

**EFEK EKSTRAK ETANOL DAUN KEMANGI (*Ocimum sanctum*) SEBAGAI  
PENGHAMBAT PEMBENTUKAN BIOFILM *Escherichia coli* SECARA IN  
VITRO**

**TUGAS AKHIR**

**Untuk Memenuhi Persyaratan  
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran**



Oleh:

**Putu Ayu Tania Krisna Putri**

**NIM. 165070107111016**

**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2019**

DAFTAR ISI

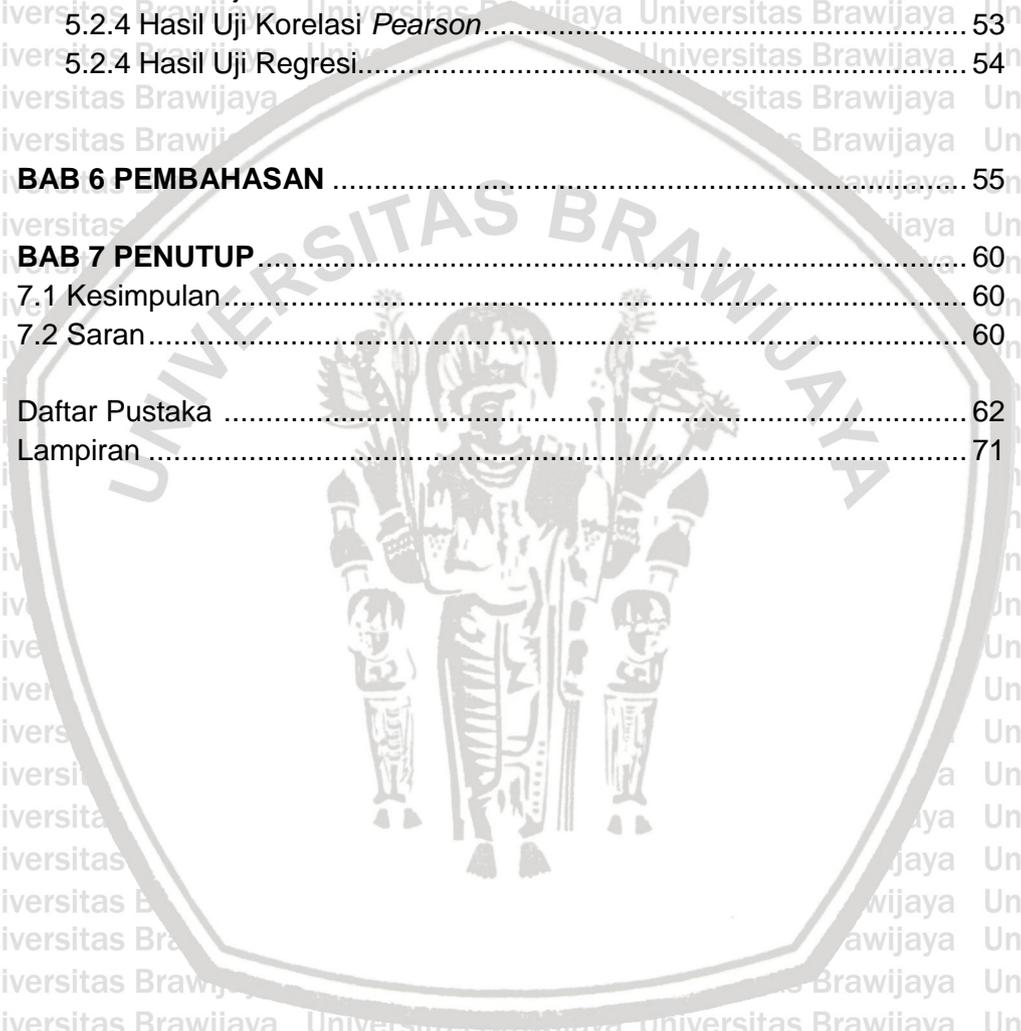
	Halaman
Halaman Judul.....	i
Halaman Pengesahan .....	ii
Pernyataan Keaslian Tulisan .....	iii
Kata Pengantar .....	iv
Abstrak .....	vi
Abstract .....	vii
Daftar Isi .....	viii
Daftar Tabel.....	xi
Daftar Gambar .....	xii
Daftar Singkatan .....	xiii
Daftar Lampiran .....	xv
<b>BAB I PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang Masalah .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	4
1.3 Tujuan Penelitian .....	5
1.3.1 Tujuan Umum .....	5
1.3.2 Tujuan Khusus .....	5
1.4 Manfaat Penelitian .....	5
1.4.1 Manfaat Akademis .....	5
1.4.2 Manfaat Praktis .....	5
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>6</b>
2.1 <i>Escherichia coli</i> .....	6
2.1.1 Taksonomi <i>Escherichia coli</i> .....	7
2.1.2 Karakteristik Bakteri .....	7
2.1.3 Identifikasi Karakteristik Bakteri <i>Escherichia coli</i> .....	9
2.1.3.1 Pewarnaan Gram .....	9
2.1.3.2 Koloni pada Agar <i>Eosin Methylene Blue</i> .....	9
2.1.3.3 Uji Biokimia .....	10
2.2 Biofilm .....	10
2.2.1 Mekanisme Pembentukan Biofilm .....	11
2.2.2 Pembentukan Biofilm pada <i>Escherichia coli</i> .....	13
2.2.3 <i>Quorum Sensing</i> .....	15
2.2.3.1 <i>Quorum Sensing</i> (QS) pada <i>E. coli</i> .....	16
2.2.4 Uji Pembentukan Biofilm .....	18
2.2.4.1 Metode Tabung .....	18
2.2.4.2 Metode <i>Tissue Culture Plate</i> .....	18



2.2.4.3 Metode Congo Red Agar.....	19
2.3 Kemangi ( <i>Ocimum sanctum</i> ).....	20
2.3.1 Morfologi Kemangi ( <i>Ocimum sanctum</i> ).....	20
2.3.2 Taksonomi Kemangi ( <i>Ocimum sanctum</i> ).....	21
2.3.3 Kemangi sebagai Antibiofilm.....	21
2.3.3.1 Eugenol.....	22
2.3.3.2 Flavonoid.....	22
2.3.4 Senyawa Penghambat Biofilm.....	23
2.3.4.1 Eugenol.....	23
2.3.4.2 Flavonoid.....	24
<b>BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN</b> .....	<b>25</b>
3.1 Kerangka Konsep.....	25
3.2 Hipotesis Penelitian.....	26
<b>BAB IV METODE PENELITIAN</b> .....	<b>27</b>
4.1 Rancangan Penelitian.....	27
4.2 Populasi dan Sampel Penelitian.....	27
4.2.1 Pengulangan.....	28
4.3 Tempat dan Waktu Penelitian.....	28
4.4 Variabel Penelitian.....	29
4.4.1 Variabel Bebas.....	29
4.4.2 Variabel Terikat.....	29
4.5 Instrumen Penelitian.....	29
4.5.1 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Daun Kemangi.....	29
4.5.2 Alat dan Bahan Identifikasi Bakteri.....	30
4.5.3 Alat dan bahan Deteksi Biofilm.....	30
4.6 Definisi Operasional.....	31
4.7 Prosedur Penelitian.....	32
4.7.1 Persiapan Daun Kemangi ( <i>Ocimum sanctum</i> ).....	32
4.7.1.1 Ekstraksi dan Evaporasi.....	32
4.7.2 Persiapan Bakteri.....	33
4.7.2.1 Identifikasi Bakteri <i>Escherichia coli</i> .....	33
4.7.2.2 Pembuatan Perbenihan Cair Bakteri.....	36
4.7.3 Uji Hambat Pembentukan Biofilm pada <i>Escherichia coli</i> .....	37
4.7.3.1 Penelitian Pendahuluan.....	37
4.7.3.2 Penelitian Inti.....	39
4.7.4 Pengukuran Mean Gray Value.....	40
4.8 Analisis Data.....	41
4.9 Rencana Operasional Penelitian.....	43
<b>BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA</b> .....	<b>44</b>



5.1 Hasil Penelitian.....	44
5.1.1 Hasil Ekstraksi Daun Kemangi ( <i>Ocimum sanctum</i> ).....	44
5.1.2 Hasil Identifikasi Bakteri.....	44
5.1.3 Hasil Uji Hambat Pembentukan Biofilm.....	46
5.2 Analisis Data.....	49
5.2.1 Hasil Uji Normalitas dan Homogenitas.....	50
5.2.2 Hasil Uji <i>Oneway ANOVA</i> .....	50
5.2.3 Hasil Uji <i>Post Hoc</i> .....	51
5.2.4 Hasil Uji Korelasi <i>Pearson</i> .....	53
5.2.4 Hasil Uji Regresi.....	54
<b>BAB 6 PEMBAHASAN</b> .....	<b>55</b>
<b>BAB 7 PENUTUP</b> .....	<b>60</b>
7.1 Kesimpulan.....	60
7.2 Saran.....	60
Daftar Pustaka.....	62
Lampiran.....	71



HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

Efek Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum sanctum*) Sebagai Penghambat  
Pembentukan Biofilm *Escherichia Coli* Secara *In Vitro*

Oleh :  
Putu Ayu Tania Krisna Putri  
NIM. 165070107111016

Telah diuji pada

Hari : Selasa

Tanggal : 15 Oktober 2019

Dan dinyatakan lulus oleh :

Penguji I

Dr. dr. Nina Handayani, Sp.M(K)  
NIP. 2012018002152001

Pembimbing I/Penguji II,

Prof. Dr. dr. Noorhamdani AS, DMM, Sp. MK(K)  
NIP. 195011101980021001

Pembimbing II/Penguji III,

Dr. med. dr. Tommy AN, Sp. BS  
NIP. 197706132002121002

Mengetahui,  
Ketua Program Studi Pendidikan Dokter

dr. Triwahyu Astuti, M. Kes., Sp.P(K)  
NIP. 196310221996012001

## ABSTRAK

Putri, Putu Ayu Tania Krisna. 2019. **Efek Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum sanctum*) Sebagai Penghambat Pembentukan Biofilm *Escherichia Coli* Secara *In Vitro***. Tugas Akhir. Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Prof. Dr. dr. Noorhamdani AS, DMM, Sp.MK(K), (2) Dr.med. dr. Tommy A Nazwar, Sp.BS

*Escherichia coli* merupakan penyebab tersering Infeksi Saluran Kemih (ISK) pada anak dan dewasa. Dalam upaya melindungi dirinya, *E.coli* dapat membentuk biofilm. Biofilm sulit dipenetrasi antibiotik dan dapat menimbulkan resistensi antibiotika. Daun kemangi sering dikonsumsi dan digunakan sebagai bahan masakan oleh masyarakat. Daun kemangi merupakan tanaman herbal yang mengandung Eugenol dan Flavonoid, yang diduga dapat menghambat pembentukan biofilm. Tujuan penelitian ini untuk membuktikan efek etanol daun kemangi sebagai penghambat pembentukan biofilm bakteri *E.coli* secara *in vitro* dengan menggunakan metode dilusi tabung. Foto hasil pengamatan dikuantifikasi menjadi nilai *Mean Gray Value* (MGV) menggunakan Adobe Photoshop CS6. Dari hasil penelitian diketahui bahwa kenaikan konsentrasi ekstrak berbanding lurus dengan penipisan cincin biofilm pada tabung dengan konsentrasi hambat minimal biofilm pada konsentrasi 35%. Uji korelasi Pearson menunjukkan korelasi sangat kuat dan signifikan ( $r = 0,933$ ,  $p=0,000$ ), dan uji komparasi *Oneway* ANOVA menunjukkan adanya perbedaan nilai yang signifikan antara rerata tiap kelompok ( $p=0,000$ ). Sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol *Ocimum sanctum* dapat menghambat pembentukan biofilm *Escherichia coli* secara *in vitro*.

