

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek ekstrak rimpang jahe merah (*Zingiber officinale* varian *Rubra*) dalam menghambat pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus in vitro*. Ekstrak didapatkan dengan cara ekstraksi metode maserasi. Ekstraksi dilakukan di Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang. Rimpang jahe merah mempunyai kandungan minyak atsiri, *cineole*, *terpenoid*, *tannin*, *flavonoid*, *saponin*, *polifenol*, dan *farnesol* yang bersifat aromatik sehingga pelarut yang digunakan adalah pelarut organik golongan alkohol yaitu etanol 96%. Bubuk jahe merah direndam pada pelarut etanol dan diuapkan pada titik didih etanol sehingga pelarut etanol dapat berkurang dan didapatkan ekstrak murni yang berbentuk cair. Pembuktian bahwa pelarut etanol sudah hilang dapat dilihat dari aroma ekstrak yang sudah tidak ada aroma alkohol dan dilakukan penyulutan ekstrak menggunakan api. Apabila tidak ada api yang tersulut maka dianggap ekstrak yang didapatkan merupakan ekstrak murni dimana kandungan etanolnya sudah hilang.

Pengamatan pembentukan biofilm dalam penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode tabung (*tube method*). Dengan metode ini akan diketahui *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC) yang diamati dari formasi cincin dan dinding berwarna ungu kebiruan pada tabung (Christensen *et al*, 2000). Pengamatan biofilm secara kuantitatif dilakukan dengan mengukur intensitas warnanya yang dinyatakan dalam *mean gray value*.

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat bakteri *Staphylococcus aureus* pembentuk biofilm yang berasal dari *swab* tenggorok

yang disimpan di laboratorium Mikrobiologi FKUB. Sebelum digunakan untuk penelitian, bakteri ini terlebih dahulu diinokulasikan pada medium *Chrom Agar* selama 24 jam, setelah itu akan terlihat koloni berwarna merah muda. Pemeriksaan selanjutnya adalah pewarnaan Gram. Pada pewarnaan Gram dan pengamatan di bawah mikroskop perbesaran 1000x didapatkan gambaran bakteri kokus berwarna ungu yang menunjukkan sifat Gram positif, serta bergerombol seperti anggur. Untuk membedakan antara genus *Staphylococcus sp* dan *Streptococcus sp*, dilakukan tes katalase. Hasil positif mengindikasikan bahwa biakan bakteri yang dites adalah genus *Staphylococcus sp*. Selanjutnya dilakukan tes koagulase untuk membedakan antara *Staphylococcus aureus* dengan *Staphylococcus* koagulase negatif. Hasil positif mengindikasikan bahwa biakan bakteri yang dites adalah *Staphylococcus aureus*. Dengan seluruh pemeriksaan identifikasi bakteri tersebut maka dapat dibuktikan bahwa isolat bakteri yang dipakai dalam penelitian ini adalah *Staphylococcus aureus* (Dzen dkk, 2003; Todar, 2008).

Sebelum melakukan uji hambat pembentukan biofilm, dilakukan penelitian pendahuluan untuk menentukan jenis *Staphylococcus aureus* pembentuk biofilm. Untuk mengetahui apakah bakteri ini membentuk biofilm, maka dilakukan uji pembentukan biofilm dengan menginokulasi bakteri pada *Congo Red Agar*. Hasilnya menunjukkan bakteri yang memunculkan warna hitam yang menghasilkan biofilm. Hal ini dilakukan karena tidak semua strain *Staphylococcus aureus* dapat membentuk biofilm, menurut Pace *et al* (2006) pertumbuhan biofilm dipengaruhi oleh ekspresi lima gen yang membantu bakteri biofilm untuk beradaptasi pada permukaan *adheren*. Tiga gen masing-masing mengkode sebuah enzim jalur glikolisis atau fermentasi, di mana dapat

merefleksikan penurunan ketersediaan oksigen. Dua gen yang lain mengkode enzim yang dapat membantu *Staphylococcus aureus* beradaptasi pada keterbatasan nutrisi. Dalam penelitian ini didapatkan satu isolat bakteri *Staphylococcus aureus* pembentuk biofilm yang kemudian dipakai dalam uji hambat biofilm.

Sebelum dimulai penelitian, dilakukan eksplorasi dahulu untuk mendapatkan konsentrasi perlakuan. Dari penelitian eksplorasi dapat diketahui rentang konsentrasi dimana sudah tidak didapatkan lagi pembentukan biofilm pada tabung. Berdasarkan hasil penelitian eksplorasi diketahui bahwa pembentukan biofilm tidak dapat diamati lagi pada konsentrasi 30% dan 35%. Dari angka ini dapat ditentukan konsentrasi yang tepat pada penelitian. Konsentrasi ekstrak yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 0% (kontrol), 15%, 20%, 25%, 30% dan 35%. Konsentrasi dibuat secara serial untuk memudahkan pembuatan larutan ekstrak, selain itu jarak yang tidak terlalu dekat akan menurunkan kemungkinan kesalahan dalam pengambilan ekstrak.

