (MBIC<sub>50</sub> dan MBIC<sub>90</sub>), dan konsentrasi minimal penghancuran biofilm *E. coli* (MBEC<sub>50</sub> dan MBEC<sub>90</sub>).

#### 4.5 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

##### 4.5.1 Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Daun murbei hitam *Morus nigra* 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
- b. *Escherichia coli*
  - 1) *Escherichia coli* yang diisolasi dari pasien ISK.
  - 2) Koloni *Escherichia coli* yang berusia 24 jam.
  - 3) Koloni *Escherichia coli* yang berwarna merah dan berbentuk batang/basil pada uji pewarnaan gram.
  - 4) Koloni *Escherichia coli* yang membentuk koloni tumbuh seperti tetesan tinta atau *metallic sheen* pada media EMB dan yang membentuk koloni hitam pada media CRA setelah diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C.
  - 5) Koloni *Escherichia coli* yang menunjukkan hasil sesuai sifat-sifat bakteri tersebut pada uji biokimia.
  - 6) Koloni *Escherichia coli* yang mampu membentuk biofilm pada uji pertumbuhan biofilm dengan metode *microtiter plate biofilm assay*.

#### 4.5.2 Kriteria Eksklusi

Kriteria eksklusi dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Daun murbei hitam *Morus nigra* yang tidak berwarna hijau, terdapat hama tanaman, sudah layu, tidak dipetik 5-7 daun dari pucuk, dan tidak diperoleh dari kebun di daerah Wagir, Kab. Malang.
- b. *Escherichia coli*
  - 1) *Escherichia coli* yang tidak diisolasi dari pasien ISK.
  - 2) Koloni *Escherichia coli* yang berusia kurang dari/lebih dari 24 jam.
  - 3) Koloni *Escherichia coli* yang tidak berwarna merah dan tidak berbentuk batang/basil pada uji pewarnaan gram.
  - 4) Koloni *Escherichia coli* yang tidak membentuk koloni seperti tetesan tinta atau *metallic sheen* pada media EMB dan yang tidak membentuk koloni hitam pada media CRA setelah diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C.
  - 5) Koloni *Escherichia coli* yang tidak menunjukkan hasil sesuai sifat-sifat bakteri tersebut pada uji biokimia.
  - 7) Koloni *Escherichia coli* yang tidak dapat membentuk biofilm pada uji pertumbuhan biofilm dengan metode *microtiter plate biofilm assay*.

#### 4.6 Definisi Operasional

- a. *Escherichia coli*

*Escherichia coli* adalah bakteri Gram negatif, memiliki kemampuan untuk membentuk biofilm, yang diisolasi dari pasien ISK.

b. Biofilm *E. coli*

Biofilm *E. coli* merupakan agregat bakteri *E. coli* yang tertutup dalam matriks polimer ekstraseluler yang diproduksi oleh bakteri tersebut.

c. Ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra*)

Ekstrak daun murbei hitam adalah produk hasil pengambilan zat aktif daun murbei hitam melalui proses ekstraksi ultrasonik (UAE) menggunakan pelarut etanol 96%.

d. Metode *microtiter plate biofilm assay*

Metode *microtiter plate biofilm assay* adalah metode mikrodilusi cair menggunakan *microplate* yang dapat memberikan hasil kuantitatif mengenai aktivitas antibiofilm ekstrak daun murbei hitam terhadap biofilm *E. coli*.

e. Kelompok Uji

Kelompok uji adalah kelompok yang mendapat perlakuan pemberian ekstrak daun murbei hitam dengan variasi konsentrasi 0,16 mg/mL, 0,08 mg/mL, 0,04 mg/mL, 0,02 mg/mL, dan 0,01 mg/mL.

f. Kelompok kontrol

Kelompok kontrol adalah kelompok yang tidak mendapat perlakuan pemberian ekstrak daun murbei hitam. Terdapat tiga kelompok kontrol yaitu kontrol positif, kontrol negatif, dan kontrol media.

g. Uji pertumbuhan biofilm

Uji pertumbuhan biofilm merupakan suatu uji untuk mengetahui kemampuan *E. coli* dalam membentuk biofilm, yaitu sebagai *non-biofilm*

*producer, weak-biofilm producer, moderate- biofilm producer, atau strong- biofilm producer.*

h. Uji pencegahan perlekatan biofilm

Uji pencegahan perlekatan biofilm adalah uji yang dilakukan untuk mengetahui kemampuan ekstrak daun murbei hitam dalam mencegah perlekatan biofilm *E. coli*.

i. Uji penghambatan pembentukan biofilm

Uji penghambatan pembentukan biofilm adalah uji yang dilakukan untuk mengetahui kemampuan ekstrak daun murbei hitam dalam menghambat pembentukan biofilm *E. coli*.

j. Uji penghancuran/degradasi biofilm

Uji penghancuran/degradasi biofilm adalah uji yang dilakukan untuk mengetahui kemampuan ekstrak daun murbei hitam dalam menghancurkan/mendegradasi biofilm *E. coli* yang telah terbentuk.

k. *Optical Density* (OD) pencegahan perlekatan biofilm

*Optical Density* (OD) pencegahan perlekatan biofilm adalah ukuran kuantitatif yang menunjukkan kepadatan biofilm *E. coli* setelah dilakukan uji pencegahan perlekatan biofilm pada *E. coli*.

l. *Optical Density* (OD) penghambatan pertumbuhan biofilm

*Optical Density* (OD) penghambatan pertumbuhan biofilm adalah ukuran kuantitatif yang menunjukkan kepadatan biofilm *E. coli* setelah dilakukan uji penghambatan pertumbuhan biofilm pada *E. coli*.

m. *Optical Density* (OD) penghancuran biofilm

*Optical Density* (OD) penghancuran biofilm adalah ukuran kuantitatif yang menunjukkan kepadatan biofilm *E. coli* setelah dilakukan uji penghancuran biofilm pada *E. coli*.

n. *Minimum Biofilm Prevention Concentration* (MBPC)

MBPC adalah konsentrasi ekstrak etanol daun murbei hitam terendah yang dapat mencegah perlekatan biofilm *E. coli*.

o. *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC)

MBIC adalah konsentrasi ekstrak etanol daun murbei hitam terendah yang dapat menghambat pertumbuhan biofilm *E. coli*.

p. *Minimum Biofilm Eradication Concentration* (MBEC)

MBEC adalah konsentrasi ekstrak etanol daun murbei hitam terendah yang dapat mengeradikasi/menghancurkan biofilm *E. coli*.

#### 4.7 Alat dan Bahan Penelitian

##### 4.7.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Microplate flat-bottom 96 wells*, *Microplate Reader*, *Ultrasonic cleaning bath*, *rotary vacuum evaporator*, *Laminar Air Flow* (LAF), autoklaf, destrose, rangkaian alat ekstraksi, labu leher, oven, timbangan analitik, gelas ukur, mikroskop, spektrofotometer, kuvet, tabung reaksi, *object glass*, cawan petri, ose, bunsen, gelas ukur, timer, pipet tetes, mikropipet, pisau, kain lap, dan blender.

##### 4.7.2 Bahan Penelitian

- a. Bahan uji, yaitu daun murbei hitam (*Morus nigra*) yang diperoleh dari daerah Wagir, Kabupaten Malang.

- b. Bakteri uji, yaitu *Escherichia coli* pembentuk biofilm yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Brawijaya Malang.
- c. Bahan lainnya, yaitu lugol, kristal violet, safranin, alkohol 96%, DMSO, minyak imersi, etanol 96%, PBS, reagen uji fitokimia, medium agar *Eosin Methylene Blue* (EMB), medium CRA, media uji biokimia IMVIC, reagen uji biokimia IMVIC, media *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), media *urea agar*, media *Trypticase Soy Broth* (TSB), glukosa, antibiotik Ciprofloksasin, *aluminium foil*, kertas saring, kapas, *blue disposal tip*, dan *yellow disposal tip*.

#### **4.8 Prosedur Penelitian**

##### **4.8.1 Pembuatan Larutan Ekstrak Daun Murbei Hitam**

###### **4.8.1.1 Determinasi Tanaman Murbei Hitam**

Determinasi tanaman murbei hitam dilakukan di Laboratorium Materia Medika Batu. Determinasi bertujuan untuk memastikan bahwa spesies tanaman yang digunakan adalah *Morus nigra*. Bagian tanaman yang dideterminasi adalah daun murbei hitam.

###### **4.8.1.2 Persiapan Daun Murbei Hitam**

Daun murbei hitam diperoleh dari daerah Wagir, Kabupaten Malang. Daun murbei hitam yang telah dipetik dipisahkan dari batangnya, kemudian dicuci untuk menghilangkan benda asing yang ikut tercampur. Selanjutnya daun murbei hitam dijemur dengan cara diangin-anginkan. Daun murbei hitam dikeringkan dengan menggunakan oven pada suhu 40°C selama 24 jam. Setelah dipastikan kering, daun murbei hitam dihaluskan menggunakan blender hingga menjadi serbuk (*simplisia*).

#### 4.8.1.3 Ekstraksi Daun Murbei Hitam (Fuadi, 2012)

Pembuatan ekstrak daun murbei hitam menggunakan metode *ultrasonic-assisted extraction* (UAE). Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi adalah etanol 96%. Perbandingan antara simplisia dengan pelarut adalah 1 : 10. Langkah-langkah pembuatan ekstrak dimulai dengan menimbang serbuk simplisia daun murbei hitam sebanyak 300 gram menggunakan timbangan analitik. Setelah ditimbang, simplisia daun murbei hitam dimasukkan ke dalam labu leher dengan volume 500 ml dan ditambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 3L. Labu yang telah dilengkapi kondenser dan termometer tersebut dimasukkan ke dalam *ultrasonic cleaning bath*. Ekstraksi dilakukan menggunakan gelombang ultrasonik dengan frekuensi 42 kHz. Lama ekstraksi adalah 2 menit dengan 3 kali pengulangan. Selanjutnya hasil ekstraksi disaring dengan kertas saring whatman. Pelarut diuapkan menggunakan *Rotary Vacum Evaporator* pada tekanan 24 kPa dan suhu 40° C hingga dihasilkan ekstrak kental. Setelah diuapkan, ekstrak kental didinginkan dan dikeringkan dengan memasukkannya ke dalam oven (Fuadi, 2012).

#### 4.8.1.4 Uji Fitokimia

Uji fitokimia bertujuan untuk mengetahui senyawa yang terkandung di dalam ekstrak daun murbei hitam. Uji fitokimia yang dilakukan pada penelitian ini meliputi uji senyawa flavonoid, tanin, saponin, fenolik, alkaloid, terpenoid, dan steroid.

##### a. Flavonoid

Ekstrak pekat daun murbei hitam sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 1-2 ml metanol panas. Selanjutnya

ditambahkan serbuk magnesium dan 0.5 ml asam klorida pekat. Apabila terbentuk warnamerah atau jingga maka hasil uji flavonoid positif (Rumagit *et al.*, 2015).

b. Tanin

Ekstrak pekat daun murbei hitam sebanyak 1.5 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan dengan 3 tetes larutan NaCl 10%, lalu disaring. Selanjutnya ditambahkan 2 tetes FeCl<sub>3</sub>. Apabila larutan menghasilkan endapan berwarna hijau kehitaman atau biru tua, maka hasil uji tanin bernilai positif.

c. Saponin

Ekstrak pekat daun murbei hitam sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 5 mL PBS. Tabung reaksi kemudian dikocok selama 30 detik dan ditambahkan 1-2 tetes HCl 1 M. Kocok kembali tabung dan amati apakah terbentuk buih. Hasil uji saponin bernilai positif jika terbentuk buih yang dapat bertahan selama 30 detik dengan ketinggian 1-3 cm (De Silva *et al.*, 2017).

d. Fenolik

Ekstrak pekat daun murbei hitam sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 10 tetes larutan FeCl<sub>3</sub> 1%. Ekstrak positif mengandung fenol apabila menghasilkan warna hijau, merah, ungu, biru atau hitam pekat (De Silva *et al.*, 2017).

e. Alkaloid

Ekstrak pekat daun murbei hitam sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 3-5 tetes reagen *Dragendorff*. Hasil

uji alkaloid bernilai positif apabila terbentuk endapan berwarna coklat atau jingga (De Silva *et al.*, 2017).

f. Terpenoid

Ekstrak pekat daun murbei hitam sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dilarutkan dengan 0,5 mL kloroform. Selanjutnya campuran tersebut ditambahkan 3-5 tetes  $H_2SO_4$  pekat melalui dinding tabung. Apabila terbentuk cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan dua pelarut, maka hasil uji terpenoid bernilai positif (Thilagavathi *et al.*, 2015).

g. Steroid

Ekstrak pekat daun murbei hitam sebanyak 1 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dilarutkan dengan 0,5 mL kloroform. Selanjutnya campuran tersebut ditambahkan 3-5 tetes  $H_2SO_4$  pekat melalui dinding tabung. Apabila terbentuk warna hijau atau biru maka uji steroid bernilai positif (Thilagavathi *et al.*, 2015).

#### 4.8.1.5 Pembuatan Larutan Ekstrak Daun Murbei Hitam

Penentuan konsentrasi pada penelitian ini berdasarkan hasil penelitian Ramadan *et al.* (2017) yang menggunakan ekstrak daun *Morus alba* terhadap bakteri *Escherichia coli*. Berdasarkan penelitian tersebut, MIC daun *Morus alba* terhadap *Escherichia coli* sebesar 0,32 mg/mL. Pada penelitian ini digunakan konsentrasi sub-MIC, yaitu 1/2 MIC, 1/4 MIC, 1/8 MIC, dan 1/16 MIC, sehingga didapatkan variasi konsentrasi 0,16 mg/mL, 0,08 mg/mL, 0,04 mg/mL, 0,02 mg/mL, dan 0,01 mg/mL. Pemilihan konsentrasi sub-MIC bertujuan agar ekstrak yang digunakan tidak mempengaruhi pertumbuhan bakteri pembentuk biofilm.

Ekstrak kering daun murbei hitam ditimbang sebanyak 6,4 mg kemudian dilarutkan ke dalam 10 mL DMSO 10% untuk mendapatkan larutan stok sebanyak 0,64 mg/mL. Selanjutnya dilakukan dilusi serial untuk mendapatkan ekstrak dengan konsentrasi 0,16 mg/mL, 0,08 mg/mL, 0,04 mg/mL, 0,02 mg/mL dan 0,01 mg/mL dengan cara berikut.

- a. Ekstrak dengan konsentrasi 0,16 mg/mL dibuat dengan cara melarutkan 5 mL larutan ekstrak konsentrasi 0,32 mg/mL ke dalam DMSO 10% hingga mencapai volume 10 mL.
- b. Ekstrak dengan konsentrasi 0,08 mg/mL dibuat dengan cara melarutkan 5 mL larutan ekstrak konsentrasi 0,16 mg/mL ke dalam DMSO 10% hingga mencapai volume 10 mL.
- c. Ekstrak dengan konsentrasi 0,04 mg/mL dibuat dengan cara melarutkan 5 mL larutan ekstrak konsentrasi 0,08 mg/mL ke dalam DMSO 10% hingga mencapai volume 10 mL.
- d. Ekstrak dengan konsentrasi 0,02 mg/mL dibuat dengan cara melarutkan 5 mL larutan ekstrak konsentrasi 0,04 mg/mL ke dalam DMSO 10% hingga mencapai volume 10 mL.
- e. Ekstrak dengan konsentrasi 0,01 mg/mL dibuat dengan cara melarutkan 5 mL larutan ekstrak konsentrasi 0,02 mg/mL ke dalam DMSO 10% hingga mencapai volume 10 mL.

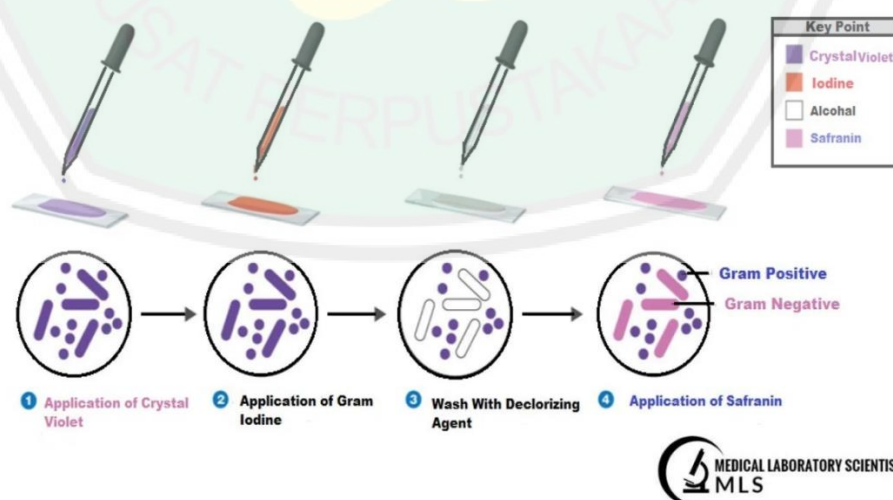
#### **4.8.2 Penyiapan Bakteri**

##### **4.8.2.1 Identifikasi Bakteri**

Proses identifikasi bakteri melalui uji mikroskopis (pewarnaan Gram), uji makroskopis (kultur bakteri pada medium agar EMB dan CRA), dan uji biokimia.

### a. Uji Mikroskopis (Pewarnaan Gram)

Pewarnaan Gram bertujuan untuk mengidentifikasi bentuk, ukuran, dan susunan bakteri. Pewarnaan Gram dimulai dengan menyiapkan *object glass*, dibersihkan dengan kapas, kemudian dilewatkan di atas api bunsen. Membuat hapusan bakteri *E. coli* pada *object glass* menggunakan ose dengan ketebalan yang sesuai. Setelah mengering, sediaan difiksasi dengan cara melewatkan di atas api bunsen. Meneteskan 5 tetes larutan kristal violet di atas sediaan dan dibiarkan selama 60 detik. Setelah itu larutan kristal violet dibuang dan sediaan dibilas dengan PBS. Kemudian meneteskan 5 tetes larutan iodine/lugol di atas sediaan dan dibiarkan selama 30 detik. Setelah itu larutan iodine/lugol dibuang dan sediaan dibilas dengan PBS. Meneteskan 5 tetes alkohol 96% (*decolorized agent*) di atas sediaan dan dibiarkan selama 5 detik. Setelah itu alkohol 96% dibuang dan sediaan dibilas dengan PBS. Meneteskan 5 tetes larutan safranin di atas sediaan dan dibiarkan selama 20 detik. Setelah itu larutan safranin dibuang dan sediaan dibilas dengan PBS. Setelah sediaan kering, sediaan diamati dengan mikroskop. *E. coli* akan terlihat berbentuk basil dan berwarna merah.



**Gambar 4.1** Metode Pewarnaan Gram. 1) Pemberian pewarna kristal violet, 2) Pemberian larutan iodine, 3) Pencucian dengan *decolorizing agent*, 4) Pemberian Safranin  
Sumber: [www.medicalabscentist.org](http://www.medicalabscentist.org)

### b. Uji Makroskopis

Uji makroskopis terdiri dari kultur bakteri uji pada media EMB dan media CRA. Media EMB dibuat dengan melarutkan 36 g *Eosin Methylene Blue Agar* dan 4,5 g agar 30% ke dalam 1 L akuades. Langkah melakukan kultur bakteri pada agar EMB yaitu dengan mengambil bakteri *E. coli* dengan menggunakan ose, kemudian menginokulasikan pada medium agar EMB dengan metode *quadrant streak*. Kemudian medium tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah diinkubasi, mengamati koloni bakteri yang terbentuk. Koloni bakteri *E. coli* yang ditanam akan nampak seperti tetesan tinta atau *metallic sheen* (Triana, 2017). Kultur bakteri pada agar CRA dilakukan dengan cara isolat bakteri *E. coli* diinokulasikan pada *plate* CRA dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dalam keadaan aerob. Koloni pembentuk biofilm ditandai dengan koloni berwarna hitam dengan konsistensi kristal kering. Sedangkan koloni bukan penghasil biofilm ditandai dengan warna pink atau merah (Kirmusaoglu, 2019).

### c. Uji Biokimia

Uji biokimia yang digunakan pada penelitian ini adalah uji biokimia IMViC, uji *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), dan uji urease.

#### 1) Uji *Indole*

Isolat bakteri *E. coli* yang telah dikultur pada media EMB diambil menggunakan ose, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 5 mL *peptone water*. Tabung reaksi diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya ditambahkan 5 tetes reagen *Kovac indole* dan diaduk perlahan. Pada uji ini *E. coli* akan menunjukkan hasil *indole* positif,

yaitu ditandai dengan terbentuknya cincin merah pada lapisan atas. (Al-Baer *et al.*, 2017).

#### 2) Uji *Methyl Red* (MR)

Isolat bakteri *E. coli* yang telah dikultur pada media EMB diambil menggunakan ose, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi media *MRVP broth* sebanyak 4 mL. Ose digerakkan secara memutar dan naik turun agar koloni bakteri tercampur rata. Tabung reaksi diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya ditambahkan 3-4 tetes reagen MR. *E. coli* akan menunjukkan hasil positif yaitu adanya perubahan warna pada media menjadi merah (Al-Baer *et al.*, 2017).

#### 3) Uji *Voges-Proskauer* (VP)

Isolat bakteri *E. coli* yang telah dikultur pada media EMB diambil menggunakan ose, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi media *MRVP broth* sebanyak 4 mL. Ose digerakkan secara memutar dan naik turun agar koloni bakteri tercampur rata. Tabung reaksi diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya ditambahkan 2 tetes reagen VP1 dan 4 tetes reagen VP2. Hasil uji positif apabila terjadi perubahan menjadi warna merah setelah 15 menit. *E. coli* akan menunjukkan hasil negatif karena tidak terdapat perubahan warna pada media menjadi merah (Al-Baer *et al.*, 2017).

#### 4) Uji Sitrat

Isolat bakteri *E. coli* yang telah dikultur pada media EMB diambil menggunakan ose kemudian diinokulasikan secara goresan pada tabung reaksi yang berisi medium *Simmons Citrate Agar* (SCA) miring.

Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Hasil uji sitrat positif apabila terjadi perubahan dari warna hijau menjadi biru pada medium SCA atau tampak adanya pertumbuhan. *E. coli* akan menunjukkan hasil negatif karena tidak terdapat perubahan warna dan media tetap berwarna hijau (Al-Baer *et al.*, 2017).

5) Uji Triple Sugar Iron Agar (TSIA)

Isolat bakteri *E. coli* yang telah dikultur pada media EMB diambil menggunakan ose kemudian diinokulasikan secara goresan pada tabung reaksi yang berisi medium TSIA miring. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Uji fermentasi bakteri dapat dilihat dari perubahan warna pada uji TSIA. Warna merah menunjukkan adanya reaksi basa dan warna kuning menunjukkan adanya reaksi asam. Pembentukan gas H<sub>2</sub>S akan ditandai dengan adanya warna hitam. Sedangkan pembentukan gas dari fermentasi glukosa ditandai dengan terbentuknya rongga di bagian bawah agar. *E. coli* akan menunjukkan warna kuning pada *slant* dan *butt* (*acid/acid*), pembentukan gas dari fermentasi glukosa positif, dan pembentukan gas H<sub>2</sub>S negatif (Leboffe dan Pierre, 2012).

6) Uji Urease

Isolat bakteri *E. coli* yang telah dikultur pada media EMB diambil menggunakan ose kemudian diinokulasikan pada media urea agar. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Hasil uji positif apabila terdapat perubahan warna dari oranye menjadi merah/pink. *E. coli* akan menunjukkan hasil uji urease negatif yaitu berwarna oranye hingga kuning (Leboffe dan Pierre, 2012).

#### 4.8.2.2 Pembuatan Media Pertumbuhan

Pembuatan media pertumbuhan dengan menggunakan media *Trypticase Soy Broth* (TSB) ditambah dengan glukosa 1%. Sebanyak 200 mL media TSB disterilkan dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Kemudian media TSB yang sudah steril ditambahkan dengan glukosa 1% sebanyak 2 gram. Penambahan glukosa 1% bertujuan untuk meningkatkan pembentukan biofilm bakteri *Escherichia coli*.

#### 4.8.2.3 Penyiapan Suspensi Bakteri

Satu ose kultur *E. coli* yang telah diremajakan pada media EMB diinokulasikan pada tabung reaksi yang berisi campuran media TSB dan glukosa 1%. Kemudian tabung dihomogenkan dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi, kepadatan bakteri (OD) diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm hingga diperoleh OD 0,2.

#### 4.8.3 Pembuatan Kelompok Kontrol

Kontrol positif pada penelitian ini menggunakan antibiotik Ciprofloksasin. Pemilihan antibiotik Ciprofloksasin didasarkan pada penelitian Dong *et al.* (2019) yang menggunakan antibiotik Ciprofloksasin dalam mengatasi biofilm yang dibentuk oleh *Escherichia coli*. Pada penelitian tersebut didapatkan rentang MIC Ciprofloksasin pada bakteri *Escherichia coli* sebesar 0,015-128 µg/mL. Penelitian ini mengambil konsentrasi MIC sebesar 128 µg/mL. Konsentrasi yang digunakan adalah sub-MIC yaitu sebesar 1/2 MIC, sehingga konsentrasi Ciprofloksasin yang digunakan sebagai kontrol positif adalah 64 µg/mL. Kontrol negatif berisi

suspensi bakteri *E. coli*, sedangkan kontrol media terdiri dari campuran media TSB dan glukosa 1%.

#### 4.9.4 Uji Aktivitas Biofilm

##### 4.9.4.1 Uji Deteksi Pembentukan Biofilm (Nicolic *et al.*, 2014 dengan modifikasi)

Uji deteksi pembentukan biofilm *E. coli* dilakukan dengan metode *tissue culture plate* atau *microtiter plate biofilm assay*. Uji ini bertujuan untuk mengetahui dan membuktikan bahwa isolat *E. coli* yang digunakan pada penelitian ini mampu untuk membentuk biofilm dan mengetahui kekuatan *E. coli* dalam membentuk biofilm. Kelompok uji terdiri dari suspensi bakteri *E. coli*, sedangkan kelompok kontrol adalah campuran media TSB dan glukosa 1%. Sebanyak 200  $\mu$ L suspensi bakteri *E. coli* dimasukkan ke dalam sumur uji dan 200  $\mu$ L campuran media TSB dan glukosa 1% dimasukkan ke dalam sumur kontrol pada *microplate 96 wells*. *Microplate* ditutup dan diinkubasi pada suhu 37° C selama 72 jam, tanpa diaduk. Setelah diinkubasi, isi *microplate* dikeluarkan dan dicuci dengan PBS untuk menghilangkan sel-sel planktonik yang tidak menempel pada *microplate*, kemudian *microplate* dikeringkan.

Selanjutnya dimasukkan pewarna kristal violet 1% sebanyak 200  $\mu$ L pada masing-masing sumur agar biomassa biofilm terwarnai, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 20 menit. Setelah diinkubasi, isi *microplate* dibuang, kemudian *microplate* dicuci menggunakan PBS steril sebanyak tiga kali untuk menghilangkan sel yang terwarnai tetapi tidak menempel pada *microplate*. Kemudian *microplate* dibiarkan mengering pada suhu ruang. Setelah *microplate* kering, sebanyak 200  $\mu$ L etanol 96% dimasukkan ke dalam masing-masing sumur

dan diinkubasi selama 20 menit pada suhu ruang. *Microplate* selanjutnya diukur menggunakan *microplate reader* dengan panjang gelombang 595 nm untuk mendapatkan nilai OD bakteri uji dan OD kontrol.

Untuk menentukan kekuatan biofilm bakteri uji, nilai  $OD_{\text{isolat}}$  dibandingkan dengan nilai *Optical Density cut-off* (ODcut). Nilai OD didapatkan dari rata-rata nilai nilai  $OD_{\text{isolat}}$  dikurangi nilai ODCut ( $OD = \text{rata-rata nilai } OD_{\text{isolat}} - ODCut$ ). ODCut didefinisikan sebagai tiga standar deviasi di atas rata-rata OD kontrol (medium kultur) (Ruchi *et al.*, 2015). Rumus menghitung ODCut sebagai berikut:

$$ODcut = ODc + (3 \times ODC)$$

Keterangan:

$ODcut = \text{Optical Density cut-off}$

$ODc = \text{Optical Density control}$

Kekuatan pertumbuhan biofilm tersebut dapat dilihat pada Tabel 4.1.