Kata kunci: Biofilm, ekstrak etanol *Ocimum sanctum*, *Escherichia coli*.

**ABSTRACT**

Putri, Putu Ayu Tania Krishna. 2019. **Basil Leaves Ethanol Extract (*Ocimum sanctum*) Effectivity as an Inhibitor for In Vitro Biofilm Formation of *Escherichia coli***. Final Assignment Medical Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: (1) Prof. Dr. dr. Noorhamdani AS, DMM, Sp.MK(K), (2) Dr.med. dr. Tommy A Nazwar, Sp.BS

*Escherichia coli* is the most common cause of urinary tract infections (UTI) in children and adults. *E. coli* can form biofilms to protect themselves. Antibiotics are difficult to penetrate biofilms. This condition can cause antibiotic resistance. Basil leaves are often consumed and used as cooking ingredients by the society. Basil leaves are herbal plants that contain eugenol and flavonoid compounds, which are thought to inhibit the formation of biofilms. The purpose of this study was to prove the effect of ethanolic extract of basil leaves as an inhibitor of *E.coli* biofilms in vitro using the tube dilution method. Observed photos are quantified to Mean Gray Value (MGV) with Adobe Photoshop CS6. From the results of the study note that the increase in extract concentration is directly proportional to the thinning of the biofilm ring on the tube with a minimum inhibitory concentration of biofilm at a concentration of 35%. The Pearson correlation test showed a very strong and significant correlation ( $r = 0.933$ ,  $p = 0.000$ ), and the Oneway ANOVA comparison test showed a significant difference between the mean of each group ( $p = 0.000$ ). So it can be concluded that the ethanol extract *Ocimum sanctum* can inhibit the formation of *Escherichia coli* biofilms in vitro.

Key word: Biofilm, ethanolic extract *Ocimum sanctum*, *Escherichia coli*.

## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang Masalah

Infeksi nosokomial atau yang dikenal sebagai *Hospital – Acquired Infection* (*HAI*) menyebabkan mortalitas yang signifikan di negara maju dan berkembang, termasuk Indonesia (Danasekaran *et al.*, 2014). Hasil penelitian di beberapa negara Amerika dan Eropa melaporkan bahwa kejadian infeksi nosokomial saluran kemih (*Urinary Tract Infection*) menempati urutan pertama yaitu sebesar 42%. Di Indonesia telah dilakukan survei pada 10 rumah sakit umum pendidikan dan ditemukan angka kejadian infeksi nosokomial cukup tinggi yaitu 6 – 16 % dengan rata-rata 9,8% pada tahun 2010 (Nugraheni *et al.*, 2012) . Bakteri bertanggung jawab untuk sekitar 90% kejadian infeksi nosokomial, sedangkan protozoa, jamur, virus dan mikobakteri kurang berkontribusi dibandingkan dengan infeksi bakteri (Khan *et al.*, 2015).

*Escherichia coli* merupakan penyebab tersering dari infeksi saluran kemih dan sudah menunjukkan resistensi terhadap beberapa antibiotik seperti  $\beta$ -laktam, fosfomisin, dan golongan kuinolon (Nilsson *et al.*, 2003). Bakteri ini dapat membentuk biofilm sebagai bentuk pertahanan terhadap kondisi yang kurang menguntungkan (Christophe *et al.*, 2013). Biofilm *E. coli* sering ditemukan pada penggunaan kateter urin sehingga dapat menyebabkan infeksi pada saluran kemih (Slawa *et al.*, 2015). Biofilm adalah lapisan yang dibentuk oleh sel-sel bakteri yang saling menempel satu sama lain pada permukaan hidup maupun tak hidup dan terbentuk dari matriks polimer ekstraseluler (Jamal *et al.*, 2015).

*Escherichia coli* merupakan bakteri gram negatif, berbentuk batang, memiliki ukuran 1 x 3  $\mu\text{m}$ , berkapsul, dan memiliki flagela (Alyamani *et al.*, 2017).

Berdasarkan kebutuhannya akan oksigen, *Escherichia coli* termasuk dalam golongan bakteri fakultatif anaerob (Tenailon *et al.*, 2010). *Escherichia coli* merupakan flora normal intestinal yang mempunyai kontribusi pada fungsi normal *intestine* tetapi bakteri ini akan menjadi patogen bila mencapai jaringan di luar jaringan intestinal. Bakteri ini dapat menyebabkan gangguan yang dicirikan dengan kolitis hemoragik, diare berdarah dan sindrom uremik hemolitik dengan kerusakan tubular ginjal (Mohawk *et al.*, 2011). *Escherichia coli* membuat biofilm agar bakteri ini dapat bertahan di lingkungan yang kurang mendukung sekalipun.

Sel-sel dalam biofilm sekitar 1000 kali lebih tahan daripada bentuk planktonik mereka (Milojevic *et al.*, 2017). Pembentukan biofilm dapat dijelaskan dalam tiga tahap yaitu: perlekatan, pematangan dan dispersi. Langkah perlekatan dikategorikan sebagai proses yang terdiri dari dua tahap: perlekatan reversibel awal dan perlekatan ireversibel. Biofilm yang melekat ireversibel dapat mentoleransi kekuatan fisik atau kimia yang lebih kuat (Rabin *et al.*, 2015). Selama proses pematangan, lebih banyak perancah biofilm, seperti protein, DNA, polisakarida, dll. disekresikan ke dalam biofilm oleh bakteri yang terperangkap.

Setelah pematangan, diikuti oleh langkah dispersi yang sangat penting untuk siklus hidup biofilm. Biofilm menyebar karena beberapa faktor seperti: kurangnya nutrisi, persaingan yang ketat, populasi yang terlalu besar. Penyebaran dapat terjadi secara keseluruhan atau hanya sebagian dari biofilm. Biofilm terdiri dari struktur bahan polimer ekstraseluler. Matriks biofilm terdiri dari satu atau lebih polisakarida ekstraseluler, DNA dan protein. Eksopolisakarida ini disintesis secara ekstraseluler atau intraseluler dan disekresikan ke luar dan berfungsi sebagai

perancah untuk karbohidrat, protein, asam nukleat dan lipid lainnya untuk melekat (Sutherland, 2001). Pembentukan biofilm oleh *Escherichia coli* dimodulasi oleh *quorum sensing* melalui sintesis sinyal *autoinducers interspecies-2* (AI-2). Tiga kelas reseptor untuk AI-2 yaitu LuxP, LsrB dan RbsB (Thompson *et al.*, 2015). AI-2 disintesis oleh LuxS, dan aktif disekresikan ke dalam lingkungan ekstraseluler di seluruh pertumbuhan sel. Pada bakteri *Escherichia coli*, AI-2 tidak dapat berdifusi secara pasif melalui membran. Serapan awal dari pengurangan jumlah AI-2 terjadi melalui sistem PTS tanpa fosforilasi substrat. Kelompok kecil AI-2 intraseluler yang diperoleh melalui pengambilan oleh PTS kemudian terfosforilasi (P-AI-2) oleh AI-2 kinase LsrK yang ada tingkat basal sehingga mengurangi represi LsrR pada operon Lsr dan memulai transport dan deplesi Lsr-dependent AI-2 (Pereira *et al.*, 2013). Sistem komunikasi ini akan memungkinkan *Escherichia coli* membentuk koloni yang besar (Papenfort dan Bassler, 2016). *Quorum sensing* mempengaruhi produksi matriks ekstraseluler yang dibentuk oleh sel bakteri. Matriks ekstraseluler dapat mencegah beberapa antibiotik menembus sel sehingga mendorong toleransi antibiotik (Irie dan Parsek, 2008). Pengendalian biofilm dapat dilakukan secara biologis dengan memanfaatkan bakteriofag dan interaksi mikrobiologis (Simoes *et al.*, 2010)

Biofilm yang dibentuk oleh bakteri khususnya *Escherichia coli* dapat dihambat dengan memanfaatkan tanaman yang memiliki potensi antibiofilm. Salah satu tanaman yang potensial adalah kemangi (*Ocimum sanctum*). Tanaman ini sudah digunakan sebagai obat herba dan tercantum dalam sebuah karya kuno Ayurveda dari India yang disusun sekitar tahun 1500 SM. Herba kemangi telah banyak digunakan sebagai pengobatan alternatif terhadap penyakit seperti bronkitis, disentri, penyakit kulit. Kandungan aktif yang dikandung herba kemangi

yaitu eugenol (1-hydroxy-2-methoxy-4-allylbenzene) dan flavonoid berpengaruh terhadap efek terapi yang diberikan oleh herba ini (Pattanayak *et al.*, 2010).

Eugenol yang terkandung dalam ekstrak etanol tanaman kemangi dapat menghambat pembentukan biofilm dengan mengurangi transkripsi gen curli, serta mengurangi transkripsi gen tipe I fimbriae yang sangat diperlukan dalam proses awal pembentukan biofilm (Kim *et al.*, 2016). Flavonoid menghambat induksi *bioluminescence* oleh sinyal QS HAI-1 dan AI-2 pada *E. coli* sehingga mengganggu sistem *quorum sensing* (Wu *et al.*, 2013)

Berdasarkan pemaparan diatas dan mempertimbangkan masalah yang timbul karena pembentukan biofilm bakteri *Escherichia coli* dimana bakteri ini dapat menyebabkan resistensi penggunaan antibiotik, maka perlu dilakukan penelitian guna mengetahui efektifitas penggunaan ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) untuk melihat efektifitas senyawa eugenol dan flavonoid dalam menghambat pembentukan biofilm oleh bakteri *Escherichia coli*.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, maka penelitian ini dilakukan untuk menjawab rumusan masalah sebagai berikut:

Apakah pemberian ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) memiliki efek sebagai penghambat pembentukan biofilm pada bakteri *Escherichia coli* secara *in vitro*?

