

## BAB II

### LANDASAN TEORI

#### 2.1 Tinjauan Pustaka

##### 2.1.1 Daun Pala (*Myristica fragrans*)



**Gambar 2.1** Daun Pala (*Myristica fragrans*)  
Sumber : Dokumentasi Pribadi

Tumbuhan pala (*Myristica fragrans*) merupakan tanaman asli Indonesia yang berasal dari kepulauan Maluku dan termasuk dalam keluarga *Myristicaceae*. Tanaman pala dikenal sebagai tanaman rempah yang dimanfaatkan di berbagai industri. Biji, fuli, dan minyak pala merupakan komoditas ekspor yang digunakan dalam industri makanan dan minuman. Selain itu, minyak yang dihasilkan dari biji, fuli, dan daun pala banyak dimanfaatkan dalam industri obat-obatan, parfum, dan kosmetik (Gusmiani Silvia, 2022).

Daun pala adalah salah satu bagian dari tanaman pala yang belum banyak dimanfaatkan. Daun ini mengandung senyawa seperti saponin, tanin, dan flavonoid yang memiliki potensi untuk

dikembangkan dalam berbagai industri (Pratiwi et al., 2019).

a. Taksonomi

Adapun taksonomi dari daun pala (*Myristica fragrans*) menurut (Fadillah Fia Nurul, 2022) adalah sebagai berikut :

Kingdom	:	Plantae
Divisi	:	Tracheophyta
Subdivisi	:	Spermatophytina
Kelas	:	Magnoliopsida
Ordo	:	Magnoliales
Famili	:	Myristicaceae
Genus	:	Myristica
Spesies	:	<i>Myristica fragrans</i>

b. Morfologi

Daun pala (*Myristica fragrans*) memiliki morfologi diantaranya, akar tunggang yang dalam dan akar lateralnya berfungsi sebagai penyerap nutrisi berbentuk serabut yang terletak di bawah permukaan tanah. Batang daun pala dapat tumbuh hingga mencapai ketinggian 18-20 meter. Batang yang tegak, berbentuk bulat dengan sedikit benggol. Cabang primer membentuk kran (karangan) yang mengelilingi batang utama dan cabang relatif rendah. Kulit batang utama berwarna abu-abu gelap hingga berwarna hijau tua dan mahkota pohon berbentuk piramida. Daun tanaman pala berbentuk elips dengan ujung dan

pangkal yang meruncing, memiliki ukuran yang lebih kecil dibandingkan daun pala betina. Bagian atas daun berwarna hijau tua dan bagian bawah berwarna hijau kebiruan muda. Bunga tanaman pala berbentuk tandan (malai), dengan perbedaan bunga jantan terdiri dari 1-10 bunga sedangkan tandan betina terdiri dari 1-3 bunga. Bunga jantan berbentuk seperti priuk dengan panjang ranting mencapai 9 mm, sementara bunga betina lebih besar. Buah tanaman pala berbentuk lonjong mirip lemon, terdiri dari tiga bagian yaitu daging buah (pericarp), fuli, dan biji. Kulit buah pala cukup tebal dan mencapai 70% dari total berat buah. Daging buah mengandung cairan bergetah dan memiliki rasa sepat. Selain itu, daging buah pala kaya akan minyak atsiri, yang memberikan aroma khas pada pala. Tanaman pala memiliki biji Tunggal yang berkeping 2, dilindungi oleh tempurung yang cukup keras meskipun tidak tebal. Biji berbentuk lonjong dan berwarna coklat muda pada bagian bawah dan coklat tua pada bagian atas dengan permukaan yang keriput (Fadillah Fia Nurul, 2022).

c. Kandungan kimia daun pala (*Myristica fragrans*)

Daun pala (*Myristica fragrans*) merupakan bagian dari tanaman pala yang masih belum banyak dimanfaatkan. Penelitian mengenai daun pala juga masih terbatas, meskipun daun ini tersedia melimpah dibandingkan bagian lain dari

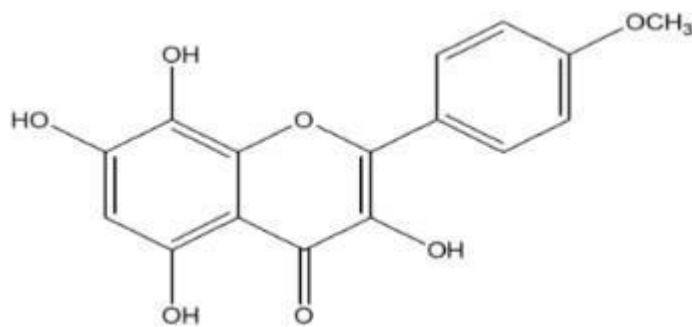
tanaman (Amin Nasution et al., 2024).