**Tabel 4.1** Interpretasi kekuatan bakteri pembentuk biofilm

| Rata-rata nilai OD                            | Kekuatan penghasil biofilm        |
|-----------------------------------------------|-----------------------------------|
| $OD_{\text{isolat}} \leq ODCut$               | <i>Non-biofilm producer</i>       |
| $ODcut < OD_{\text{isolat}} \leq 2x ODCut$    | <i>Weak-biofilm producer</i>      |
| $2x ODCut < OD_{\text{isolat}} \leq 4x ODCut$ | <i>Moderate- biofilm producer</i> |
| $4x ODCut < OD_{\text{isolat}}$               | <i>Strong- biofilm producer</i>   |

$ODcut = \text{Optical Density cut}$ ,  $OD_{\text{isolat}} = \text{Optical Density isolat}$

Sumber: (Ramadan *et al.*, 2017)

#### 4.8.4.2 Uji Pencegahan Perlekatan Biofilm *Escherichia coli* (Kining *et al.*, 2016 dengan modifikasi)

Pada pengujian pencegahan perlekatan biofilm digunakan 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. Sebanyak 200  $\mu\text{L}$  ekstrak dengan berbagai konsentrasi dimasukkan ke dalam sumur uji. Antibiotik Ciprofloksasin sebanyak 200  $\mu\text{L}$

dimasukkan ke dalam sumur kontrol positif. Sebanyak 200  $\mu\text{L}$  campuran media TSB dan glukosa 1% dimasukkan ke dalam sumur kontrol media pada *microplate* 96wells. *Microplate* ditutup dan diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 60 menit. Selanjutnya isi *microplate* dikeluarkan, dicuci dengan PBS steril sebanyak tiga kali dan dikeringkan. Setelah *microplate* kering, sebanyak 200  $\mu\text{L}$  suspensi bakteri *E. coli* dimasukkan ke dalam sumur uji, sumur kontrol positif, dan sumur kontrol negatif. Sedangkan sumur kontrol media diisi dengan 200  $\mu\text{L}$  campuran media TSB dan glukosa 1%. *Microplate* diinkubasi pada suhu 37° C selama 72 jam. Setelah diinkubasi, isi *microplate* dikeluarkan, dicuci menggunakan PBS steril sebanyak tiga kali dan dikeringkan.

Setelah *microplate* kering, sebanyak 200  $\mu\text{L}$  pewarna kristal violet 1% dimasukkan ke dalam semua sumur agar biomassa biofilm terwarnai kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 20 menit. Selanjutnya isi *microplate* dicuci menggunakan PBS steril untuk menghilangkan sel yang terwarnai tetapi tidak menempel pada *microplate*. Kemudian *microplate* dibiarkan mengering pada suhu ruang. Memasukkan 200  $\mu\text{L}$  larutan etanol 96% ke dalam semua sumur dan diinkubasi pada suhu ruang selama 20 menit. Kemudian *microplate* 96well diamati menggunakan *Microplate Reader* pada panjang gelombang 595 nm. Pencegahan perlekatan biofilm dihitung menggunakan rumus berikut:

$$\% \text{ Pencegahan perlekatan biofilm} = \frac{OD_{kn} - OD_{uji}}{OD_{kn}} \times 100\%$$

Keterangan:

$OD_{kn}$  = Optical Density kontrol negatif

$OD_{uji}$  = Optical Density uji

#### 4.8.4.3 Uji Penghambatan Pertumbuhan biofilm *Escherichia coli* (Kining *et al.*, 2016 dengan modifikasi)

Pada pengujian penghambatan pertumbuhan biofilm digunakan 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. Sebanyak 100 µL ekstrak daun murbei hitam dengan berbagai konsentrasi dimasukkan ke dalam sumur uji pada *microplate 96wells*. Antibiotik Ciprofloksasin sebanyak 100 µL dimasukkan pada sumur kontrol positif dan 200 µL campuran media TSB dan glukosa 1% pada kontrol media. Kemudian menambahkan 100 µL suspensi bakteri *E. coli* ke dalam sumur uji dan sumur kontrol positif dan 200 µL suspensi bakteri *E. coli* ke dalam sumur kontrol negatif. *Microplate* ditutup dan diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 72 jam. Setelah diinkubasi, isi *microplate* dikeluarkan, dicuci menggunakan PBS steril sebanyak tiga kali dan dikeringkan.

Setelah *microplate* kering, sebanyak 200 µL pewarna kristal violet 1% dimasukkan ke dalam semua sumur agar biomassa biofilm terwarnai kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 20 menit. Selanjutnya isi *microplate* dicuci menggunakan PBS steril untuk menghilangkan sel yang terwarnai tetapi tidak menempel pada *microplate*. Kemudian *microplate* dibiarkan mengering pada suhu ruang. Memasukkan 200 µL larutan etanol 96% ke dalam semua sumur dan diinkubasi pada suhu ruang selama 20 menit. Kemudian *microplate 96 well* diamati menggunakan *Microplate Reader* pada panjang gelombang 595 nm. Penghambatan pertumbuhan biofilm dihitung menggunakan rumus berikut:

$$\% \text{ Penghambatan pertumbuhan biofilm} = \frac{OD_{kn} - OD_{uji}}{OD_{kn}} \times 100\%$$

Keterangan:

$OD_{kn}$  = Optical Density kontrol negatif

$OD_{uji}$  = Optical Density uji

#### 4.8.4.4 Uji Penghancuran/Degradasi Biofilm *Escherichia coli* (Mohsenipour et al., 2015 dengan modifikasi)

Pada pengujian penghancuran biofilm digunakan 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. Sebanyak 200  $\mu$ L suspensi bakteri *E. coli* dimasukkan ke sumur uji, sumur kontrol positif, dan sumur kontrol negatif pada *microplate 96wells*. Sumur kontrol media diisi dengan 200  $\mu$ L campuran media TSB dan glukosa 1%. *Microplate* ditutup dan diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 72 jam. Setelah diinkubasi, isi *microplate* dikeluarkan, dicuci dengan PBS steril sebanyak tiga kali dan dikeringkan. Selanjutnya sebanyak 200  $\mu$ L ekstrak daun murbei hitam dengan berbagai konsentrasi dimasukkan ke dalam sumur uji. Antibiotik Ciprofloksasin sebanyak 200  $\mu$ L dimasukkan ke sumur kontrol positif, 200  $\mu$ L suspensi bakteri *E. coli* pada sumur kontrol negatif, dan 200  $\mu$ L campuran media TSB dan glukosa 1% pada sumur kontrol media. *Microplate* ditutup kembali dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit. Setelah diinkubasi, isi *microplate* dikeluarkan, dicuci menggunakan PBS steril sebanyak tiga kali dan dikeringkan.

Setelah *microplate* kering, sebanyak 200  $\mu$ L pewarna kristal violet 1% dimasukkan ke dalam semua sumur agar biomassa biofilm terwarnai kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 20 menit. Selanjutnya isi *microplate* dicuci menggunakan PBS steril untuk menghilangkan sel yang terwarnai tetapi tidak menempel pada *microplate*. Kemudian *microplate* dibiarkan mengering pada suhu ruang. Memasukkan 200  $\mu$ L larutan etanol 96% ke dalam semua sumur dan diinkubasi pada suhu ruang selama 20 menit. Kemudian *microplate* 96

well diamati menggunakan *Microplate Reader* pada panjang gelombang 595 nm.

Penghancuran biofilm dihitung menggunakan rumus berikut:

$$\% \text{ Penghancuran biofilm} = \frac{OD_{kn} - OD_{uji}}{OD_{kn}} \times 100\%$$

Keterangan:

$OD_{kn}$  = Optical Density kontrol negatif

$OD_{uji}$  = Optical Density uji

#### 4.9 Denah Perlakuan Uji Aktivitas Antibiofilm

Denah perlakuan uji aktivitas antibiofilm pada *microplate* 96 wells sesuai pada Gambar 4.2 berikut.

|   | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| B |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| C |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| D |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| E |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| F |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| G |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| H |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |

**Gambar 4.2** Denah penggunaan *microplate* 96 wells pada uji antibiofilm

Keterangan:

- |                                                                                                                         |                                                                                                              |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  kelompok uji konsentrasi 0,16 mg/mL |  kelompok kontrol positif |
|  kelompok uji konsentrasi 0,08 mg/mL |  kelompok kontrol negatif |
|  kelompok uji konsentrasi 0,04 mg/mL |  kelompok kontrol media   |
|  kelompok uji konsentrasi 0,02 mg/mL |                                                                                                              |
|  kelompok uji konsentrasi 0,01 mg/mL |                                                                                                              |

#### **4.10 Perhitungan Konsentrasi Ekstrak Minimal Antibiofilm (Gupta *et al.* 2015 dengan modifikasi)**

##### **4.10.1 Konsentrasi Ekstrak Minimal Pencegahan Biofilm**

Konsentrasi Ekstrak Minimal Pencegahan Biofilm/*Minimum Biofilm Prevention Concentration* (MBPC) yang dihitung pada penelitian ini terdiri dari MBPC<sub>50</sub> dan MBPC<sub>90</sub>. MBPC<sub>50</sub> ditentukan dari konsentrasi ekstrak daun murbei hitam terendah yang dapat mencegah perlekatan 50% biofilm *E. coli*, sedangkan MBPC<sub>90</sub> dihitung dari konsentrasi ekstrak daun murbei hitam terendah yang dapat mencegah perlekatan 90% biofilm *E. coli*.

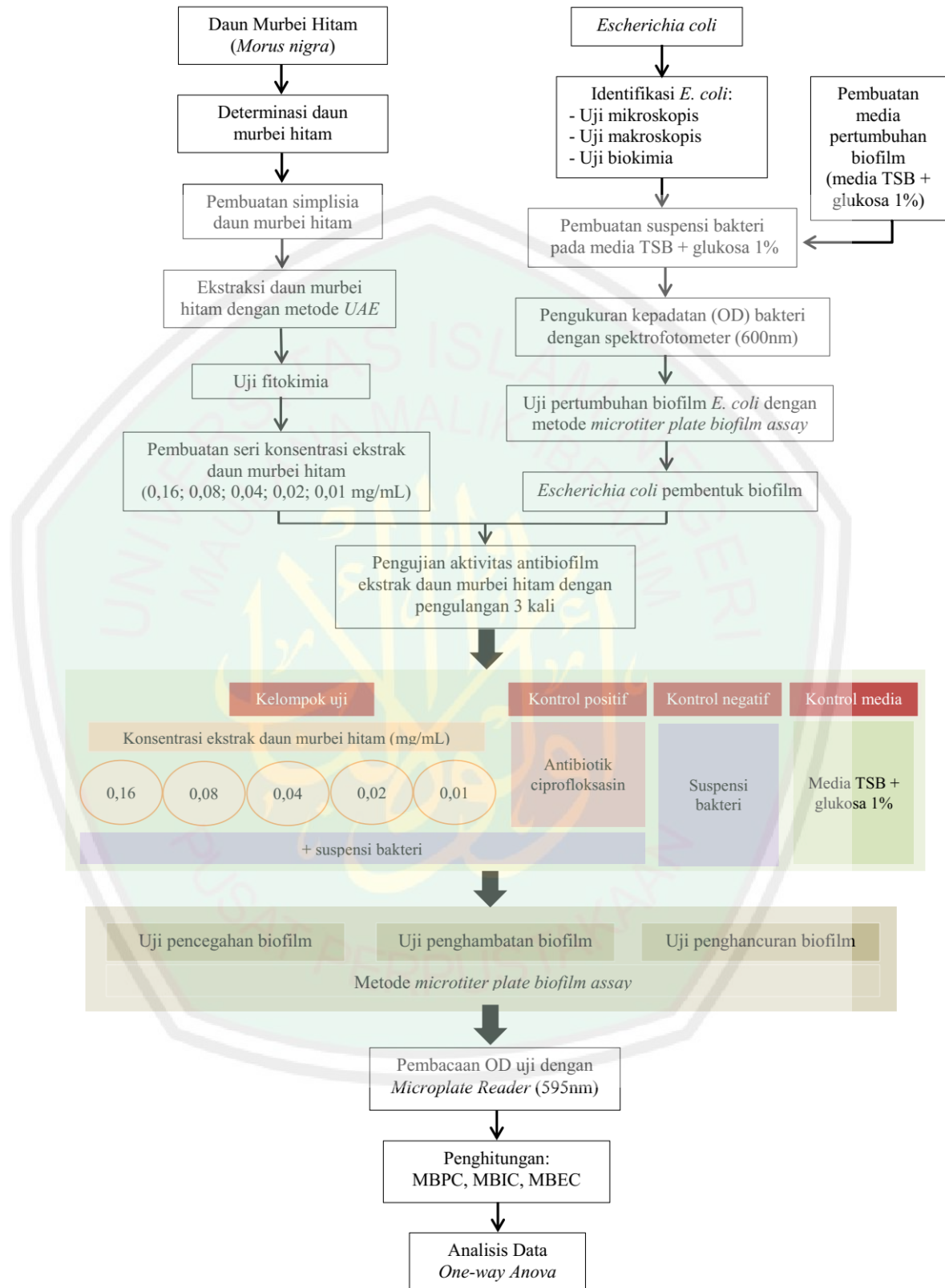
##### **4.10.2 Konsentrasi Ekstrak Minimal Penghambatan Biofilm**

Konsentrasi Ekstrak Minimal Penghambatan Biofilm/*Minimum Biofilm Inhibition Concentration* (MBIC) yang dihitung pada penelitian ini terdiri dari MBIC<sub>50</sub> dan MBIC<sub>90</sub>. MBIC<sub>50</sub> ditentukan dari konsentrasi ekstrak daun murbei hitam terendah yang dapat menghambat pertumbuhan 50% biofilm *E. coli*, sedangkan MBIC<sub>90</sub> dihitung dari konsentrasi ekstrak daun murbei hitam terendah yang dapat menghambat pertumbuhan 90% biofilm *E. coli*.

##### **4.10.3 Konsentrasi Ekstrak Minimal Penghancuran Biofilm**

Konsentrasi Ekstrak Minimal Penghancuran Biofilm/*Minimum Biofilm Eradication Concentration* (MBEC) yang dihitung pada penelitian ini terdiri dari MBEC<sub>50</sub> dan MBEC<sub>90</sub>. MBEC<sub>50</sub> ditentukan dari konsentrasi ekstrak daun murbei hitam terendah yang dapat menghancurkan 50% biofilm *E. coli*, sedangkan MBEC<sub>90</sub> dihitung dari konsentrasi ekstrak daun murbei hitam terendah yang dapat menghancurkan 90% biofilm *E. coli*.

#### 4.11 Alur Penelitian



Gambar 4.3 Alur Penelitian

#### 4.12 Analisis Data

Analisis data hasil penelitian menggunakan aplikasi *SPSS for windows*. Data dianalisis menggunakan Uji *One-Way Analysis of Variance (Anova)*. Uji *One-Way Anova* merupakan uji parametrik untuk membandingkan perbedaan rerata data yang lebih dari dua kelompok. Taraf signifikansi data adalah 0,05. Uji anova dipilih karena penelitian ini menggunakan skala data numerik, hanya memiliki satu variabel independen, dan terdapat lebih dari dua kelompok perlakuan.

Distribusi data dapat dianalisis dengan uji normalitas. Uji normalitas digunakan untuk membuktikan bahwa data penelitian berdistribusi normal. Uji normalitas yang digunakan adalah uji *Kolmogorov Smirnov*. Apabila nilai signifikansi data lebih dari 0,05 maka data tidak memiliki perbedaan signifikan dengan data normal baku, artinya data terdistribusi normal. Namun apabila nilai signifikansi data di bawah 0,05 maka data tidak terdistribusi normal. Untuk mengetahui sampel yang digunakan berasal dari populasi yang memiliki varian sama, dilakukan uji homogenitas dengan uji *Lavene*. Data homogen apabila didapatkan nilai signifikansi lebih dari 0,05 (Cahyono, 2018).

Apabila data hasil penelitian tidak memenuhi asumsi uji *one-way Anova*, maka data tidak diuji dengan uji *One-Way Anova*. Data akan diuji dengan uji non-parametrik yaitu uji *Kruskal Wallis* (Sirait, 2001). Bila dari uji *One-Way Anova* atau uji *Kruskal Wallis* ditemukan perbedaan bermakna dengan nilai  $p < 0,05$ , dilanjutkan dengan uji *Post Hoc*. Uji *Post Hoc* merupakan uji lanjutan untuk menentukan kelompok perlakuan mana yang berbeda secara signifikan. Selanjutnya dilakukan uji korelasi *Pearson* untuk mengetahui hubungan antara konsentrasi ekstrak dengan besarnya nilai *optical density (OD)* uji.

## BAB V

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 5.1 Hasil Penelitian

##### 5.1.1 Hasil Determinasi Tanaman Murbei Hitam

Determinasi sampel tanaman murbei hitam dari Laboratorium Herbal Materia Medica Batu pada tanggal 22 Januari 2020. Bagian tanaman yang dideterminasi adalah daun. Hasil determinasi menyatakan bahwa sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah spesies *Morus nigra* L. (Lampiran 1).

##### 5.1.2 Hasil Ekstraksi Daun Murbei Hitam

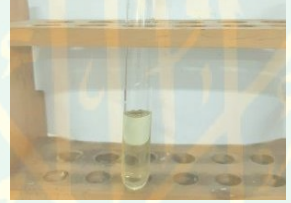
Daun murbei hitam diperoleh dari daerah Kecamatan Wagir, Kabupaten Malang. Daun murbei hitam yang telah dipetik dibersihkan, dicuci, dan diangin-anginkan selama semalam, kemudian daun murbei hitam dikeringkan dalam oven pada suhu 40°C. Setelah daun mengering, daun diblender sehingga menjadi simplisia. Simplisia daun murbei hitam yang diperoleh sebanyak 700 gram. Selanjutnya dilakukan ekstraksi simplisia daun murbei hitam dengan metode UAE. Ekstraksi menggunakan daun murbei hitam sebanyak 300 gram dengan pelarut etanol 96% sebanyak 3 L. Selanjutnya hasil ekstrak disaring dengan kertas saring. Sisa pelarut diuapkan dengan *Rotary Evaporator* selama 6 jam sehingga menghasilkan ekstrak kental. Selanjutnya ekstrak kental dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 40°C selama 5 hari agar pelarut dapat menguap lebih maksimal. Hasil ekstrak yang didapatkan berupa ekstrak kental/pasta.

##### 5.1.3 Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Daun Murbei Hitam

Uji fitokimia dilakukan di Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang, meliputi uji senyawa flavonoid, tanin, saponin,

fenolik, alkaloid, triterpenoid, dan steroid. Hasil uji fitokimia sampel daun murbei hitam dapat dilihat pada tabel 5.1.

**Tabel 5.1** Hasil uji fitokimia ekstrak daun murbei hitam

| No. | Uji Fitokimia | Gambar                                                                              | 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<br>kehitaman |
|----|---------|-----------------------------------------------------------------------------------|---|--------------------|

#### 5.1.4 Hasil Identifikasi Bakteri Uji

Identifikasi sampel isolat bakteri *E. coli* pada penelitian ini dilakukan secara fenotip, yang terdiri dari uji mikroskopis, uji makroskopis, dan uji biokimia (IMViC).

##### a. Uji mikroskopis

Uji mikroskopis untuk mengidentifikasi sampel isolat bakteri *E. coli* pada penelitian ini menggunakan pewarnaan Gram. Dari pewarnaan Gram terlihat bahwa bakteri berbentuk basil dan berwarna merah, sehingga dapat digolongkan sebagai bakteri Gram negatif. Hasil ini menunjukkan bahwa sampel yang digunakan pada penelitian ini benar merupakan bakteri *E. coli*. Hasil pewarnaan Gram bakteri uji dapat dilihat pada gambar 5.1.



**Gambar 5.1** Hasil pewarnaan Gram *E. coli* pada perbesaran 1000x. Tampak bakteri berbentuk basil dan berwarna merah (tanda panah).

##### b. Uji makroskopis

Uji makroskopis untuk mengidentifikasi sampel isolat bakteri pada penelitian ini dengan melakukan kultur bakteri pada media EMB. Dari uji

makroskopis terhadap sampel terlihat bahwa koloni bakteri berbentuk bulat, tepi koloni tidak rata, elevansi koloni cembung, koloni mengkilap berwarna hijau metalik, dan konsistensi koloni non mukoid. Hasil tersebut menunjukkan bahwa sampel yang digunakan pada penelitian ini merupakan bakteri *E. coli*. Hasil uji makroskopis pada media EMB dapat dilihat pada gambar 5.2.



**Gambar 5.2** Hasil uji pertumbuhan *E. coli* pada EMB. Tampak koloni bakteri berbentuk bulat, tepi koloni tidak rata, cembung, mengkilap, berwarna hijau metalik, dan konsistensi non mukoid.

Untuk mengetahui apakah bakteri uji dapat membentuk biofilm, dilakukan uji deteksi biofilm *E. coli* secara makroskopis menggunakan media CRA. Hasil kultur di media CRA menunjukkan koloni berwarna hitam yang mengindikasikan bahwa bakteri uji positif mampu membentuk biofilm.



**Gambar 5.3** Hasil uji deteksi pertumbuhan biofilm bakteri uji pada media CRA. Tampak koloni bakteri uji yang berwarna hitam.

c. Uji biokimia IMViC

Uji biokimia IMViC terhadap sampel isolat bakteri *E. coli* dapat dilihat pada tabel 5.2 berikut.

**Tabel 5.2** Hasil uji biokimia IMViC terhadap bakteri uji

| No. | Uji IMViC | Hasil                              |
|-----|-----------|------------------------------------|
| 1.  | TSI       | As/As, H <sub>2</sub> S (-), G (+) |
| 2.  | Indol     | Positif                            |
| 3.  | MR        | Positif                            |
| 4.  | VP        | Negatif                            |
| 5.  | Sitrat    | Negatif                            |
| 6.  | Urease    | Negatif                            |



**Gambar 5.4** Hasil uji biokimia IMViC. Uji terdiri dari TSI, Indol, MR, VP, Sitrat, dan Urease. Uji TSI menunjukkan warna kuning pada *slant* dan *butt* dan tidak didapatkan adanya endapan kehitaman. Uji Indol menunjukkan hasil positif yakni terbentuk cincin berwarna merah. Uji MR menunjukkan hasil positif karena terjadi perubahan warna menjadi merah. Uji VP menunjukkan hasil negatif karena tidak didapatkan perubahan warna. Uji sitrat didapatkan hasil negatif karena tidak terdapat perubahan warna maupun pertumbuhan bakteri. Uji urease didapatkan adanya warna kuning yang berarti hasil uji urease negatif

### 5.1.5 Hasil Uji Deteksi Pertumbuhan Biofilm *E. coli*

Hasil *Optical Density* perlakuan uji deteksi pertumbuhan biofilm bakteri *E. coli* dengan suspensi sebesar OD<sub>600nm</sub> 0,2 diukur menggunakan *microplate reader* setelah diinkubasi pada suhu 37°C selama 72 jam. Hasil uji deteksi pertumbuhan biofilm *E. coli* dapat dilihat pada tabel 5.3.

**Tabel 5.3** Hasil uji deteksi pertumbuhan biofilm *E. coli*

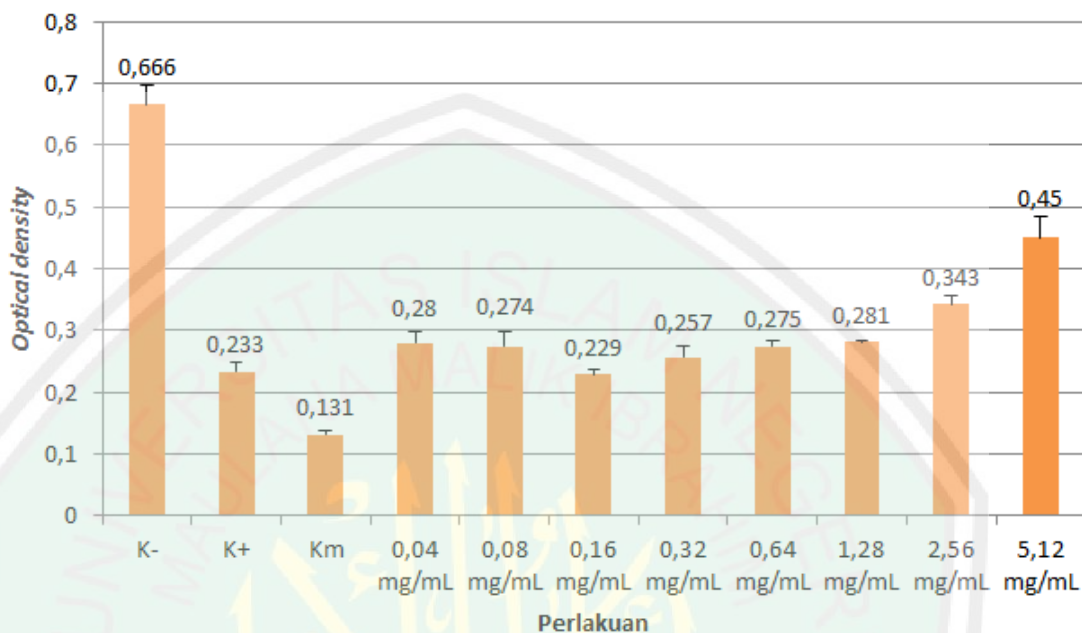
| Kelompok perlakuan                              | Optical density |       |       |           |
|-------------------------------------------------|-----------------|-------|-------|-----------|
|                                                 | Pengulangan ke- |       |       | Rata-rata |
|                                                 | 1               | 2     | 3     |           |
| kelompok uji:<br>suspensi <i>E. coli</i> OD 0,2 | 0,369           | 0,347 | 0,320 | 0,345     |
| kelompok kontrol:<br>media TSB dan glukosa 1%   | 0,113           | 0,123 | 0,132 | 0,122     |

Dari hasil di atas dapat dihitung nilai OD<sub>cut</sub> dengan rumus tiga standar deviasi di atas rata-rata OD kontrol (medium kultur). Nilai OD<sub>cut</sub> uji deteksi pembentukan biofilm yang diperoleh adalah 0,151. Selanjutnya dihitung nilai OD<sub>isolat</sub> yaitu nilai rata-rata OD kelompok uji dikurangi OD<sub>cut</sub> dan didapatkan nilai OD<sub>isolat</sub> adalah 0,186. Nilai OD<sub>isolat</sub> positif menunjukkan bahwa bakteri uji memiliki kemampuan membentuk biofilm. Kekuatan bakteri uji dalam membentuk biofilm termasuk kategori pembentuk biofilm lemah karena memenuhi  $OD_{cut} < OD_{isolat} \leq 2 \times OD_{cut}$ .

#### 5.1.6 Hasil Uji Pendahuluan

Uji pendahuluan bertujuan untuk mencari variasi konsentrasi yang akan digunakan pada penelitian dan untuk melihat apakah ekstrak daun murbei memiliki aktivitas antibiofilm. Uji pendahuluan dilakukan dengan metode uji penghambatan pembentukan biofilm *E. coli*. Suspensi bakteri yang digunakan sebesar OD<sub>600nm</sub> 0,2. Berdasarkan hasil uji pendahuluan, didapatkan bahwa semua konsentrasi ekstrak daun murbei hitam memiliki aktivitas antibiofilm karena memiliki nilai OD yang lebih rendah daripada kontrol negatif. Pada konsentrasi 0,04 mg/mL-0,16 mg/mL, menunjukkan peningkatan aktivitas antibiofilm seiring dengan peningkatan dosis ekstrak yang digunakan. Sedangkan konsentrasi 0,32

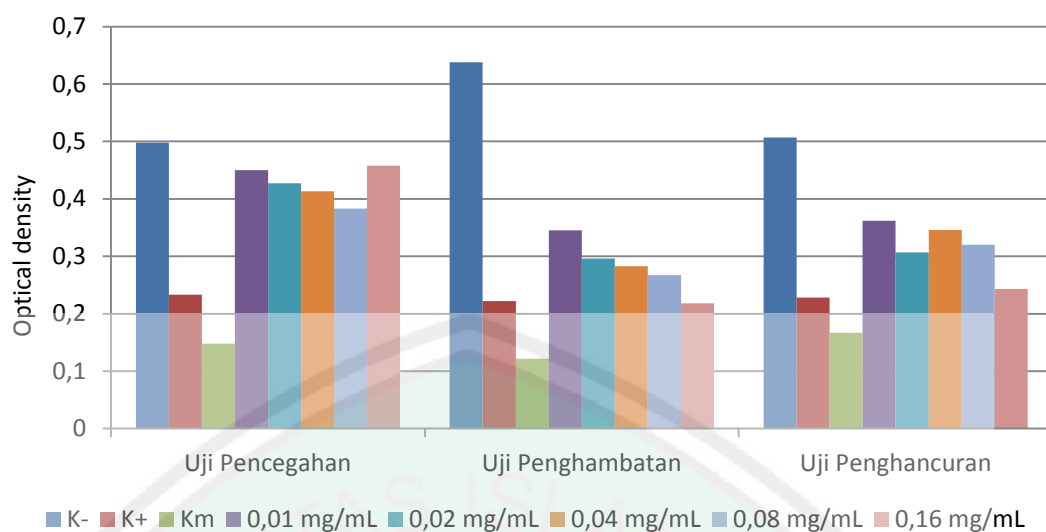
mg/mL-5,12 mg/mL menunjukkan penurunan aktivitas antibiofilm seiring dengan peningkatan dosis ekstrak yang digunakan. Hasil uji pendahuluan dapat dilihat pada gambar 5.5 berikut.