### 1.3 Tujuan Penelitian

#### 1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan bahwa ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) memiliki efek sebagai penghambat pembentukan biofilm pada bakteri *Escherichia coli* secara *in vitro*.

#### 1.3.2 Tujuan Khusus

1. Membedakan hasil dari pemberian masing-masing konsentrasi ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) dalam menghambat pembentukan biofilm pada bakteri *Escherichia coli* secara *in vitro*.
2. Mengukur Kadar Hambat Minimal (KHM) dari ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) yang dapat menghambat pembentukan biofilm (MBIC = *Minimal Biofilm Inhibitory Concentration*) pada bakteri *Escherichia coli* secara *in vitro*.

### 1.4 Manfaat Penelitian

#### 1.4.1 Manfaat Akademis

1. Dapat digunakan sebagai dasar teori untuk menambah ilmu pengetahuan dalam bidang kesehatan mengenai manfaat ekstrak etanol kemangi (*Ocimum sanctum*) sebagai penghambat pembentukan biofilm pada bakteri *Escherichia coli*.
2. Dapat menjadi referensi ilmu yang dapat dikembangkan di masa depan untuk terapi penyakit yang disebabkan oleh biofilm yang dibentuk *Escherichia coli*.

#### 1.4.2 Manfaat Praktis

Dapat digunakan sebagai dasar teori untuk mengembangkan pengobatan aplikatif dari ekstrak daun kemangi (*Ocimum sanctum*).



## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* adalah bakteri gram negatif, berbentuk batang, memiliki ukuran 1 x 3  $\mu\text{m}$ , berkapsul, dan memiliki flagel. *Escherichia coli* termasuk dalam bakteri fakultatif anaerob. Bakteri ini bersifat oksidase negatif, katalase positif, dan dapat fermentatif (glukosa, laktosa, D-mannitol, D-sorbitol, arabinosa, dan maltosa), mereduksi nitrat, dan  $\beta$ -galaktinosa positif. *Escherichia coli* dapat bertahan hidup pada suhu 7 – 46°C dan tumbuh optimum pada suhu 37°C serta pada kisaran pH 4.4 – 9.0. Struktur dinding sel, membran sel, dan struktur internal *Escherichia coli* menyerupai bakteri-bakteri yang termasuk dalam famili *Enterobacteriaceae* (Bachir dan Abouni, 2015).

*Escherichia coli* merupakan salah satu flora normal dalam saluran pencernaan manusia. Beberapa strain dari bakteri ini tidak membahayakan. Bakteri ini dapat berbahaya saat ia berada diluar habitat yang seharusnya, misalnya pada saluran kemih, bakteri *E. coli* merupakan penyebab tersering infeksi saluran kemih (ISK) (van Elsas *et al.*, 2011).

Dalam menyebabkan berbagai manifestasi penyakit, *E. coli* membentuk suatu struktur yang dapat menguntungkan adaptasi dan kehidupannya di berbagai keadaan lingkungan yang disebut dengan biofilm. Pembentukan biofilm pada *E. coli* terjadi dalam beberapa tahapan mencakup (I) perlekatan (adhesi) bakteri ke permukaan yang padat, (II) akumulasi dan pembentukan mikro koloni, (III) maturasi biofilm, dan (IV) dispersi (Garry *et al.*, 2014)

### 2.1.1 Taksonomi *Escherichia coli*

Bakteri *Escherichia coli* termasuk dalam genus *Escherichia*. Dalam genus ini terdapat enam spesies, lima diantaranya berhubungan dengan penyakit pada manusia. *E. coli* bertanggung jawab pada hampir semua infeksi klinis yang disebabkan genus *Escherichia*, sementara spesies yang lain menyebabkan infeksi klinis kurang dari 1% (Noorhamdani dkk., 2017). Bakteri *E. coli* pertama kali diisolasi oleh ilmuwan asal Jerman yaitu Theodor Escherich pada tahun 1885.

Bakteri ini berbentuk batang, pada saat pertama kali diidentifikasi diberi nama *Bacillum coli* namun pada tahun 1958 diganti namanya menjadi *Escherichia coli* untuk menghargai jasa Theodor Escherich. Bakteri ini diidentifikasi sebagai flora normal pada saluran pencernaan manusia dan juga sering ditemukan pada sampel urin pada penderita infeksi saluran kemih (Jacobsen *et al.*, 2008). Berikut adalah taksonomi dari *E. coli*:

Kingdom : Bacteria  
Phylum : Proteobacteria  
Kelas : Gamma Proteobacteria  
Ordo : Enterobacteriales  
Family : Enterobacteriaceae  
Genus : *Escherichia*  
Spesies : *Escherichia coli*

(Brooks *et al.*, 2013)

### 2.1.2 Karakteristik Bakteri

*Escherichia coli* merupakan bakteri gram negatif berbentuk batang dan tidak dapat membentuk spora. Bakteri ini memiliki kemampuan untuk bergerak karena

memiliki flagella peritrik (Noorhamdani dkk., 2017). Jika dilihat akan kebutuhannya terhadap oksigen, bakteri ini termasuk dalam kategori anaerob fakultatif.

*Escherichia coli* memiliki dimensi  $1 \times 3 \mu\text{m}$  dengan sisi yang paralel dan ujung yang membulat. Struktur dinding sel, membran sel, dan struktur internal *Escherichia coli* menyerupai bakteri-bakteri yang termasuk dalam famili *Enterobacteriaceae*.

Membran luar *E. coli* adalah *lipid bilayer* asimetris yang terdiri dari fosfolipid di lapisan dalam dan lipopolisakarida di lapisan luar. Fungsinya sebagai penghalang selektif yang sangat penting untuk kelangsungan hidup bakteri di lingkungan yang berbeda, struktur ini membuat bakteri ini lebih tahan terhadap antibiotik daripada bakteri gram positif (Emilia *et al.*, 2014).

Bakteri ini memerlukan suhu optimum untuk dapat tumbuh dengan baik yaitu sekitar  $37^\circ\text{C}$  dalam pH optimum 7 – 7,5 dan memerlukan media yang mengandung pepton yaitu senyawa hidrolisis protein hewani atau nabati sebagai sumber karbon dan nitrogen sebagai bahan baku metabolismenya (Jawetz *et al.*, 2008).

Media yang umum digunakan untuk membiakkan *E. coli* adalah endo agar, MacConkey agar, dan *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA). Selain tumbuh di media agar darah, endo agar dan EMBA, *E. coli* juga tumbuh pada media SIM (*Sulfide Indol Motility*) sehingga dapat diketahui bersifat motil dan menghasilkan indol. Bakteri *E. coli* secara khas memberi hasil positif pada tes indol, hemolisis tipe beta pada agar darah, uji methyl red, dan peragian manitol serta membentuk gas dari glukosa (Rahayu dkk., 2017).

### 2.1.3 Identifikasi Karakteristik *Escherichia coli*

#### 2.1.3.1 Pewarnaan Gram

Bakteri adalah mikroorganisme transparan yang sulit untuk diamati secara langsung, oleh karena itu dilakukan suatu teknik pengecatan yang disebut pengecatan gram. Pewarnaan gram dengan mudah membagi bakteri menjadi dua kelompok, Gram-positif dan Gram-negatif, atas dasar dinding sel mereka dan permeabilitas membran sel. Mekanisme lebih lanjut menyiratkan bahwa dekolorisasi pelarut menyebabkan kerusakan signifikan pada permukaan sel bakteri Gram negatif dan hanya kerusakan terbatas pada bakteri Gram-positif. Hal ini menunjukkan bakteri Gram-negatif lebih "bocor", menyebabkan sel-sel yang kaya lipid dan berdinding tipis ini kehilangan noda kristal violet dan tampak merah dari *counterstain* (Thairu *et al.*, 2014)

#### 2.1.3.2 Koloni pada *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA)

*Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA) adalah media selektif dan diferensial. Media ini mengandung eosin dan metilen biru, yang menghambat pertumbuhan bakteri gram positif, maka media ini dipilih untuk bakteri gram negatif. EMBA juga mengandung karbohidrat laktosa, yang membuat bakteri gram negatif terdiferensiasi berdasarkan pada kemampuan mereka untuk memfermentasi laktosa. Warna media sebelum pemupukan bakteri berwarna merah keunguan. Perubahan warna hijau metalik pada media EMBA karena *Escherichia coli* dapat memfermentasi laktosa yang mengakibatkan peningkatan kadar asam dalam media. Kadar asam yang tinggi dapat mengendapkan metilen biru dalam media EMBA (Harijani dkk., 2013).

### 2.1.3.3 Uji Biokimia

Uji biokimia dapat dilakukan untuk mengidentifikasi biakan murni suatu bakteri melalui sifat fisiologisnya. Proses biokimia erat kaitannya dengan metabolisme sel, yakni reaksi kimiawi yang dilakukan oleh sel untuk menghasilkan energi maupun menggunakan energi untuk sintesis komponen sel dan untuk kegiatan seluler (Neelma *et al.*, 2018). Bakteri dikultur pada media diferensial yang mengandung zat warna khusus dan karbohidrat, misalnya: medium *MacConkey*, *Eosine Methylene Blue Agar* (EMBA), atau deoksikholat yang membedakan antara bakteri yang dapat meragikan laktosa (*lactose fermenting*) dengan koloninya berwarna merah dengan bakteri *nonlactose-fermenting* yang koloninya tidak berwarna (pucat). *Escherichia coli* adalah bakteri yang mampu meragikan laktosa sehingga koloninya berwarna merah. Pada medium *Triple Sugar Iron* (TSI) yang mengandung 0,1% glukosa, 1% sukrosa, 1% laktosa, ferosulfat, ekstrak jaringan dan indikator pH, apabila hanya glukosa yang diragikan awalnya akan berwarna kuning lalu berubah menjadi merah, namun apabila laktosa atau sukrosa yang diragikan *slant* dan *butt* tetap berwarna kuning (Noorhamdani dkk., 2017).