Kandungan daun pala juga memiliki manfaat dari senyawa kimia diantaranya:

1) Flavonoid

Flavonoid merupakan kelompok senyawa fenolik yang paling banyak ditemukan di alam. Senyawa ini umumnya terdapat di berbagai tumbuhan, seperti daun, biji, dan benang sari. Flavonoid memiliki aktivitas sebagai antibakteri, antijamur, dan antivirus yang tidak hanya dapat melawan patogen pada tanaman tetapi juga pada manusia (Gusmiani Silvia, 2022). Ekstrak dari tanaman mengandung senyawa metabolit sekunder flavonoid yang berpotensi menghambat gen adhesi antar sel *icaA* dan *icaD* (Intraceluller Adhesion). Keberadaan gen *icaA* dan *icaD* pada bakteri merupakan salah satu faktor dalam pembentukan biofilm. Hidroksil dalam struktur senyawa flavonoid dapat menyebabkan pembentukan senyawa kompleks dengan protein, yang dapat mengakibatkan denaturasi biofilm (Winarsih et al., 2019). Flavonoid adalah turunan fenol yang dapat menyebabkan denaturasi dan koagulasi protein sel bakteri. Senyawa flavonoid merusak sel bakteri dengan memanfaatkan perbedaan kapolaran antara lipid penyusun sel bakteri dan gugus alkohol pada

senyawa flavonoid. Proses ini mengakibatkan kerusakan dinding sel yang terdiri dari lipid dan asam amino, bereaksi dengan gugus alkohol pada senyawa flavonoid sehingga akan menyebabkan dinding sel akan rusak dan mengalami penguraian yang memungkinkan penetrasi fenol ke dalam sel bakteri dan menyebabkan koagulasi protein sehingga membrane sel bakteri mengalami lisis. Flafonoid dapat dirumuskan dengan C6-C3-C6 (Suryani et al., 2019). Berikut terdapat struktur senyawa pada flavonoid:



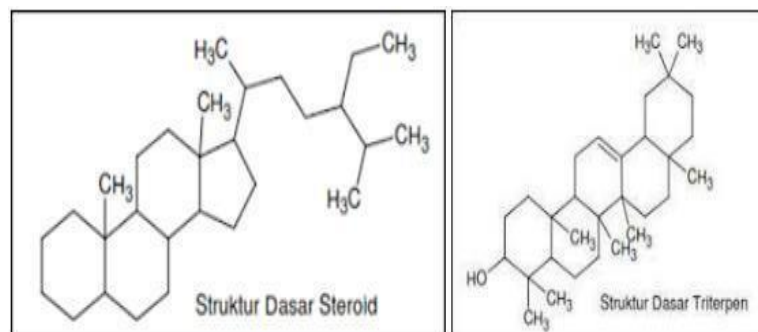
**Gambar 2.2** struktur senyawa flavonoid

Sumber : Rasidah et al., 2019.

## 2) Saponin

Saponin merupakan glikosida yang mengandung aglikon berupa sapogenin, yang mampu menurunkan tegangan permukaan udara sehingga menghasilkan buih ketika dikocok (Gusmiani Silvia, 2022). Saponin bekerja sebagai antibakteri dengan cara meningkatkan kebocoran permeabilitas dengan menurunkan tegangan permukaan

sehingga senyawa bisa keluar menyebabkan kebocoran protein dan enzim tertentu dari sel dan mengakibatkan kematian sel bakteri (Widyawati et al., 2020). Mekanisme kerja saponin sebagai antibakteri adalah dengan menyebabkan kebocoran protein dan enzim dari dalam sel. Saponin bertindak sebagai antibakteri karena zat aktif permukaan mirip dengan detergen yang mengakibatkan penurunan tegangan permukaan dinding sel bakteri dan merusak permeabilitas membran. Kerusakan pada membran sel sangat mengganggu kelangsungan hidup bakteri. Saponin dapat dirumuskan yaitu  $C_{27}H_{48}O_3$  (Suryani et al., 2019). Saponin merupakan sejenis glikosida yang mengandung aglikon berbentuk steroid dan triterpenoid. Berikut terdapat struktur senyawa pada saponin:



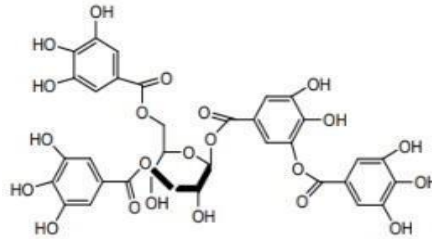
**Gambar 2.3** struktur senyawa saponin

Sumber : Anggraeni Putri et al., 2023.

### 3) Tanin

Tanin merupakan senyawa aktif metabolit sekunder turunan polirenenol. Pemberian tanin dengan lipoprotein sel dapat menyebabkan penimbunan senyawa dan pemecahan lemak (Winarsih et al., 2019) . Tanin umumnya terdapat hampir di semua bagian tanaman seperti pada kulit kayu dan juga buah. Tanin terbagi atas dua jenis, yaitu tanin terhidrolisis dan tanin terkondensasi. Tanin terkondensasi umumnya dari senyawa flavonoid, katekin, dan flavan-3-4-diol Ketika ditambahkan asam atau enzim akan menjadi plobapen. Tanin terkondensasi dikenal juga sebagai *proanthocyanidin* yaitu polimer flavonoid yang terhubung melalui ikatan C-8 dan C-4. Sedangkan tanin terhidrolisis dapat dihidrolisis oleh asam dan enzim sehingga menghasilkan asam galat dan asam elegit. Pada tanaman, jumlah tanin terkondensasi lebih dominan dari pada tanin terhidrolisis (Hersila & Chatri, 2023). Mekanisme kerja antibakteri tanin melibatkan kemampuan tanin untuk mengendapkan protein. Tanin berfungsi sebagai antibakteri dengan menghambat enzim *reverse transcriptase* dan DNA topoisomerase sehingga sel bakteri tidak dapat terbentuk (Hersila & Chatri, 2023).

