

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk membuktikan efek antibiofilm dari ekstrak daun belimbing wuluh terhadap bakteri *P.aeruginosa* pembentuk biofilm isolat sputum dari laboratorium mikrobiologi FKUB.

Metode mikrotiter plate test dipilih karena pada metode ini dapat menunjukkan hasil kuantitatif dari nilai penghambatan biofilm melalui OD yang dihasilkan pada pembacaan *Elisa reader*. Metode mikrotiter ini mempunyai keunggulan lebih cepat, praktis dan akurat jika dibandingkan dengan metode yang lain seperti metode tabung dan *Congo red* agar.

Sebelum digunakan untuk penelitian, bakteri *P.aeruginosa* diidentifikasi terlebih dahulu apakah termasuk *P.aeruginosa* galur pembentuk biofilm dengan menggunakan metode mikrotiter plate. Dari hasil identifikasi didapatkan adanya bentukan biofilm yang tercatat ungu pada dinding sebelah dalam dan dasar dari mikrotiter plate.

Daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi L.*) digunakan sebagai penelitian dengan alasan kemudahan dalam mendapatkannya karena tumbuhan belimbing wuluh sangat banyak di temukan di berbagai daerah nusantara dan mengandung bahan aktif yaitu tanin yang kadarnya cukup tinggi. Kemampuan daun belimbing wuluh dalam menghambat pembentukan biofilm bakteri *P.aeruginosa* disebabkan oleh adanya bahan-bahan aktif, yaitu tanin, flavonoid, dan triterpenoid.

Sebelum dilakukan percobaan uji antibiofilm terhadap bakteri *P.aeruginosa* penghasil biofilm ini, dilakukan uji eksplorasi konsentrasi ekstrak

terlebih dahulu untuk menentukan konsentrasi yang akan dipakai. Pada proses ini, ditemukan beberapa kesulitan diantaranya adalah kepekatan ekstrak yang cukup tinggi sehingga mengakibatkan adanya gangguan dalam pembacaan OD. Gangguan ini mulai terlihat pada dosis diatas 0,1% dimana nilai OD lebih besar dari OD kontrol, namun pada dosis 0,01% sudah bisa terlihat terjadi menghambat pembentukan biofilm karena mempunyai OD yang lebih kecil dari kontrol. Sehingga dari hasil eksplorasi tersebut ditemukan konsentrasi yang akan digunakan untuk penelitian ini, yaitu konsentrasi 0 % (kontrol kuman), 0,01% (dosis I), 0,02% (dosis II), 0,03% (dosis III), 0,04% (dosis IV), dan 0,05% (dosis V).

Setelah menemukan konsentrasi yang akan digunakan selanjutnya dilakukan pengukuran terhadap OD Biofilm dengan menggunakan *Elisa rader*. Dari hasil pembacaan OD, didapatkan nilai OD biofilm bakteri yang diberi perlakuan berupa ekstrak selalu lebih rendah dari OD biofilm bakteri yang tidak diberi ekstrak (kontrol kuman) hal ini menunjukkan bahwa semua konsentrasi perlakuan dapat menghambat pembentukan biofilm yang dihasilkan *P.aeruginosa*.

Dari hasil analisis data yang didapat, bisa diambil kesimpulan bahwa ekstrak daun belimbing wuluh dapat menghambat pertumbuhan biofilm dari bakteri *P. aeruginosa* mulai dari konsentrasi terkecil yaitu 0,01%. Sehingga dapat disimpulkan *Minimal Biofilm Inhibitory Concentration* 50% (MBIC₅₀) dari penelitian ini adalah 0,01%, karena pada dosis ini OD bakteri yang didapat sama dengan / kurang dari 50% dibandingkan mean OD bakteri kontrol, dimana OD mewakili jumlah dari biofilm yang terbentuk.

Selain ekstrak belimbing wuluh yang pekat dan dapat menyebabkan false positif pada pembacaan *Elisa reader*, kelemahan dari penelitian ini adalah mempunyai nilai R^2 (R square) 0,413, yang artinya hanya 41,3% penurunan nilai OD dikarenakan oleh paparan ekstrak blimbing wuluh.

Kandungan pada daun belimbing wuluh yang berperan dalam menghambat pembentukan biofilm adalah *terpenoid*, tanin dan *flavonoid*. Mekanisme dari *terpenoid* ini diduga dengan disrupsi membran bakteri, sehingga menyebabkan gangguan pada proses penempelan bakteri pada substrat (Cowan, 1999). Tanin mempunyai efek pada biofilm dan dapat digunakan sebagai antibiofilm karena diduga dapat menghambat proses pembentukan biofilm pada tahap *primary attachment*, *secondary attachment* dan *maturation*. Penghambatan pada tahap maturasi terjadi karena adanya penghambatan terhadap *quorum sensing* (Taganna *et al* ,2011). Sedangkan efek dari *flavonoid* yang berpengaruh pada penghambatan pembentukan biofilm adalah kemampuannya untuk menghambat fungsi membran sitoplasma bakteri. Mekanisme penghambatan fungsi membran sitoplasma bakteri ini adalah dengan terjadinya pengurangan fluiditas dari membran dalam dan membran luar sel bakteri. Akhirnya terjadi kerusakan membran dan membran tidak berfungsi sebagai mestinya, termasuk untuk melakukan perlekatan dengan substrat. Selain itu *flavonoid* mempunyai efek dalam mempunyai efek inhibisi terhadap molekul *adhesin*. Mekanisme ini yang akan mengganggu proses pembentukan biofilm karena menghambat pembentukan *polysaccharide intercellular adhesion* (Cushnie dan Lamb, 2005).