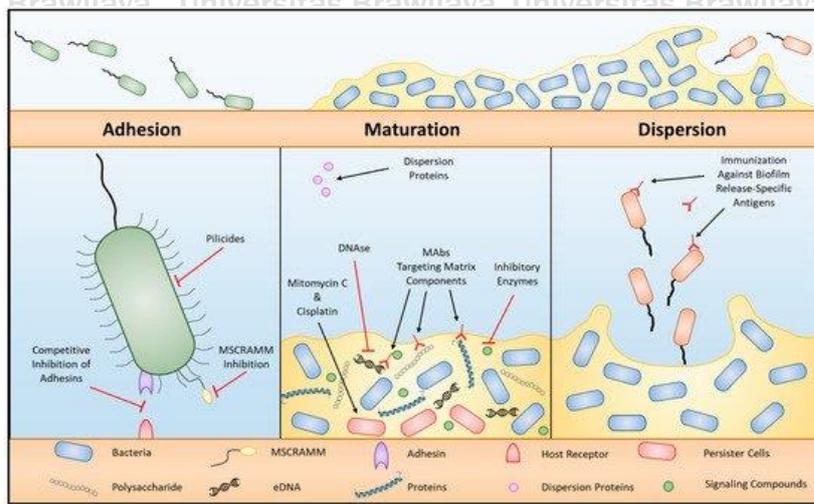
### 2.2 Biofilm

Biofilm adalah asosiasi mikroorganisme di mana sel-sel mikroba menempel satu sama lain pada permukaan hidup atau tidak hidup dalam matriks polimer ekstraseluler yang diproduksi sendiri. Biofilm dapat terbentuk pada berbagai permukaan, termasuk jaringan hidup, perangkat medis yang ada di dalam rumah sakit, pipa air sistem industri atau air minum, atau sistem akuatik alami (Donlan, 2002). Biofilm bakteri bersifat infeksius dan dapat menyebabkan infeksi nosokomial. Menurut *National Institutes of Health* (NIH) sekitar 65% dari

semua infeksi mikroba, dan 80% dari semua infeksi kronis dikaitkan dengan biofilm. Selama pembentukan biofilm, banyak spesies bakteri mampu berkomunikasi dengan yang lain melalui mekanisme khusus yang disebut *quorum sensing*. *Quorum sensing* adalah sistem stimulus untuk mengkoordinasikan ekspresi gen yang berbeda. Bakteri biofilm sulit diakses antibiotik dan sistem kekebalan tubuh manusia sehingga menimbulkan ancaman besar bagi kesehatan masyarakat karena keterlibatannya dalam berbagai penyakit menular. Pemahaman yang lebih besar dari biofilm bakteri diperlukan untuk pengembangan strategi pengendalian yang baru dan efektif sehingga menghasilkan peningkatan dalam manajemen pasien (Jamal *et al.*, 2015).

### 2.2.1 Mekanisme Pembentukan Biofilm

Pembentukan biofilm adalah proses yang sangat kompleks, di mana sel-sel mikroorganisme berubah dari bentuk pertumbuhan planktonik menjadi aggregate yang menempel pada substrat (Okada, 2005). Proses pembentukan biofilm terjadi melalui serangkaian peristiwa yang menyebabkan adaptasi dalam kondisi gizi dan lingkungan yang beragam. Pembentukan biofilm meliputi beberapa tahapan (a) keterikatan pada permukaan (b) maturasi dan (c) pelepasan (Samal dan Das, 2017).



Gambar 2.1 Tahapan Pembentukan Biofilm (Beitelshes et al., 2018)

Pada langkah pertama ini sel-sel bakteri datang dan menempel ke permukaan atau ke mikroorganisme lain yang sudah ada di atasnya. Permukaan kasar dan hidrofilik mendukung perlekatan sel dan pembentukan biofilm.

Kombinasi permukaan padat-cair dapat menyediakan lingkungan yang ideal untuk keterikatan. Ketersediaan nutrisi, suhu yang menguntungkan, struktur lokomotor, protein dan karbohidrat juga dapat mempercepat keterikatan (Donlan, 2002).

Adanya struktur lokomotor pada permukaan sel seperti flagella, pili, fimbriae, protein atau polisakarida juga penting dan dapat memberi keuntungan dalam pembentukan biofilm saat ada komunitas campuran (Donlan, 2002).

Selanjutnya, terjadi perlekatan antar individu sel bakteri satu sama lain sehingga membentuk koloni mikro yang stabil. Multiplikasi bakteri dalam biofilm

terjadi akibat sinyal kimia. Mekanisme genetik produksi eksopolisakarida diaktifkan saat intensitas sinyal melewati batas tertentu (Aparna dan Yadav, 2008). Dengan cara menggunakan sinyal kimia tersebut, pembelahan sel bakteri terjadi di dalam matriks eksopolisakarida yang tertanam, sehingga menghasilkan pembentukan koloni mikro (Samal, 2018).



Setelah biofilm terbentuk, bakteri berhenti memproduksi eksopolisakarida (EPS) dan melepaskan diri dari biofilm yang sudah terbentuk. Dengan melakukan ini bakteri bisa mengalami multiplikasi dan menyebar dengan cepat. Pelepasan sel bakteri planktonik dari biofilm adalah pelepasan yang terprogram, memiliki pola alami (Kostakioti *et al.*, 2013) Selain karena program, stres mekanik juga dapat memicu terlepasnya bakteri dari biofilm. Tapi dalam kebanyakan kasus beberapa bakteri menghentikan produksi EPS dan terlepas ke lingkungan. Penyebaran sel biofilm terjadi baik dengan memisahkan sel-sel baru yang terbentuk dari sel tumbuh atau dispersi agregat biofilm karena efek yang mengalir atau karena *quorum sensing* (Kaplan, 2010).

### 2.2.2 Pembentukan Biofilm pada *Escherichia coli*

*Escherichia coli* merupakan bakteri gram negatif yang memiliki banyak *strain*. Bakteri ini juga dikenal dengan kemampuannya membentuk biofilm sehingga mengakibatkan berbagai penyakit seperti infeksi saluran kemih pada penggunaan kateter yang ditumbuhi biofilm. *Uropathogenic E. coli* sering diisolasi dari biofilm yang terbentuk di lumen kateter, di mana mereka menunjukkan resistensi antibiotik (Jacobsen, 2008)

*E. coli* telah menjadi organisme model gram-negatif penting untuk analisis *in vitro* pembentukan biofilm pada permukaan abiotik (Beloin, 2008).

Beberapa faktor penentu permukaan terlibat dalam pembentukan biofilm seperti:

#### 1. *Flagella* dan Motilitas

*E. coli* motil umumnya memperlihatkan beberapa flagella peritrik. Motilitas terlibat dalam kolonisasi organisme inang atau organ target dan mendorong kontak sel ke permukaan awal.

## 2. *Fimbriae*

*Fimbriae* adalah salah satu faktor virulen yang terkait dengan adhesi jaringan inang strain *E. coli* patogen. *Fimbriae* tipe 1 adalah yang paling umum terdapat di antara *E. coli* dan memiliki peran penting dalam keterikatan awal pada permukaan abiotik dalam pembentukan biofilm (Lasaro *et al.*, 2009).

## 3. Protein Autotransporter

Protein sekretorik ini menyajikan semua persyaratan untuk sekresi di sitoplasma dan membran luar ke permukaan sel bakteri. Di antara protein ini Ag43, AIDA (adhesin involved in diffuse adherence) dan TibA terlibat dalam adhesi. Antigen 43 mempromosikan agregasi sel melalui interaksi Ag43-Ag43 oleh mekanisme *handshake* intraselular (Leo *et al.*, 2011).

## 4. *Curli*

Agregat *curli fimbriae* pada permukaan sel membentuk struktur diameter 6 sampai 12 nm yang panjangnya bervariasi antara 0,5 – 1  $\mu\text{m}$ . Serat perekat *Curli* juga memicu pembentukan biofilm ke permukaan abiotik baik dengan memfasilitasi interaksi sel permukaan awal dan interaksi sel-sel berikutnya (Beloin, 2008)

## 5. *F Conjugative Pilus*

*F-pilus* mempromosikan penempelan (adhesi) awal dan pematangan biofilm melalui pelekatan nonspesifik ke permukaan abiotik dan kontak antar-sel berikutnya yang menstabilkan struktur biofilm (Berne *et al.*, 2015).

## 6. Produksi Eksopolisakarida (EPS)

Matriks biofilm disusun oleh eksopolisakarida. Matriks ini membentuk lapisan kental terhidrasi yang melindungi bakteri yang menempel dari pengeringan dan dari pertahanan inang karena bakteri yang membentuk struktur ini mungkin tidak dikenali oleh sistem kekebalan tubuh. Matriks juga dapat dilibatkan dalam

perlindungan bakteri terhadap molekul beracun seperti antimikroba, radikal hidroksil, dan anion superoksida. Konstruksi matriks berbasis polisakarida memediasi perakitan biofilm sebagai berikut: (i) EPS yang terbentuk pada permukaan apatit dan bakteri membentuk matriks polimer awal yang mendorong kolonisasi mikroba awal dan pengelompokan sel; (ii) produksi EPS yang berkelanjutan di situ memperluas matriks dalam 3 dimensi sambil membentuk inti sel-sel bakteri yang diinduksi oleh EPS; (iii) inti ini menyediakan kerangka kerja pendukung memfasilitasi pengembangan mikrokoloni (kelompok sel 3 dimensi yang terstruktur) (Xiao *et al.*, 2012).

Semua aspek matriks ini dapat berkontribusi terhadap pengembangan resistensi fenotipik biofilm *E. coli* patogen dan menyebabkan infeksi persisten (Anderson *et al.*, 2003). Selain itu, interaksi EPS dengan komponen matriks lainnya mendukung pertumbuhan tiga dimensi biofilm (Flemming dan Wingender, 2010).

### 2.2.3 Quorum Sensing

Selama pembentukan biofilm, banyak spesies bakteri dapat berkomunikasi satu sama lain melalui mekanisme yang disebut *quorum sensing*.

*Quorum sensing* adalah sistem stimulus untuk mengoordinasikan ekspresi gen dengan sel-sel lain dan respon yang terkait dengan kepadatan populasi lokal mereka (Allen *et al.*, 2016). Selama molekul sinyal *quorum sensing* melekat pada reseptor bakteri baru dan membantu dalam transkripsi gen dalam satu spesies bakteri serta antara spesies bakteri yang berbeda (Rutherford dan Bassler, 2012).

Sistem *quorum sensing* memungkinkan komunikasi antara intraspesies dan antarspesies yang melibatkan dalam formasi biofilm. Kekurangan makanan dan kondisi stres lingkungan, seperti disinfektan, antibiotik, kolonisasi bakteri,

identifikasi spesies yang mengganggu, pembentukan flora usus yang normal serta pencegahan flora usus yang berbahaya dapat memicu bakteri untuk mengaktifkan sistem *quorum sensing*. *Quorum sensing* mengontrol beragam proses fisiologis: misalnya, *bioluminescence*, sekresi faktor virulensi, pembentukan biofilm, resistensi antibiotik dan banyak lagi. *Quorum sensing* telah ditunjukkan untuk mengatur pembentukan biofilm di beberapa spesies bakteri (Chen *et al.*, 2002). Banyak bakteri yang terkait secara klinis menggunakan *quorum sensing* untuk pengaturan produksi kolektif faktor virulensi (Jamal *et al.*, 2015).