Gambar 5.5 Hasil nilai *Optical Density* (OD) uji pendahuluan

#### 5.1.7 Hasil Uji Aktivitas Antibiofilm Ekstrak Daun Murbei Hitam terhadap Biofilm *E. coli*

Uji aktivitas antibiofilm menggunakan suspensi bakteri *E. coli* dengan OD<sub>600nm</sub> sebesar 0,2. Hasil perlakuan diukur dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 595nm setelah diinkubasi pada suhu 37°C selama 72 jam. Hasil penelitian uji aktivitas antibiofilm ekstrak daun murbei hitam terhadap biofilm *E. coli* yang meliputi uji pencegahan perlekatan biofilm, uji penghambatan pertumbuhan biofilm, dan uji penghancuran biofilm menunjukkan bahwa ekstrak daun murbei hitam memiliki aktivitas antibiofilm terhadap biofilm *E. coli*, seperti yang ditunjukkan gambar 5.6 berikut.



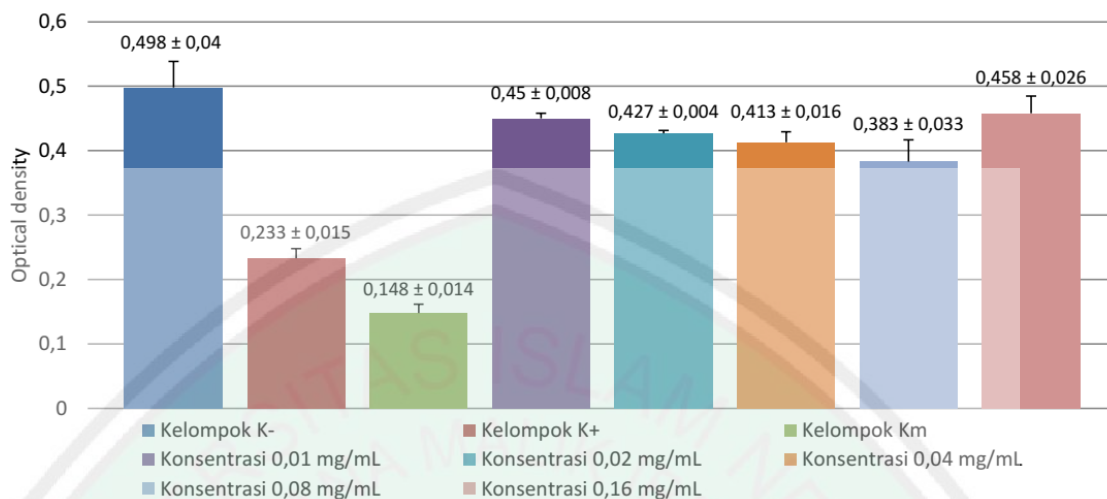
**Gambar 5.6** Hasil nilai *Optical Density* (OD) uji antibiofilm ekstrak daun murbei hitam terhadap biofilm *E. coli*. Pada semua kelompok terlihat bahwa uji pencegahan biofilm memiliki nilai OD tertinggi, sedangkan uji penghambatan biofilm memiliki nilai OD terendah.

Gambar 5.6 menunjukkan bahwa nilai OD tertinggi secara berturut-turut terlihat pada uji pencegahan perlekatan, uji penghancuran, dan uji penghambatan pertumbuhan. Uji pencegahan perlekatan biofilm memiliki nilai OD tertinggi yang berarti kepadatan biofilm paling tinggi di banding uji antibiofilm lainnya. Sedangkan nilai OD terendah terlihat pada uji penghambatan pertumbuhan biofilm, yang berarti kepadatan biofilm paling rendah.

#### 5.1.7.1 Hasil Uji Pencegahan Perlekatan Biofilm *E. coli*

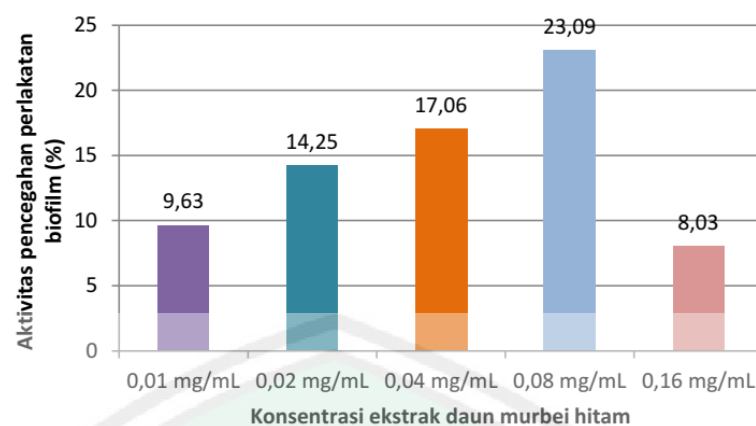
Hasil OD uji pencegahan perlekatan biofilm *E. coli* menunjukkan bahwa kontrol negatif memiliki nilai OD tertinggi dari semua kelompok perlakuan, sedangkan kontrol media memiliki nilai OD terendah dari semua kelompok. Nilai OD tertinggi pada kelompok uji terlihat pada konsentrasi 0,16 mg/mL yaitu sebesar 0,458 dan nilai OD terendah pada konsentrasi 0,08 mg/mL yaitu sebesar 0,383. Nilai OD dari konsentrasi 0,01 mg/mL semakin menurun hingga

konsentrasi 0,08 mg/mL dan meningkat pada konsentrasi 0,16 mg/mL. Hasil uji pencegahan perlekatan biofilm *E. coli* dapat dilihat pada Gambar 5.7 berikut.



**Gambar 5.7** Hasil *Optical Density* (OD) uji pencegahan perlekatan biofilm *E. coli*.

Aktivitas pencegahan perlekatan biofilm menunjukkan hasil yang semakin meningkat dari konsentrasi 0,01 mg/mL hingga konsentrasi 0,08 mg/mL. Konsentrasi 0,08 mg/mL memiliki aktivitas pencegahan perlekatan biofilm tertinggi yaitu 23,09%. Dari konsentrasi 0,08 mg/mL, aktivitas pencegahan perlekatan biofilm menurun tajam pada konsentrasi 0,16 mg/mL dengan nilai aktivitas pencegahan perlekatan biofilm terendah dari kelompok uji yaitu sebesar 8,03%. Hasil aktivitas pencegahan perlekatan biofilm dapat dilihat pada Gambar 5.8 berikut.



**Gambar 5.8** Persentase aktivitas pencegahan perlekatan biofilm pada uji pencegahan perlekatan biofilm *E. coli*.

Data uji pencegahan perlekatan biofilm dianalisis secara statistik menggunakan SPSS versi 25. Pada uji normalitas *Saphiro Wilk* didapatkan data terdistribusi normal ( $p \geq 0,05$ ) dan pada uji homogenitas *Lavene's test* didapatkan data terdistribusi homogen ( $p \geq 0,05$ ). Selanjutnya data diuji dengan uji *one-way ANOVA* untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan. Hasil uji *one-way ANOVA* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan uji pencegahan perlekatan biofilm ( $p \leq 0,05$ ) dengan nilai  $p = 0,000$ . Untuk mengetahui perlakuan mana yang berbeda secara signifikan dilakukan uji *post hoc Tukey*, dengan kriteria bahwa apabila satu pasang perlakuan menghasilkan probabilitas  $\leq$  *level of significance* ( $\alpha = 5\%$ ) maka dapat dinyatakan terdapat perbedaan pengaruh pemberian ekstrak daun murbei hitam terhadap pencegahan perlekatan biofilm *E. coli* secara signifikan. Hasil uji *pos hoc Tukey* data pencegahan perlekatan biofilm dapat dilihat pada tabel 5.4 berikut.

**Tabel 5.4** Hasil Uji *Pos Hoc Tukey* Data Pencegahan Perlekatan Biofilm

| Perlakuan  | Nilai probabilitas |        |        |               |               |               |               |               |
|------------|--------------------|--------|--------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|            | K-                 | K+     | Km     | 0,01<br>mg/mL | 0,02<br>mg/mL | 0,04<br>mg/mL | 0,08<br>mg/mL | 0,16<br>mg/mL |
| K-         |                    | *0.000 | *0.000 | 0.301         | *0.042        | *0.011        | *0.001        | 0.496         |
| K+         | *0.000             |        | *0.011 | *0.000        | *0.000        | *0.000        | *0.000        | *0.000        |
| Km         | *0.000             | *0.011 |        | *0.000        | *0.000        | *0.000        | *0.000        | *0.000        |
| 0,01 mg/mL | 0.301              | *0.000 | *0.000 |               | 0.936         | 0.613         | 0.063         | 1.000         |
| 0,02 mg/mL | *0.042             | *0.000 | *0.000 | 0.936         |               | 0.996         | 0.405         | 0.783         |
| 0,04 mg/mL | *0.011             | *0.000 | *0.000 | 0.613         | 0.996         |               | 0.792         | 0.396         |
| 0,08 mg/mL | *0.001             | *0.000 | *0.000 | 0.063         | 0.405         | 0.792         |               | *0.031        |
| 0,16 mg/mL | 0.496              | *0.000 | *0.000 | 1.000         | 0.783         | 0.396         | *0.031        |               |

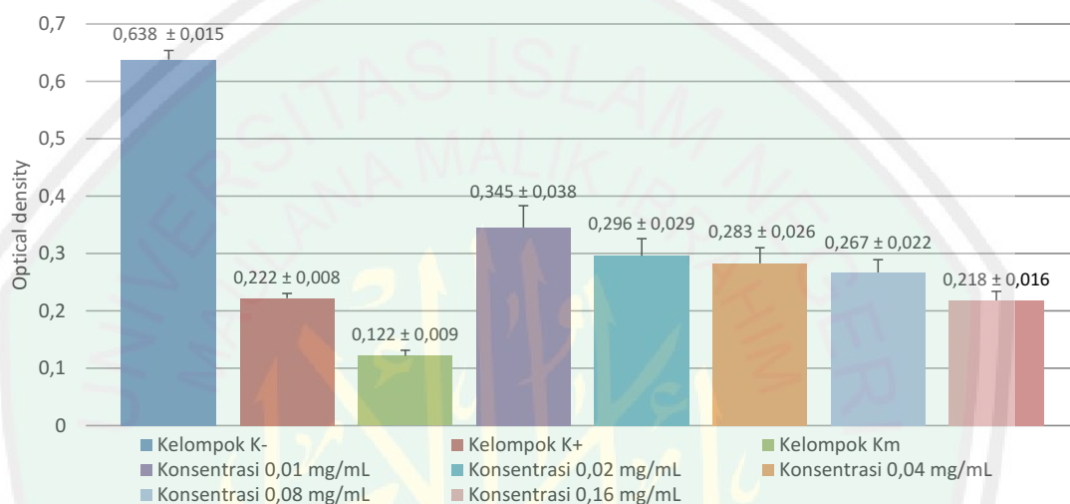
Tanda \* menunjukkan terdapat perbedaan signifikan pada kelompok yang dibandingkan.

Selanjutnya data diuji dengan uji korelasi Pearson untuk mengetahui hubungan tingkat pemberian konsentrasi ekstrak daun murbei hitam terhadap pencegahan perlekatan biofilm *E. coli*. Hasil uji korelasi Pearson pencegahan perlekatan biofilm *E. coli* didapatkan nilai signifikansi  $p = 0,663$  ( $p > 0,05$ ) yang artinya tidak ada korelasi antara besarnya konsentrasi ekstrak yang digunakan dengan tingkat pencegahan perlekatan biofilm (ditunjukkan dengan nilai OD yang diperoleh). Hubungan konsentrasi ekstrak dengan nilai OD menunjukkan arah korelasi positif, yang berarti semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka semakin tinggi nilai OD yang dihasilkan (tingkat pencegahan perlekatan biofilm semakin rendah).

#### 5.1.7.2 Hasil Uji Penghambatan Pertumbuhan Biofilm *E. coli*

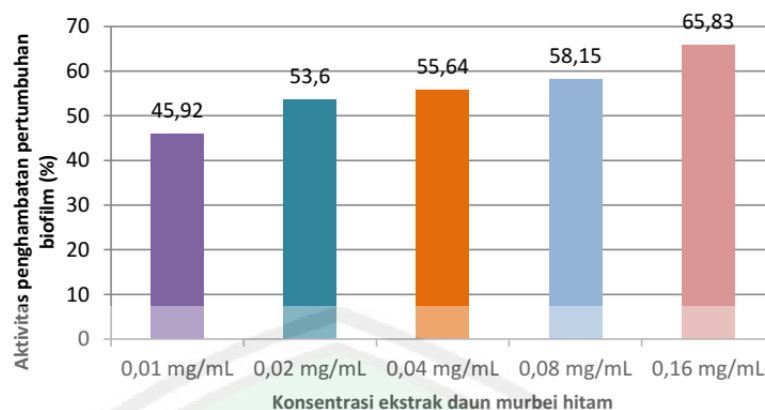
Hasil uji penghambatan pertumbuhan biofilm *E. coli* oleh ekstrak daun murbei hitam menunjukkan bahwa terjadi penurunan pertumbuhan biofilm seiring dengan peningkatan dosis ekstrak daun murbei hitam. Hal ini dapat dilihat dari adanya penurunan nilai OD pada kelompok uji seiring dengan peningkatan dosis ekstrak

yang diberikan. Nilai OD tertinggi pada kelompok uji terlihat pada konsentrasi 0,01 mg/mL yaitu sebesar 0,345. Selanjutnya nilai OD semakin menurun hingga mencapai nilai terendah pada konsentrasi 0,16 mg/mL dengan OD sebesar 0,218. Kontrol negatif memiliki nilai OD tertinggi dari semua kelompok perlakuan dan kontrol media memiliki nilai OD terendah dari semua perlakuan. Hasil uji penghambatan pertumbuhan biofilm *E. coli* dapat dilihat pada Gambar 5.9.



**Gambar 5.9** Hasil *Optical Density* (OD) uji penghambatan pertumbuhan biofilm *E. coli*.

Aktivitas penghambatan pertumbuhan biofilm menunjukkan hasil yang semakin meningkat seiring dengan penambahan dosis ekstrak daun murbei hitam yang digunakan. Aktivitas penghambatan pertumbuhan tertinggi terlihat pada konsentrasi ekstrak daun murbei hitam 0,16 mg/mL dengan persentase daya hambat sebesar 65,83%, sedangkan aktivitas daya hambat terendah terlihat pada ekstrak dengan konsentrasi 0,01 mg/mL dengan persentase daya hambat sebesar 45,92%. Hasil aktivitas penghambatan pertumbuhan dapat dilihat pada Gambar 5.10 berikut.



**Gambar 5.10** Persentase aktivitas penghambatan pertumbuhan biofilm pada uji penghambatan pertumbuhan biofilm *E. coli*.

Data uji penghambatan pertumbuhan biofilm dianalisis secara statistik menggunakan SPSS versi 25. Pada uji normalitas *Saphiro Wilk* didapatkan data terdistribusi normal ( $p \geq 0,05$ ) dan pada uji homogenitas *Lavene's test* didapatkan data terdistribusi homogen ( $p \geq 0,05$ ). Selanjutnya data diuji dengan uji *one-way ANOVA* untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan. Hasil uji *one-way ANOVA* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan uji penghambatan pertumbuhan biofilm ( $p \leq 0,05$ ) dengan nilai  $p = 0,000$ . Untuk mengetahui perlakuan mana yang berbeda secara signifikan dilakukan uji *post hoc Tukey*. Untuk mengetahui perlakuan mana yang berbeda secara signifikan dilakukan uji *post hoc Tukey*, dengan kriteria bahwa apabila satu pasang perlakuan menghasilkan probabilitas  $\leq \text{level of significance}$  ( $\alpha = 5\%$ ) maka dapat dinyatakan terdapat perbedaan pengaruh pemberian ekstrak daun murbei hitam terhadap penghambatan pertumbuhan biofilm *E. coli* secara signifikan. Hasil uji *pos hoc Tukey* data penghambatan pertumbuhan biofilm dapat dilihat pada tabel 5.5 berikut.

**Tabel 5.5** Hasil Uji *Pos Hoc Tukey* Data Penghambatan Pertumbuhan Biofilm

| Perlakuan  | Nilai probabilitas |        |        |               |               |               |               |               |
|------------|--------------------|--------|--------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|            | K-                 | K+     | Km     | 0,01<br>mg/mL | 0,02<br>mg/mL | 0,04<br>mg/mL | 0,08<br>mg/mL | 0,16<br>mg/mL |
| K-         |                    | *0.000 | *0.000 | *0.000        | *0.000        | *0.000        | *0.000        | *0.000        |
| K+         | *0.000             |        | *0.001 | *0.000        | *0.020        | 0.071         | 0.295         | 1.000         |
| Km         | *0.000             | *0.001 |        | *0.000        | *0.000        | *0.000        | *0.000        | *0.002        |
| 0,01 mg/mL | *0.000             | *0.000 | *0.000 |               | 0.213         | 0.066         | *0.013        | *0.000        |
| 0,02 mg/mL | *0.000             | *0.020 | *0.000 | 0.213         |               | 0.997         | 0.781         | *0.013        |
| 0,04 mg/mL | *0.000             | 0.071  | *0.000 | 0.066         | 0.997         |               | 0.986         | *0.047        |
| 0,08 mg/mL | *0.000             | 0.295  | *0.000 | *0.013        | 0.781         | 0.986         |               | 0.213         |
| 0,16 mg/mL | *0.000             | 1.000  | *0.002 | *0.000        | *0.013        | *0.047        | 0.213         |               |

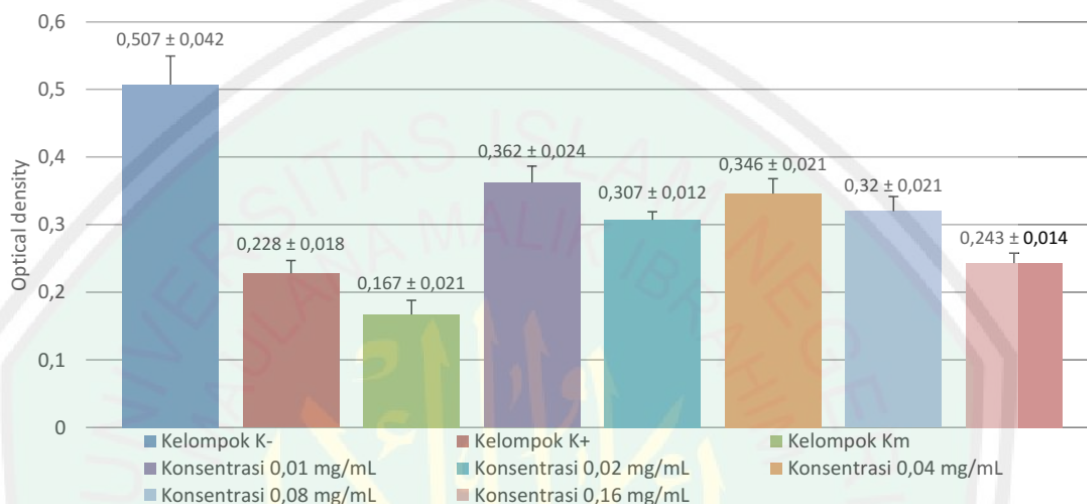
Tanda \* menunjukkan terdapat perbedaan signifikan pada kelompok yang dibandingkan.

Selanjutnya data diuji dengan uji korelasi Pearson untuk mengetahui hubungan tingkat pemberian konsentrasi ekstrak daun murbei hitam terhadap penghambatan pertumbuhan biofilm *E. coli*. Hasil uji korelasi Pearson uji penghambatan pertumbuhan biofilm *E. coli* didapatkan nilai signifikansi  $p = 0,000$  ( $p < 0,05$ ) yang artinya terdapat korelasi antara besarnya konsentrasi ekstrak yang digunakan dengan tingkat penghambatan pertumbuhan biofilm (ditunjukkan dari nilai OD yang diperoleh). Korelasi menunjukkan hubungan yang sangat kuat dengan nilai korelasi  $r = 0,852$  dan arah korelasi negatif. Hal tersebut berarti semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka semakin rendah nilai OD yang dihasilkan (tingkat penghambatan pertumbuhan biofilm semakin tinggi).

#### 5.1.7.3 Hasil Uji Penghancuran Biofilm *E. coli*

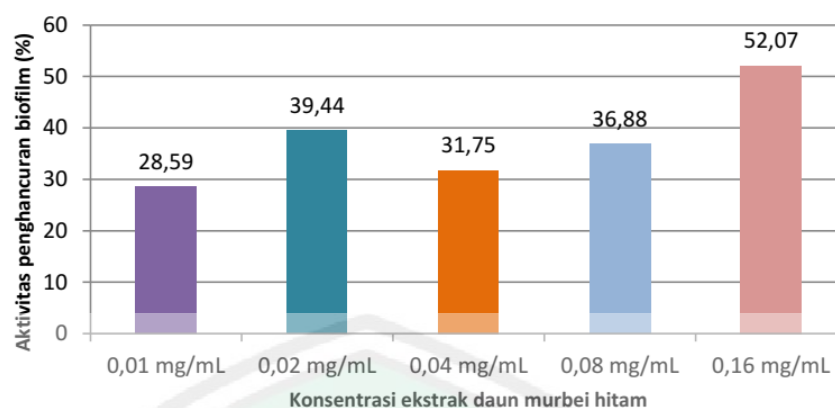
Hasil OD uji penghancuran biofilm *E. coli* menunjukkan bahwa kontrol negatif memiliki nilai OD tertinggi dari semua kelompok perlakuan dan kontrol media memiliki nilai OD terendah dari semua kelompok perlakuan. Nilai OD tertinggi pada kelompok uji terlihat pada konsentrasi 0,01 mg/mL yaitu sebesar

0,362. Nilai OD menurun pada konsentrasi 0,02 mg/mL dan kembali meningkat pada konsentrasi 0,04 mg/mL. Selanjutnya nilai OD terus menurun hingga konsentrasi 0,16 mg/mL dan mencapai nilai OD terendah sebesar 0,243. Hasil uji penghancuran biofilm *E. coli* oleh ekstrak daun murbei hitam dapat dilihat pada Gambar 5.11 berikut.



**Gambar 5.11** Hasil *Optical Density* (OD) uji penghancuran biofilm *E. coli*.

Aktivitas penghancuran biofilm tertinggi terlihat pada konsentrasi ekstrak daun murbei hitam 0,16 mg/mL yaitu sebesar 65,83%, sedangkan aktivitas penghancuran biofilm terendah terlihat pada ekstrak dengan konsentrasi 0,01 mg/mL yaitu sebesar 45,92%. Hasil aktivitas penghancuran biofilm dapat dilihat pada Gambar 5.12 berikut.



**Gambar 5.12** Persentase aktivitas penghancuran biofilm pada uji penghancuran biofilm *E. coli*.

Data uji penghancuran biofilm dianalisis secara statistik menggunakan SPSS versi 25. Pada uji normalitas *Saphiro Wilk* didapatkan data terdistribusi normal ( $p \geq 0,05$ ) dan pada uji homogenitas *Lavene's test* didapatkan data terdistribusi homogen ( $p \geq 0,05$ ). Selanjutnya data diuji dengan uji *one-way ANOVA* untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan. Hasil uji *one-way ANOVA* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan uji penghancuran biofilm ( $p \leq 0,05$ ) dengan nilai  $p = 0,000$ . Untuk mengetahui perlakuan mana yang berbeda secara signifikan dilakukan uji *post hoc Tukey*. Untuk mengetahui perlakuan mana yang berbeda secara signifikan dilakukan uji *post hoc Tukey*, dengan kriteria bahwa apabila satu pasang perlakuan menghasilkan probabilitas  $\leq$  level of significance ( $\alpha = 5\%$ ) maka dapat dinyatakan terdapat perbedaan pengaruh pemberian ekstrak daun murbei hitam terhadap penghancuran biofilm *E. coli* secara signifikan. Hasil uji *pos hoc Tukey* data penghancuran biofilm dapat dilihat pada tabel 5.6 berikut.

**Tabel 5.6** Hasil Uji *Pos Hoc Tukey* Data Penghancuran Biofilm

| Perlakuan  | Nilai probabilitas |        |        |               |               |               |               |               |
|------------|--------------------|--------|--------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|            | K-                 | K+     | Km     | 0,01<br>mg/mL | 0,02<br>mg/mL | 0,04<br>mg/mL | 0,08<br>mg/mL | 0,16<br>mg/mL |
| K-         |                    | *0.000 | *0.000 | *0.000        | *0.000        | *0.000        | *0.000        | *0.000        |
| K+         | *0.000             |        | 0.091  | *0.000        | *0.016        | *0.000        | *0.004        | 0.991         |
| Km         | *0.000             | 0.091  |        | *0.000        | *0.000        | *0.000        | *0.000        | *0.021        |
| 0,01 mg/mL | *0.000             | *0.000 | *0.000 |               | 0.151         | 0.989         | 0.413         | *0.000        |
| 0,02 mg/mL | *0.000             | *0.016 | *0.000 | 0.151         |               | 0.498         | 0.997         | 0.073         |
| 0,04 mg/mL | *0.000             | *0.000 | *0.000 | 0.989         | 0.498         |               | 0.865         | *0.001        |
| 0,08 mg/mL | *0.000             | *0.004 | *0.000 | 0.413         | 0.997         | 0.865         |               | *0.021        |
| 0,16 mg/mL | *0.000             | 0.991  | *0.021 | *0.000        | 0.073         | *0.001        | *0.021        |               |

Tanda \* menunjukkan terdapat perbedaan signifikan pada kelompok yang dibandingkan.

Selanjutnya data diuji dengan uji korelasi Pearson untuk mengetahui hubungan tingkat pemberian konsentrasi ekstrak daun murbei hitam terhadap penghancuran biofilm *E. coli*. Hasil uji korelasi Pearson uji penghancuran biofilm *E. coli* didapatkan nilai  $p = 0,002$  ( $p < 0,05$ ) yang artinya terdapat korelasi antara besarnya konsentrasi ekstrak daun murbei hitam yang digunakan dengan tingkat penghancuran biofilm (ditunjukkan dari nilai OD yang diperoleh). Korelasi menunjukkan hubungan yang kuat dengan nilai korelasi  $r = 0,721$  dan arah korelasi negatif. Hal tersebut berarti semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun murbei hitam yang digunakan maka semakin rendah nilai OD yang dihasilkan (tingkat penghancuran biofilm semakin tinggi).

### 5.1.8 Konsentrasi Ekstrak Minimal Antibiofilm

Konsentrasi ekstrak minimal antibiofilm yang diukur terdiri dari MBPC (*Minimum Biofilm Prevention Concentration*) untuk uji pencegahan perlekatan biofilm, MBIC (*Minimum Biofilm Inhibition Concentration*) untuk uji

penghambatan pertumbuhan biofilm, dan MBEC (*Minimum Biofilm Eradication Concentration*) untuk uji penghancuran biofilm.

#### 5.1.8.1 MBPC Uji Pencegahan Perlekatan Biofilm *E. coli*

MBPC<sub>50</sub> didapatkan dari konsentrasi ekstrak daun murbei hitam terendah yang dapat mencegah perlekatan 50% biofilm *E. coli*. Sedangkan MBPC<sub>90</sub> dihitung dari konsentrasi ekstrak daun murbei hitam terendah yang dapat mencegah perlekatan 90% biofilm *E. coli*. MBPC uji pencegahan perlekatan biofilm *E. coli* dapat dilihat pada tabel 5.7.

**Tabel 5.7** Hasil MBPC uji pencegahan perlekatan biofilm *E. coli*

| Konsentrasi ekstrak<br>(mg/mL) | % Pencegahan perlekatan<br>biofilm | MBPC <sub>50</sub> | MBPC <sub>90</sub> |
|--------------------------------|------------------------------------|--------------------|--------------------|
| 0,01                           | 9,63%                              | tidak ada          | tidak ada          |
| 0,02                           | 14,25%                             | konsentrasi        | konsentrasi        |
| 0,04                           | 17,06%                             | ekstrak            | ekstrak            |
| 0,08                           | 23,09%                             | yang               | yang               |
| 0,16                           | 8,03%                              | memenuhi           | memenuhi           |

Pada uji pencegahan perlekatan biofilm *E. coli*, semua konsentrasi ekstrak daun murbei hitam tidak memenuhi MBPC<sub>50</sub> maupun MBPC<sub>90</sub> karena persentase pencegahan perlekatan biofilm tertinggi hanya sebesar 23,09%.

#### 5.1.8.2 MBIC Uji Penghambatan Pertumbuhan Biofilm *E. coli*

MBIC<sub>50</sub> didapatkan dari konsentrasi ekstrak daun murbei hitam terendah yang dapat menghambat pertumbuhan 50% biofilm *E. coli*. Sedangkan MBIC<sub>90</sub> dihitung dari konsentrasi ekstrak daun murbei hitam terendah yang dapat menghambat pertumbuhan 90% biofilm *E. coli*. MBIC uji penghambatan pertumbuhan biofilm *E. coli* dapat dilihat pada tabel 5.8 berikut.