Metode yang digunakan dalam uji hambat pembentukan biofilm adalah metode tabung. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Mathur (2006), metode tabung mempunyai angka sensitivitas dan spesifisitas yang cukup tinggi dibandingkan dengan metode yang lain seperti *microtiter plate test* atau *congo red agar*. Metode tabung mempunyai angka sensitivitas sebesar 77,9% dan spesifisitas sebesar 96%. Pengamatan biofilm dilakukan dengan dua cara, yang pertama adalah pengamatan langsung untuk menentukan MBIC, sedangkan yang kedua adalah pengamatan secara kuantitatif untuk melihat efek hambat dari masing-masing kelompok konsentrasi.

Pengamatan langsung dilakukan dengan mengamati formasi cincin dan dinding berwarna ungu kebiruan. Hasil pengamatan hanya dinyatakan dengan “pembentukan positif” (+) dan “pembentukan negatif” (-), hal ini dilakukan karena metode ini tidak mampu membedakan antara pembentukan biofilm kuat, sedang, dan lemah. Berdasarkan hasil pengamatan langsung, pada pengulangan ke-1, 2, 3 dan 4 didapatkan bahwa pada konsentrasi 30% dan 35% sudah tidak didapatkan pembentukan biofilm lagi. Dari keseluruhan hasil pengamatan tersebut lalu ditentukan besar MBIC-nya dengan melihat konsentrasi terkecil dimana sudah tidak didapatkan pembentukan biofilm pada semua pengulangan. Pada penelitian ini disimpulkan bahwa MBIC ekstrak rimpang jahe merah adalah sebesar 30%.

Pengamatan secara kuantitatif dilakukan dengan mengukur intensitas warna hasil pengecatan tabung. Nilai ini dinyatakan dengan *Mean Gray Value* (MGV). Skala yang dapat ditunjukkan MGV berkisar antara 0 sampai 255. Semakin mendekati angka 0 maka intensitas warnanya semakin pekat, sebaliknya bila mendekati angka 255 maka intensitas warnanya semakin terang. Intensitas warna ini menunjukkan efek pembentukan biofilm pada tabung. Semakin pekat warna tabung mengindikasikan semakin tebal permukaan biofilm, begitu pula sebaliknya.

Hasil pengukuran MGV kemudian dianalisa dengan program SPSS 13. Uji statistik yang digunakan adalah Uji *One Way ANOVA* dan Uji korelasi *Pearson*. Dari Uji *One Way ANOVA* didapatkan nilai signifikansi $p = 0,000$ ($p < 0,05$), hal ini berarti terdapat perbedaan efek yang bermakna antara tiap konsentrasi ekstrak rimpang jahe merah. Hasil Uji *Pearson* menunjukkan nilai $r = 0,906$, hal ini membuktikan adanya korelasi yang sangat kuat ($r > 0,75$) antara ekstrak

rimpang jahe merah dan *Mean Gray Value*. Tanda korelasi positif menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi ekstrak rimpang jahe merah maka semakin besar MGV nya, yang berarti semakin rendah kepekatan warnanya dan semakin rendah pembentukan biofilmnya. Hal ini diduga disebabkan oleh kandungan minyak atsiri, tannin, flavonoid, saponin, polifenol, dan farnesol yang cukup tinggi dalam ekstrak rimpang jahe. Tannin dan flavonoid mempunyai mekanisme dalam menginaktivasi adhesin, inhibisi enzim, dan disrupsi membran. Saponin menyebabkan destruksi membran sel dan dapat mereduksi kemampuan permukaan sel dalam mempertahankan biofilm sehingga dapat melepaskan biofilm. Minyak atsiri dapat merusak perlekatan biofilm. Farnesol dan polifenol adalah zat anti *quorum sensing* yang dapat menghambat pembentukan biofilm. Keenam bahan aktif tersebut diduga secara sinergis mengganggu pembentukan biofilm.

Kelemahan pada penelitian untuk mengamati pembentukan biofilm menggunakan metode tabung ini adalah tidak dapat dibedakan apakah bakteri pembentuk biofilm pada penelitian ini merupakan jenis bakteri pembentuk biofilm yang ringan, sedang, atau kuat. Pada penelitian ini hanya dapat diamati secara kualitatif apakah bakteri dapat membentuk biofilm atau tidak. Sehingga diperlukan penelitian lebih lanjut untuk mengamati efek rimpang jahe merah dalam menghambat pembentukan biofilm yang ringan, sedang, atau kuat.