### 2.2.3.1 *Quorum Sensing* (QS) pada *E. Coli*

Bakteri berkomunikasi satu sama lain melalui molekul organik kecil menyerupai hormon yang disebut sebagai *autoinducer interspecies* (AI). Komunikasi sel-ke-sel bakteri berbasis *autoinducer*, memungkinkan multiseluleritas berbasis populasi yang disebut *quorum sensing* (QS). Fungsi seluler yang dikendalikan oleh QS bervariasi dan mencerminkan kebutuhan spesies bakteri tertentu untuk menghuni ceruk tertentu (Sperandio, 2010).

QS di antara *Escherichia coli* dimediasi oleh LuxR homolog SdiA; sistem LuxS / *autoinducer* 2 (AI-2), sistem AI-3, dan sistem sinyal dimediasi oleh *indole* (Kendall dan Sperandio, 2014). Di antara sistem-sistem ini, sistem LuxS / AI-2 memiliki fitur unik dalam memberkati perilaku yang bergantung pada populasi sel ketika berinteraksi dengan metabolisme pusat melalui siklus metil aktif intraseluler (Wang *et al.*, 2005). Oleh karena itu, LuxS / AI-2 memiliki potensi untuk mempengaruhi regulasi gen dan kebugaran bakteri. Fungsi AI-2 telah dipelajari menggunakan mutan *luxS* dan dengan menambahkan medium terkondisi atau AI-2 yang di uji secara in-vitro ke kultur bakteri. Profil transkripsi *luxS* tidak sinkron

dengan profil akumulasi dari ekstraseluler AI-2 pada supernatan bakteri. Pada bakteri *E. coli*, puncak aktivitas AI-2 ekstraseluler selama fase pertengahan hingga akhir-eksponensial dan cepat menurun selama masuk ke fase diam / statis. Penurunan yang sesuai dalam kadar protein LuxS tidak diamati. Hilangnya aktivitas ekstraseluler AI-2 pada *E. coli* disebabkan karena absorpsi yang dilakukan melalui alat pengikat kaset ATP-binding yang disebut *transporter* yang diatur oleh LuxS (Lsr) (Pereira *et al.*, 2013). Protein *transporter* adalah bagian dari operon *lsr*, yang diatur oleh reseptor *Antimicrobial Peptides* AMP / siklik AMP dan protein yang ditranskripsikan dari dua gen, *lsrK* dan *lsrR*, terletak tepat di hulu *lsr* dan secara berbeda ditranskripsikan dalam operon *lsrRK* sendiri. Sitoplasma kinase *LsrK* memfosforilasi AI-2 ke dalam molekul aktif yang disarankan untuk mengikat dan menurunkan *lsrR* represor *lsr*. *LsrR* dan *LsrK* berfungsi sebagai regulator global ekspresi gen dan mempengaruhi arsitektur biofilm melalui pengaturan koordinat gen terkait biofilm dan gen – gen autoagregasi. Sementara ekspresi dari banyak gen penting ditemukan diubah oleh *LsrR* dan penghapusan *lsrK* (dan secara putatif diatur oleh *LsrRK*), yang terkait dengan invasi inang, respon stres, dan DNA asing. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Wang *et al.* pada tahun 2009, *LsrR* dan *LsrK* (khususnya *LsrR* dan AI-2) beroperasi bersama-sama dan dalam kebalikan dari peran mereka dalam mengatur penyerapan AI-2. Identifikasi positif dari pensinyalan *LsrR* / AI-2 menjelaskan lebih lanjut mengenai perbedaan yang didiskusikan secara luas antara AI-2, hasil samping metabolik, dan AI-2 sebagai molekul sinyal QS (Rezzonico, 2012)

## 2.2.4 Uji Pembentukan Biofilm

### 2.2.4.1 Metode Tabung

Sebuah perulangan organisme uji dari piring kultur semalam diinokulasi dalam tabung kaca borosilikat yang mengandung 10 ml kaldu kedelai *Trypticase* dengan glukosa 1%. Tabung kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 48 jam secara aerob. Setelah inkubasi, tabung dituang dan dicuci dengan garam penyangga fosfat pada pH 7,3 dan dikeringkan. Tabung kemudian diwarnai dengan kristal violet (0,1%) selama 15 menit. Pewarnaan itu dituang dan tabung dicuci dengan air deionisasi dan dikeringkan dalam posisi terbalik. Pembentukan biofilm dianggap positif saat film yang terlihat melapisi dinding dan bagian bawah tabung. Pembentukan lapisan bernoda pada batas cairan dengan udara dianggap positif untuk pembentukan biofilm (Ruchi *et al.*, 2015).

### 2.2.4.2 Metode *Tissue Culture Plate*

Perulangan organisme uji terisolasi dari kultur semalam diinokulasi dalam 10 ml kaldu kedelai *Trypticase* dengan glukosa 1% dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Sumur individu dari kultur jaringan polistirena bawah polistirena steril yang terbata rata diisi dengan 200µl suspensi bakteri yang sesuai dengan 0,5 McFarland setelah pengenceran lebih lanjut 1: 100 dengan media segar bersama dengan organisme kontrol. Hanya kaldu yang berfungsi sebagai kontrol untuk memeriksa kemandulan dan pengikat media yang tidak spesifik. Pelat diinokulasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah inkubasi, isi masing-masing sumur dilepaskan dengan penyedapan dan sumur yang lembut dicuci tiga kali dengan 300 µl larutan garam steril. Bakteri terlampir yang tersisa tetap panas dengan cara mengeksposnya ke udara panas pada suhu 60°C selama 60 menit. Kemudian pewarna kristal 150 µl (2%) ditambahkan ke masing-masing sumur.

Setelah 15 menit, kelebihan noda dibilas dengan dekantasi, dan piring dicuci. 150  $\mu$ l etanol 95% ditambahkan ke masing-masing sumur, dan setelah 30 menit, kerapatan optik / *optical density* (OD) film bakteri patri ditafsirkan dibaca dengan menggunakan pembaca piring mikrotiter pada 600nm. Nilai OD dihitung untuk semua strain yang diuji dan kontrol negatif, nilai *cut-off* (OD<sub>c</sub>) telah ditetapkan. Ini didefinisikan sebagai tiga standar deviasi (SD) di atas mean OD dari kontrol negatif:  $OD_c = OD \text{ rata-rata kontrol negatif} + (3 \times SD \text{ kontrol negatif})$ . Nilai akhir OD dari strain yang diuji dinyatakan sebagai nilai OD rata-rata regangan yang dikurangi dengan nilai OD<sub>c</sub> ( $OD = \text{rata-rata OD dari regangan} - OD_c$ ); Nilai OD<sub>c</sub> dihitung untuk setiap lempeng mikrotiter secara terpisah. Ketika sebuah nilai negatif diperoleh, maka disajikan sebagai Untuk interpretasi hasil yang lebih mudah, strain dibagi menjadi beberapa kategori berikut:

1. Bukan pembentuk biofilm (0)  $OD \leq OD_c$
2. Pembentuk biofilm lemah (+ atau 1)  $OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$
3. Pembentuk biofilm sedang (++) atau 2)  $2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$
4. Pembentuk biofilm kuat (+++ atau 3),  $4 \times OD_c < OD$  (Ruchi *et al.*, 2015).

#### 2.2.4.3 Metode Congo Red Agar

Metode Congo Red Agar (CRA) adalah metode penyaringan kualitatif sederhana untuk mendeteksi produksi biofilm. Media yang digunakan pada metode ini terdiri dari kaldu infus jantung otak (BHI) (37 g /L) ditambah sukrosa (50 g /L), agar No 1 (10g /L) dan Congo red (0,8 g /L). Pertama, Congo Red stain disiapkan sebagai larutan berair pekat dan diautoklaf (121°C selama 15 menit) secara terpisah dari unsur penyusun media lainnya. Kemudian ditambahkan ke agar infus jantung otak yang diautoklaf dengan sukrosa pada suhu 55°C. Pelat

CRA diinokulasi dengan organisme uji dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam secara aerob (Ruchi *et al.*, 2015)

### 2.3 Kemangi (*Ocimum sanctum*)

Kemangi (*Ocimum sanctum*) merupakan tanaman yang populer di Indonesia. Kemangi (*Ocimum sanctum*) merupakan spesies basil terbesar di dunia. Di Asia, tanaman kemangi banyak digunakan sebagai bumbu masak. Sejak zaman dahulu, tanaman kemangi (*Ocimum sanctum*) sudah digunakan sebagai pengobatan tradisional *Ayurveda*. Ekstraknya dipercaya dapat menyembuhkan inflamasi, antipiretik, dan analgesik (Bhatt, 2012)

#### 2.3.1 Morfologi Kemangi (*Ocimum sanctum*)

Pohon kemangi (*Ocimum sanctum*) berbentuk semak dengan tinggi 30 – 150 cm. Batangnya berkayu, beralur, bercabang, dan memiliki bentuk rambut halus pada kulit batangnya. Daun tunggal dengan bentuk oval dengan ujung yang runcing, memiliki gerigi dengan tulang daun menyirip dan berwarna hijau. Kemangi (*Ocimum sanctum*) memiliki bunga majemuk berbentuk tandan dan berbulu. Buah kemangi (*Ocimum sanctum*) berwarna hitam dan tanaman ini memiliki akar tunggang (Malav *et al.*, 2015)



Gambar 2.2 Daun Kemangi (*Ocimum sanctum*) (Shasany *et al.*, 2016)

### 2.3.2 Taksonomi Kemangi (*Ocimum sanctum*)

Taksonomi dari tanaman kemangi (*Ocimum sanctum*) sebagai berikut:

Kerajaan : Plantae  
Divisi : Magnoliophyta  
Kelas : Magnoliopsida  
Ordo : Lamiales  
Famili : Lamiaceae  
Genus : *Ocimum*  
Spesies : *Ocimum sanctum*

(Bhasin , 2016)

### 2.3.3 Kemangi sebagai Antibiofilm

*Ocimum sanctum* menunjukkan aktivitas antimikroba. Ekstrak etanol, metanol, dan organik dari *Ocimum sanctum* menunjukkan zona luas penghambatan terhadap *Escherichia coli*, *Staphylococci sp.*, *Shigella sp.*, *Staphylococcus aureus* dan *Enterobacteria sp.* *Ocimum sanctum* juga bertindak melawan *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococci sp.*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella pneumonia*, *Proteus*, *Candida albicans*, *Mycobacterium tuberculosis* dan *Micrococcus pyogenes*. Hasil ini membuktikan bahwa *Ocimum sanctum* dapat bertindak sebagai agen antimikroba yang sangat baik terhadap banyak mikroba.