Tanin dapat dirumuskan dengan  $C_{78}H_{52}O_{46}$  (Suryani et al., 2019). Berikut terdapat struktur senyawa pada tanin:



**Gambar 2.4** Struktur senyawa tanin

Sumber : Hersila & Chatri, 2023.

#### 2.1.2 Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* merupakan patogen oportunistik, yang dapat mengeksploitasi cacat pada mekanisme pertumbuhan bakteri untuk melalui infeksi *Pseudomonas aeruginosa* bersifat patogen jika masuk ke area dengan sistem perlindungan yang tidak normal, misalnya ketika selaput lender dan kulit ''robek'' akibat kerusakan jaringan secara langsung. *Pseudomonas aeruginosa* menyebabkan infeksi pada luka bakar dan luka biasa, terutama pada luka bakar derajat dua dan tiga, dengan nanah berwarna hijau kebiruan yang disebabkan oleh pigmen piosianin (Fauziah hesti, 2024).

Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dapat ditemukan di berbagai lingkungan, termasuk rumah sakit. Bakteri ini menyebabkan infeksi nosokomial, infeksi pada pasien dengan luka bakar, infeksi pada pasien yang menggunakan kateter atau infus, serta komplikasi pasca operasi. Angka kejadian infeksi nosokomial di Rumah Sakit yang

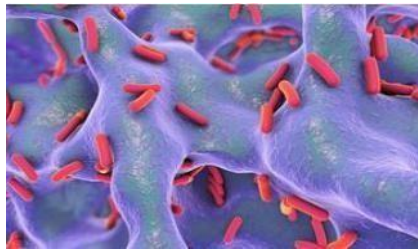
disebabkan oleh *Pseudomonas aeruginosa* di dunia tercatat sebesar 10%-15%. *Pseudomonas aeruginosa* adalah patogen yang sulit diobati, karena resistensi terhadap beberapa antibiotik sering menyebabkan kegagalan pengobatan dan sering dikaitkan dengan penyebab utama kematian (Milenia Purnama et al., 2024).

Pembentukan biofilm pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, termasuk komposisi nutrient yang tersedia, kondisi lingkungan seperti pH dan suhu, serta adanya senyawa inhibitor lain. Faktor virulensi yang dimiliki oleh *Pseudomonas aeruginosa* juga mempengaruhi kemampuan dalam membentuk biofilm dan seringkali membuat bakteri ini lebih resisten terhadap senyawa antibakteri. Di antara faktor virulensi tersebut adanya kemampuan menghasilkan toksin seperti *pyocyanin*, serta memiliki lapisan membran luar yang tebal terdiri dari lipopolisakarida (Milenia Purnama et al., 2024).

Ditemukan bahwa bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang diujikan resisten terhadap *streptomisin*, *kanamycin*, *polimiksin B*, *amoxiclav*, *amoxicillin*, *penicillin*, *penicillin G*, *seftriakson*, *sefotaksim*, *cefepime*, *celophatim*, *teicoplanin*, *kloramfenikol*, *kotrimoxazol*, *sulfonamid*, *eritromisin*, *tetrasiklin*, *azitromisin*, dan *nirtofuratoin* ( $\geq 50\%$ ), sedangkan antibiotik seperti *amikacin*, *spektinomisin*, *meropenem*, *seftazidim*, *seforerazon*, *fasfomocin* resisten dibawah 50.

a. Klarifikasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dapat diklarifikasikan sebagai berikut:



**Gambar 2.5** Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

Sumber : Yesi Wulandari, 2023.

Kingdom	: <i>Bacteria</i>
Phylum	: <i>Proteobacteria</i>
Class	: <i>Gamma Proteobacteria</i>
Order	: <i>Pseudomonadales</i>
Family	: <i>Pseudomonadaceae</i>
Genus	: <i>Pseudomonas</i>
Species	: <i>Aeruginosa</i>

b. Karakteristik *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri gram negatif yang memiliki flagella polar, membuatnya motil dengan ukuran sekitar 0,5-1,0  $\mu\text{m}$ . Bakteri ini dapat hidup dalam berbagai kondisi dan menyesuaikan diri dengan lingkungan yang memiliki oksigen dan suplemen rendah serta mampu bertahan pada suhu antara 4-42°C. *Pseudomonas aeruginosa* juga dapat bertahan di perangkat medis dan area lain dalam

klinik, sehingga mudah menginfeksi pasien dengan sistem kekebalan yang lemah. *Pseudomonas aeruginosa* umumnya tidak memiliki katalis gidrolitik penting untuk menguraikan polimer menjadi monomer, tetapi mereka memiliki sistem operasi yang dapat diinkubasi untuk memproduksi protein spesifik selama metabolisme sumber karbon yang biasanya tidak digunakan. Mikroorganisme ini memainkan peran penting dalam proses perubahan campuran sintetik menjadi komponen yang lebih sederhana melalui biodegradasi (Waqih Ainur Riza, 2023).

Pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* telah diamati pada berbagai jenis media budidaya, dan beberapa strain terbukti mampu menginduksi hemolisis pada darah. Koloni

*Pseudomonas aeruginosa* memiliki morfologi bulat dan menampilkan cahaya hijau yang khas. Bakteri ini mampu mensintesis pigmen *fluoresen pyoverdine*, yang menghasilkan warna kehijauan pada media agar (Yesi Wulandari, 2023),

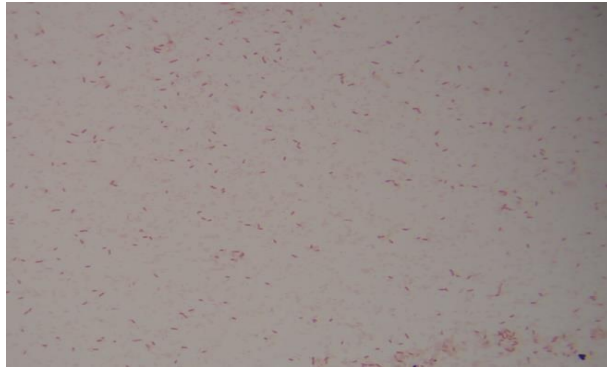
c. Patogenitas *Pseudomonas aeruginosa*

Patogenesis *Pseudomonas aeruginosa* dimulai ketika organisme mikroskopis masuk ke dalam tubuh melalui selaput lendir pada saluran pernafasan, lambung, genital, dan saluran kemih. Infeksi bakteri ini juga dapat menembus lapisan lender dan kulit pada luka parah serta luka bakar (Waqih Ainur Riza, 2023).

Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dapat menunjukkan patogenesis ketika masuk ke dalam tubuh melalui mekanisme pertahanan yang terganggu, seperti selaput lendir dan kulit yang rusak akibat cedera jaringan. Kehadiran bakteri ini sering dikaitkan dengan penggunaan peralatan medis seperti kateter, stetoskop, dan alat serupa lainnya, serta mampu menyebabkan infeksi pada individu dengan sistem kekebalan yang lemah. Setelah menempel pada selaput lendir atau kulit dan membentuk koloni, bakteri akan menembus jaringan di sekitarnya, sehingga menyebabkan penyakit sistemik. Pili, enzim, dan racun memainkan peran penting dalam proses ini. *Pseudomonas aeruginosa* memiliki pili yang memanjang dari permukaan selnya untuk menempel pada sel epitel inang. Sebagian besar strain *pseudomonas aeruginosa* yang diperoleh dari infeksi klinis yang mampu mensintesis enzim ekstraseluler seperti *elastase*, *protease*, dan dua *hemolisin*, yaitu *forfolipase C* dapat tahan panas dan *glikolipid* yang stabil pada suhu tinggi (Yesi Wulandari, 2023).

d. Identifikasi *Pseudomonas aeruginosa*

1. Mikroskopis



**Gambar 2.6** Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dibawah mikroskop perbesaran 100x setelah pengecetan gram

Sumber : Dokumentasi Pribadi.

Pengamatan mikroorganisme seperti bakteri dilakukan secara mikroskopis dengan pewarnaan gram. Pewarnaan ini digunakan untuk mengamati bentuk, susunan, dan ukuran bakteri. Pada pewarnaan gram bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, bakteri terlihat berwarna merah dengan bentuk batang pendek. Hal ini karena *Pseudomonas aeruginosa* termasuk dalam golongan bakteri gram negatif yang memiliki lapisan peptidoglikan tipis. Akibatnya, saat diberi alkohol, kompleks kristal violet dari pewarnaan sebelumnya mudah terurai dan membuat bakteri tidak berwarna. Bakteri gram negatif seperti *Pseudomonas aeruginosa* hanya menyerap pewarna safranin, yang membuatnya terlihat berwarna merah muda.

## 2. Uji biokimia

Untuk mengidentifikasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dapat dilakukan uji biokimia berupa uji IMViC, yang meliputi uji indol, *Sulfid Indol Motility* (SIM), uji gula (glukosa, sukrosa, laktosa, dan mannitol), *Methyl Red* (MR), *Voges-Proskauer* (MR-VP), dan *Simmon's Citrate Agar* (SCA). Setelah itu, sampel diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, dan perubahan yang terjadi diamati.

### a. Uji Indol

Uji indol pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* didapatkan hasil negatif, ditandai dengan tidak terbentuknya cincin ungu pada tabung reaksi yang mengindikasikan bakteri tidak menghasilkan enzim *tryptophanase*.

### b. Uji TSIA

Uji TSIA digunakan untuk mengidentifikasi bakteri berdasarkan kemampuannya mengurai dektrosa, laktosa, sukrosa, dan menghasilkan gas sulfida. Selain itu, uji ini juga berguna untuk mendeteksi gas H<sub>2</sub>S yang dihasilkan oleh bakteri. Pada pengujian terhadap *pseudomonas aeruginosa*, ditemukan hasil berupa warna hijau kebiruan dan permukaan yang mengkilat.

c. Methyl Red (MR)

Uji MR dilakukan untuk menentukan apakah terjadi fermentasi asam campuran, yaitu kemampuan bakteri memfermentasi glukosa yang menyebabkan pH media pertumbuhan menjadi lebih asam. Pada pengujian terhadap *pseudomonas aeruginosa*, hasil uji MR negatif yang berarti tidak ada perubahan warna cairan *methyl red* menjadi kuning.

d. Uji *Sulfid Indol Motility* (SIM)

Uji SIM berfungsi untuk mengetahui motilitas suatu bakteri pada pengujian *pseudomonas aeruginosa* yang didapatkan hasil positif. Dimana terlihat penyebaran pertumbuhan di garis tusukan yang telah dibuat pada media.

e. Uji *Simmon's Citrate Agar* (SCA)

Uji SCA bertujuan untuk mengetahui adanya sifat yang menjadi sumber karbon dan menciptakan sifat biasa. Uji dengan *pseudomonas aeruginosa* adalah positif. Dimana terjadi perubahan warna menjadi biru.