**Tabel 5.8** Hasil MBIC uji penghambatan pertumbuhan biofilm *E. coli*

| Konsentrasi ekstrak (mg/mL) | % Penghambatan pertumbuhan biofilm | MBIC <sub>50</sub> | MBIC <sub>90</sub>                          |
|-----------------------------|------------------------------------|--------------------|---------------------------------------------|
| 0,01                        | 45,92 %                            | 0,02 mg/mL         | tidak ada konsentrasi ekstrak yang memenuhi |
| 0,02                        | 53,60 %                            |                    |                                             |
| 0,04                        | 55,64 %                            |                    |                                             |
| 0,08                        | 58,15 %                            |                    |                                             |
| 0,16                        | 65,83 %                            |                    |                                             |

Pada uji penghambatan pertumbuhan biofilm *E. coli*, MBIC<sub>50</sub> terlihat pada konsentrasi 0,02 mg/mL yaitu sebesar 53,60%. Namun tidak ada konsentrasi ekstrak daun murbei hitam yang memenuhi MBIC<sub>90</sub> karena persentase penghambatan pertumbuhan biofilm *E. coli* tidak ada yang mencapai 90%.

#### 5.1.8.3 MBEC Uji Penghancuran Biofilm *E. coli*

MBEC<sub>50</sub> didapatkan dari konsentrasi ekstrak daun murbei hitam terendah yang dapat menghancurkan 50% biofilm *E. coli*. Sedangkan MBEC<sub>90</sub> dihitung dari konsentrasi ekstrak daun murbei hitam terendah yang dapat menghancurkan 90% biofilm *E. coli*. MBEC uji penghancuran biofilm *E. coli* dapat dilihat pada tabel 5.9 berikut.

**Tabel 5.9** Hasil MBEC uji penghancuran biofilm *E. coli*

| Konsentrasi ekstrak (mg/mL) | % Penghancuran biofilm | MBEC <sub>50</sub> | MBEC <sub>90</sub>                          |
|-----------------------------|------------------------|--------------------|---------------------------------------------|
| 0,01                        | 28,59 %                | 0,16 mg/mL         | tidak ada konsentrasi ekstrak yang memenuhi |
| 0,02                        | 39,44 %                |                    |                                             |
| 0,04                        | 31,75 %                |                    |                                             |
| 0,08                        | 36,88 %                |                    |                                             |
| 0,16                        | 52,07 %                |                    |                                             |

Pada uji penghancuran biofilm *E. coli*, MBEC<sub>50</sub> terlihat pada konsentrasi 0,16 mg/mL yaitu sebesar 52,07%. Namun tidak ada konsentrasi ekstrak daun murbei hitam yang memenuhi MBEC<sub>90</sub> karena persentase penghancuran biofilm *E. coli* tidak ada yang mencapai 90%.

## 5.2 Pembahasan

Salah satu tanaman yang banyak dijumpai di Indonesia adalah murbei hitam (*Morus nigra*). Tanaman tersebut dapat tumbuh subur di iklim tropis. Tanaman murbei hitam memiliki manfaat multiguna, diantaranya sebagai pakan ulat sutra dan obat. Tanaman dari genus *Morus* mengandung kadar senyawa turunan fenol yang tinggi, terutama spesies *Morus nigra*. Berdasarkan penelitian Budiman *et al.* (2017), *Morus nigra* memiliki kandungan senyawa turunan fenol tertinggi diantara spesies Genus *Morus* lainnya sehingga tanaman *Morus nigra* dianggap potensial sebagai obat.

Daun murbei yang digunakan dalam penelitian ini merupakan daun murbei yang masih muda, yaitu 5-7 daun yang dipetik dari pucuk. Daun murbei muda dilaporkan memiliki kandungan senyawa aktif yang lebih tinggi dibanding daun murbei tua. Setelah dipanen daun murbei dicuci untuk membersihkan dari kotoran dan hama. Daun murbei diangin-anginkan selama satu malam selanjutnya dikeringkan di dalam oven dengan suhu 40°C. Suhu tersebut dipilih berdasarkan rekomendasi Departemen Kesehatan RI (1985) yang menyatakan bahwa herbal yang mengandung senyawa aktif tidak tahan panas atau mudah menguap harus dikeringkan pada suhu rendah (30°-45°C) atau menggunakan pengeringan vakum.

Simplisia daun murbei diekstrak menggunakan metode ultrasonik/*Ultrasonic Assisted Extraction* (UAE). Metode tersebut dipilih berdasarkan Wen *et al.* (2019)

yang menyatakan bahwa UAE termasuk metode ekstraksi yang efisien untuk mengekstrak senyawa bioaktif murbei. Cavuldak *et al.* (2019) juga menyatakan bahwa UAE merupakan metode yang potensial untuk mengekstrak kandungan antioksidan dan senyawa fenolik pada *Morus nigra*. Metode ini dapat menghemat waktu, energi dan jumlah pelarut yang diperlukan. Energi ultrasonik untuk ekstraksi juga mampu memfasilitasi pencampuran yang lebih efektif, transfer energi lebih cepat, menurunkan gradien suhu dan suhu ekstraksi, ekstraksi bersifat selektif, mengurangi ukuran bahan, kontrol proses ekstraksi lebih cepat, meningkatkan produktivitas, dan mengurangi langkah proses ekstraksi. Pelarut yang digunakan dalam ekstraksi adalah etanol 96%. Menurut Dent *et al.* (2013), etanol termasuk pelarut yang paling cocok digunakan untuk mengekstrak tumbuhan polifenol karena perbedaan polaritas unsur bioaktifnya dan merupakan pelarut yang dapat diterima untuk dikonsumsi manusia.

Ekstrak daun murbei hitam diuji fitokimia untuk mengetahui kandungan senyawa aktif secara kualitatif. Uji fitokimia yang dilakukan meliputi uji senyawa flavonoid, tanin, saponin, fenolik, alkaloid, terpenoid, dan steroid. Uji kandungan tanin, fenolik, terpenoid, dan steroid menunjukkan hasil positif, sedangkan uji kandungan flavonoid, saponin, dan alkaloid menunjukkan hasil negatif. Hasil yang didapat pada penelitian ini berbeda dengan penelitian sebelumnya. Penelitian yang dilakukan Aulifa *et al.* (2018) menyatakan bahwa ekstrak etanol daun murbei hitam mengandung flavonoid, tanin, monoterpenoid, dan quinone, tetapi tidak mengandung alkaloid, steroid, terpenoid, saponin, dan fenolik. Senyawa aktif pada daun murbei hitam yang didapatkan pada penelitian Hussain *et al.* (2017) adalah steroid, alkaloid, dan flavonoid. Sedangkan berdasarkan penelitian

Padilha *et al.* (2010), ekstrak daun murbei hitam mengandung steroid dan triterpenoid, tetapi tidak mengandung tannin, alkaloid, saponin, dan flavonoid. Perbedaan kandungan metabolit sekunder pada daun murbei hitam tersebut dapat disebabkan oleh berbagai faktor, terutama faktor lingkungan yaitu suhu, kelembapan, ketersediaan air, cahaya matahari, sifat fisika dan kimia tanah, dan iklim (Alvita, 2015).

Proses pemanasan yang terjadi pada saat pembuatan simplisia dapat menjadi salah satu penyebab tidak ditemukannya senyawa flavonoid pada ekstrak daun murbei hitam. Flavonoid merupakan senyawa yang sensitif terhadap suhu tinggi sehingga proses pemanasan dapat menurunkan kadar flavonoid hingga 15-78%. Penggunaan suhu di atas 50°C dapat merusak flavonoid. Pada penelitian ini, proses pemanasan dilakukan saat pengeringan daun murbei, yaitu dikeringkan di dalam oven pada suhu 40°C. Meskipun penggunaan suhu pada penelitian ini masih dalam rentang yang direkomendasikan oleh Departemen Kesehatan RI (1985), pemanasan tersebut dapat menjadi salah satu penyebab menurunnya atau hilangnya kandungan senyawa aktif pada ekstrak.

Pemilihan variasi konsentrasi ekstrak daun murbei pada penelitian ini didasarkan pada penelitian Ramadhan *et al.* (2017) yang meneliti mengenai efek ekstrak daun murbei (*Morus alba*) terhadap *E. coli*. Pada penelitian tersebut diperoleh hasil MIC ekstrak daun murbei terhadap *E. coli* sebesar 0,32 mg/mL dan MBC sebesar 0,64 mg/mL. Menurut Famuyide *et al.* (2019), aktivitas antimikroba pada ekstrak tumbuhan dapat diklasifikasikan sebagai poten (MIC < 0,1 mg/mL), sedang ( $0,1 \leq \text{MIC} \leq 0,625$  mg/mL), dan lemah (MIC > 0,625 mg/mL). Berdasarkan hasil penelitian oleh Ramadhan *et al.* (2017) dapat

diketahui bahwa ekstrak daun murbei memiliki aktivitas antimikroba dengan kekuatan sedang.

Pada uji pendahuluan, peneliti menguji aktivitas antibiofilm ekstrak daun murbei hitam terhadap biofilm *E. coli* dengan menggunakan dasar MIC sebesar 0,32 mg/mL dari penelitian Ramadhan *et al.* (2017). Variasi konsentrasi yang digunakan adalah 16MIC, 8MIC, 4MIC, 2MIC, MIC, 1/2MIC, 1/4MIC, dan 1/8MIC, sehingga diperoleh konsentrasi 5,12 mg/mL, 2,56 mg/mL, 1,28 mg/mL, 0,64 mg/mL, 0,32 mg/mL, 0,16 mg/mL, 0,08 mg/mL, dan 0,04 mg/mL. Berdasarkan hasil uji pendahuluan didapatkan bahwa penggunaan *sub-inhibitory concentration* (SIC) yaitu 1/2MIC, 1/4 MIC, dan 1/8MIC menunjukkan hasil aktivitas antibiofilm yang lebih baik dibanding MIC atau konsentrasi di atas MIC. Hal ini dapat dibuktikan pada konsentrasi 0,04 mg/mL-0,16 mg/mL yang menunjukkan adanya peningkatan aktivitas antibiofilm seiring dengan peningkatan dosis ekstrak yang digunakan. Sedangkan konsentrasi 0,32 mg/mL-5,12 mg/mL menunjukkan hasil sebaliknya, yaitu terjadi penurunan aktivitas antibiofilm seiring dengan peningkatan dosis ekstrak yang digunakan.

Berdasarkan hasil uji pendahuluan, peneliti menggunakan *sub-inhibitory concentration* (SIC) dalam menentukan variasi konsentrasi ekstrak daun murbei hitam pada penelitian ini. SIC yang digunakan yaitu 1/2MIC, 1/4MIC, 1/8MIC, 1/16MIC, dan 1/32MIC, sehingga diperoleh konsentrasi ekstrak daun murbei 0,16 mg/mL, 0,08 mg/mL, 0,04 mg/mL, 0,02 mg/mL, dan 0,01 mg/mL. Penggunaan ekstrak dengan konsentrasi SIC diharapkan tidak akan mempengaruhi pertumbuhan sel planktonik *E. coli*. Pembuatan variasi konsentrasi ekstrak diawali dengan membuat larutan ekstrak dengan konsentrasi 0,64 mg/mL sebagai larutan

stok, yaitu dengan melarutkan 6,4 mg ekstrak ke dalam 10 ml DMSO 10%. Selanjutnya dilakukan dilusi serial untuk mendapatkan konsentrasi 0,16 mg/ml, 0,08 mg/mL, 0,04 mg/mL, 0,02 mg/mL, dan 0,01 mg/mL. Konsentrasi DMSO yang digunakan tidak lebih dari 10% karena dapat menghambat pertumbuhan bakteri (Nikolic *et al.*, 2014).

Bakteri uji yang digunakan pada penelitian ini adalah *E. coli* pembentuk biofilm yang diisolasi dari pasien infeksi saluran kemih, sehingga bakteri uji dapat digolongkan sebagai bakteri patogen (UPEC). Prevalensi gen yang mengode protein adhesin pada strain *E. coli* komensal dan pada UPEC telah diteliti oleh Qin *et al* (2013). Gen yang mengode fimbria tipe P ditemukan pada 28% isolat UPEC dan hanya 5% pada strain *E. coli* komensal. Gen yang mengode adhesin afimbrial *Afa* ditemukan pada 36% isolat UPEC dan tidak ditemukan pada strain *E. coli* komensal. Gen *iroN*, *iutA*, *ompT* dan *hlyF* lebih sering terdeteksi pada isolat klinis ExPEC dibanding isolat komensal. Maka dapat diketahui bahwa faktor virulensi bakteri lebih banyak ditemukan pada bakteri patogen dibanding bakteri komensal.

Efek senyawa aktif suatu ekstrak dapat memberikan hasil yang berbeda antara bakteri patogen dan bakteri non patogen/komensal. Berdasarkan Upadhyay *et al.* (2014) *plant-derived antimicrobial* memiliki efek bakterisidal yang tinggi terhadap patogen tetapi memiliki efek antimikroba yang rendah terhadap bakteri komensal. Derajat penghambatan senyawa antimikroba pada tanaman lebih tinggi terhadap bakteri patogen dibanding bakteri komensal. Menurut Pelczar dan Chan (1998) dalam Rahmawati (2014), reaksi sel bakteri terhadap senyawa fenolik dipengaruhi oleh ketebalan dinding sel bakteri patogen dan non patogen. Dinding

sel bakteri non patogen akan mengalami dehidrasi yang menyebabkan pori-pori mengecil, sehingga daya rembes dinding sel dan fungsi membran menurun. Pada bakteri patogen lipid akan terekstrasi dari dinding sel sehingga pori-pori mengembang yang menyebabkan daya rembes sel dan fungsi membran meningkat. Hal tersebut akan memicu terjadinya penyerapan yang tidak terkontrol sehingga akan merusak komponen dinding sel bakteri patogen.

Isolat bakteri uji dilakukan identifikasi secara fenotip untuk memastikan bahwa bakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah *E. coli*. Identifikasi bakteri uji meliputi uji mikroskopis, uji makroskopis, dan uji biokimia. Pewarnaan Gram pada uji mikroskopis bertujuan untuk mengidentifikasi bentuk, ukuran, dan susunan bakteri. Bakteri uji terlihat berbentuk basil dan berwarna merah, sehingga dapat digolongkan bakteri Gram negatif. Hasil tersebut sesuai dengan morfologi dan sifat *E. coli*. Bakteri Gram negatif memiliki dinding peptidolikan yang tipis (satu lapis) dan mengandung lebih banyak lipid daripada bakteri Gram positif. Pemberian *decolorized agent* (alkohol) menyebabkan terekstraksinya lipid dan memperbesar permeabilitas dinding sel sehingga bakteri Gram negatif tidak mampu mempertahankan kompleks kristal violet. Bakteri Gram negatif selanjutnya akan dapat menyerap pewarna safranin dan sel menjadi berwarna merah. Sedangkan bakteri Gram positif memiliki peptidoglikan yang lebih tebal sehingga saat diberikan alkohol, dinding sel mengalami dehidrasi, pori-pori mengerut, daya serap dinding sel menurun sehingga pewarna safranin tidak dapat masuk ke dalam sel dan sel tetap berwarna keunguan (Alvita, 2015).

Bakteri Gram negatif secara umum lebih resisten terhadap ekstrak tumbuhan daripada bakteri Gram positif. Hal ini disebabkan karena perbedaan morfologi

dinding sel kedua bakteri tersebut. Bakteri Gram negatif memiliki lapisan luar lipopolisakarida hidrofilik yang tingkat resistensinya lebih tinggi terhadap penetrasi agen antibakteri dan memiliki beberapa enzim di periplasma yang dapat memecah molekul antibakteri (Famuyide *et al.*, 2019).

Pada uji makroskopis, bakteri uji ditumbuhkan pada media diferensial EMB. Bakteri uji terlihat memiliki koloni berbentuk bulat dan berwarna merah, tepi koloni tidak rata, elevansi koloni cembung, dan konsistensi koloni non mukoid. Hasil tersebut sesuai dengan ciri khas *E. coli*. Untuk memastikan bahwa bakteri uji dapat membentuk biofilm, dilakukan uji pertumbuhan pada media CRA. Hasil uji CRA menunjukkan koloni pembentuk biofilm yang ditandai dengan koloni berwarna hitam dengan konsistensi kristal kering.

Uji biokimia yang digunakan adalah uji IMViC. Pada uji indol didapatkan hasil positif karena terbentuk cincin berwarna merah setelah ditetaskan reagen Kovak. Hal ini menandakan bakteri uji memiliki enzim triptofanase yang menghidrolisis triptofan menjadi indol. Uji MRVP digunakan untuk membedakan antibakteri pada famili *Enterobacteriaceae* dan dari basil Gram negatif lainnya. Uji MR menunjukkan hasil positif, artinya terjadi perubahan warna menjadi merah. Uji MR bertujuan untuk mendeteksi organisme yang mampu memfermentasi asam campuran. Uji VP pada bakteri uji menunjukkan hasil negatif karena tidak didapatkan perubahan warna setelah penambahan reagen VP. Uji VP bertujuan untuk mengidentifikasi organisme yang mampu memfermentasi glukosa, tetapi dengan cepat mengubah produk asam menjadi aseton dan 2,3-butadienol. Uji sitrat untuk mengidentifikasi kemampuan bakteri dalam menggunakan sitrat sebagai sumber karbon. Dari uji sitrat didapatkan hasil negatif

karena tidak terdapat perubahan warna maupun pertumbuhan bakteri (Leboffe dan Pierre, 2012).

Uji urease digunakan untuk membedakan suatu organisme berdasarkan kemampuan menghidrolisis urea menjadi amonia dan karbondioksida melalui enzim urease. Dari uji urease didapatkan adanya warna orange atau kuning yang berarti hasil uji urease negatif. Hal ini menunjukkan bahwa bakteri uji tidak menghidrolisis urea, tidak menghasilkan urea, atau tidak dapat hidup di dalam broth tersebut. Pada uji TSI terlihat warna kuning pada *slant* dan *butt* yang menandakan bakteri uji mampu memfermentasikan glukosa, laktosa dan/atau sukrosa dengan adanya akumulasi asam. Pada agar TSI tidak didapatkan adanya endapan kehitaman yang berarti tidak ada pembentukan gas dari H<sub>2</sub>S. H<sub>2</sub>S dihasilkan dari reduksi thiosulfat dalam medium atau pemecahan sistein dalam pepton. *Ferrous sulfat* akan bereaksi dengan H<sub>2</sub>S sehingga terbentuk endapan kehitaman. Agar yang terlihat terangkat menandakan terbentuknya gas, sebagai hasil fermentasi karbohidrat (Leboffe dan Pierre, 2012).

**Tabel 5.10** Karakteristik uji biokimia bakteri dalam Famili *Enterobacteriaceae*

| Tests or Substrate          | Escherichiae | Edwardsiellae | Citrobacteriaceae      | Salmonellae* | Klebsiellae | Proteeae <sup>†</sup> | Yersinia |
|-----------------------------|--------------|---------------|------------------------|--------------|-------------|-----------------------|----------|
| H <sub>2</sub> S (TSI agar) | –            | +             | + or –                 | +            | –           | + or –                | –        |
| Urease                      | –            | –             | (+ <sup>w</sup> ) or – | –            | – or (+)    | + or –                | +        |
| Indole                      | + or –       | +             | – or +                 | –            | –           | + or –                | + or –   |
| Methyl red                  | +            | +             | +                      | +            | –           | +                     | +        |
| Voges-Proskauer             | –            | –             | –                      | –            | +           | –                     | –        |
| Citrate (Simmons)           | –            | –             | +                      | +            | +           | d                     | –        |
| KCN                         | –            | –             | + or –                 | –            | +           | +                     | –        |
| Phenylalanine deaminase     | –            | –             | –                      | –            | –           | +                     | –        |
| Mucate                      | d            | –             | –                      | d            | + or –      | –                     | –        |
| Mannitol                    | + or –       | –             | +                      | +            | +           | – or +                | +        |

Sumber: Mahon CR *et al.*, 2015

Kontrol positif yang digunakan pada penelitian adalah Ciprofloksasin. Ciprofloksasin termasuk antibiotik spektrum luas golongan floroquinolon generasi kedua. Ciprofloksasin digunakan sebagai lini pertama terapi infeksi saluran kemih

(ISK). Penelitian Wojnicz *et al.* (2013) tentang efek konsentrasi *sub-minimum inhibitory* ciprofloksasin, amikacin, dan colistin terhadap pembentukan biofilm dan faktor virulensi sel planktonik dan biofilm *E. coli* yang diisolasi dari urin manusia menyatakan bahwa rentang MIC ciprofloksasin terhadap *E. coli* sebesar 0,007-32 µg/ml dan konsentrasi 1/2MIC ciprofloksasin dapat menurunkan produksi biofilm pada *micoplate*. Sedangkan menurut penelitian Dong *et al.* (2019) mengenai efek sub-MIC ciprofloksasin terhadap biofilm *E. coli*, rentang MIC ciprofloksasin terhadap *E. coli* sebesar 0,015-128 µg/mL dan 1/4MIC merupakan subkonsentrasi terbaik yang mampu menghambat produksi biofilm dan menurunkan ekspresi gen virulensi pada *E. coli*. Penelitian lainnya yang dilakukan Gupta *et al.* (2016) dan Nalca *et al.* (2006) menunjukkan bahwa penggunaan sub-MIC dari beberapa antibiotik seperti azitromicin dan ciprofloksasin dapat menurunkan patogenitas *Pseudomonas aeruginosa* dengan cara menghambat pembentukan biofilm dan faktor virulensi. Pada penelitian ini peneliti menggunakan MIC ciprofloksasin sebesar 128 µg/mL dan menggunakan 1/2MIC yaitu 64 µg/mL sebagai kontrol positif.

Penggunaan subkonsentrasi antibiotik bertujuan agar antibiotik tidak mempengaruhi pertumbuhan sel planktonik *E. coli*. Subkonsentrasi ciprofloksasin dapat menghambat pembentukan biofilm pada *E. coli* dengan cara menghambat ekspresi gen *pgaABCD*, *iron*, *fim*, dan *usp*. Lokus gen *pgaABCD* pada *E. coli* berperan dalam sintesis adhesin polisakarida yang diperlukan untuk pembentukan biofilm. Kluster gen *fim*, yang dikode oleh fimbria tipe 1 memperlancar adhesi bakteri dan invasi bakteri pada sel epitel kandung kemih (Dong *et al.*, 2019).

Pemilihan kontrol negatif berupa media TSB + suspensi bakteri dan kontrol media yang berisi media TSB saja didasarkan pada penelitian Mohsenipour *et al.* (2015).

Pertumbuhan biofilm sangat dipengaruhi oleh suhu, nutrisi, dan komponen pada media yang digunakan. Hasil penelitian oleh Nyenje *et al.* (2013) menyatakan bahwa strain *Enterobacter cloacae* dapat membentuk biofilm yang kuat pada suhu yang lebih tinggi (37°C) dibanding suhu ruang (25°C). Aktivitas antibiofilm suatu ekstrak juga dipengaruhi oleh suhu. Alvita *et al.* (2016) melaporkan bahwa suhu optimum ekstrak daun pepaya terhadap biofilm *E. coli* berada pada suhu 37°C, sedangkan aktivitas antibiofilm pada suhu ruang (25°C) dan suhu 50°C memberikan hasil yang lebih rendah. Hal ini disebabkan penggunaan suhu yang terlalu tinggi dapat merusak senyawa aktif yang terkandung pada ekstrak atau menurunkan aktivitas enzimatis dari ekstrak yang digunakan. Maka peneliti menggunakan suhu 37°C untuk menginduksi pertumbuhan biofilm *E. coli* dan untuk uji aktivitas antibiofilm ekstrak daun murbei hitam terhadap biofilm *E. coli*.

Media yang digunakan untuk menumbuhkan biofilm adalah TSB + glukosa 1%. Pemilihan media didasarkan pada penelitian Mohsenipour *et al.* (2015) yang menggunakan media TSB untuk uji antibiofilm bakteri *E. coli*. Penambahan glukosa pada medium cair dapat meningkatkan kemampuan bakteri untuk membentuk biofilm. Glukosa dapat diberikan dengan konsentrasi 0,25% sampai 4%. Stepanovic *et al.* (2007) juga merekomendasikan menggunakan TSB + glukosa 1% atau BHI + sukrosa 2% + glukosa 2% untuk menumbuhkan biofilm *S. aureus*.

Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah *microtiter plate biofilm assay*. Metode tersebut merupakan metode mikrodilusi cair menggunakan *microplate* yang dapat memberikan hasil kuantitatif mengenai aktivitas antibiofilm ekstrak daun murbei hitam terhadap biofilm *E. coli*. *Microplate* yang digunakan berbahan PVC dengan *flat-bottom*. PVC adalah suatu permukaan anorganik yang bersifat hidrofobik. Kekuatan interaksi hidrofobik dianggap sebagai ikatan yang sangat berperan dalam proses penempelan bakteri. Metode ini dipilih karena sederhana, mudah dikerjakan, dan dapat memberikan hasil secara kuantitatif.

Pencucian merupakan langkah penting dalam proses uji antibiofilm. Pencucian bertujuan untuk menghilangkan semua sel yang tidak melekat pada *microplate* dengan tetap mempertahankan integritas biofilm. Proses pencucian pada penelitian ini dilakukan menggunakan larutan PBS sebanyak tiga kali pada setiap proses. Hal ini sesuai rekomendasi Stepanovic *et al.* (2007) yang menyatakan bahwa pencucian yang dilakukan sebanyak dua kali kurang efektif dan merekomendasikan pencucian sebanyak tiga hingga empat kali. Pencucian dapat dilakukan dengan metode *washing roboter* yang dapat mencuci dengan sangat lembut, namun hal ini dapat memicu hasil positif palsu. Sedangkan pencucian dengan *pipetting* menggunakan mikropipet dapat menyebabkan kerusakan biofilm sehingga memberikan hasil negatif palsu. Berdasarkan penelitian oleh Stepanovic *et al.* (2007), proses pencucian yang dilakukan dengan cara *pipetting* menggunakan mikropipet secara hati-hati tidak merusak integritas biofilm. Maka pada penelitian ini peneliti melakukan pencucian dengan metode *pipetting* menggunakan mikropipet.

Pewarnaan biofilm menggunakan kristal violet 1% bertujuan untuk mewarnai biofilm, yaitu sel bakteri dan matriks EPS. Kristal violet dapat berikatan dengan muatan negatif pada permukaan molekul dan polisakarida pada EPS. Hal ini menyebabkan pewarna kristal violet 1% yang telah mewarnai biofilm tidak akan hilang saat dilakukan pencucian. Pada penelitian ini biofilm *E. coli* yang terwarnai tampak seperti cincin berwarna ungu di permukaan bagian atas *well*. Hasil tersebut sesuai dengan penelitian Sari *et al.* (2014) mengenai penelusuran potensi kapulaga, temu putri, dan senggugu sebagai penghambat pembentukan biofilm *E. coli* dan MRSA, yang menyatakan bahwa biofilm *E. coli* berbentuk cincin dan berwarna ungu. Warna ungu yang terbentuk terpusat pada permukaan bagian atas *well* karena *E. coli* termasuk bakteri motil yang dapat melakukan pergerakan. *E. coli* sebagai bakteri fakultatif anaerob cenderung membentuk biofilm dengan pola cincin yang melingkar pada permukaan atas *well* karena membutuhkan oksigen. Penggunaan kristal violet 1% sesuai dengan penelitian Triana (2017) dan Mohsenipour *et al.* (2015).

Banyaknya kristal violet yang terikat berbanding lurus dengan ketebalan biofilm yang terbentuk. Namun beberapa faktor fisika, kimia, dan biologi dapat mempengaruhi kekuatan ikatan kristal violet dengan biofilm. Faktor tersebut diantaranya adalah struktur yang mempengaruhi difusi kristal violet, perbedaan morfologi dan fisiologi dari setiap sel yang mempengaruhi ikatan kristal violet, dan interaksi kimia antara komponen dalam ekstrak dari tumbuhan dan kristal violet (Sari *et al.*, 2014). Pemberian etanol 96% bertujuan untuk melarutkan cincin biofilm yang telah terbentuk. Pengukuran hasil dengan *microplate reader*

menggunakan panjang gelombang 595nm sesuai dengan panjang gelombang kristal violet yang dipakai sebagai zat pewarna (Skogman, 2012).

### **Uji Deteksi Pertumbuhan Biofilm *E. coli***

Uji deteksi pertumbuhan biofilm terhadap bakteri uji dilakukan untuk mengetahui apakah bakteri yang digunakan dalam penelitian mampu membentuk biofilm dan untuk mengetahui kekuatan bakteri uji dalam membentuk biofilm. Suspensi bakteri uji yang digunakan berumur 24 jam dengan OD 0,2 yang diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm. Pemilihan densitas optik dan panjang gelombang didasarkan pada penelitian sebelumnya yakni penelitian Triana (2017) dan Mohsenipour *et al.* (2015) yang menggunakan bakteri *E. coli* dengan densitas optik 0,2 dan panjang gelombang 600 nm. Suspensi bakteri dimasukkan ke dalam *microplate* dan diinkubasi selama 72 jam pada suhu 37°C.