Kemampuan *Ocimum sanctum* dalam menghambat berbagai mikroorganismepatogen disebabkan oleh berbagai kandungan senyawa aktif seperti eugenol, tannin, saponin, dan flavonoid pada daunnya (Khan *et al.*, 2012). Analisis menggunakan kromatogram menunjukkan adanya enam flavonoid yaitu glukosida luteolin, *quercetin*, *coumarin*, apigenin dan *kaempherol* (Pandey dan Sharma, 2014)

### 2.3.3.1 Eugenol

Eugenol berupa zat cair berbentuk minyak, tidak berwarna atau sedikit kekuningan, menjadi coklat dalam udara, berbau dan berasa rempah-rempah.

Eugenol dapat larut dalam alkohol, eter, kloroform, dan mudah menguap serta sedikit larut dalam air. Senyawa eugenol yang mempunyai rumus molekul

$C_{10}H_{12}O_2$  mengandung beberapa gugus fungsional yaitu alil ( $-CH_2-CH=CH_2$ ),

fenol ( $-OH$ ) dan metoksi ( $-OCH_3$ ), sehingga dengan adanya gugus tersebut dapat

memungkinkan eugenol sebagai bahan dasar sintesis berbagai senyawa lain yang

bernilai lebih tinggi seperti isoeugenol, eugenol asetat, isoeugenol asetat, benzil

eugenol, benzil isoeugenol, metil eugenol, eugenol metil eter, eugenol etil eter,

isoeugenol metil eter, vanilin dan sebagainya (Harnani dkk., 2010). Eugenol

digunakan sebagai bahan baku obat dan parfum. Eugenol mudah bersenyawa

dengan besi, oleh karena itu penyimpanannya harus dalam botol kaca, drum

aluminium, atau drum timah putih. Data sifat fisika dari eugenol adalah sebagai

berikut: Berat jenis : 1,0651 Indeks bias : 1,5410 ( $20^\circ C$ ) Titik didih :  $253^\circ C$  Titik

nyala :  $110^\circ C$ . Eugenol termasuk senyawa fenol, akan bereaksi dengan alkali

hidroksida membentuk senyawa fenolat yang meningkat kelarutannya dalam air.

Selain digunakan dalam berbagai bidang industri, eugenol juga diteliti memiliki sifat

antimikroba terhadap beberapa bakteri seperti *Klebisella*, *E. coli*, *Proteus*, *S.*

*aureus*, *Shigella*, *P. aeruginosa* dan *Vibrio cholerae* (Saeed dan Tariq, 2008)

### 2.3.3.2 Flavonoid

Flavonoid merupakan kelompok polifenol dan diklasifikasikan berdasarkan struktur kimia serta biosintesisnya (Seleem *et al.*, 2017). Struktur dasar flavonoid

terdiri dari dua gugus aromatik yang digabungkan oleh jembatan karbon ( $C_6-C_3-$

C6). Flavonoid diklasifikasikan sebagai flavon, flavanone, flavonol, katekin, flavanol, kalkan dan antosianin (Panche *et al.*, 2016). Pembagian kelompok flavonoid didasarkan pada perbedaan struktur terutama pada substitusi karbon pada gugus aromatik sentral dengan beragamnya aktivitas farmakologi yang ditimbulkan (Wang *et al.*, 2018).

### 2.3.4 Senyawa Penghambat Biofilm

#### 2.3.4.1 Eugenol

Eugenol menunjukkan aktifitas penghambatan pembentukan biofilm yang signifikan. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Kim *et al.* pada tahun 2016 tiga turunan eugenol lainnya isoeugenol, 2-methoxy-4-propylphenol, dan 4-ethylguaiacol memiliki aktivitas antibiofilm, menunjukkan bahwa unit hidroksil C-1, unit metoksi C-2, dan rantai alkil C-4 atau alkana pada cincin benzena eugenol memainkan peran penting dalam aktivitas antibiofilm. Eugenol berpengaruh pada penurunan kemampuan *E.coli* untuk bergerak dimana kemampuan untuk motil sangat diperlukan dalam proses pembentukan awal biofilm. Eugenol juga berperan dalam menghambat ekspresi gen curli (csgABDFG) sebesar 8 kali lipat sampai 155 kali lipat dan berperan dalam mengubah ekspresi tipe I fimbrial dan gen fimbrial lainnya. Eugenol dapat menurunkan regulasi beberapa gen motilitas (gen-gen berkerumun fimA dan fimH dan gen berenang flhD, fliA, dan motB). Produksi curli fimbriae sangat penting untuk pembentukan biofilm oleh *E.coli*, khususnya strain ATCC 43895 QRT-PCR ini. Hasilnya menunjukkan eugenol sangat mengurangi transkripsi gen curli, serta mengurangi transkripsi gen tipe I fimbriae (Kim *et al.*, 2016)

### 2.3.5.2 Flavonoid

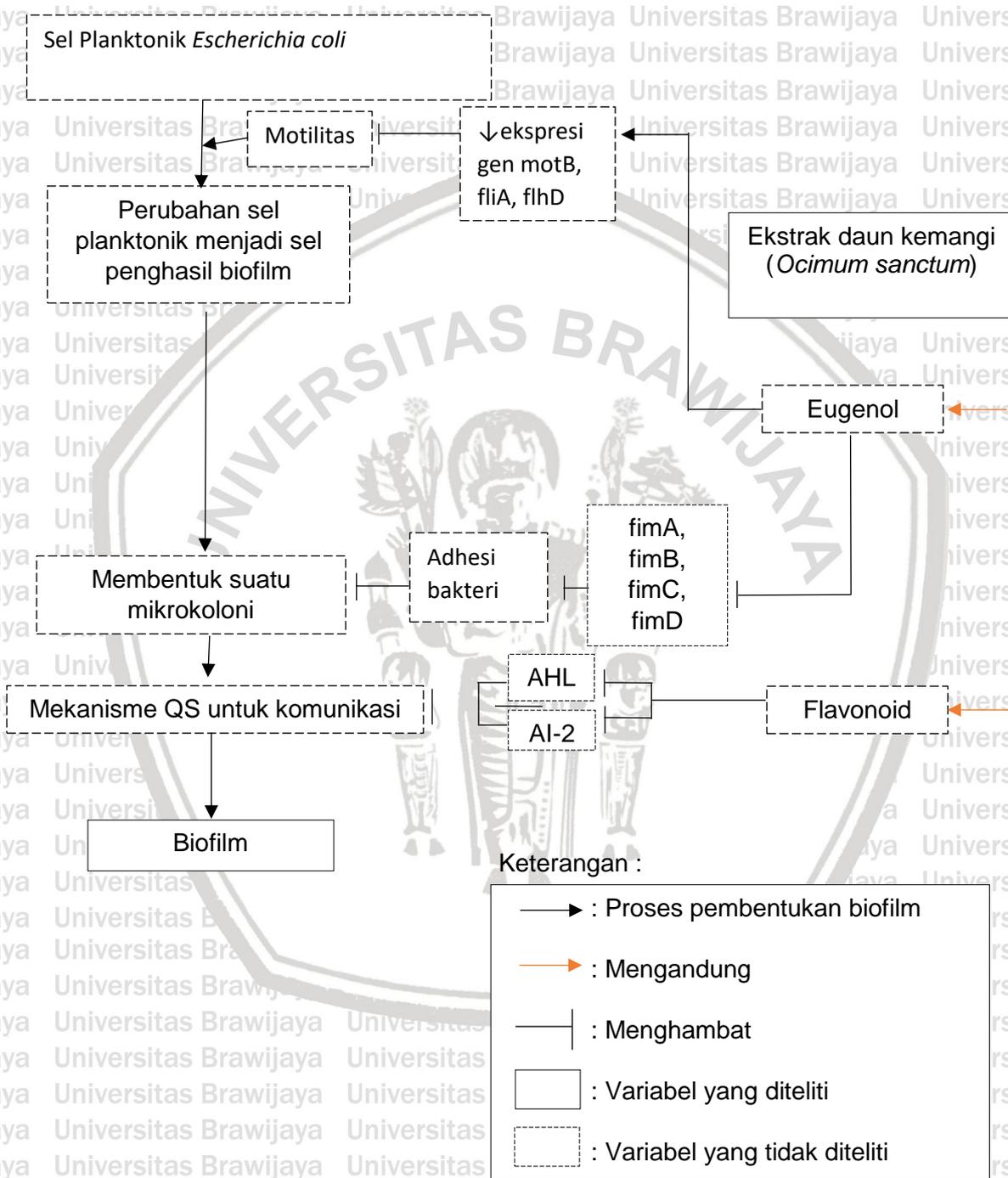
Flavonoid disintesis pada tanaman salah satunya untuk melindungi diri dari infeksi bakteri. Aktivitas antibakteri flavonoid telah banyak diuji secara *in vitro* dan menunjukkan aktivitas terhadap banyak bakteri (Kumar dan Pandey, 2013). Contoh flavonoid yang telah terbukti mempunyai aktivitas antibakteri adalah apigenin, quercetin, naringenin, epigallocatekin galat, dan derivatnya, flavon, dan isoflavon (Cushnie dan Lamb, 2005). Penelitian yang dilakukan Wang *et al.* (2018) menunjukkan pengkompleksan 5-hidroksi-7,4'-dimetoksiflavon dengan logam metal meningkatkan aktivitas antibakteri. Aktivitas ini diakibatkan oleh 3,4-hidroksi pada cincin C. Dengan adanya gugus hidroksi tersebut flavonoid akan membentuk kompleks dengan protein pada bakteri dan melisis membran bakteri tersebut (Cushnie and Lamb, 2005). Penelitian terbaru yang dilakukan Tsou *et al.*, (2016) terhadap bakteri *Salmonella* pencernaan menunjukkan mekanisme pengikatan flavonoid kepada type III secretion system (T3SS) bakteri secara kovalen yang mengakibatkan inhibisi invasi pada sel epitel. Pengujian antibakteri ini juga dilakukan terhadap 13 macam senyawa fenol yang diujikan kepada beberapa bakteri seperti *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus nervous*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger*, dan *Eschericia coli* dengan metode difusi agar. Hasil yang didapatkan yaitu flavon, quercetin, dan naringenin terbukti memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bekteri tersebut (Rauha *et al.*, 2000). Sebagai penghambat pembentukan biofilm, flavonoid bekerja dengan cara menghambat induksi *bioluminescence* oleh sinyal QS HAI-1 dan AI-2 pada *E. coli* sehingga mengganggu sistem *quorum sensing* (Asfour, 2018)



BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep dan Hipotesis Penelitian

Bakteri *Escherichia coli* mencapai jumlah yang cukup untuk menimbulkan infeksi sehingga menjadi sel planktonik (sel bebas). Lalu *E. coli* berkumpul untuk membentuk biofilm.