### 2.1.3 Simplisia

Simplisia dapat disebut sebagai bahan baku untuk pembuatan obat yang berasal dari tanaman obat yang belum diolah dengan berbagai cara kecuali dengan proses pengeringan (Kusuma et al.,

2023). Untuk itu perlu ditentukan batas suhu pengeringan maksimal agar kualitas simplisia tetap terjaga dengan suhu pengeringan simplisia berkisar antara 40-60°C. Kadar air simplisia adalah <10%. Perbedaan nilai antara masing-masing perlakuan dapat disebabkan oleh variasi panas matahari yang tidak konstan, sedangkan panas buatan stabil dan merata. Berat kering konstan lebih cepat dicapai dengan pengeringan menggunakan oven dibandingkan dengan sinar matahari, yang menunjukkan bahwa semakin tinggi suhu yang digunakan maka semakin cepat untuk proses transpirasi (Wandira Ayu, 2023).

#### 2.1.4 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan zat target dari zat yang tidak diinginkan dengan menggunakan teknik verifikasi berdasarkan perbedaan distribusi zat yang terlalu larut antara dua atau lebih pelarut yang tidak saling bercampur. Sehingga proses yang dilakukan untuk memperoleh kandungan senyawa kimia dari jaringan tumbuhan atau hewan menggunakan pelarut yang sesuai dengan standar prosedur ekstraksi. Proses ekstraksi akan berhenti ketika keseimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dan konsentrasi dalam simplisia tercapai (Sudarwati Tri Puji Lestari, 2019).

a. Infusa

Infusa merupakan metode ekstraksi yang menggunakan pelarut udara. Selama proses infusdasi, suhu air pelarut harus mencapai 90 °C selama 15 menit. Rasio berat bahan terhadap udara adalah 1:10, yang berarti jika berat bahan adalah 10 gram, maka volume udara yang digunakan adalah 100 ml. Serbuk akan dipanaskan dalam panci dengan air secukupnya atau menggunakan *waterbath* (Sudarwati Tri Puji Lestari, 2019).

b. Maserasi

Maserasi merupakan metode ekstraksi yang paling sederhana, dengan cara melakukan perendaman serbuk simplisia dalam cairan penyari. Cairan penyari akan menembus dinding sel dan masuk ke dalam rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan larut karena perbedaan konsentrasi antara larutan zat aktif di dalam sel dan di luar sel, larutan yang lebih pekat akan terdorong keluar. Proses ini akan terus berulang hingga tercapai keseimbangan konsentrasi antara larutan di dalam dan di luar sel (Sudarwati Tri Puji Lestari, 2019).

c. Perlokasi

Perlokasi merupakan proses ekstraksi simplisia dengan melewati pelarut yang sesuai secara perlahan melalui simplisia dalam sebuah perkolator. Tujuan dari perlokasi adalah untuk menarik seluruh zat berhkasiat, baik yang tahan maupun

tidak tahan terhadap pemanasan. Cairan penyari dialirkan dari atas ke bawah melalui serbuk simplisia, melarutkan zat aktif dari sel-sel yang dilalui sehingga mencapai keadaan jenuh. Kekuatan yang berperan dalam perlokasi meliputi gaya gravitasi, kekentalan, daya larut, tegangan permukaan, difusi, osmosis, adhesi, daya layar, dan pembekuan (friksi) (Sudarwati Tri Puji Lestari, 2019).

d. Refluks

Salah satu metode sintesis senyawa anorganik adalah refluks yang digunakan. Ketika pelarut *volatile* terlibat dalam sintesis. Jika pemanasan bisa digunakan, pelarut akan menguap sebelum reaksi selesai. Prinsip metode refluks adalah pelarut *volatile* akan menguap pada suhu tinggi, tetapi kemudian diserahkan oleh kondensor sehingga uap akan mengembun dan kembali ke wadah reaksi (Sudarwati Tri Puji Lestari, 2019).

e. Soxhlet

Soxhlet merupakan metode pemisahan komponen dalam zat padat melalui penyaringan berulang menggunakan pelarut tertentu, sehingga semua komponen yang diinginkan akan terlindungi. Metode ini menggunakan pelarut organik tertentu dan melibatkan pemanasan, sehingga uap yang terbentuk akan mendingin dan sampel terus menerus basah. Pelarut yang telah mengandung senyawa kimia diuapkan menggunakan *rotary*

*evaporator* sehingga pelarut dapat dipisahkan kembali (Sudarwati Tri Puji Lestari, 2019).