Pada penelitian yang dilakukan oleh (Mukhlisoh, 2010) hasil pengujian antibakteri terhadap daun belimbing wuluh menggunakan bakteri *Pseudomonas*

fluorescens dan *Micrococcus luteus* menunjukkan ekstrak daun belimbing wuluh mampu menghambat pertumbuhan kedua bakteri yang di uji. Konsentrasi hambat minimumnya yaitu 0,1% dengan luas zona hambat 23,33 mm pada bakteri *M. luteus*, sedangkan pada bakteri *P. fluorescens* yaitu 0,1% dengan luas zona hambat 21 mm. Hal ini menunjukkan bahwa daun belimbing wuluh selain mempunyai efek antibiofilm juga mempunyai efek sebagai antibakteri.

Pada penelitian yang lain (Rahmadiani, 2011) didapatkan bahwa ekstrak daun kayu putih (*Melaleuca leucadendra* L) mampu menghambat pembentukan biofilm *S. aureus* isolat darah maupun isolat urin. Metode yang digunakan juga sama dengan penelitian ini yaitu dengan menggunakan metode *microtiter plate*. Daun kayu putih mengandung *flavonoid* dan tanin yang memiliki kemampuan untuk menghambat biofilm. Ekstrak daun kayu putih mampu menghambat pembentukan biofilm mulai dosis 0,25%, sedangkan pada daun belimbing wuluh di penelitian ini sudah mampu menghambat biofilm pada dosis 0,01%. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak daun belimbing wuluh memiliki potensi lebih bagus dari pada ekstrak daun kayu putih. Potensi ekstrak daun belimbing wuluh yang lebih besar dari pada daun kayu putih, mungkin disebabkan jumlah zat aktif tanin yang ada di dalam ekstrak daun belimbing wuluh lebih tinggi dari pada tanin di dalam ekstrak daun kayu putih.

Penelitian yang dilakukan oleh Rahmadiani ini juga mengalami kendala yang sama yaitu ekstrak daun kayu putih yang pekat dan mengganggu pembacaan OD bakteri pada *Elisa reader*. Sifat dari ekstrak ini dapat mempengaruhi nilai OD dari biofilm karena untuk membaca nilai OD digunakan prinsip pembelokan cahaya oleh bakteri pada biofilm yang berwarna oleh kristal violet. Jika terdapat sisa ekstrak yang berikatan dengan kristal violet yang masih

tertinggal pada mikrotiter saat dibaca pada *Elisa reader* akan terbaca sebagai *false positif*. Untuk kepentingan penelitian yang selanjutnya, hal ini dapat diatasi dengan menggunakan metode MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a yellow tetrazole) atau metode XTT (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide).

Metode MTT merupakan suatu metode dimana sistem respirasi bakteri berupa mitokondria dan sistem transport elektronnya mengurangi kadar MTT dan membentuk suatu kristal keunguan yang tidak larut air di dalam sel (Freimoser *et al.*, 1999). *Purple MTT formazan* ini tidak larut dalam air, sehingga dalam pembacaan pada *Elisa reader* memerlukan isopropanol asam (Wallert and Provost Lab, 2007). Jumlah kristal ini dapat ditentukan secara spektrofotometris dan menunjukkan jumlah mitokondria yang mewakili jumlah bakteri dalam sampel tersebut. Penghitungan ini dilakukan dengan menggunakan panjang gelombang 490nm (Cady *et al.*, 2012).

Metode XTT memiliki prinsip yang sama dengan metode MTT. Yang membedakan MTT dengan XTT hanyalah pewarna yang digunakan. Metode XTT memiliki sensitivitas yang lebih tinggi dari pada metode MTT. Pada metode XTT digunakan derivat dari tetrazolium, yang nantinya akan tereduksi menjadi produk berwarna *orange* yang sangat larut dalam air, sehingga bisa melewati langkah pelarutan yang diperlukan pada metode MTT yang selanjutnya bisa menghasilkan data yang lebih baik (Freimoser *et al.*, 1999).

Metode lain yang bisa digunakan adalah dengan menggunakan mikroskop electron atau *scanning electron microscope* (SEM), keuntungan dari metode ini adalah mampu melihat secara mendetail dan spesifik bakteri beserta biofilm yang terbentuk. Metode ini dapat membedakan apakah perlakuan benar-

benar mampu menghambat biofilm bahkan tanpa membunuh bakteri penghasil biofilm atau perlakuan menghambat pembentukan biofilm dan membunuh bakteri (Soumya, 2012). Kelemahan dari metode ini adalah harganya yang mahal, sulit dalam membuat preparat biofilm dan kesediaan alat yang terbatas.