Pembentukan biofilm *E. coli* dimulai dari perubahan sel planktonik menjadi sel pembentuk biofilm (fenotipik). Setelah itu, perlekatan bakteri *E. coli* tersebut membentuk lapisan *monolayer* yang masih bersifat sementara. Bersamaan dengan itu, untuk perlekatan permanen, bakteri *E. coli* membentuk matriks EPS yaitu suatu perekat yang melekatkan bakteri pada satu permukaan dan melekatkan satu sama lain pada *monolayer* yang menjadi tempat sel bakteri melekat. Setelah bakteri *E. coli* melekat secara permanen, akan terbentuk mikrokoloni yang selanjutnya diikuti dengan pengembangan dan maturasi biofilm bakteri *E. coli* melalui mekanisme *quorum sensing*.

Pada penelitian ini, variabel yang diteliti adalah ekstrak daun kemangi (*Ocimum sanctum*) dan biofilm bakteri *E. coli*. Ekstrak daun kemangi dengan kandungan eugenol dan flavonoid (yang ditunjukkan dengan panah berwarna oranye), bersinergi untuk menghambat pembentukan biofilm. Flavonoid menghambat pembentukan biofilm melalui mekanisme menghambat AHL dan AI-2 agar tidak berkomunikasi. Eugenol dapat menurunkan regulasi beberapa gen motilitas (*flhD*, *fliA*, dan *motB*) serta dapat menurunkan gen *fimA*, *fimB*, *fimC*, dan *fimD* untuk memproduksi fimbriae. Dengan terhambatnya produksi fimbriae, maka akan menghambat proses adhesi antara bakteri dengan inangnya, sehingga pembentukan biofilm juga ikut terhambat.

### 3.2. Hipotesis Penelitian

Ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) memiliki efek menghambat pembentukan biofilm pada *Escherichia coli* secara *in vitro*.

## BAB IV METODE PENELITIAN

### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian dilakukan dengan menggunakan rancangan, eksperimental laboratorium untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) terhadap pembentukan biofilm *Echerichia coli*. Desain penelitian ini adalah *true experimental-post test only group design* dengan menggunakan metode tabung untuk mengamati pembentukan biofilm.

Kelompok kontrol adalah kelompok yang tidak mendapat perlakuan berupa pemberian ekstrak. Kelompok perlakuan adalah kelompok yang mendapat perlakuan berupa pemberian ekstrak dengan konsentrasi 3,125%, 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, dan 100% (studi eksplorasi). Penelitian inti dilakukan dengan konsentrasi 0%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, dan 45%.

### 4.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*). Sampel penelitian ini adalah *Escherichia coli* stok kultur Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah diidentifikasi ulang sebelum penelitian dilakukan.

### 1.2.1a Pengulangan

1.2.2 Terdapat 7 perlakuan pada penelitian ini yaitu 0%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40% dan 45%. Jumlah pengulangan penelitian dihitung dengan rumus Federer sebagai berikut :

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

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

$$6n-6 \geq 15$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 3,5$$

$$n = 4$$

#### Keterangan:

n = jumlah pengulangan tiap perlakuan

p = jumlah perlakuan (dosis ekstrak daun kemangi)

Berdasarkan perhitungan di atas, maka besar sampel atau pengulangan yang diperlukan dalam penelitian ini paling sedikit adalah 4 (Muntaha, 2015).

### 4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Simplisia daun kemangi didapatkan dari Batu Materia Medica dan telah diberi surat keterangan determinasi pada lampiran 9. Proses ekstraksi etanol dilakukan di Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang. Uji penghambatan biofilm *Escherichia coli* dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dari bulan Februari 2019 sampai dengan April 2019.

#### 4.4 Variabel Penelitian

##### 4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas adalah variabel yang disengaja atau ditentukan, dan dipelajari pengaruhnya terhadap variabel terikat. (Flannelly *et al.*, 2014). Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak daun kemangi (*Ocimum sanctum*) dengan konsentrasi 0%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40% dan 45%.

##### 4.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat adalah variabel yang dipikirkan sebagai akibat atau keadaannya tergantung dari variabel-variabel lain (Flannelly *et al.*, 2014). Variabel terikat pada penelitian ini adalah derajat pembentukan biofilm bakteri *Escherichia coli* dengan metode tabung yang dikualifikasi dengan menggunakan *Mean Gray Value* untuk menentukan Kadar Hambat Biofilm Minimal (KHBM).

#### 4.5 Instrumen Penelitian

##### 4.5.1 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Daun Kemangi

1. Simplisia daun Kemangi (*Ocimum sanctum*)
2. Etanol 96%
3. Timbangan analitik
4. Gelas kimia 250 ml
5. Alat ekstraksi Sokhet
6. Cawan petri