f. Dekokta

Dekokta mempunyai prinsip kerja yang hamper sama dengan infusa. Hanya saja terdapat perbedaan pada waktu ekstraksi. Metode ini membutuhkan waktu sekitar 30 menit dengan suhu mencapai titik didih air (Sari seli puspita, 2024).

g. Destilasi

Destilasi merupakan salah satu metode ekstraksi yang menggunakan panas. Prinsip kerja metode ini adalah mengestraksi senyawa yang menguap bersama air sebagai pelarut. Saat proses pendinginan, uap udara dan senyawa akan terkondensasi dan terpisah menjadi distilat udara dan senyawa yang diekstraksi (Sari seli puspita, 2024).

h. Lawan arah (*counter current*)

Metode lawan arah (*counter current*) sama dengan perkolasi tetapi simplisia bergerak berlawanan arah dengan pelarut yang digunakan. Cara ini dimanfaatkan untuk ekstraksi bahan herbal skala besar (Sari seli puspita, 2024).

i. Ultrasonik

Metode ultrasonik melibatkan penggunaan gelombang ultrasonik dengan frekuensi 20-2000 kHz sehingga permeabilitas dinding sel meningkat dan isi sel keluar (Sari seli puspita, 2024).

j. Gelombang mikro (*microwave assisted extraction*, MAE)

Metode ini menggunakan gelombang mikro dengan frekuensi 2450 MHz merupakan teknik ekstraksi spektrum untuk senyawa yang memiliki dipol/dipole polar (Sari seli puspita, 2024).

k. Ekstraksi gas susperkritis (*supercritical gas extraction*, SGE)

Minyak atsiri atau senyawa yang bersifat mudah menguap metode ini menggunakan CO<sub>2</sub> dengan tekanan tinggi, dan banyak digunakan untuk ekstraksi atau termolabil. Metode ini disukai karena bersifat inert, toksisitasnya rendah, aman bagi lingkungan, harga relatif mudah, dan tidak mudah terbakar pada kondisi superkritisnya (Sari seli puspita, 2024).

Dari semua jenis metode ekstraksi, peneliti akan menggunakan metode ekstraksi infusa. Karena metode infusa mudah dilakukan, sederhana, murah dan aplikatif.

#### 2.1.5 Biofilm

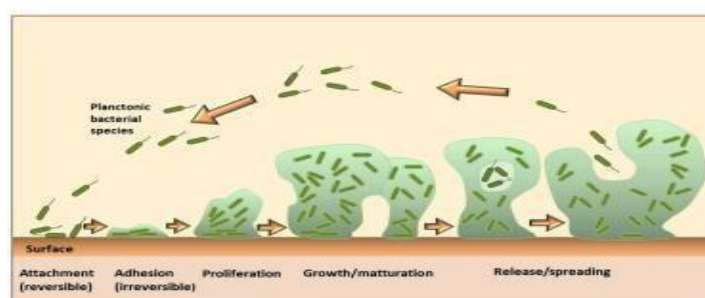
Biofilm merupakan koloni mikroorganisme kompleks yang menempel pada permukaan, membentuk agregat yang terbungkus dalam lender yaitu matriks polisakarida ekstraseluler yang dihasilkan sendiri. Biofilm dapat ditemukan diberbagai lingkungan mikro dinamis yang terlindungi bagi sel mikroba penyusunnya. Ketika biofilm matang, akan menjadi penghalang yang efektif terhadap agen antimikroba dan sistem kekebalan tubuh manusia yang dapat

mengakibatkan kolonisasi jangka panjang atau infeksi pada lokasi pembentukan biofilm (Sekhi, 2022).

Pembentukan biofilm bakteri *pseudomonas aeruginosa* menyebabkan peningkatan kesulitan pengendalian penyakit sehingga diperlukan pencarian bahan-bahan anti pembentukan biofilm sebagai tanaman di Indonesia dapat digunakan sebagai tanaman obat (Nadhirah adinda putri, 2019).

Dalam proses pembentukan biofilm, menjadi sel atau *Quorum Sensing* yang berperan penting dan mengatur aktivitas kelompok bakteri, termasuk pembentukan biofilm, bioluminensi, sporulasi, kompetensi, produksi antibiotik, dan sekresi faktor virulensi. *Quorum Sensing* menghasilkan dua molekul sinyal, yaitu AHLs dan AI-2, yang mengatur aktivasi dan transkripsi gen tertentu, seperti gen yang terlibat dalam pembentukan biofilm, faktor virulensi, dan aktivitas bakteri lainnya.

#### 1. Mekanisme pembentukan biofilm



**Gambar 2.7** Tahap pembentukan biofilm

Sumber : (Rukavina & Vanic, 2016)

Tahap pertama terbentuknya biofilm dimulai dari perlekatan sel mikroba planktonik pada permukaan substrat. Mikroba mempunyai kemampuan adhesi yang sama, namun sifat permukaan yang kasar akan lebih cepat terbentuk pada material. Selain itu, koloni akan mengikat lebih kuat pada permukaan dengan menggunakan pili. Selama tahap ini, sel bakteri akan mengalami pertumbuhan logaritmik. Koloni awal berperan sebagai fasilitator bagi sel lainnya untuk mencari sisi perlekatan selanjutnya. Sel yang tidak mampu melekat pada permukaan akan melalui suatu *quorum sensing* (QS) yang berperan memacu sel-sel dalam koloni untuk pembentukan matriks. Pada *Pseudomonas aeruginosa*, *N-Acyl homoserine lactones* (AHL) diketahui molekul sinyal yang berperan penting dalam persinyalan sel (*cell signaling*) dan perkembangan integritas struktur biofilm sangat tergantung pada QS yaitu *ekstraseluler*, *pheromone*, yang dapat meningkatkan komunikasi antara bakteri (Nadhirah adinda putri, 2019).