Hasil uji deteksi pembentukan biofilm menunjukkan bahwa bakteri uji memiliki kemampuan membentuk biofilm dengan hasil OD sebesar 0,322. Berdasarkan tingkat kekuatan pembentukan biofilm, bakteri uji termasuk bakteri pembentuk biofilm lemah (*weak-biofilm producer*). Kekuatan bakteri uji tersebut berbeda dengan penelitian Ramadhan *et al.* (2017) dan Nikolic *et al.* (2014) yang menyatakan bahwa *E. coli* termasuk *moderate-biofilm producer*. Hal ini dapat disebabkan dari perbedaan asal bakteri yang digunakan pada penelitian. Kemungkinan penyebab lain adalah karena bakteri uji telah dikultur beberapa kali sehingga patogenesisnya sudah menurun.

### Uji Pencegahan Perlekatan Biofilm *E. coli*

Uji pencegahan perlekatan biofilm bertujuan untuk menguji kemampuan ekstrak etanol daun murbei hitam dalam mencegah perlekatan bakteri pada fase awal pembentukan biofilm. Ekstrak dimasukkan terlebih dahulu ke dalam sumur *mikroplate* dan diharapkan ekstrak dapat melapisi dinding sumur sehingga bakteri tidak dapat melekat. Waktu kontak ekstrak dengan *E. coli* dilakukan selama 60 menit, sesuai dengan penelitian Alvita (2015) yang menyatakan kontak terbaik ekstrak daun singkong dalam mencegah perlekatan biofilm *E. coli* selama 60 menit.

Berdasarkan hasil uji pencegahan perlekatan biofilm, kontrol positif menunjukkan nilai OD yang lebih rendah dari kelompok uji dan memiliki perbedaan bermakna dengan semua konsentrasi ekstrak pada kelompok uji. Hal ini menunjukkan bahwa antibiotik yang digunakan memiliki efek mencegah perlekatan biofilm yang lebih baik daripada ekstrak daun murbei hitam. Pada kelompok uji konsentrasi ekstrak 0,08 mg/mL merupakan konsentrasi paling efektif untuk mencegah perlekatan biofilm karena OD yang dihasilkan paling rendah. Nilai OD pada konsentrasi 0,01 mg/mL sampai dengan konsentrasi 0,08 mg/mL terus menurun, yang menandakan semakin besar dosis konsentrasi ekstrak yang digunakan maka kemampuan dalam mencegah perlekatan biofilm semakin meningkat. Namun pada konsentrasi 0,16 mg/mL yang merupakan konsentrasi terbesar, nilai OD yang dihasilkan paling tinggi dibanding konsentrasi lainnya. Hal ini dapat disebabkan karena terjadinya kejenuhan reaksi senyawa aktif pada ekstrak dengan reseptornya. Hubungan tingkat dosis dan respon suatu agen obat sangat terkait dengan ketersediaan dan karakteristik reseptor obat tersebut dalam

menimbulkan suatu efek. Penurunan efek pada dosis yang lebih tinggi menunjukkan terjadinya kejenuhan reaksi antar molekul obat dengan reseptornya sehingga peningkatan dosis tidak akan menyebabkan peningkatan efek yang timbul (Katzung *et al.*, 2012). Penelitian oleh Wahyudi *et al.* (2018) mengenai pengaruh ekstrak daun kemangi terhadap kadar SGOT dan SGPT tikus putih yang diinduksi MSG menyatakan bahwa hubungan dosis dan respon tidak selalu positif, artinya semakin tinggi dosis tidak selalu diikuti dengan adanya peningkatan efek.

Aktivitas pencegahan perlekatan biofilm tertinggi terlihat pada konsentrasi 0,08 mg/mL dengan persentase sebesar 23,09%. Berdasarkan Famuyide *et al.* (2019), ekstrak dapat digolongkan memiliki aktivitas antibiofilm yang tinggi apabila menghasilkan persentase aktivitas antibiofilm  $\geq 50\%$ , sedangkan persentase 0-49% digolongkan memiliki aktivitas antibiofilm rendah. Maka dapat diketahui bahwa ekstrak daun murbei hitam memiliki aktivitas antibiofilm yang rendah pada uji pencegahan perlekatan biofilm, sehingga kurang efektif digunakan sebagai agen pencegahan perlekatan biofilm *E. coli*. Hasil penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Alvita (2015) menunjukkan bahwa ekstrak daun singkong dapat mencegah perlekatan *E. coli* dengan persentase hasil terbaik sebesar 45,12% pada konsentrasi 100%. Penelitian lainnya oleh Kining *et al.* (2016) menyatakan ekstrak daun pepaya dapat mencegah perlekatan biofilm *Pseudomonas aeruginosa* sebesar 41,176% pada konsentrasi 25%. Semua konsentrasi ekstrak daun murbei hitam tidak ada yang mencapai MBPC<sub>50</sub> dan MBPC<sub>90</sub> karena rendahnya aktivitas pencegahan perlekatan ekstrak daun murbei hitam terhadap biofilm *E. coli*.

Perlekatan sel bakteri pada permukaan merupakan proses penting sebagai awal terbentuknya biofilm. Proses ini sangat dipengaruhi oleh karakteristik fisika dan kimia bakteri, sifat permukaan, dan lingkungan. Faktor biologis bakteri seperti adanya fimbria dan flagel juga mempengaruhi perlekatan pada permukaan. Adanya senyawa tertentu yang tidak menguntungkan sel bakteri akan menghalangi perlekatan sel pada permukaan. Mekanisme pencegahan perlekatan biofilm *E. coli* oleh ekstrak daun murbei hitam adalah melalui efek antiadhesif pada senyawa tanin. Tanin dapat mengikat reseptor permukaan bakteri berupa protein adhesin, sehingga kemampuan bakteri untuk melekat menjadi menurun (Kining *et al.*, 2016). Ikatan tanin dengan reseptor adhesi bakteri dapat memicu pembentukan kanal ion yang menyebabkan ketidakseimbangan potensial listrik pada sel bakteri (Lahiri *et al.*, 2019). Lee *et al.* (2013) menyatakan bahwa asam tanin dapat menghambat biofilm *S. aureus* dengan menekan ekspresi gen *ica* dan gen pengatur lainnya. Gen *ica* merupakan gen yang berkaitan dengan adhesi interseluler. Terpenoid juga memiliki efek antiadhesif sel dan dapat menyebabkan stress kalsium pada sepanjang membrane sel bakteri (Lahiri *et al.*, 2019).

Motilitas merupakan salah satu faktor virulensi yang berperan penting dalam perlekatan awal bakteri pada suatu permukaan, yang merupakan tahap awal pembentukan biofilm. Asam fenolat dapat menurunkan sintesis fimbria pada bakteri. Asam galat dan asam ferulat berpotensi untuk menghambat motilitas sel pada *E. coli* yang diperantarai oleh flagel bakteri, yaitu pergerakan berenang (*swimming*) dan berkerumun (*swarming*). Pergerakan berkerumun dikenal sebagai perilaku sosial bakteri. Ketika sel bakteri yang motil merasakan suatu stimulus tertentu, kemampuan motilitas bakteri dapat membantu bakteri tersebut

bermigrasi ke tempat yang lebih baik. Motilitas juga berperan dalam transisi bakteri dari bentuk planktonik ke *surface-associated life-style*. Dengan adanya penurunan kemampuan motilitas bakterimaka kemampuan bakteri untuk membentuk biofilm juga akan menurun (Borges *et al.*, 2012).

#### **Uji Penghambatan Pertumbuhan Biofilm *E. coli***

Uji kedua yang dilakukan adalah uji penghambatan pertumbuhan biofilm. Ekstrak dimasukkan secara bersamaan dengan bakteri uji sehingga diharapkan ekstrak dapat menghambat pertumbuhan biofilm bakteri uji. Waktu kontak ekstrak dan bakteri uji dilakukan selama 72 jam sesuai dengan penelitian Alvita (2015) yang menyatakan bahwa waktu kontak terbaik ekstrak daun singkong dalam menghambat pertumbuhan biofilm *E. coli* diantara 2,5-3 hari. Penelitian Kining *et al.* (2016) juga menyatakan bahwa waktu kontak 3 hari merupakan waktu terbaik untuk menghambat pertumbuhan biofilm *Pseudomonas aeruginosa*.

Pada uji penghambatan pertumbuhan biofilm, semua konsentrasi ekstrak daun murbei dan kontrol positif memiliki nilai OD yang lebih rendah dan berbeda secara signifikan dengan kontrol negatif. Hal ini menunjukkan bahwa semua konsentrasi ekstrak daun murbei dan kontrol positif mampu menghambat pertumbuhan biofilm. Pada kelompok uji, nilai OD yang dihasilkan semakin menurun seiring peningkatan dosis konsentrasi ekstrak daun murbei hitam yang digunakan. Konsentrasi 0,16 mg/mL menghasilkan nilai OD terendah diantara semua konsentrasi, sehingga konsentrasi tersebut merupakan konsentrasi terbaik untuk menghambat pertumbuhan biofilm bakteri uji. Konsentrasi 0,16 mg/mL juga memiliki nilai OD yang lebih rendah daripada kontrol positif, namun hasil analisis *pos hoc Tukey* menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna

antara konsentrasi 0,08 mg/mL, 0,16 mg/mL, dan kontrol positif. Konsentrasi 0,01 mg/mL memiliki nilai OD tertinggi dari semua konsentrasi, artinya biofilm yang terbentuk paling banyak. Hal ini dikarenakan semakin rendah konsentrasi maka jumlah senyawa aktif yang ada semakin sedikit, sehingga aktivitas antibiofilm semakin menurun.

Konsentrasi ekstrak daun murbei hitam 0,16 mg/mL menunjukkan aktivitas penghambatan terbesar dengan persentase penghambatan sebesar 65,83%. Berdasarkan Famuyide *et al.* (2019), ekstrak dapat digolongkan memiliki aktivitas antibiofilm yang tinggi apabila persentase aktivitas antibiofilm  $\geq 50\%$ , sedangkan persentase 0-49% digolongkan memiliki aktivitas antibiofilm rendah. Maka dapat diketahui bahwa ekstrak daun murbei hitam memiliki aktivitas antibiofilm yang tinggi dalam penghambatan pertumbuhan biofilm *E. coli*. Uji penghambatan pertumbuhan ini memiliki aktivitas antibiofilm terbesar diantara uji antibiofilm lainnya. Penelitian sebelumnya oleh Ramadhan *et al.* (2017) menyatakan bahwa ekstrak etanol daun murbei (*Morus alba*) termasuk *strong biofilm inhibitor* terhadap *E. coli* dan *P. aeruginosa*, yang menunjukkan hasil penghambatan biofilm *E. coli* terbaik pada konsentrasi 0,16 mg/mL dengan persentase penghambatan sebesar 66%. Hasil penelitian Alvita (2015) menunjukkan bahwa ekstrak daun pepaya dapat menghambat pertumbuhan biofilm *E. coli* dengan persentase hasil terbaik sebesar 36,02% pada konsentrasi 100%. Penelitian lainnya oleh Kining *et al.* (2016), ekstrak daun pepaya dapat menghambat pertumbuhan biofilm *Pseudomonas aeruginosa* sebesar 46,748% pada konsentrasi 25%.

MBIC<sub>50</sub> dari uji penghambatan pembentukan biofilm berada pada konsentrasi 0,02 mg/mL. Namun dari semua konsentrasi ekstrak tidak ada yang memenuhi MBIC<sub>90</sub>. Penelitian sebelumnya oleh Nikolic *et al.* (2014) menunjukkan BIC<sub>50</sub> ekstrak *Zingiber officinale* terhadap *E. coli* ATCC 25922 sebesar >20 mg/mL. Perumal *et al.* (2013) yang meneliti efek antibiofilm ekstrak *Euphorbia hirta* terhadap *E. coli* menyatakan bahwa MBIC *E. coli* sebesar 1 mg/mL. Penelitian lainnya dari Wangi *et al.* (2017) mengenai efek penghambatan biofilm ekstrak metanol bawang putih terhadap biofilm *Pseudomonas aeruginosa*, didapatkan MBIC sebesar 0,3468 mg/mL.

Pertumbuhan biofilm akan dimulai setelah bakteri berhasil melekat pada suatu permukaan. Bakteri yang telah melekat pada permukaan akan mulai melakukan komunikasi antarsel (quorum sensing) untuk mengoordinasikan pertumbuhan dan menghasilkan matriks EPS. Adanya senyawa pada ekstrak daun murbei hitam yang mampu menghambat proses quorum sensing dan produksi matriks EPS akan menghambat pertumbuhan biofilm bakteri. Ekstrak daun murbei hitam mengandung senyawa antibakteri seperti terpenoid, fenolik, steroid, dan tanin. Terpenoid mampu menghambat dua proses penting dari mikroba, yaitu pengambilan oksigen dan fosforilasi oksidatif sehingga metabolisme sel terganggu. Berdasarkan penelitian Dong *et al.* (2017) asam tanin dapat secara langsung berikatan dengan peptidoglikan pada dinding sel bakteri sehingga integritas dinding sel terganggu. Senyawa fenolik yakni asam fenolat dapat menurunkan produksi EPS dan dapat mengganggu proses quorum sensing (Borges *et al.*, 2012). Tanin dapat mengganggu produksi EPS dari bakteri sehingga terbentuk *matrix-deficient cell cluster*. Tanin juga dapat menurunkan

luas permukaan lapisan peptidoglikan dan meningkatkan penetrasi antibiotik yang digunakan (Lahiri *et al.*, 2019).

### **Uji Penghancuran Biofilm *E. coli***

Uji penghancuran biofilm bertujuan untuk mengetahui kemampuan ekstrak daun murbei hitam dalam menghancurkan biofilm *E. coli* yang sudah terbentuk. Waktu kontak ekstrak dan bakteri uji dilakukan selama 60 menit sesuai dengan penelitian Alvita (2015) yang menyatakan bahwa waktu kontak terbaik ekstrak daun singkong dalam menghancurkan biofilm *E. coli* diantara 55-60 menit. Penelitian lainnya dari Alvita *et al.* (2016) juga menyatakan waktu kontrak terbaik ekstrak daun pepaya untuk menghancurkan biofilm *E. coli* selama 57-60 menit.

Berdasarkan hasil uji penghancuran biofilm, semua konsentrasi ekstrak daun murbei dan kontrol positif memiliki nilai OD yang lebih rendah dan berbeda secara signifikan dengan kontrol negatif. Hal ini menunjukkan bahwa semua konsentrasi ekstrak daun murbei dan kontrol positif mampu menghancurkan biofilm yang telah terbentuk. Konsentrasi 0,16 mg/mL menghasilkan nilai OD terendah diantara semua konsentrasi, sehingga konsentrasi tersebut merupakan konsentrasi terbaik untuk menghancurkan biofilm bakteri uji. Konsentrasi 0,16 mg/mL juga memiliki nilai OD yang lebih rendah daripada kontrol positif, tetapi kedua kelompok tersebut tidak memiliki perbedaan bermakna secara statistika. Konsentrasi 0,01 mg/mL-0,08 mg/mL tidak memiliki perbedaan bermakna, sehingga efek penghancuran biofilm yang dihasilkan keempat konsentrasi tersebut tidak berbeda secara signifikan.

Konsentrasi ekstrak daun murbei hitam 0,16 mg/mL menunjukkan aktivitas penghancuran terbesar dengan persentase sebesar 52,07%. Konsentrasi 0,01

mg/mL memiliki kemampuan menghambat terendah dibanding konsentrasi lainnya, karena kandungan senyawa aktifnya paling sedikit. Berdasarkan Famuyide *et al.* (2019), ekstrak dapat digolongkan memiliki aktivitas antibiofilm yang tinggi apabila persentase aktivitas antibiofilm  $\geq 50\%$ , sedangkan persentase 0-49% digolongkan memiliki aktivitas antibiofilm rendah. Maka dapat diketahui bahwa ekstrak daun murbei hitam dengan konsentrasi 0,16 mg/mL memiliki aktivitas penghancuran biofilm *E. coli* yang tinggi, sedangkan konsentrasi 0,01-0,08 mg/mL memiliki aktivitas penghancuran biofilm *E. coli* yang rendah. Hasil penelitian sebelumnya oleh Alvita (2015) menunjukkan bahwa ekstrak daun pepaya dapat menghancurkan biofilm *E. coli* dengan persentase hasil terbaik sebesar 48,99% pada konsentrasi 75%. Penelitian lainnya oleh Kining *et al.* (2016) menyatakan ekstrak daun pepaya dapat menghancurkan biofilm *Pseudomonas aeruginosa* sebesar 49,02% pada konsentrasi 25%. MBEC<sub>50</sub> dari uji penghambatan berada pada konsentrasi 0,16 mg/mL dan tidak ada konsentrasi ekstrak yang memenuhi MBEC<sub>90</sub>. Penelitian sebelumnya oleh Perumal *et al.* (2013) yang meneliti efek antibiofilm ekstrak *Euphorbia hirta* terhadap *E. coli* menyatakan bahwa MBEC *E. coli* sebesar  $>1$  mg/mL.

Ketika biofilm telah mengalami maturasi, sinergisitas dan komunikasi antarbakteri di dalam biofilm semakin kompleks. Lapisan matriks EPS yang terbentuk semakin banyak dan tebal. Matriks EPS dapat meningkatkan pertahanan bakteri dibanding dalam kondisi planktonik. Kemampuan penghancuran dari suatu ekstrak terkait dengan kemampuan senyawa yang terkandung dalam ekstrak untuk penetrasi ke lapisan matriks EPS yang menyelimuti bakteri dan menghancurkan matriks EPS pada biofilm. Tanin merupakan salah satu senyawa

yang dapat menghancurkan matriks EPS. Penelitian oleh Hamzah *et al.* (2019) menyatakan bahwa tanin dapat menghancurkan biofilm polimikrobial dari *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, dan *C. albicans*. Asam ferulat, salah satu jenis senyawa fenolik, dapat menurunkan jumlah sel dalam biofilm tetapi tidak dapat menghilangkan keseluruhan massa biofilm (Kot *et al.*, 2015). Penelitian dari Borges *et al.*, (2013) juga menyatakan bahwa asam ferulat mampu menurunkan biofilm pada *microplate* dengan cara menyebabkan perubahan sifat membran sel sehingga terjadi kebocoran konstituen intrasel.

### 5.3 Kajian Integrasi Islam mengenai Aktivitas Antibiofilm Ekstrak Daun Murbei Hitam terhadap Biofilm *E. coli*

Menjaga kebersihan merupakan salah satu cara yang dianjurkan oleh islam dalam memelihara kesehatan, terutama dari penyakit infeksi. Penyakit infeksi dapat disebabkan oleh berbagai agen patogen seperti bakteri, virus, jamur, dan sebagainya. Seseorang yang memiliki higiene buruk atau tidak menjaga kebersihan akan lebih berisiko terkena penyakit. Kebersihan yang harus selalu dijaga meliputi kebersihan tubuh, kebersihan makanan dan minuman, kebersihan tempat tinggal, dan kebersihan lingkungan. Kebersihan juga sangat disukai oleh Allah swt, sebagaimana firman Allah dalam Q.S Al-Baqarah: 222 berikut.

إِنَّ اللَّهَ يُحِبُّ التَّوَّابِينَ وَيُحِبُّ الْمُتَطَهِّرِينَ {البقره: 222}

Artinya: “Sesungguhnya Allah menyukai orang-orang yang bertaubat dan menyukai orang-orang yang menyucikan diri” (Q.S Al-Baqarah: 222) (Alquran Terjemah, 2012).

Bakteri yang sering menyebabkan suatu penyakit diantaranya adalah bakteri *E. coli*. *E. coli* merupakan agen penyebab pertama infeksi saluran kemih pada manusia. Beberapa strain dari *E. coli* memiliki kemampuan membentuk biofilm,

baik di permukaan biotik maupun permukaan abiotik. Keberadaan biofilm menyebabkan pengobatan yang digunakan menjadi kurang efektif karena biofilm cenderung resisten terhadap antibiotik. Pemakaian antibiotik sebagai satu-satunya pengobatan menjadi kurang efektif dan membutuhkan waktu terapi yang lama. Hal ini dapat meningkatkan morbiditas dan mortalitas pasien terutama pasien dengan status imunitas yang rendah.

Ketika sakit manusia diperintahkan Allah untuk senantiasa bertawakal dan berikhtiar. Salah satu bentuk ikhtiar adalah berusaha mencari pengobatan yang tepat hingga mendapatkan anugerah kesembuhan dari Allah. Rasulullah saw telah menganjurkan umatnya untuk berobat tatkala ditimpa penyakit.

إِنَّ اللَّهَ أَنْزَلَ الدَّاءَ وَالِدَوَاءَ وَجَعَلَ لِكُلِّ دَاءٍ دَوَاءً فَتَدَاوُوا وَلَا تَدَوُّوا بِحَرَامٍ  
{رواه أبو داود}

Artinya: “Sesungguhnya Allah menurunkan penyakit dan obatnya dan menjadikan bagi setiap penyakit ada obatnya. Maka berobatlah kalian, dan jangan kalian berobat dengan yang haram” (H.R Abu Daud).

Hadis tersebut menjelaskan bahwa semua penyakit terjadi karena kehendak Allah dan seorang muslim dianjurkan untuk berobat ketika ditimpa suatu penyakit. Manusia tidak boleh langsung putus asa karena setiap penyakit pasti ada obatnya. Namun dalam memilih pengobatan, seorang muslim harus memilih pengobatan yang menggunakan cara yang baik dan memilih obat yang baik. Seorang muslim tidak boleh menggunakan pengobatan atau obat yang diharamkan oleh Allah meskipun pengobatan atau obat tersebut sangat manjur, kecuali apabila keadaan sangat darurat.

عن جابر عبد الله لِكُلِّ دَاءٍ دَوَاءٌ، فَإِذَا أَصَابَ الدَّاءُ، بَرَأَ بِإِذْنِ اللَّهِ  
عَزَّوَجَلَّ {رواه مسلم}

Artinya: “Setiap penyakit pasti memiliki obat. Bila sebuah obat sesuai dengan penyakitnya maka dia akan sembuh dengan seizin Allah Subhanahu wa Ta’ala” (H.R Muslim).

Dari hadis tersebut Rasulullah menjelaskan bahwa semua penyakit ada obatnya. Obat yang digunakan tepat dengan sumber penyakitnya maka dengan izin Allah penyakit tersebut akan sembuh. Untuk menemukan suatu obat yang tepat diperlukan berbagai penelitian dan percobaan. Pemilihan obat yang tepat diawali dengan memilih bahan yang potensial, diantaranya dari tumbuh-tumbuhan. Tumbuhan merupakan sumber obat yang tersedia melimpah di alam dan memiliki berbagai kandungan senyawa aktif dengan aktivitas farmakologis yang luas. Semua bagian dari tumbuhan dapat dimanfaatkan sebagai obat, tergantung kebutuhan yang diperlukan. Allah telah menumbuhkan berbagai macam tumbuhan di bumi untuk dapat dimanfaatkan oleh manusia, sebagaimana firman Allah berikut.

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ {الشعراى: 7}

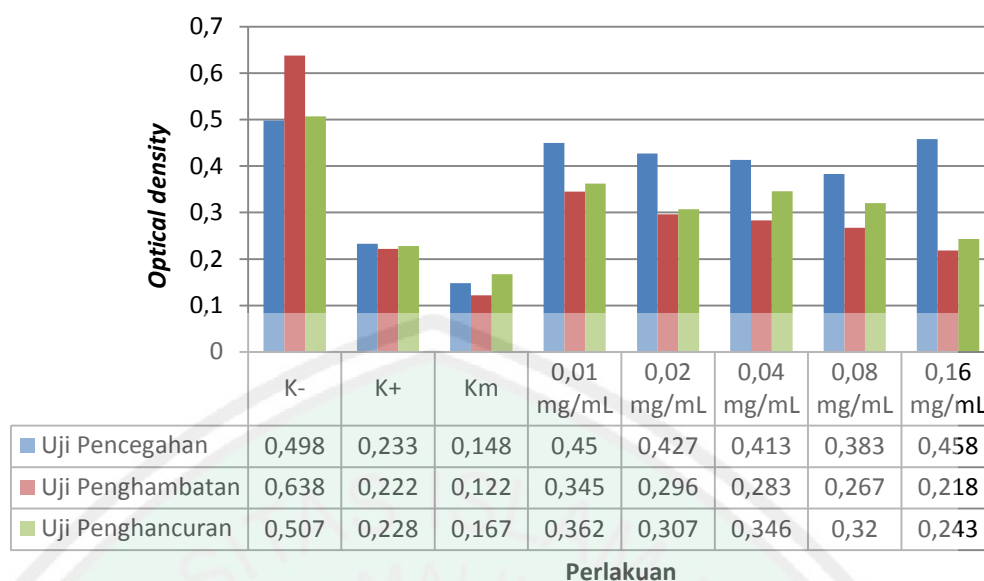
Artinya: “Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, betapa banyak Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam pasangan (tumbuh-tumbuhan) yang baik?” (Q.S Asy-Syu’ara: 7) (Alquran Terjemah, 2012).

Dalam kitab Tafsir Al-Mishbah dijelaskan bahwa kata “ila” yang berarti kepada awal ayat tersebut merupakan kata yang mengandung makna batas akhir. Kata tersebut mengarahkan arah pandangan manusia hingga batas kemampuannya memandang sampai mencakup seantero bumi, dengan aneka tanah dan tumbuhannya dan aneka keajaiban yang terhampar pada tumbuh-tumbuhannya. Kata “zaujin” berarti pasangan. Pasangan yang dimaksud dalam ayat ini adalah pasangan tumbuh-tumbuhan. Kata tersebut mengisyaratkan bahwa tumbuh-tumbuhan memiliki pasangan dalam pertumbuhan dan perkembangannya. Ayat

tersebut diawali dengan kalimat pertanyaan "*apakah mereka tidak melihat*", pertanyaan yang mengandung unsur keheranan terhadap mereka yang tidak menggunakan matanya untuk melihat bukti yang jelas mengenai tanaman. Kata "*kariim*" yang berarti *mulia*, digunakan untuk menggambarkan segala sesuatu yang baik bagi setiap objek yang disifatinya. Tumbuhan yang baik adalah yang subur dan bermanfaat (Shihab, 2002).

Berdasarkan ayat tersebut dapat diketahui bahwa Allah telah menumbuhkan berbagai macam tumbuhan yang baik, yakni tumbuhan yang subur dan bermanfaat untuk makhluk hidup. Allah juga memerintahkan manusia untuk mengamati tumbuh-tumbuhan yang telah Allah ciptakan. Setiap tumbuhan yang ada di bumi pasti memiliki manfaat karena Allah tidak akan menciptakan sesuatu yang sia-sia. Tumbuhan yang dipilih sebagai obat harus disesuaikan dengan tujuan pengobatan, sehingga peneliti harus memerhatikan senyawa aktif yang terkandung di dalamnya.

Pengembangan obat berbahan dasar tumbuhan merupakan salah satu cara untuk menemukan agen antibiofilm yang dapat mengatasi biofilm *E. coli* secara efektif. Daun murbei hitam diketahui memiliki kandungan senyawa aktif yang tinggi, terutama fenolik. Dari hasil uji fitokimia penelitian ini, daun murbei hitam mengandung senyawa tanin, fenolik, terpenoid, dan steroid. Senyawa tersebut dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri dan antibiofilm sehingga berpotensi untuk dijadikan salah satu agen antibiofilm terhadap biofilm *E. coli*. Berdasarkan hasil dari penelitian ini ekstrak etanol daun murbei hitam terbukti memiliki aktivitas antibiofilm terhadap biofilm *E. coli*. Hal ini dapat dilihat pada gambar berikut.



**Gambar 5.13** Hasil nilai *Optical Density* (OD) uji antibiofilm ekstrak daun murbei hitam terhadap biofilm *E. coli*. Pada semua kelompok perlakuan terlihat bahwa uji pencegahan biofilm memiliki nilai OD tertinggi, sedangkan uji penghambatan biofilm memiliki nilai OD terendah.

Berdasarkan gambar 5.13 dapat diketahui bahwa semua konsentrasi ekstrak daun murbei hitam memiliki nilai *optical density* yang lebih rendah daripada kontrol negatif, sehingga dapat disimpulkan ekstrak daun murbei hitam memiliki aktivitas antibiofilm terhadap biofilm *E. coli*. Aktivitas antibiofilm tertinggi secara berturut-turut terjadi pada uji penghambatan pertumbuhan biofilm, uji penghancuran biofilm, dan uji pencegahan perlekatan biofilm.

Penelitian ini diharapkan dapat menumbuhkan semangat pada peneliti muslim lainnya untuk terus mengembangkan agen antibiofilm. Penelitian agen antibiofilm ini sangat diperlukan karena tingginya resistensi antibiotik terhadap biofilm bakteri. Dengan ditemukannya agen antibiofilm yang efektif diharapkan dapat menurunkan morbiditas dan mortalitas pada pasien yang terinfeksi bakteri. Hasil penelitian ini juga dapat dijadikan sebagai referensi ilmiah bagi penelitian selanjutnya yang ingin mengembangkan lebih lanjut mengenai agen antibiofilm berbahan dasar tumbuhan, terutama dari daun murbei hitam.

## BAB VI

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 6.1 Kesimpulan

1. Ekstrak daun murbei hitam memiliki aktivitas antibiofilm terhadap biofilm *Escherichia coli*.
2. Ekstrak daun murbei hitam memiliki aktivitas pencegahan perlekatan biofilm *Escherichia coli* dengan persentase aktivitas tertinggi pada konsentrasi 0,08 mg/mL yaitu sebesar 23,09%.
3. Ekstrak daun murbei hitam memiliki aktivitas penghambatan pertumbuhan biofilm *Escherichia coli* dengan persentase aktivitas tertinggi pada konsentrasi 0,16 mg/mL yaitu sebesar 65,83%.
4. Ekstrak daun murbei hitam memiliki aktivitas penghancuran biofilm *Escherichia coli* dengan persentase aktivitas tertinggi pada konsentrasi 0,16 mg/mL yaitu sebesar 52,07%.
5. Pada uji pencegahan perlekatan biofilm tidak ada konsentrasi ekstrak yang memenuhi MBPC<sub>50</sub> dan MBPC<sub>90</sub>. MBIC<sub>50</sub> pada uji penghambatan pertumbuhan pada konsentrasi 0,02 mg/mL dan tidak ada konsentrasi ekstrak yang memenuhi MBIC<sub>90</sub>. Pada uji penghancuran MBEC<sub>50</sub> pada konsentrasi 0,16 mg/mL dan tidak ada konsentrasi ekstrak yang memenuhi MBEC<sub>90</sub>.

#### 6.2 Saran

1. Diperlukan penelitian penentuan kadar KHM dan KBM ekstrak daun murbei hitam (*Morus nigra*) terhadap *E. coli* sebagai dasar penentuan variasi konsentrasi ekstrak daun murbei hitam untuk uji antibiofilm.

2. Diperlukan penelitian lanjutan mengenai senyawa aktif spesifik yang terkandung di dalam ekstrak daun murbei hitam dan mekanisme kerja senyawa tersebut sebagai agen antibiofilm.
3. Bagi peneliti selanjutnya dapat meneliti aktivitas antibiofilm ekstrak daun murbei hitam dengan menggunakan metode yang berbeda



## DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed, Bahar. 2007. Chemistry Of Natural Products. New Delhi: Department of Pharmaceutical Chemistry Faculty of Science Jamia Hamdard.
- Akiyama, H. ( 2001). Antibacterial Action of Several Tannins against *S. aureus*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(4): 487-491.
- Al-Baer, Ali saadi and Hussein, Asmaa A. (2017). Isolation and Identification of *Escherichia coli* Producing Cytosine Deaminase from Iraqi patients, *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci*, 4(11): 1-6.
- Alquran Terjemah. 2012. *Al-Qur'an dan Terjemah New Cordova*. Bandung: Tim Syaamil Quran.
- Alvita LR, Falah S, Nurhidayat N. (2016). Water Extract Activity of Papaya Leaf as Antibiofilm against *E. coli*, *Current Biochemistry*, 2(3): 164-175.
- Alvita LR. (2015). Aktivitas Antibiofilm dari Bakteri *E. coli* oleh Ekstrak Air Daun Singkong, Pepaya dan Melinjo secara *In Vitro*, Thesis, Bogor: IPB.
- Antony, Ally C., et all. (2016). Comparative Evaluation of EMB Agar And Hicrome *E. coli* Agar for Differentiation of Green Metallic Sheen Producing Non *E. coli* And Typical *E. coli* Colonies from Food and Environmental Samples, *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 10(4): 2863.
- Arshad, M. A., Mir, A. K., Mushtaq, A., Mamoon, 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): 889–898. Doi:10.5897/Jmpr2010.733
- Aulifa DL, Fitriansyah SN, Ardiansyah SA, Wibowo DP, Julata YA, Christy DS. (2018). Phytochemical Screening, Antibacterial Activity, and Mode of Action on *Morus Nigra*. *Pharmacog Journal*.10(1): 167-71.
- Bien, J., Sokolova, O., & Bozko, P. (2012). Role of *Uropathogenic Escherichia coli* Virulence Factors in Development of Urinary Tract Infection and Kidney Damage. *International Journal of Nephrology*: 1-15.
- Borges A, Saavedra M J& Simões M. (2012). The Activity of Ferulic and Gallic Acids in Biofilm Prevention and Control of Pathogenic Bacteria, *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, 28(7): 755-767, DOI: 0.1080/08927014.2012.706751
- Borges, A., Ferreira, C., Saavedra, M. J., & Simões, M. (2013). Antibacterial Activity and Mode of Action of Ferulic and Gallic Acids against Pathogenic Bacteria. *Microbial Drug Resistance*, 19(4), 256–265.

- Bouyahya, A., Dakka, N., Et-Touys, A., Abrini, J., & Bakri, Y. (2017). Medicinal plant products targeting quorum sensing for combating bacterial infections. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10(8), 729–743.
- Brooks G. F., Carroll K. C., Butel J. S., Morse S. A., Mietzner T. A. 2013. *Jawetz Melnick & Adelbergs Medical Microbiology 26E*. McGraw Hill Professional.
- Budiman A, Aulifa DL, Kusuma AS, Sulastri A. (2017). Antibacterial and Antioxidant Activity of Black Mulberry (*Morus Nigra* L.) Extract for Acne Treatment. *Pharmacognosy Journal*, 9 (5): 611-614.
- Cahyono, Tri. 2018. *Statistika Terapan & Indikator Kesehatan*. Sleman: Deepublish Publisher.
- CDC. 2017. *Catheter-associated Urinary Tract Infections (CAUTI)*. USA
- Cavuldak, Vural, Akay, Anli. (2019). Optimization of ultrasound-assisted water extraction conditions for the extraction of phenolic compounds from black mulberry leaves (*Morus nigra* L.), *Journal of Food Process Engineering*, 1-15.
- Dahlan, Sopiudin. 2008. *Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan*. Edisi 3. Jakarta: Salemba Medika.
- De Silva, G. O., Abeysundara A. T., Aponso M. M. W. (2017). Extraction methods, qualitative and quantitative techniques for screening of phytochemicals from plants, *American Journal of Essential Oils and Natural Products*, 5(2): 29-32.
- Dent M, Dragovic-Uzelac V, Penic M, Brncic M, Bosiljkov T, Levaj B. (2013). The Effect of Extraction Solvents, Temperature and Time on the Composition and Mass Fraction of Polyphenols in Dalmatian Wild Sage (*Salvia officinalis* L.) Extracts, *Biotechnol.* 51 (1) 84–91.
- Dong G, Li J, Chen L, Bi W, Zhang X, Liu H, Zhi X, Zhou T, Cao J. (2019). Effects of sub-minimum inhibitory concentrations of ciprofloxacin on biofilm formation and virulence factors of *Escherichia coli*, *Brazilian Journal of Infectious Disease*, 3(1): 15-21.
- Famuyide IM, Aro AO, Fasina FO, Eloff JN, McGraw LJ. (2019). Antibacterial and antibiofilm activity of acetone leaf extracts of nine underinvestigated south African *Eugenia* and *Syzygium* (Myrtaceae) species and their selectivity indices, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 19(141).
- Ferlinahayati, Hakim, E. H., Syah, Y. M., & Juliawati, L. D. (2012). Senyawa Morusin dari Tumbuhan Murbei Hitam (*Morus Nigra*). *Jurnal Penelitian Sains*, 15(2).

- Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., & Hultgren, S. J. (2015). Urinary Tract Infections: Epidemiology, Mechanisms of Infection and Treatment Options. *Nature Reviews. Microbiology*, 13(5), 269–284.
- Fuadi, Anwar. (2012). Ultrasonik sebagai Alat Bantu Ekstraksi Oleoresin Jahe, *Jurnal Teknologi*, 12 (1): 14-21.
- Gomes, F., Martins, N., Ferreira, I., & Henriques, M. (2010). Anti-biofilm Activity of Hydromethanolic Plant Extracts against *Staphylococcus aureus* Isolates from Bovine Mastitis. *Heliyon*, 5(5), e01728.
- Gupta P, Chhibber S, Harjai K. (2016). Subinhibitory concentration of ciprofloxacin targets quorum sensing system of *Pseudomonas aeruginosa* causing inhibition of biofilm formation & reduction of virulence. *Indian J Med Res*;143:643–51.
- Hamzah H, Hertiani T, Pratiwi SUT, Nuryastuti T. (2019). The Inhibition Activity of Tannin on the Formation of Mono-Species and Polymicrobial Biofilm *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Candida albicans*, *Trad. Med. J*, 24 (2): 110-118.
- Haney E. F., Trimble M. J., Cheng J. T., Valle Q., Hancock R. E. W. (2018). Critical Assessment of Methods to Quantify Biofilm Growth and Evaluate Antibiofilm Activity of Host Defence Peptides, *Biomolecules*, 8 (29): 1-22.
- Hussain F., Rana Z., Shafique H., Malik A., Hussain Z. (2017). Phytopharmacological Potential of Different Species of *Morus alba* and Their Bioactive Phytochemicals: A Review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(10): 950-956.
- Isnain, Wahyudi & Muin, Nurhaedah. (2015). “Tanaman Murbei” Sumber Daya Hutan Multimanfaat, *Info Teknis EBONI*, 12 (2): 111-119.
- Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., Kamil, M. A. (2018). Bacterial Biofilm and Associated Infections. *Journal of The Chinese Medical Association*, 81(1), 7–11.
- Katzung, Betram G. 2012. *Farmakologi Dasar dan Klinis Edisi 10*. Jakarta: EGC.
- Kemenkes. 2016. *Profil Kesehatan Indonesia 2016*. Jakarta: Kemenkes
- 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 Journal*, 2 (3): 150-163.
- Kirmusaoglu, Sahra. (2019). The Method for Detection of Biofilm and Screening Antibiofilm Agents. *Antimicrobial, Antibiotic Resistance, Antibiofilm Strategies and Activity Methods*, IntechOpen, p. 1-17.

- Kot B, Wicha J, Piechota M, Wolska K, Gruzewska A. (2015). Antibiofilm activity of trans-cinnamaldehyde, *p*-coumaric, and ferulic acids on uropathogenic *Escherichia coli*, *Turkish Journal of Medical Science*, 45: 919-924.
- Krishna, H., Singh, D., Singh, R. S., Kumar, L., Sharma, B. D., & Saroj, P. L. (2018). Morphological and Antioxidant Characteristics of Mulberry (*Morus Spp.*) Genotypes. *Journal of The Saudi Society of Agricultural Sciences*.
- Kudinha, T. (2017). *The Pathogenesis of Escherichia coli Urinary Tract Infection. Escherichia coli - Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications, Intech Journal*.
- Kumar, A., Alam, A., Rani, M., Ehtesham, N. Z., & Hasnain, S. E. (2017). Biofilms: Survival and Defense Strategy For Pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*, 307(8), 481–489.
- Kyaw, B. M., Arora, S., & Lim, C. S. (2011). Anti-Pseudomonal And Anti-Biofilm Activity of Tannic Acid in Combination with Antibiotics. *International Journal of Integrative Biology*, 11(3), 110-116.
- Lahiri, D., Dash, S., Dutta, R., & Nag, M. (2019). Elucidating the effect of anti-biofilm activity of bioactive compounds extracted from plants. *Journal of Biosciences*, 44(2).
- Leboffe MJ dan Pierre BE. 2012. *A Photographic Atlas for the Microbiology Laboratory*. Ed ke-4. Colorado (US): Morton Publishing Company.
- Lee J, Park J, Cho H.S, Joo S.W, Cho M.H, Lee J. (2013). Anti-biofilm activities of quercetin and tannic acid against *S. aureus*, *Biofouling*, 29(5): 491-499.
- Letica-Kriegel AS, Salmasian H, Vawdrey DK, Et Al. (2019). Identifying The Risk Factors for Catheter-Associated Urinary Tract Infections: A Large Cross-Sectional Study Of Six Hospitals. *BMJ Open*, 9:E022137.
- Lim, S., & Choi, C.-I. (2019). Pharmacological Properties of *Morus Nigra L.* (Black Mulberry) as a Promising Nutraceutical Resource. *Nutrients*, 11(2), 437. Doi:10.3390/Nu11020437
- Lixa, C., Mujo, A., Anobom, C. D., & Pinheiro, A. S. (2015). A Structural Perspective on The Mechanisms of Quorum Sensing Activation in Bacteria. *Anais Da Academia Brasileira De Ciências*, 87(4), 2189–2203.
- Mahizan, N. A., Yang, S. K., Moo, C. L., Song, A. A., Chong, C. M., Chong, C. W., Abushelaibi, A., Lim, S. E., & Lai, K. S. (2019). Terpene Derivatives as a Potential Agent against Antimicrobial Resistance (AMR) Pathogens. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(14), 2631.
- Mahon, CR. 2015. *Textbook of Diagnostic Microbiology 5th Edition*. Philadelphia: Elsevier.

- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2013). *Medical Microbiology*. Philadelphia: Elsevier.
- Musdalipah. (2018). Identifikasi Drug Related Problem (DRP) pada Pasien Infeksi Saluran Kemih di Rumah Sakit Bhayangkara Kendari. *Jurnal Kesehatan*, 11(1).
- Mohsenipour, Zeinab And Hassanshahian, Mehdi. (2015). The Effects of *Allium Sativum* Extracts on Biofilm Formation and Activities of Six Pathogenic Bacteria. *Jundishapur Journal Microbiol*, 8 (8): 1-7.
- Nalca Y, Jansch L, Bredenbruch F, Geffers R, Buer J, Häussler S. (2006). Quorum-sensing antagonistic activities of azithromycin in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 50: 1680–8.
- Ng WL, Bassler BL. (2009). Bacterial Quorum-Sensing Network Architectures. *Annu Rev Genet*. 43:197–222. [Pubmed: 19686078]
- Nikolic, M., Vasic S., Durdevic J., Stefanovic O., Comic L. (2014). Antibacterial and Anti-Biofilm Activity of Ginger (*Zingiber officinale* (Roscoe)) Ethanolic Extract, *Kragujevac Journal Sciences*, 36: 129-136.
- Nielsen, D. W., Klimavicz, J. S., Cavender, T., Wannemuehler, Y., Barbieri, N. L., Nolan, L. K., & Logue, C. M. (2018). The Impact of Media, Phylogenetic Classification, and *E. coli* Pathotypes on Biofilm Formation in Extraintestinal And Commensal *E. coli* From Humans And Animals. *Frontiers in Microbiology*, 9. Doi:10.3389/Fmicb.2018.00902
- Nyenje, M., Green, E., & Ndip, R. (2013). Evaluation of the Effect of Different Growth Media and Temperature on the Suitability of Biofilm Formation by *Enterobacter cloacae* Strains Isolated from Food Samples in South Africa. *Molecules*, 18(8), 9582–9593. doi:10.3390/molecules18089582
- O'hara, C. (2005). M. Manual And Automated Instrumentation for Identification of *Enterobacteriaceae* and other Aerobic Gram-Negative Bacilli, *Clinical Microbiology Reviews*, 18 (1): 147-162.
- Okatan, Volkan. (2018). Phenolic Compounds and Phytochemicals in Fruits of Black Mulberry (*Morus Nigra* L.) Genotypes from The Aegean Region in Turkey, *Folia Horticulturae Journal*, 30 (1): 93-101.
- 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), 1496–1500. doi:10.1002/ptr.3134
- Parvez A S., & Rahman, D. (2019). Virulence Factors of Uropathogenic *E. coli*. *Microbiology of Urinary Tract Infections - Microbial Agents and Predisposing Factor*, Doi:10.5772/Intechopen.79557

- Pelczar, M.J dan Chan, E.C.S., 1988. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Terjemahan Universitas Indonesia Press. Jakarta
- Perumal S & Mahmud R. (2013). Chemical analysis, inhibition of biofilm formation and biofilm eradication potential of *Euphorbia hirta* L. against clinical isolates and standard strains, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13: 346.
- Post, K W. And Songer, GJ. 2005. *MICROBIOLOGY Bacterial and Fungal Agent of Animal Disease*. Elsevier Saunders: Philadelphia
- Purnomo, B. B. (2011). *Dasar-Dasar Urologi*. Malang: CV. Sagung Seto.
- Qin X, Hu F, Wu S, Ye X, Zhu D, Zhang Y, Wang M. (2013). Comparison of adhesin genes and antimicrobial susceptibilities between uropathogenic and intestinal commensal *Escherichia coli* strains. *PLoS ONE*. 8:e61169.
- 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.
- 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*, 151-159.
- Roy, R., Tiwari, M., Donelli, G., & Tiwari, V. (2017). Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*, 9(1), 522–554. doi:10.1080/21505594.2017.1313372
- Ruchi T., Sutaja B., Anuradha D. (2015). Comparison of Phenotypic Methods for The Detection Of Biofilm Production in Uro-Pathogens in a Tertiary Care Hospital in India, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4 (9): 840-849.
- Rumagit H. M., Runtuwene M. R. J., Sudewi S. (2015). Uji Fitokimia dan Uji Aktivitas Antioksidan dari Ekstrak Etanol Spons *Lamellodysidea herbacea*, *Pharmakon*, 4(3): 183-191.
- Sadekuzzaman, M., Yang, S., Mizan, M. F. R., & Ha, S. D. (2015). Current and Recent Advanced Strategies for Combating Biofilms. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(4), 491–509.
- Sari S. P. W., Rahmapuspita F., Iriyani N., Pratiwi S. U. T., Hertiani T. (2014). Penelusuran Potensi Kapulaga, Temu Putri dan Senggugu sebagai Penghambat Pembentukan Biofilm. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 12(1): 17-24.

- Sari, E. W., & Satyabakti, P. (2015). Perbedaan Risiko Infeksi Nosokomial Saluran Kemih Berdasarkan Kateterisasi Urin, Umur, dan Diabetes Melitus. *Jurnal Berkala Epidemiologi*, 3(2), 205-216.
- Sarowska, J., Futoma-Koloch, B., Jama-Kmiecik, A., Frej-Madrzak, M., Ksiazczyk, M., Bugla, G., & Choroszy-Krol, I. (2019). Virulence Factors, Prevalence and Potential Transmission of Extraintestinal Pathogenic *E. coli* Isolated from Different Sources: Recent Reports. *Gut Pathogens*, 11(1).
- Sharma, G., Sharma S, Sharma P, Chandola, D., Dang, S., Gupta, S., Et Al. (2016). *Eschericia coli* Biofilm: Development and Therapeutic Strategies. *Journal of Applied Microbiology*, 309-319.
- Shihab, M. Quraish. 2002. *Tafsir Al-Mishbah: Pesan, Kesan, dan Keserasian Al-Qur'an*. Jakarta: Lentera Hati
- Silva Passos Da, D., Schofield, M., Parsek, M., & Tseng, B. (2017). *An Update On The Sociomicrobiology of Quorum Sensing in Gram-Negative Biofilm Development*. *Pathogens*, 6(4), 51. Doi:10.3390/Pathogens6040051
- Singh, B., Katiyar, D., Tilak, R., Srivastava, R. K., & Chauhan, R. S. (2018). Prevalence of Urinary Tract Infecion Causing Microorganism and Determination of Suspectibility to Antibiotik Among Slum Women of District Varanasi, India. *International Journal of Current Microbiology and Apllied Sciences*, 7(02).
- Sirait, Anna Maria. 2001. Analisa Varians (ANOVA) dalam Penelitian Kesehatan. *Media Litbang Kesehatan*, 9 (2): 39-43.
- Slobodníková, L., Fialová, S., Rendeková, K., Kováč, J., & Mučaji, P. (2016). Antibiofilm Activity of Plant Polyphenols. *Molecules*, 21(12), 1717.
- Stepanovic´ S, Vukovic´ D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukic´ S, C´ irkovic´ 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*;115:891–9.
- Subashchandrabose, S., & Mobley, H. L. T. (2015). *Virulence And Fitness Determinants of Uropathogenic Eschericia coli* . *Microbiology Spectrum*, 3(4). Doi:10.1128/Microbiolspec.Uti-0015-2012
- Suskind, A. M., Saigal, C. S., Hanley, J. M., Lai, J., Setodji, C. M., & Clemens, J. Q. (2016). Incidence and Management of Uncomplicated Recurrent Urinary Tract Infections in a National Sample of Women in The United States. *Urology*, 90, 50–55. Doi:10.1016/J.Urology.2015.11.051
- Suwarjana, Ketut. 2016. *Statistik Kesehatan*. Yogyakarta: CV Andi Offset

- Terlizzi ME, Gribaudo G And Maffei ME. (2017). Uropathogenic *Eschericia coli* (UPEC) Infections: Virulence Factors, Bladder Responses, Antibiotic, And Non-Antibiotic Antimicrobial Strategies. *Front. Microbiol*, 8:1566.
- Thilagavathi.T, Arvindganth.R, Vidhya.D, Dhivya .R. (2015). Preliminary phytochemical screening of different solvent mediated medicinal plant extracts evaluated. *Int. Res. J. Pharm*, 6(4):246-248
- Toyofuku M, Inaba T, Kiyokawa T, Obana N, Yawata Y & Nomura N. (2015). Environmental Factors That Shape Biofilm Formation, Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry, DOI: 10.1080/09168451.2015.1058701
- Trentin, D. S., Silva, D. B., Amaral, M. W., Zimmer, K. R., Silva, M. V., Lopes, N. P., Macedo, A. J. (2013). Tannins Possessing Bacteriostatic Effect Impair *Pseudomonas aeruginosa* Adhesion and Biofilm Formation. *Plos ONE*, 8(6), E66257. Doi:10.1371/Journal.Pone.0066257
- Triana, Evi. (2018). Aktivitas Antibiofilm Bakteri *Eschericia coli* oleh Bakteriofag secara *in vitro*. *Berita Biologi*, 17(1): 77-84.
- Upadhyay *et al.* (2014). Review Article: Combating Pathogenic Microorganisms Using Plant-Derived Antimicrobials: A Minireview of the Mechanistic Basis. *BioMed Research International*, 2014: 1-18.
- Vogeleer, P., Tremblay, Y. D., Mafu, A. A., Jacques, M., & Harel, J. (2014). Life on The Outside: Role of Biofilms in Environmental Persistence of Shiga-Toxin Producing *Eschericia coli*. *Frontiers In Microbiology*, 5.
- Wahyudi A., Bahar Y., Septianawati P. (2018). Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum basilicum L Folium*) terhadap Kadar SGOT dan SGPT Tikus Putih (*Rattus norvegicus* strain wistar) yang diinduksi MSG, *Herb-Medicine Journal*, 1(1): 31-38.
- Welch, R. A. (2006). *The Genus Escherichia*. Dalam *Prokaryotes* (Hal. 60-71).
- Wen P., Hu TG., Linhardt R. J., Liao ST., Wu H., Zou YX. (2019). Mulberry: A review of bioactive compounds and advanced processing technology, *Trends in Food Sciences & Technology*, 138-158.
- Wojnicz & Tichaczek-Goska. (2013). Effect of sub-minimum inhibitory concentrations of ciprofloxacin, amikacin and colistin on biofilm formation and virulence factors of *E. coli* planktonic and biofilm forms isolated from human urine. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(1): 259-265.
- Wood, T. K. (2009). Insights on *Eschericiacoli* biofilm Formation and Inhibition from Whole-Transcriptome Profiling. *Environmental Microbiology*, 11(1), 1–15. Doi:10.1111/J.1462-2920.2008.01768.X

## LAMPIRAN

## Lampiran 1. Hasil Determinasi Murbei Hitam



**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.

Batu, 22 Januari 2020

An. Kepala UPT Lab. Herbal Materia Medica Batu  
 Kepala Seksi Pelayanan Laboratorium Herbal,



*Furra Rahmawati, S.Farm., Apt.*  
 NIP.19900430 201403 2 002

## Lampiran 2. Etik Penelitian

|                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | <b>FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN</b><br><b>UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG</b><br><b>KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN</b><br>Gedung Klinik UMMI It 2<br>Jalan Gajayana No. 50, Dineyo, Kec Lowokwaru, Kota Malang<br>E-mail: <a href="mailto:kepk.fkik@uin-malang.ac.id">kepk.fkik@uin-malang.ac.id</a> - Website : <a href="http://www.kepk.fkik.uin-malang.ac.id">http://www.kepk.fkik.uin-malang.ac.id</a> |
|                                                                                   | <b>KETERANGAN KELAIKAN ETIK</b><br><b>(ETHICAL CLEARANCE)</b><br><b>No. 004/EC/KEPK-FKIK/2020</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |

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 Yasmina Abidah
2. Alif Raudhah Husnul Khotimah

Unit / Lembaga Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang

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)  
NIP. 2016120111515

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 3. Hasil 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  
Anahs  
Mier Rhomawati, S.Si



Kedalaman Spiritual, Keagungan Akhlaq, Keluasan Ilmu dan Kematangan Profesional

# Lampiran 4. Hasil Uji Identifikasi Bakteri Uji



## 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:018/IB /Lab.Wiyasa Mandiri /2020

KODE SAMPEL : 018/IB  
NAMA/JENIS SAMPEL : Isolat Bakteri  
NAMA PELANGGAN : Hafshah Amina Abidah  
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 : Merah  
Tepi Koloni : Tidak Rata  
Elevansi Koloni : Cembung  
Konsistensi Koloni : Non Mukoid

#### III. UJI BIOKIMIA

TSI : As/As, H<sub>2</sub>S (-), G (+)  
Indol : Positif  
MR : Positif  
VP : Negatif  
Citrat : Negatif  
Urease : Negatif

CRA Produksi Biofilm : Positif

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

CATATAN : Hasil uji ini berlaku untuk sampel yang diuji

Malang, 18 Februari 2020

Director

  
CV WIYASA MANDIRI

Dyah Rokhmawanti, S.Si

### Lampiran 5. Alat yang Digunakan pada Penelitian



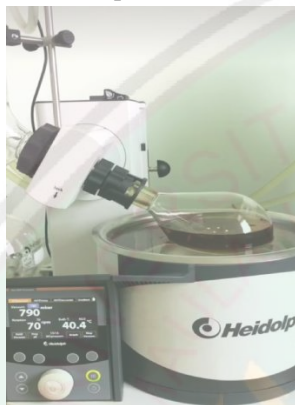
Mikroplate reader



Alat ekstraksi UAE



Spektrofotometer



Rotary Evaporator



Neraca analitik



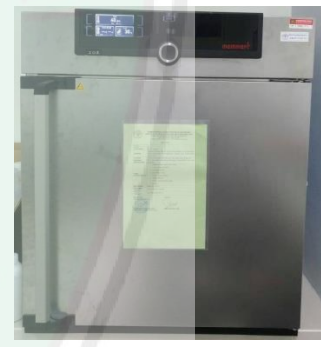
Inkubator



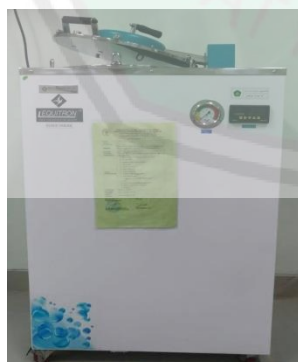
Blender



Laminar Air Flow (LAF)



Oven



Autoklaf



Destrose



Vortex

## Lampiran 6. Penyiapan Ekstrak Daun Murbei Hitam

### Pembuatan Simplisia Daun Murbei Hitam



Daun murbei hitam yang dipanen



Daun murbei hitam yang telah dicuci dan diangin-anginkan



Daun murbei hitam yang telah dikeringkan di oven dihaluskan menggunakan blender



Daun murbei yang telah diblender



Simplisia daun murbei hitam

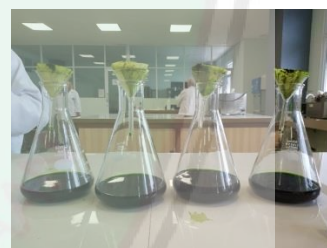
### Ekstraksi Daun Murbei Hitam



Simplisia daun murbei hitam diekstrak di dalam mesin UAE



Hasil ekstraksi daun murbei hitam dari mesin UAE



Penyaringan hasil ekstraksi



Penguapan pelarut dengan Rotary Evaporator



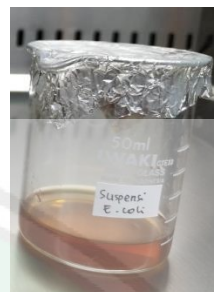
Hasil ekstrak daun murbei hitam

## Lampiran 7. Prosedur Uji Aktivitas Antibiofilm

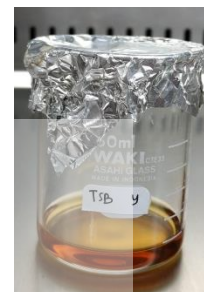
### Persiapan Uji Antibiofilm



Kelompok uji (ekstrak daun murbei hitam) dan K+  
(dari kiri ke kanan: konsentrasi 0,01 mg/mL; 0,02 mg/mL; 0,04 mg/mL; 0,08 mg/mL; 0,16 mg/mL; 0,32 mg/mL; 0,64 mg/mL; K+)



Suspensi bakteri  
*E. coli* (K-)

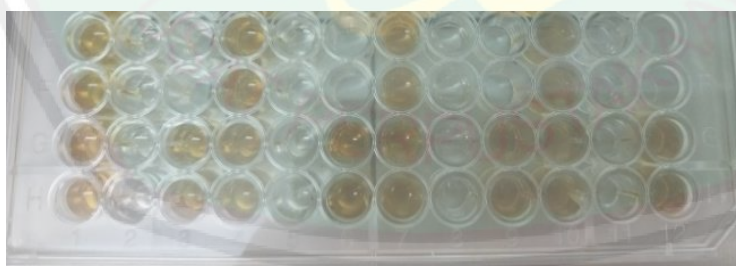


Media TSB dan glukosa 1% (Km)

### Uji Deteksi Pembentukan Biofilm *E. coli*



Prosedur memasukkan suspensi bakteri uji dan kontrol ke dalam mikroplate



Mikroplate siap diinkubasi



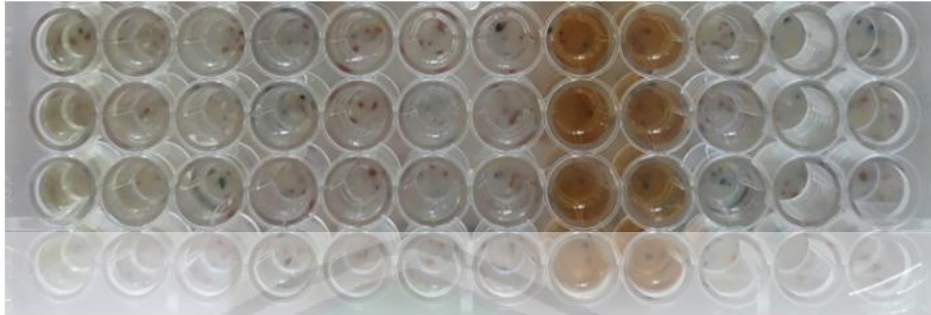
Biofilm yang terbentuk pada dinding well



Hasil pewarnaan dengan KV 1% pada 72 jam

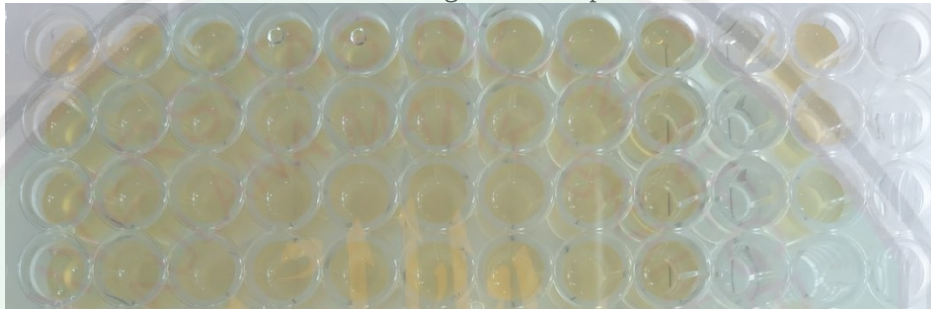
### Uji pencegahan perlekatan biofilm

Memasukkan kelompok uji, kontrol positif, dan kontrol media ke dalam *mikroplate*

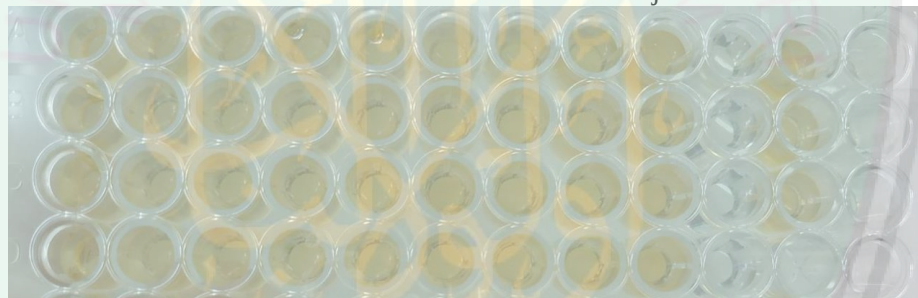


Memasukkan suspensi bakteri pada kelompok uji, kontrol positif, dan kontrol negatif.