Tahap kedua, bakteri mengalami multiplikasi dan mengeluarkan sinyal kimia untuk berkomunikasi secara internal. Substansi EPS mulai dihasilkan berdasarkan mekanisme genetik. Agregat sel terbentuk motilitas sel yang menjadi semakin menurun sejalan dengan semakin progresifnya lapisan agregat (Nadhirah adinda putri, 2019).

Tahap ketiga, selama tahap maturasi biofilm terus tumbuh sejalan dengan pertumbuhan koloni. Semakin lama biofilm berkembang dengan penambahan ukuran dan perubahan (Nadhirah adinda putri, 2019).

Tahap keempat, ketebalan lapisan biofilm pada tahap ini mencapai lebih dari 100 mm dan dapat mencapai 300-400 mm. Tahap ini dispersi, sel-sel dalam koloni akan terlepas sendiri atau Bersama sebagai komponen matriks. Matriks ekstrasuler biofilm akan didegrasi oleh enzim *dispensing B* dan *deoxyribonuclease* (Nadhirah adinda putri, 2019).

Tahap kelima, biofilm terjadi disperse sel sehingga memungkinkan beberapa bakteri meninggalkan biofilm untuk berkembang kembali menjadi sel planktonik (Nadhirah adinda putri, 2019).

Pembentukan biofilm *pseudomonas aeruginosa* memerlukan tiga komponen utama yaitu Psl, Pel, dan Alginate. Pembentukan biofilm pada bakteri *pseudomonas aeruginosa* di media glukosa minimal terjadi pada 2 jam pertama di saat sel planktonik mulai menempel. Selanjutnya 8 jam setelahnya akan membentuk ikatan *irreversible* dengan jaringan maupun lingkungan abiotiknya. Perlekatan *irreversible* bertahan sampai tahapan *Quorum Sensing* akan membentuk mikrokoloni dan mulai produksi EPS dalam waktu 14 jam. Sehingga akan terjadi

proses maturasi selama 1-4 hari setelah perlekatan. Faktor yang mempengaruhi perlekatan sel-sel planktonik pada pembentukan biofilm sebagai berikut:

a. Efek permukaan (Substantum)

Kondisi permukaan yang menempel pada sel planktonik lebih baik yaitu diatas permukaan yang kasar, karena dapat mengurangi kekuatan arus yang mampu melepaskan biofilm dan memiliki permukaan yang luas.

b. *Conditioning film*

Suatu permukaan yang terkena zat air, Dimana cairan akan diselimuti oleh polimer-pilimer yang dapat menyebabkan modifikasi kimia sehingga akan memberikan efek pada pertumbuhan dan penyebaran pembentukan biofilm

c. Hidrodinamik

Hidrodinamik apabila kecepatan aliran semakin besar, maka akan cepat proses menempelnya mikroorganisme pada permukaan bakteri.

d. Karakteristik media cairan

Kandungan yang ada pada media yaitu nutrisi, kation, suhu, dan pH. Pada media BHI terdapat glukosa, natrium klorida, disodium hidrogen fosfat yang berfungsi sebagai pasokan nutrisi untuk pertumbuhan bakteri.

e. Keadaan permukaan

Permukaan yang bersifat hindrofobik, terdapat flagel, fimbriae, lapisan polisakarida yang memudahkan proses perlekatan mikroorganisme (Sholihah Rizka Mar'athus, 2021).

2. Fungsi biofilm dan peran terhadap resistensi bakteri

Peran biofilm terhadap mikroba adalah sebagai perlindungan, pertahanan, nutrisi, dan variasi genetik. Perlindungan bakteri akan mengeluarkan zat ekstrapolimer yang sangat penting sebagai eksopolisakarida. Matriks akan melindungi bakteri dari lingkungan eksternal seperti radiasi UV, pergeseran pH, suhu, Gerakan osmotik, dan pengeringan tanpa mempengaruhi pasokan nutrisinya. Biofilm berfungsi sebagai mekanisme bagi bakteri dengan meningkatkan resistensi terhadap gaya fisik yang dapat menurunkan perkembangan bakteri yang tidak menempel, fagositosis oleh sel imun dan penetrasi dari senyawa toksik bagi bakteri. Bakteri yang terdapat biofilm akan lebih resisten 10-1000 kali dibandingkan tidak terdapat biofilm (Nadhirah adinda putri, 2019).

3. Strategi intervensi terhadap biofilm

Penghambatan biofilm diperlukan strategi intervensi yang mampu mencegah terbentuknya biofilm, antara lain:

- a. Melindungi permukaan dengan molekul yang menghambat perlekatan mikroba dan merusak matriks yang diproduksi.
- b. Menghambat sinyal molekul dengan mengganggu mekanisme gen dalam bakteri.
- c. Menggunakan antibiotik untuk menghambat strategi pertahanan biofilm.
- d. Melalui mekanisme *self destruction* yang akan menghasilkan lyase dan dapat menghancurkan matriks film berupa alginate pada lingkungan yang kurang oksigen, sehingga biofilm akan hancur (Nadhirah adinda putri, 2019).