Memasukkan media TSB+glukosa 1% pada kontrol media



Hasil setelah diinkubasi selama 72 jam



Hasil pewarnaan KV 1% dan pemberian etanol 96%



Konsentrasi  
0,16 mg/mL



Konsentrasi  
0,08 mg/mL



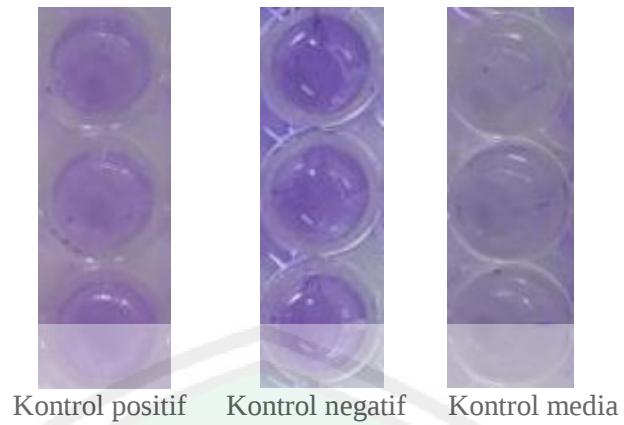
Konsentrasi  
0,04 mg/mL



Konsentrasi  
0,02 mg/mL

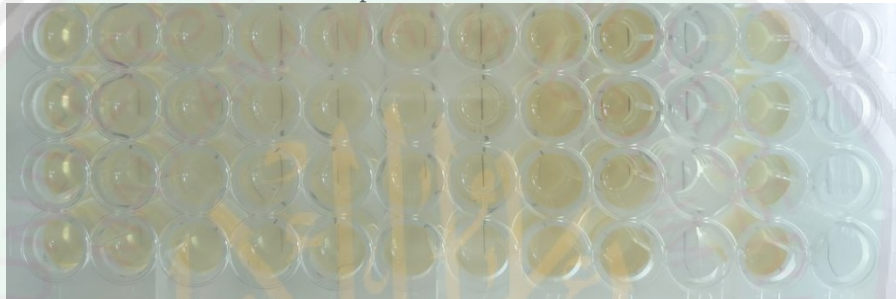


Konsentrasi  
0,01 mg/mL

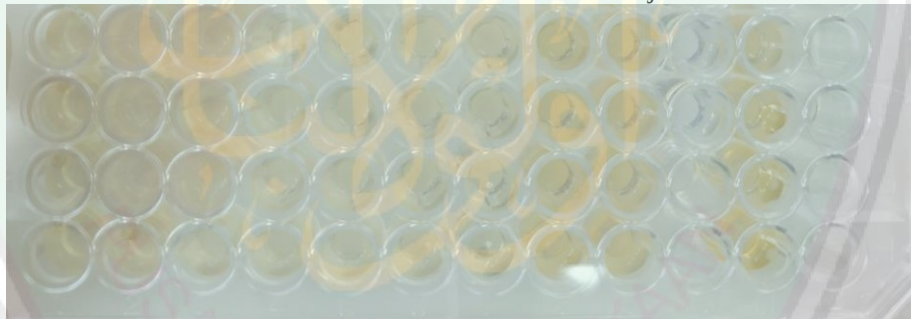


### Uji Penghambatan Pertumbuhan Biofilm

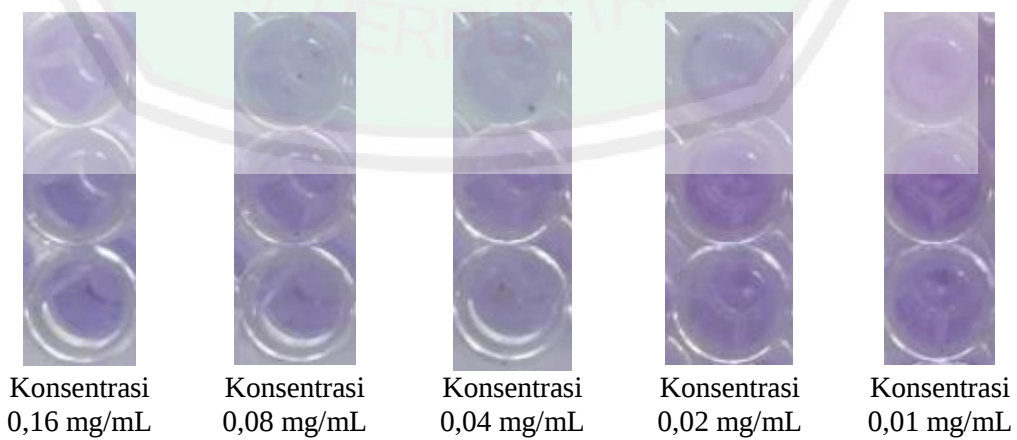
Mikroplate sebelum inkubasi

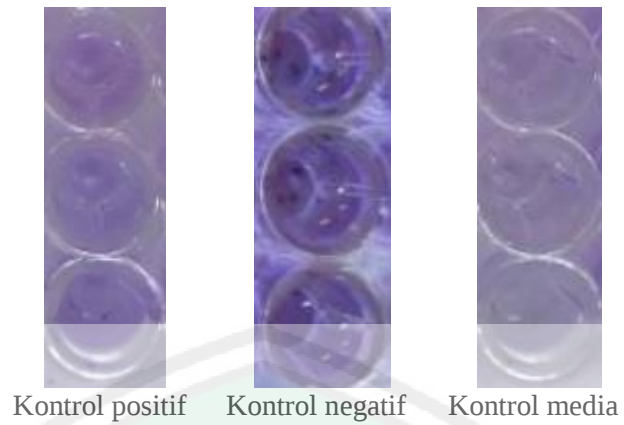


Hasil setelah diinkubasi selama 72 jam



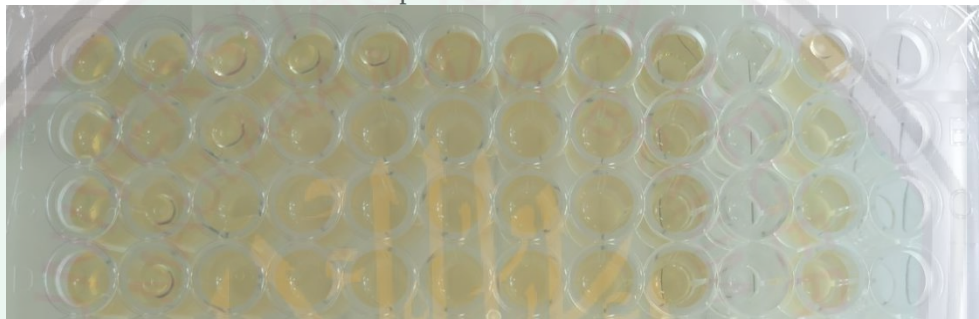
Hasil pewarnaan KV 1% dan pemberian etanol 96%



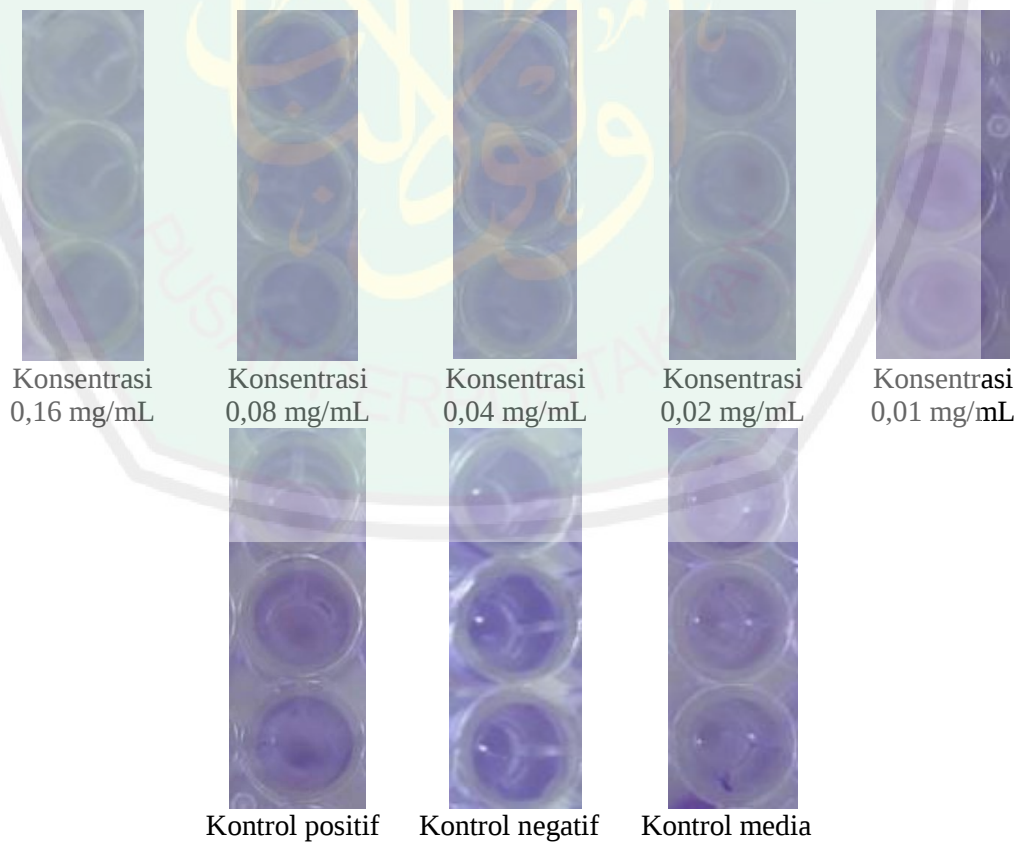


### Uji Penghancuran Biofilm

Mikroplate sebelum inkubasi



Hasil pewarnaan KV 1% dan pemberian etanol 96%



## Lampiran 8. Hasil Data Uji Aktivitas Antibiofilm

### 1. Hasil Data Uji Pencegahan Perlekatan Biofilm *E. coli*

| Kelompok perlakuan              | Nilai <i>Optical Density</i> |       |       |                | Persentase Pencegahan Biofilm |
|---------------------------------|------------------------------|-------|-------|----------------|-------------------------------|
|                                 | Pengulangan ke-              |       |       | rata-rata ± SD |                               |
|                                 | 1                            | 2     | 3     |                |                               |
| kelompok uji dengan konsentrasi |                              |       |       |                |                               |
| 0,01 mg/mL                      | 0.454                        | 0.441 | 0.456 | 0.450 ± 0.0081 | 9,63%                         |
| 0,02 mg/mL                      | 0.423                        | 0.427 | 0.432 | 0.427 ± 0.0045 | 14,25%                        |
| 0,04 mg/mL                      | 0.411                        | 0.431 | 0.399 | 0.413 ± 0.0161 | 17,06%                        |
| 0,08 mg/mL                      | 0.343                        | 0.381 | 0.426 | 0.383 ± 0.0339 | 23,09%                        |
| 0,16 mg/mL                      | 0.433                        | 0.455 | 0.486 | 0.458 ± 0.0266 | 8,03%                         |
| kelompok kontrol                |                              |       |       |                |                               |
| kontrol negatif                 | 0.543                        | 0.464 | 0.489 | 0.498 ± 0.0403 |                               |
| kontrol positif                 | 0.220                        | 0.231 | 0.250 | 0.233 ± 0.0151 |                               |
| kontrol media                   | 0.154                        | 0.132 | 0.158 | 0.148 ± 0.0140 |                               |

### 2. Hasil Uji Penghambatan Pertumbuhan Biofilm *E. coli*

| Kelompok perlakuan              | Nilai <i>Optical Density</i> |       |       |                | Persentase Penghambatan Pertumbuhan Biofilm |
|---------------------------------|------------------------------|-------|-------|----------------|---------------------------------------------|
|                                 | Pengulangan ke-              |       |       | rata-rata ± SD |                                             |
|                                 | 1                            | 2     | 3     |                |                                             |
| kelompok uji dengan konsentrasi |                              |       |       |                |                                             |
| 0,01 mg/mL                      | 0.333                        | 0.315 | 0.388 | 0.345 ± 0.0380 | 45,92%                                      |
| 0,02 mg/mL                      | 0.291                        | 0.328 | 0.269 | 0.296 ± 0.0298 | 53,60%                                      |
| 0,04 mg/mL                      | 0.304                        | 0.293 | 0.253 | 0.283 ± 0.0218 | 55,64%                                      |
| 0,08 mg/mL                      | 0.286                        | 0.273 | 0.243 | 0.267 ± 0.0220 | 58,15%                                      |
| 0,16 mg/mL                      | 0.201                        | 0.220 | 0.233 | 0.218 ± 0.0160 | 65,83%                                      |
| kelompok kontrol                |                              |       |       |                |                                             |
| kontrol negatif                 | 0.649                        | 0.645 | 0.620 | 0.638 ± 0.0157 |                                             |
| kontrol positif                 | 0.220                        | 0.231 | 0.215 | 0.222 ± 0.0081 |                                             |
| kontrol media                   | 0.113                        | 0.123 | 0.132 | 0.122 ± 0.0095 |                                             |

### 3. Hasil Uji Penghancuran Biofilm *E. coli*

| Kelompok perlakuan              | Nilai <i>Optical Density</i> |       |       |                | Persentase Penghancuran Biofilm |
|---------------------------------|------------------------------|-------|-------|----------------|---------------------------------|
|                                 | Pengulangan ke-              |       |       | rata-rata ± SD |                                 |
|                                 | 1                            | 2     | 3     |                |                                 |
| kelompok uji dengan konsentrasi |                              |       |       |                |                                 |
| 0.01 mg/mL                      | 0.369                        | 0.383 | 0.335 | 0.362 ± 0.0246 | 28.59%                          |
| 0.02 mg/mL                      | 0.293                        | 0.316 | 0.312 | 0.307 ± 0.0122 | 39.44%                          |
| 0.04 mg/mL                      | 0.342                        | 0.327 | 0.370 | 0.346 ± 0.0218 | 31.75%                          |
| 0.08 mg/mL                      | 0.296                        | 0.338 | 0.326 | 0.320 ± 0.0216 | 36.88%                          |
| 0.16 mg/mL                      | 0.227                        | 0.249 | 0.255 | 0.243 ± 0.0147 | 52.07%                          |
| kelompok kontrol                |                              |       |       |                |                                 |
| kontrol negatif                 | 0.554                        | 0.496 | 0.471 | 0.507 ± 0.0425 |                                 |
| kontrol positif                 | 0.215                        | 0.250 | 0.220 | 0.228 ± 0.0189 |                                 |
| kontrol media                   | 0.178                        | 0.143 | 0.142 | 0.154 ± 0.0211 |                                 |

## Lampiran 9. Hasil Uji Statistik Aktivitas Antibiofilm Ekstrak Daun Murbei Hitam terhadap Biofilm *E. coli*

### 1. Uji Pencegahan Perlekatan Biofilm *E. coli*

#### a. Uji Normalitas

Tujuan : Mengetahui normalitas distribusi data OD uji pencegahan perlekatan biofilm.

Hipotesis :

Ho = Data OD pencegahan perlekatan biofilm berdistribusi normal.

Ha = Data OD pencegahan perlekatan biofilm tidak berdistribusi normal.

Pengambilan Keputusan :

- Jika nilai signifikansi  $\geq 0.05$  Ho diterima
- Jika nilai signifikansi  $\leq 0.05$  Ho ditolak

Tabel 8.1 Hasil Uji Normalitas Pencegahan Perlekatan Biofilm

| perlakuan              | Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup> |    |      | Shapiro-Wilk |    |      |
|------------------------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
|                        | Statistic                       | df | Sig. | Statistic    | df | Sig. |
| optical density        |                                 |    |      |              |    |      |
| kontrol negatif        | .261                            | 3  | .    | .957         | 3  | .601 |
| kontrol positif        | .236                            | 3  | .    | .977         | 3  | .708 |
| kontrol media          | .333                            | 3  | .    | .862         | 3  | .274 |
| konsentrasi 0,01 mg/ml | .340                            | 3  | .    | .848         | 3  | .235 |
| konsentrasi 0,02 mg/ml | .196                            | 3  | .    | .996         | 3  | .878 |
| konsentrasi 0,04 mg/ml | .232                            | 3  | .    | .980         | 3  | .726 |
| konsentrasi 0,08 mg/ml | .189                            | 3  | .    | .998         | 3  | .907 |
| konsentrasi 0,16 mg/ml | .212                            | 3  | .    | .990         | 3  | .813 |

a. Lilliefors Significance Correction

Keputusan : data OD pencegahan perlekatan biofilm pada semua kelompok perlakuan memiliki  $p$  value  $> 0.05$  sehingga Ho diterima (data berdistribusi normal).

#### b. Uji Homogenitas

Tujuan : Mengetahui homogenitas data OD uji pencegahan perlekatan biofilm.

Hipotesis :

Ho = Data OD uji pencegahan perlekatan biofilm homogen.

Ha = Data OD uji pencegahan perlekatan biofilm tidak homogen.

Pengambilan Keputusan :

- Jika nilai signifikansi  $\geq 0.05$  Ho diterima

- Jika nilai signifikansi  $\leq 0.05$  Ho ditolak

Tabel 8.2 Hasil Uji Homogenitas Pencegahan Perlekatan Biofilm

|                 |                                      | Levene Statistic | df1 | df2   | Sig. |
|-----------------|--------------------------------------|------------------|-----|-------|------|
| optical density | Based on Mean                        | 1.966            | 7   | 16    | .125 |
|                 | Based on Median                      | 1.067            | 7   | 16    | .427 |
|                 | Based on Median and with adjusted df | 1.067            | 7   | 7.800 | .461 |
|                 | Based on trimmed mean                | 1.903            | 7   | 16    | .136 |

Keputusan : data OD pencegahan perlekatan biofilm memiliki  $p\text{-value} > 0.05$  sehingga Ho diterima (data berdistribusi homogen). Selanjutnya data dianalisis menggunakan *One-way* anova.

### c. Uji *One-way* anova

Tujuan : untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan uji pencegahan perlekatan biofilm.

Hipotesis :

Ho = tidak terdapat perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan uji pencegahan perlekatan biofilm.

Ha = terdapat perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan uji pencegahan perlekatan biofilm.

Pengambilan Keputusan :

- Jika nilai signifikansi  $\leq 0.05$  Ho ditolak
- Jika nilai signifikansi  $\geq 0.05$  Ho diterima

Tabel 8.3 Hasil Uji *One-Way* ANOVA Pencegahan Perlekatan Biofilm

| ANOVA           |                |    |             |        |      |
|-----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| optical density | Sum of Squares | df | Mean Square | F      | Sig. |
| Between Groups  | .311           | 7  | .044        | 73.420 | .000 |
| Within Groups   | .010           | 16 | .001        |        |      |
| Total           | .321           | 23 |             |        |      |

Keputusan : data OD pencegahan perlekatan biofilm memiliki  $p\text{-value} < 0.05$  sehingga Ha diterima (terdapat perbedaan antara data OD pencegahan perlekatan biofilm).

#### d. Uji Pos Hoc Tukey

Tujuan : untuk mengetahui kelompok perlakuan mana yang memiliki perbedaan secara signifikan.

Pengambilan Keputusan :

- Jika nilai signifikansi  $\leq 0.05$  Ho ditolak
- Jika nilai signifikansi  $\geq 0.05$  Ho diterima

Tabel 8.4 Hasil Uji Pos Hoc Tukey Pencegahan Perlekatan Biofilm

Dependent Variable: optical density

|                        |                        | Mean Difference        |            |         |         | 95% Confidence Interval |             |
|------------------------|------------------------|------------------------|------------|---------|---------|-------------------------|-------------|
|                        |                        | (I-J)                  | Std. Error | Sig.    |         | Lower Bound             | Upper Bound |
|                        | (I) perlakuan          | (J) perlakuan          |            |         |         |                         |             |
| Tukey<br>HSD           | kontrol negatif        | kontrol positif        | .265000*   | .020083 | .000    | .19547                  | .33453      |
|                        |                        | kontrol media          | .350667*   | .020083 | .000    | .28114                  | .42020      |
|                        |                        | konsentrasi 0,01 mg/ml | .048333    | .020083 | .301    | -.02120                 | .11786      |
|                        |                        | konsentrasi 0,02 mg/ml | .071333*   | .020083 | .042    | .00180                  | .14086      |
|                        |                        | konsentrasi 0,04 mg/ml | .085000*   | .020083 | .011    | .01547                  | .15453      |
|                        |                        | konsentrasi 0,08 mg/ml | .115333*   | .020083 | .001    | .04580                  | .18486      |
|                        |                        | konsentrasi 0,16 mg/ml | .040667    | .020083 | .496    | -.02886                 | .11020      |
|                        | kontrol positif        | kontrol negatif        | -.265000*  | .020083 | .000    | -.33453                 | -.19547     |
|                        |                        | kontrol media          | .085667*   | .020083 | .011    | .01614                  | .15520      |
|                        |                        | konsentrasi 0,01 mg/ml | -.216667*  | .020083 | .000    | -.28620                 | -.14714     |
|                        |                        | konsentrasi 0,02 mg/ml | -.193667*  | .020083 | .000    | -.26320                 | -.12414     |
|                        |                        | konsentrasi 0,04 mg/ml | -.180000*  | .020083 | .000    | -.24953                 | -.11047     |
|                        |                        | konsentrasi 0,08 mg/ml | -.149667*  | .020083 | .000    | -.21920                 | -.08014     |
|                        |                        | konsentrasi 0,16 mg/ml | -.224333*  | .020083 | .000    | -.29386                 | -.15480     |
|                        | kontrol media          | kontrol negatif        | -.350667*  | .020083 | .000    | -.42020                 | -.28114     |
|                        |                        | kontrol positif        | -.085667*  | .020083 | .011    | -.15520                 | -.01614     |
|                        |                        | konsentrasi 0,01 mg/ml | -.302333*  | .020083 | .000    | -.37186                 | -.23280     |
|                        |                        | konsentrasi 0,02 mg/ml | -.279333*  | .020083 | .000    | -.34886                 | -.20980     |
|                        |                        | konsentrasi 0,04 mg/ml | -.265667*  | .020083 | .000    | -.33520                 | -.19614     |
|                        |                        | konsentrasi 0,08 mg/ml | -.235333*  | .020083 | .000    | -.30486                 | -.16580     |
| konsentrasi 0,16 mg/ml |                        | -.310000*              | .020083    | .000    | -.37953 | -.24047                 |             |
| konsentrasi 0,01 mg/ml | kontrol negatif        | -.048333               | .020083    | .301    | -.11786 | .02120                  |             |
|                        | kontrol positif        | .216667*               | .020083    | .000    | .14714  | .28620                  |             |
|                        | kontrol media          | .302333*               | .020083    | .000    | .23280  | .37186                  |             |
|                        | konsentrasi 0,02 mg/ml | .023000                | .020083    | .936    | -.04653 | .09253                  |             |
|                        | konsentrasi 0,04 mg/ml | .036667                | .020083    | .613    | -.03286 | .10620                  |             |
|                        | konsentrasi 0,08 mg/ml | .067000                | .020083    | .063    | -.00253 | .13653                  |             |

|                        |                        |           |         |       |         |         |
|------------------------|------------------------|-----------|---------|-------|---------|---------|
|                        | konsentrasi 0,16 mg/ml | -.007667  | .020083 | 1.000 | -.07720 | .06186  |
| konsentrasi 0,02 mg/ml | kontrol negatif        | -.071333* | .020083 | .042  | -.14086 | -.00180 |
|                        | kontrol positif        | .193667*  | .020083 | .000  | .12414  | .26320  |
|                        | kontrol media          | .279333*  | .020083 | .000  | .20980  | .34886  |
|                        | konsentrasi 0,01 mg/ml | -.023000  | .020083 | .936  | -.09253 | .04653  |
|                        | konsentrasi 0,04 mg/ml | .013667   | .020083 | .996  | -.05586 | .08320  |
|                        | konsentrasi 0,08 mg/ml | .044000   | .020083 | .405  | -.02553 | .11353  |
|                        | konsentrasi 0,16 mg/ml | -.030667  | .020083 | .783  | -.10020 | .03886  |
| konsentrasi 0,04 mg/ml | kontrol negatif        | -.085000* | .020083 | .011  | -.15453 | -.01547 |
|                        | kontrol positif        | .180000*  | .020083 | .000  | .11047  | .24953  |
|                        | kontrol media          | .265667*  | .020083 | .000  | .19614  | .33520  |
|                        | konsentrasi 0,01 mg/ml | -.036667  | .020083 | .613  | -.10620 | .03286  |
|                        | konsentrasi 0,02 mg/ml | -.013667  | .020083 | .996  | -.08320 | .05586  |
|                        | konsentrasi 0,08 mg/ml | .030333   | .020083 | .792  | -.03920 | .09986  |
|                        | konsentrasi 0,16 mg/ml | -.044333  | .020083 | .396  | -.11386 | .02520  |
| konsentrasi 0,08 mg/ml | kontrol negatif        | -.115333* | .020083 | .001  | -.18486 | -.04580 |
|                        | kontrol positif        | .149667*  | .020083 | .000  | .08014  | .21920  |
|                        | kontrol media          | .235333*  | .020083 | .000  | .16580  | .30486  |
|                        | konsentrasi 0,01 mg/ml | -.067000  | .020083 | .063  | -.13653 | .00253  |
|                        | konsentrasi 0,02 mg/ml | -.044000  | .020083 | .405  | -.11353 | .02553  |
|                        | konsentrasi 0,04 mg/ml | -.030333  | .020083 | .792  | -.09986 | .03920  |
|                        | konsentrasi 0,16 mg/ml | -.074667* | .020083 | .031  | -.14420 | -.00514 |
| konsentrasi 0,16 mg/ml | kontrol negatif        | -.040667  | .020083 | .496  | -.11020 | .02886  |
|                        | kontrol positif        | .224333*  | .020083 | .000  | .15480  | .29386  |
|                        | kontrol media          | .310000*  | .020083 | .000  | .24047  | .37953  |
|                        | konsentrasi 0,01 mg/ml | .007667   | .020083 | 1.000 | -.06186 | .07720  |
|                        | konsentrasi 0,02 mg/ml | .030667   | .020083 | .783  | -.03886 | .10020  |
|                        | konsentrasi 0,04 mg/ml | .044333   | .020083 | .396  | -.02520 | .11386  |
|                        | konsentrasi 0,08 mg/ml | .074667*  | .020083 | .031  | .00514  | .14420  |

Tanda \* menunjukkan perbedaan signifikan pada kelompok yang dibandingkan.