#### 4. Struktur biofilm



**Gambar 2.8** Matriks ekstraseluler pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

Sumber : Benamara et al., 2014

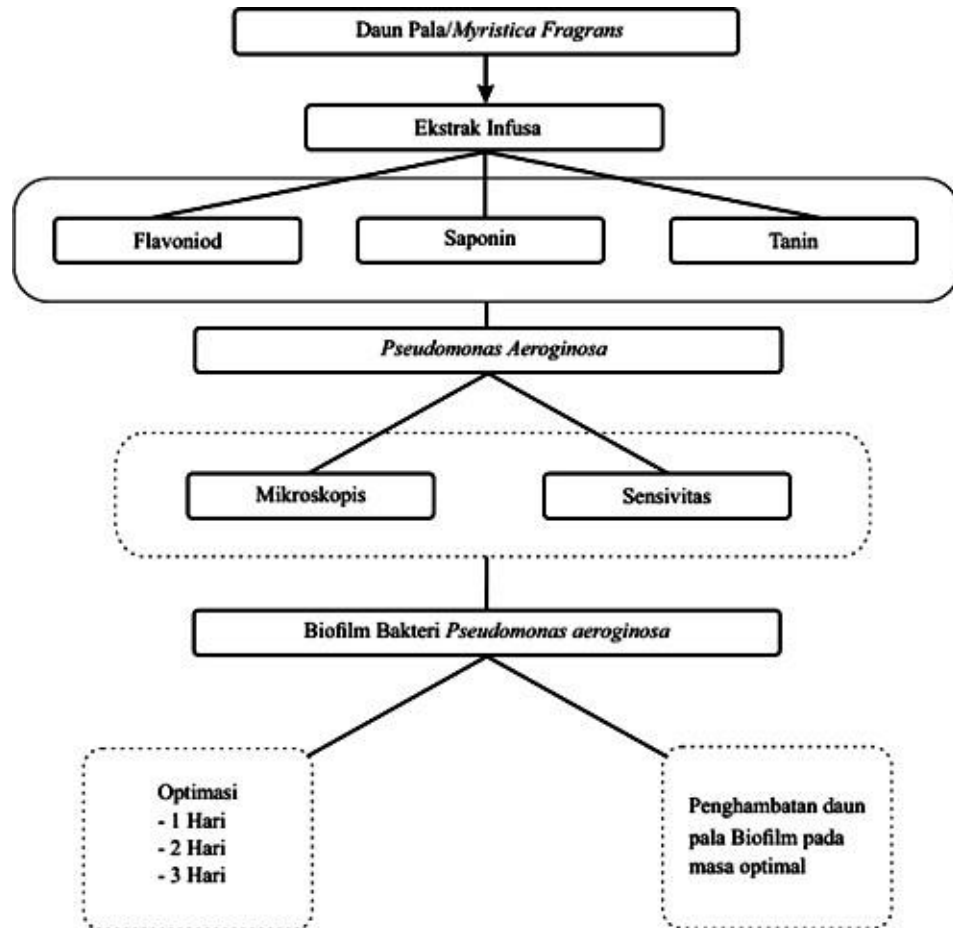
Struktur biofilm merupakan pondasi utama yang memungkinkan terbentuknya mekanisme pertahanan seperti *quorum sensing*, resistensi mikroba, dan membantu interaksi fisiologis antar mikrokoloni dalam biofilm yang matang.

Biofilm bakteri terdiri dari matriks (85% dari keseluruhan volume) dan sel-sel bakteri (15% sisanya). *Ekstracellular Polymeric Substance* (EPS) merupakan komponen utama biofilm, menyumbang 50-90% dari karbon organik biofilm. Struktur utama EPS adalah polisakarida, yang bersifat hidrofilik dan mampu menyerap air dalam jumlah besar dengan kelarutan yang berbeda-beda (Sholihah Rizka Mar'athus, 2021).

#### 5. Resistensi biofilm terhadap antibiotik

Salah satu aspek utama dalam pertumbuhan biofilm bakteri yaitu meningkatnya resistensi mikroba terhadap antibiotik dan stressor lainnya. Struktur dan karakteristik sel biofilm memberikan perlindungan terhadap agen antimikroba serta stressor lain yang memulai mekanisme pertahanan dari kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan. Resistensi intrinsik adalah bagian dari perkembangan biofilm yang disebabkan oleh struktur biofilm dan perubahan pola hidup fisiologis (Maharani Galuh Putri, 2024).

## 2.2 Kerangka Pemikiran



Keterangan :

.....: Diamati

\_\_\_: Tidak diamati

### 2.3 Hipotesis

H0 :Tidak ada pengaruh ekstrak infusa daun pala (*Myristica fragrans*) dalam menghambat pertumbuhan biofilm bakteri *pseudomonas aeruginosa*

H1 : Ada pengaruh ekstrak infusa daun pala (*Myristica fragrans*) dalam menghambat pertumbuhan biofilm bakteri *pseudomonas aeruginosa*