#### e. Uji Korelasi Pearson

Tujuan : untuk mengetahui apakah terdapat hubungan antara besarnya konsentrasi ekstrak dengan nilai OD yang diperoleh.

Pengambilan Keputusan :

- Jika nilai signifikansi  $\leq 0.05$  maka terdapat korelasi
- Jika nilai signifikansi  $\geq 0.05$  maka tidak terdapat korelasi

Tabel 8.5 Hasil Uji Korelasi Pearson Uji Pencegahan Perlekatan Biofilm

|                     |                     | Konsentrasi ekstrak | Optical density |
|---------------------|---------------------|---------------------|-----------------|
| Konsentrasi ekstrak | Pearson Correlation | 1                   | -.123           |
|                     | Sig. (2-tailed)     |                     | .663            |
|                     | N                   | 15                  | 15              |
| Optical density     | Pearson Correlation | -.123               | 1               |
|                     | Sig. (2-tailed)     | .663                |                 |
|                     | N                   | 15                  | 15              |

Keputusan : hasil uji korelasi pencegahan perlekatan biofilm memiliki signifikansi sebesar 0.663 ( $p > 0,05$ ), maka tidak terdapat korelasi antara besarnya konsentrasi dengan nilai OD.

## 2. Uji Penghambatan Pertumbuhan Biofilm *E. coli*

### a. Uji Normalitas

Tujuan : Mengetahui normalitas distribusi data OD uji penghambatan pertumbuhan biofilm.

Hipotesis :

$H_0$  = Data OD penghambatan pertumbuhan biofilm berdistribusi normal

$H_a$  = Data OD penghambatan pertumbuhan biofilm tidak berdistribusi normal

Pengambilan Keputusan :

- Jika nilai signifikansi  $\geq 0.05$   $H_0$  diterima
- Jika nilai signifikansi  $\leq 0.05$   $H_0$  ditolak

Tabel 8.6 Hasil Uji Normalitas Penghambatan Pertumbuhan Biofilm

|                 |                        | Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup> |    |      | Shapiro-Wilk |    |      |
|-----------------|------------------------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
|                 | perlakuan              | Statistic                       | df | Sig. | Statistic    | df | Sig. |
| optical density | kontrol negatif        | .339                            | 3  | .    | .851         | 3  | .244 |
|                 | kontrol positif        | .263                            | 3  | .    | .955         | 3  | .593 |
|                 | kontrol media          | .181                            | 3  | .    | .999         | 3  | .942 |
|                 | konsentrasi 0,01 mg/ml | .294                            | 3  | .    | .921         | 3  | .456 |
|                 | konsentrasi 0,02 mg/ml | .233                            | 3  | .    | .979         | 3  | .722 |
|                 | konsentrasi 0,04 mg/ml | .307                            | 3  | .    | .903         | 3  | .394 |
|                 | konsentrasi 0,08 mg/ml | .268                            | 3  | .    | .950         | 3  | .571 |
|                 | konsentrasi 0,16 mg/ml | .216                            | 3  | .    | .988         | 3  | .794 |

a. Lilliefors Significance Correction

Keputusan : data OD penghambatan pertumbuhan biofilm pada semua kelompok perlakuan memiliki  $p \text{ value} > 0.05$  sehingga  $H_0$  diterima (data berdistribusi normal)

#### b. Uji Homogenitas

Tujuan : Mengetahui homogenitas data OD uji penghambatan pertumbuhan biofilm.

Hipotesis :

$H_0$  = Data OD uji penghambatan pertumbuhan biofilm homogen.

$H_a$  = Data OD uji penghambatan pertumbuhan biofilm tidak homogen.

Pengambilan Keputusan :

- Jika nilai signifikansi  $\geq 0.05$   $H_0$  diterima
- Jika nilai signifikansi  $\leq 0.05$   $H_0$  ditolak

Tabel 8.7 Hasil Uji Homogenitas Penghambatan Pertumbuhan Biofilm

|                 |                                      | Levene Statistic | df1 | df2   | Sig. |
|-----------------|--------------------------------------|------------------|-----|-------|------|
| optical density | Based on Mean                        | 1.881            | 7   | 16    | .140 |
|                 | Based on Median                      | .500             | 7   | 16    | .821 |
|                 | Based on Median and with adjusted df | .500             | 7   | 8.866 | .814 |
|                 | Based on trimmed mean                | 1.739            | 7   | 16    | .170 |

Keputusan : data OD penghambatan pertumbuhan biofilm memiliki  $p \text{ value} > 0.05$  sehingga  $H_0$  diterima (data berdistribusi homogen). Selanjutnya data dianalisis menggunakan *One-way* anova.

#### c. Uji *One-way* ANOVA

Tujuan : untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan uji penghambatan pertumbuhan biofilm.

Hipotesis :

$H_0$  = tidak terdapat perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan uji penghambatan pertumbuhan biofilm.

$H_a$  = terdapat perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan uji penghambatan pertumbuhan biofilm.

Pengambilan Keputusan :

- Jika nilai signifikansi  $\leq 0.05$   $H_0$  diterima
- Jika nilai signifikansi  $\geq 0.05$   $H_0$  ditolak

Tabel 8.8 Hasil Uji *One-Way* ANOVA Penghambatan Pertumbuhan Biofilm**ANOVA**

optical density

|                | Sum of Squares | df | Mean Square | F       | Sig. |
|----------------|----------------|----|-------------|---------|------|
| Between Groups | .486           | 7  | .069        | 132.002 | .000 |
| Within Groups  | .008           | 16 | .001        |         |      |
| Total          | .494           | 23 |             |         |      |

Keputusan : data OD penghambatan pertumbuhan biofilm memiliki *p-value* < 0.05 sehingga  $H_a$  diterima (terdapat perbedaan antara data OD penghambatan pertumbuhan biofilm).

**d. Uji *Pos Hoc* Tukey**

Tujuan : untuk mengetahui kelompok perlakuan mana yang memiliki perbedaan secara signifikan.

Pengambilan Keputusan :

- Jika nilai signifikansi  $\leq 0.05$   $H_0$  ditolak
- Jika nilai signifikansi  $\geq 0.05$   $H_0$  diterima

Tabel 8.9 Hasil Uji *Pos Hoc* Tukey Penghambatan Pertumbuhan Biofilm

Dependent Variable: optical density

|               |                 | Mean Difference        |            |         | 95% Confidence Interval |             |         |
|---------------|-----------------|------------------------|------------|---------|-------------------------|-------------|---------|
| (I) perlakuan | (J) perlakuan   | (I-J)                  | Std. Error | Sig.    | Lower Bound             | Upper Bound |         |
| Tukey HSD     | kontrol         | kontrol positif        | .416000*   | .018720 | .000                    | .35119      | .48081  |
|               | negatif         | kontrol media          | .515333*   | .018720 | .000                    | .45052      | .58015  |
|               |                 | konsentrasi 0,01 mg/ml | .292667*   | .018720 | .000                    | .22785      | .35748  |
|               |                 | konsentrasi 0,02 mg/ml | .342000*   | .018720 | .000                    | .27719      | .40681  |
|               |                 | konsentrasi 0,04 mg/ml | .354667*   | .018720 | .000                    | .28985      | .41948  |
|               |                 | konsentrasi 0,08 mg/ml | .370667*   | .018720 | .000                    | .30585      | .43548  |
|               |                 | konsentrasi 0,16 mg/ml | .420000*   | .018720 | .000                    | .35519      | .48481  |
|               | kontrol         | kontrol negatif        | -.416000*  | .018720 | .000                    | -.48081     | -.35119 |
|               | positif         | kontrol media          | .099333*   | .018720 | .001                    | .03452      | .16415  |
|               |                 | konsentrasi 0,01 mg/ml | -.123333*  | .018720 | .000                    | -.18815     | -.05852 |
|               |                 | konsentrasi 0,02 mg/ml | -.074000*  | .018720 | .020                    | -.13881     | -.00919 |
|               |                 | konsentrasi 0,04 mg/ml | -.061333   | .018720 | .071                    | -.12615     | .00348  |
|               |                 | konsentrasi 0,08 mg/ml | -.045333   | .018720 | .295                    | -.11015     | .01948  |
|               |                 | konsentrasi 0,16 mg/ml | .004000    | .018720 | 1.000                   | -.06081     | .06881  |
| kontrol media | kontrol negatif | -.515333*              | .018720    | .000    | -.58015                 | -.45052     |         |

|                           |  |                        |           |         |       |         |         |
|---------------------------|--|------------------------|-----------|---------|-------|---------|---------|
|                           |  | kontrol positif        | -.099333* | .018720 | .001  | -.16415 | -.03452 |
|                           |  | konsentrasi 0,01 mg/ml | -.222667* | .018720 | .000  | -.28748 | -.15785 |
|                           |  | konsentrasi 0,02 mg/ml | -.173333* | .018720 | .000  | -.23815 | -.10852 |
|                           |  | konsentrasi 0,04 mg/ml | -.160667* | .018720 | .000  | -.22548 | -.09585 |
|                           |  | konsentrasi 0,08 mg/ml | -.144667* | .018720 | .000  | -.20948 | -.07985 |
|                           |  | konsentrasi 0,16 mg/ml | -.095333* | .018720 | .002  | -.16015 | -.03052 |
| konsentrasi<br>0,01 mg/ml |  | kontrol negatif        | -.292667* | .018720 | .000  | -.35748 | -.22785 |
|                           |  | kontrol positif        | .123333*  | .018720 | .000  | .05852  | .18815  |
|                           |  | kontrol media          | .222667*  | .018720 | .000  | .15785  | .28748  |
|                           |  | konsentrasi 0,02 mg/ml | .049333   | .018720 | .213  | -.01548 | .11415  |
|                           |  | konsentrasi 0,04 mg/ml | .062000   | .018720 | .066  | -.00281 | .12681  |
|                           |  | konsentrasi 0,08 mg/ml | .078000*  | .018720 | .013  | .01319  | .14281  |
| konsentrasi<br>0,02 mg/ml |  | konsentrasi 0,16 mg/ml | .127333*  | .018720 | .000  | .06252  | .19215  |
|                           |  | kontrol negatif        | -.342000* | .018720 | .000  | -.40681 | -.27719 |
|                           |  | kontrol positif        | .074000*  | .018720 | .020  | .00919  | .13881  |
|                           |  | kontrol media          | .173333*  | .018720 | .000  | .10852  | .23815  |
|                           |  | konsentrasi 0,01 mg/ml | -.049333  | .018720 | .213  | -.11415 | .01548  |
|                           |  | konsentrasi 0,04 mg/ml | .012667   | .018720 | .997  | -.05215 | .07748  |
| konsentrasi<br>0,04 mg/ml |  | konsentrasi 0,08 mg/ml | .028667   | .018720 | .781  | -.03615 | .09348  |
|                           |  | konsentrasi 0,16 mg/ml | .078000*  | .018720 | .013  | .01319  | .14281  |
|                           |  | kontrol negatif        | -.354667* | .018720 | .000  | -.41948 | -.28985 |
|                           |  | kontrol positif        | .061333   | .018720 | .071  | -.00348 | .12615  |
|                           |  | kontrol media          | .160667*  | .018720 | .000  | .09585  | .22548  |
|                           |  | konsentrasi 0,01 mg/ml | -.062000  | .018720 | .066  | -.12681 | .00281  |
| konsentrasi<br>0,08 mg/ml |  | konsentrasi 0,02 mg/ml | -.012667  | .018720 | .997  | -.07748 | .05215  |
|                           |  | konsentrasi 0,08 mg/ml | .016000   | .018720 | .986  | -.04881 | .08081  |
|                           |  | konsentrasi 0,16 mg/ml | .065333*  | .018720 | .047  | .00052  | .13015  |
|                           |  | kontrol negatif        | -.370667* | .018720 | .000  | -.43548 | -.30585 |
|                           |  | kontrol positif        | .045333   | .018720 | .295  | -.01948 | .11015  |
|                           |  | kontrol media          | .144667*  | .018720 | .000  | .07985  | .20948  |
| konsentrasi<br>0,16 mg/ml |  | konsentrasi 0,01 mg/ml | -.078000* | .018720 | .013  | -.14281 | -.01319 |
|                           |  | konsentrasi 0,02 mg/ml | -.028667  | .018720 | .781  | -.09348 | .03615  |
|                           |  | konsentrasi 0,04 mg/ml | -.016000  | .018720 | .986  | -.08081 | .04881  |
|                           |  | konsentrasi 0,16 mg/ml | .049333   | .018720 | .213  | -.01548 | .11415  |
|                           |  | kontrol negatif        | -.420000* | .018720 | .000  | -.48481 | -.35519 |
|                           |  | kontrol positif        | -.004000  | .018720 | 1.000 | -.06881 | .06081  |
|                           |  | kontrol media          | .095333*  | .018720 | .002  | .03052  | .16015  |
|                           |  | konsentrasi 0,01 mg/ml | -.127333* | .018720 | .000  | -.19215 | -.06252 |
|                           |  | konsentrasi 0,02 mg/ml | -.078000* | .018720 | .013  | -.14281 | -.01319 |

|                        |           |         |      |         |         |
|------------------------|-----------|---------|------|---------|---------|
| konsentrasi 0,04 mg/ml | -.065333* | .018720 | .047 | -.13015 | -.00052 |
| konsentrasi 0,08 mg/ml | -.049333  | .018720 | .213 | -.11415 | .01548  |

Tanda \* menunjukkan perbedaan signifikan pada kelompok yang dibandingkan.

#### e. Uji Korelasi Pearson

Tujuan : untuk mengetahui apakah terdapat hubungan antara besarnya konsentrasi ekstrak dengan nilai OD yang diperoleh.

Pengambilan Keputusan :

- Jika nilai signifikansi  $\leq 0.05$  maka terdapat korelasi
- Jika nilai signifikansi  $\geq 0.05$  maka tidak terdapat korelasi

Tabel 8.10 Hasil Uji Korelasi Pearson Uji Penghambatan Pertumbuhan Biofilm

|                     |                     | Konsentrasi ekstrak | Optical density |
|---------------------|---------------------|---------------------|-----------------|
| Konsentrasi ekstrak | Pearson Correlation | 1                   | -.852**         |
|                     | Sig. (2-tailed)     |                     | .000            |
|                     | N                   | 15                  | 15              |
| Optical density     | Pearson Correlation | -.852**             | 1               |
|                     | Sig. (2-tailed)     | .000                |                 |
|                     | N                   | 15                  | 15              |

Keputusan : hasil uji korelasi pencegahan perlekatan biofilm memiliki signifikansi sebesar 0.000 ( $p < 0,05$ ), maka terdapat korelasi antara besarnya konsentrasi dengan nilai OD.

### 3. Uji Penghancuran Biofilm *E. coli*

#### a. Uji Normalitas

Tujuan : Mengetahui normalitas distribusi data OD uji penghancuran biofilm.

Hipotesis :

$H_0$  = Data OD penghancuran biofilm berdistribusi normal

$H_a$  = Data OD penghancuran biofilm tidak berdistribusi normal

Pengambilan Keputusan :

- Jika nilai signifikansi  $\geq 0.05$   $H_0$  diterima
- Jika nilai signifikansi  $\leq 0.05$   $H_0$  ditolak

Tabel 8.11 Hasil Uji Normalitas Penghancuran Biofilm

|           |                 | Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup> |    |      | Shapiro-Wilk |    |      |
|-----------|-----------------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
| perlakuan |                 | Statistic                       | df | Sig. | Statistic    | df | Sig. |
| optical   | kontrol negatif | .269                            | 3  | .    | .950         | 3  | .569 |
| density   | kontrol positif | .337                            | 3  | .    | .855         | 3  | .253 |

|                        |      |   |   |      |   |      |
|------------------------|------|---|---|------|---|------|
| kontrol media          | .360 | 3 | . | .809 | 3 | .136 |
| konsentrasi 0,01 mg/ml | .273 | 3 | . | .945 | 3 | .549 |
| konsentrasi 0,02 mg/ml | .325 | 3 | . | .876 | 3 | .312 |
| konsentrasi 0,04 mg/ml | .245 | 3 | . | .970 | 3 | .670 |
| konsentrasi 0,08 mg/ml | .276 | 3 | . | .942 | 3 | .537 |
| konsentrasi 0,16 mg/ml | .308 | 3 | . | .902 | 3 | .391 |

a. Lilliefors Significance Correction

Keputusan : data OD penghancuran biofilm pada semua kelompok perlakuan memiliki  $p\text{ value} > 0.05$  sehingga  $H_0$  diterima (data berdistribusi normal)

b. Uji Homogenitas

Tujuan : Mengetahui homogenitas data OD uji penghancuran biofilm.

Hipotesis :

$H_0$  = Data OD uji penghancuran biofilm homogen.

$H_a$  = Data OD uji penghancuran biofilm tidak homogen.

Pengambilan Keputusan :

- Jika nilai signifikansi  $\geq 0.05$   $H_0$  diterima
- Jika nilai signifikansi  $\leq 0.05$   $H_0$  ditolak

Tabel 8.12 Hasil Uji Homogenitas Penghancuran Biofilm

|                 |                                      | Levene Statistic | df1 | df2    | Sig. |
|-----------------|--------------------------------------|------------------|-----|--------|------|
| optical density | Based on Mean                        | 1.342            | 7   | 16     | .294 |
|                 | Based on Median                      | .367             | 7   | 16     | .908 |
|                 | Based on Median and with adjusted df | .367             | 7   | 10.451 | .903 |
|                 | Based on trimmed mean                | 1.236            | 7   | 16     | .340 |

Keputusan : data OD penghancuran biofilm memiliki  $p\text{ value} > 0.05$  sehingga  $H_0$  diterima (data berdistribusi homogen). Selanjutnya data dianalisis menggunakan *One-way anova*.

c. Uji *One-way ANOVA*

Tujuan : untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan uji penghambatan pertumbuhan biofilm.

Hipotesis :

$H_0$  = tidak terdapat perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan uji penghambatan pertumbuhan biofilm.

$H_a$  = terdapat perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan uji penghambatan pertumbuhan biofilm.

Pengambilan Keputusan :

- Jika nilai signifikansi  $\leq 0.05$   $H_0$  ditolak
- Jika nilai signifikansi  $\geq 0.05$   $H_0$  diterima

Tabel 8.13 Hasil Uji *One-Way ANOVA* Penghancuran Biofilm

| ANOVA           |                |    |             |        |      |
|-----------------|----------------|----|-------------|--------|------|
| optical density |                |    |             |        |      |
|                 | Sum of Squares | df | Mean Square | F      | Sig. |
| Between Groups  | .223           | 7  | .032        | 56.190 | .000 |
| Within Groups   | .009           | 16 | .001        |        |      |
| Total           | .232           | 23 |             |        |      |

Keputusan : data OD penghancuran biofilm memiliki  $p\text{-value} < 0.05$  sehingga  $H_a$  diterima (terdapat perbedaan antara data OD penghancuran biofilm).

#### d. Uji *Pos Hoc Tukey*

Tujuan : untuk mengetahui kelompok perlakuan mana yang memiliki perbedaan secara signifikan.

Pengambilan Keputusan :

- Jika nilai signifikansi  $\leq 0.05$   $H_0$  ditolak
- Jika nilai signifikansi  $\geq 0.05$   $H_0$  diterima

Tabel 8.14 Hasil Uji *Pos Hoc Tukey* Penghancuran Biofilm

Dependent Variable: optical density

|               |                        | Mean Difference        |            |         | 95% Confidence Interval |             |         |
|---------------|------------------------|------------------------|------------|---------|-------------------------|-------------|---------|
| (I) perlakuan | (J) perlakuan          | (I-J)                  | Std. Error | Sig.    | Lower Bound             | Upper Bound |         |
| Tukey         | kontrol                | kontrol positif        | .278667*   | .019450 | .000                    | .21133      | .34601  |
|               | negatif                | kontrol media          | .339667*   | .019450 | .000                    | .27233      | .40701  |
| HSD           |                        | konsentrasi 0,01 mg/ml | .144667*   | .019450 | .000                    | .07733      | .21201  |
|               |                        | konsentrasi 0,02 mg/ml | .200000*   | .019450 | .000                    | .13266      | .26734  |
|               |                        | konsentrasi 0,04 mg/ml | .160667*   | .019450 | .000                    | .09333      | .22801  |
|               |                        | konsentrasi 0,08 mg/ml | .187000*   | .019450 | .000                    | .11966      | .25434  |
|               |                        | konsentrasi 0,16 mg/ml | .263333*   | .019450 | .000                    | .19599      | .33067  |
|               | kontrol                | kontrol negatif        | -.278667*  | .019450 | .000                    | -.34601     | -.21133 |
|               | positif                | kontrol media          | .061000    | .019450 | .091                    | -.00634     | .12834  |
|               | konsentrasi 0.01 mg/ml | -.134000*              | .019450    | .000    | -.20134                 | -.06666     |         |

|               |                        |           |         |      |         |         |
|---------------|------------------------|-----------|---------|------|---------|---------|
| kontrol media | konsentrasi 0,02 mg/ml | -.078667* | .019450 | .016 | -.14601 | -.01133 |
|               | konsentrasi 0,04 mg/ml | -.118000* | .019450 | .000 | -.18534 | -.05066 |
|               | konsentrasi 0,08 mg/ml | -.091667* | .019450 | .004 | -.15901 | -.02433 |
|               | konsentrasi 0,16 mg/ml | -.015333  | .019450 | .991 | -.08267 | .05201  |
|               | kontrol negatif        | -.339667* | .019450 | .000 | -.40701 | -.27233 |
|               | kontrol positif        | -.061000  | .019450 | .091 | -.12834 | .00634  |
| kontrol media | konsentrasi 0,01 mg/ml | -.195000* | .019450 | .000 | -.26234 | -.12766 |
|               | konsentrasi 0,02 mg/ml | -.139667* | .019450 | .000 | -.20701 | -.07233 |
|               | konsentrasi 0,04 mg/ml | -.179000* | .019450 | .000 | -.24634 | -.11166 |
|               | konsentrasi 0,08 mg/ml | -.152667* | .019450 | .000 | -.22001 | -.08533 |
|               | konsentrasi 0,16 mg/ml | -.076333* | .019450 | .021 | -.14367 | -.00899 |
|               | kontrol negatif        | -.144667* | .019450 | .000 | -.21201 | -.07733 |
| 0,01 mg/ml    | kontrol positif        | .134000*  | .019450 | .000 | .06666  | .20134  |
|               | kontrol media          | .195000*  | .019450 | .000 | .12766  | .26234  |
|               | konsentrasi 0,02 mg/ml | .055333   | .019450 | .151 | -.01201 | .12267  |
|               | konsentrasi 0,04 mg/ml | .016000   | .019450 | .989 | -.05134 | .08334  |
|               | konsentrasi 0,08 mg/ml | .042333   | .019450 | .413 | -.02501 | .10967  |
|               | konsentrasi 0,16 mg/ml | .118667*  | .019450 | .000 | .05133  | .18601  |
| 0,02 mg/ml    | kontrol negatif        | -.200000* | .019450 | .000 | -.26734 | -.13266 |
|               | kontrol positif        | .078667*  | .019450 | .016 | .01133  | .14601  |
|               | kontrol media          | .139667*  | .019450 | .000 | .07233  | .20701  |
|               | konsentrasi 0,01 mg/ml | -.055333  | .019450 | .151 | -.12267 | .01201  |
|               | konsentrasi 0,04 mg/ml | -.039333  | .019450 | .498 | -.10667 | .02801  |
|               | konsentrasi 0,08 mg/ml | -.013000  | .019450 | .997 | -.08034 | .05434  |
| 0,04 mg/ml    | konsentrasi 0,16 mg/ml | .063333   | .019450 | .073 | -.00401 | .13067  |
|               | kontrol negatif        | -.160667* | .019450 | .000 | -.22801 | -.09333 |
|               | kontrol positif        | .118000*  | .019450 | .000 | .05066  | .18534  |
|               | kontrol media          | .179000*  | .019450 | .000 | .11166  | .24634  |
|               | konsentrasi 0,01 mg/ml | -.016000  | .019450 | .989 | -.08334 | .05134  |
|               | konsentrasi 0,02 mg/ml | .039333   | .019450 | .498 | -.02801 | .10667  |
| 0,08 mg/ml    | konsentrasi 0,08 mg/ml | .026333   | .019450 | .865 | -.04101 | .09367  |
|               | konsentrasi 0,16 mg/ml | .102667*  | .019450 | .001 | .03533  | .17001  |
|               | kontrol negatif        | -.187000* | .019450 | .000 | -.25434 | -.11966 |
|               | kontrol positif        | .091667*  | .019450 | .004 | .02433  | .15901  |
|               | kontrol media          | .152667*  | .019450 | .000 | .08533  | .22001  |
|               | konsentrasi 0,01 mg/ml | -.042333  | .019450 | .413 | -.10967 | .02501  |
| 0,16 mg/ml    | konsentrasi 0,02 mg/ml | .013000   | .019450 | .997 | -.05434 | .08034  |
|               | konsentrasi 0,04 mg/ml | -.026333  | .019450 | .865 | -.09367 | .04101  |
|               | konsentrasi 0,08 mg/ml | .076333*  | .019450 | .021 | .00899  | .14367  |
|               | kontrol negatif        | -.187000* | .019450 | .000 | -.25434 | -.11966 |
|               | kontrol positif        | .091667*  | .019450 | .004 | .02433  | .15901  |
|               | kontrol media          | .152667*  | .019450 | .000 | .08533  | .22001  |

|                           |                        |           |         |      |         |         |
|---------------------------|------------------------|-----------|---------|------|---------|---------|
| konsentrasi<br>0,16 mg/ml | kontrol negatif        | -.263333* | .019450 | .000 | -.33067 | -.19599 |
|                           | kontrol positif        | .015333   | .019450 | .991 | -.05201 | .08267  |
|                           | kontrol media          | .076333*  | .019450 | .021 | .00899  | .14367  |
|                           | konsentrasi 0,01 mg/ml | -.118667* | .019450 | .000 | -.18601 | -.05133 |
|                           | konsentrasi 0,02 mg/ml | -.063333  | .019450 | .073 | -.13067 | .00401  |
|                           | konsentrasi 0,04 mg/ml | -.102667* | .019450 | .001 | -.17001 | -.03533 |
|                           | konsentrasi 0,08 mg/ml | -.076333* | .019450 | .021 | -.14367 | -.00899 |

Tanda \* menunjukkan perbedaan signifikan pada kelompok yang dibandingkan.

#### e. Uji Korelasi Pearson

Tujuan : untuk mengetahui apakah terdapat hubungan antara besarnya konsentrasi ekstrak dengan nilai OD yang diperoleh.

Pengambilan Keputusan :

- Jika nilai signifikansi  $\leq 0.05$  maka terdapat korelasi
- Jika nilai signifikansi  $\geq 0.05$  maka tidak terdapat korelasi

Tabel 8.15 Hasil Uji Korelasi Pearson Uji Penghambatan Pertumbuhan Biofilm

|                     |                     | Konsentrasi ekstrak | Optical density |
|---------------------|---------------------|---------------------|-----------------|
| Konsentrasi ekstrak | Pearson Correlation | 1                   | -.721**         |
|                     | Sig. (2-tailed)     |                     | .002            |
|                     | N                   | 15                  | 15              |
| Optical density     | Pearson Correlation | -.721**             | 1               |
|                     | Sig. (2-tailed)     | .002                |                 |
|                     | N                   | 15                  | 15              |

Keputusan : hasil uji korelasi pencegahan perlekatan biofilm memiliki signifikansi sebesar 0.002 ( $p < 0,05$ ), maka terdapat korelasi antara besarnya konsentrasi dengan nilai OD.