7. Penjepit cawan petri

8. Desikator

9. Spatula

10. Pemanas aquades

11. Kertas saring

12. Thimble

13. Oven

**4.5.2 Alat dan Bahan Identifikasi Bakteri**

1. Isolat *Escherichia coli*

2. Bahan pengecatan Gram: lugol, kristal violet, safranin, dan alkohol 96%

3. Minyak imersi, mikroskop, dan ose

4. Medium *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA)

5. Lampu spiritus

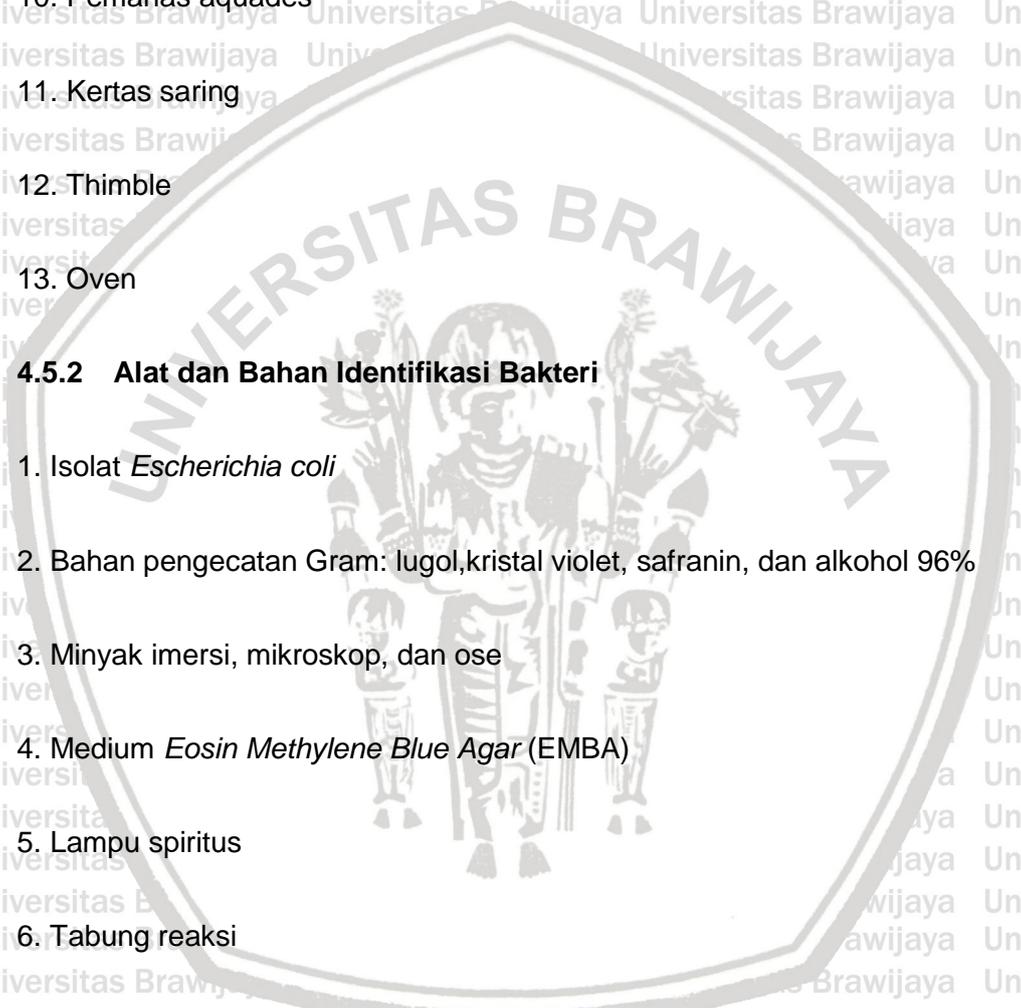
6. Tabung reaksi

**4.5.3 Alat dan Bahan Deteksi Biofilm**

1. TSB + *glycerol* 10%

2. Biakan *Escherichia coli* pembentuk biofilm

3. Tabung reaksi



4. *Phosphate Buffer Saline* (PBS) pH 7,3

5. *Deionized water*

6. Kristal violet

7. Pipet

8. Ose

9. *Beaker glass*

10. Inkubator

#### 4.6 Definisi Operasional

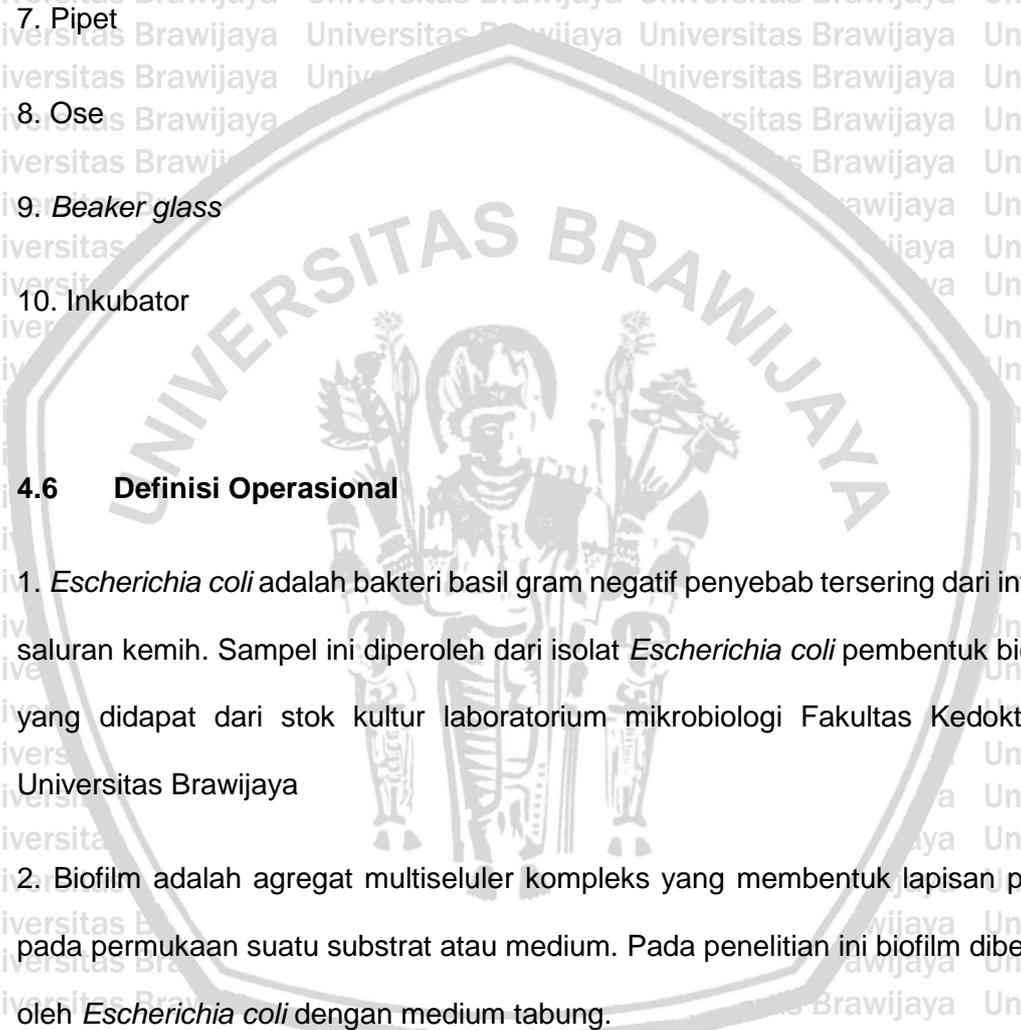
1. *Escherichia coli* adalah bakteri basil gram negatif penyebab tersering dari infeksi saluran kemih. Sampel ini diperoleh dari isolat *Escherichia coli* pembentuk biofilm

yang didapat dari stok kultur laboratorium mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

2. Biofilm adalah agregat multiseluler kompleks yang membentuk lapisan padat pada permukaan suatu substrat atau medium. Pada penelitian ini biofilm dibentuk oleh *Escherichia coli* dengan medium tabung.

3. Ekstrak daun kemangi adalah hasil ekstraksi cair daun kemangi dengan pelarut etanol. Ekstrak yang didapat dianggap memiliki kandungan ekstrak sebesar 100%. Kemangi berasal dari Batu Materia Medika.

4. Metode tabung adalah metode deteksi biofilm dengan menggunakan tabung sebagai medium yang bersifat kualitatif.



5. *Mean Gray Value* adalah acuan skala intensitas warna yang terdapat pada program *Adobe Photoshop CS6*. Skala berkisar antara 0 – 255 . Angka mendekati 0 menunjukkan kepekatan warna yang tinggi. Sedangkan angka mendekati 255 menunjukkan kepekatan warna yang rendah (Andriyani, 2014)

6. *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC) adalah konsentrasi ekstrak daun kemangi terendah yang mampu menghambat pembentukan biofilm yang ditandai dengan terjadinya penipisan bentuk cincin dan lapisan ungu kebiruan yang terdapat pada dinding dan dasar tabung. MBIC adalah konsentrasi ekstrak yang menghasilkan nilai *Mean Gray Value* pada tabung dengan pemberian ekstrak minimal 10% dibawah *MGV* tabung kosong (Maciá et al., 2014).

#### **4.7 Prosedur Penelitian**

##### **4.7.1 Persiapan Daun Kemangi (*Ocimum sanctum*)**

###### **4.7.1.1 Ekstraksi dan Evaporasi**

1. Menggunakan 400 gr daun kemangi (*Ocimum sanctum*) dicuci bersih dan dikeringkan, kemudian di oven dengan suhu 50°C sehingga kandungan airnya berkurang.
2. Kemudian, daun kemangi yang kering tersebut di blender menjadi sediaan bubuk, kemudian dimasukkan kedalam gelas *Erlenmeyer* ukuran 1L lalu direndam dengan etanol 96% sampai volume 1L, kemudian dikocok sampai benar – benar tercampur, kurang lebih 30 menit dan di amkan satu malam sampai mengendap.

3. Setelah satu malam, diambil lapisan atas campuran etanol 96% dengan zat aktif yang sudah terambil, proses ini dilakukan sampai sebanyak 3 kali dan dilanjutkan dengan proses evaporasi.
4. Memasang evaporator set pada tiang permanen agar dapat digantung dengan kemiringan  $30^{\circ}$  -  $40^{\circ}$  terhadap meja dengan susunan dari bawah ke atas alat pemanas air, labu penampung hasil evaporasi, *rotatory evaporator* dan tabung pendingin.
5. Kemudian air dingin yang terhubung dengan bak penampung air dingin melalui selang plastik.
6. Hasil maserasi dimasukkan dalam labu evaporasi sedangkan *rotatory evaporator*, alat pompa sirkulasi air dingin dan alat pompa vakum dinyalakan.
7. Pemanas aquades juga dinyalakan sehingga hasil ekstraksi dalam tabung penampung evaporasi mendidih sampai dengan suhu  $78^{\circ}\text{C}$  (sesuai titik didih etanol 96%) dan etanol 96% mulai menguap.
8. Hasil penguapan etanol 96% dikondensasikan menuju labu penampung etanol 96% menuju labu penampung etanol 96% sehingga tidak tercampur hasil evaporasi dan uap lain tersedot pompa vakum.
9. Proses evaporasi dilakukan hingga volume hasil ekstraksi berkurang dan menjadi kental. Setelah kental evaporasi dihentikan dan hasil evaporasi diambil. Hasil evaporasi ditampung dalam cawan penguap kemudian di oven selama kurang lebih 1,5 sampai 2 jam untuk menguapkan pelarut yang tersisa.

Setelah itu kita dapatkan hasil ekstraksi sebanyak 35 mL. (Sudarmadji *et al.*, 2003).

#### 4.7.2 Persiapan Bakteri

##### 4.7.2.1 Identifikasi Bakteri *Escherichia coli*

### A. Pemeriksaan Mikroskopis

#### Pembentukan sediaan slide

1. Bersihkan *object glass* dengan kapas, dilanjutkan fiksasi dengan dilewatkan di atas api dan biarkan dingin sehingga *object glass* menjadi steril dari bahan pencemar lain. Kemudian pembuatan sediaan yang tidak terlalu tebal dan tidak terlalu tipis dengan cara:
  2. Teteskan satu ose aquades steril pada gelas objek. Ambil sedikit biakan kuman menggunakan ose, kemudian suspensikan dengan aquades pada gelas objek dan ratakan. Khusus sediaan cair tidak perlu disuspensikan dengan aquades.
  3. Biarkan sediaan kering di udara, kemudian lakukan fiksasi dengan cara melewatkan sediaan di atas api satu atau dua kali (Forbes *et al.*, 2007).

### B. Pewarnaan Gram

1. Tuang sediaan pada gelas objek dengan kristal violet dengan durasi 1 menit. Pewarnaan dengan kristal violet akan membuat sediaan menjadi berwarna biru. Buang sisa kristal violet dan bilas dengan air.
2. Tuang sediaan dengan lugol selama 1 menit. Buang sisa lugol dan bilas dengan air.
3. Tuang sediaan dengan alkohol 96% selama 5 – 10 detik atau sampai warna cat luntur. Buang sisa alkohol dan bilas lagi dengan air.
4. Tuang sediaan dengan safranin selama ½ menit. Buang sisa safranin dan bilas lagi dengan air.
5. Keringkan sediaan dengan kertas penghisap.

6. Lihat di bawah mikroskop dengan lensa objektif perbesaran 100x (Sandle, 2004).

### C. Perbenihan Pada *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA)

Koloni *Escherichia coli* yang ditanam pada medium *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA), akan nampak seperti tetesan tinta pada lantai yang disebut '*metallic sheen*' (Noorhamdani dkk., 2017).

#### Prosedur pembiakan Bakteri Pada Medium EMBA

1. Coretkan bakteri menggunakan metode *quadrant streak* pada medium EMBA
2. Sediaan diinkubasi dengan suhu 37°C selama 18 – 24 jam.
3. Koloni bakteri *Escherichia coli* pada medium EMBA menghasilkan gambaran hijau metalik.

### D. *Microbact* 12A

Uji biokimia menggunakan *Microbact* 12A meliputi beberapa prosedur uji antara lain:

1. Satu koloni bakteri yang telah diinkubasi selama 18 – 24 jam diambil dengan menggunakan ose kemudian dilarutkan ke dalam 3 – 5 mL garam fisiologis dalam tabung reaksi steril hingga homogen.
2. Larutan bakteri yang telah homogen dimasukkan ke dalam sumur *Microbact* 12A sebanyak 100µL atau 4 tetes. Untuk sumur lysin, ornitin dan H<sub>2</sub>S ditambahkan larutan *mineral oil* sebanyak 1 – 2 tetes. Setelah itu, *Microbact* 12A diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 – 24 jam.
3. *Microbact* 12A yang telah diinkubasi kemudian diberikan *reagent* pada sumur nomor 8 dengan *indol kovact* sebanyak 2 tetes, sumur nomor 10

dengan VP I dan VP II masing-masing 1 tetes, dan sumur nomor 12 dengan TDA sebanyak 1 tetes.

4. Evaluasi hasil dilihat melalui sumur-sumur *Microbact* 12A apakah positif atau negatif dengan cara membandingkan dengan tabel warna dan hasilnya dituliskan pada formulir *Patent Record*.
5. Angka-angka oktaf didapatkan dari penjumlahan reaksi positif dari tiap-tiap kelompok (3 sumur didapatkan 1 angka oktaf).
6. Nama bakteri dilihat dengan computer berdasarkan angka oktaf yang keluar.

#### 4.7.2.2 Pembuatan Perbenihan Cair Bakteri

1. Koloni bakteri *Escherichia coli* dipindahkan ke *broth* menggunakan ose, kemudian dilakukan *spektrofotometri* dengan panjang gelombang ( $\lambda$ ) 625 nm sehingga diketahui kepadatan bakterinya (OD = *Optical Density*) yang setara dengan kepadatan bakteri  $10^8$  bakteri/mL.
2. Untuk mendapatkan suspensi bakteri uji dengan konsentrasi bakteri sebesar  $10^8$ /mL yang setara dengan OD = 0,1 maka dilakukan perhitungan sebagai berikut

$$N1 \times V1 = N2 \times V2$$

$$1,621 \times V1 = 0,1 \times 10$$

$$V1 = 1/1,621 = 0,61 \text{ mL}$$

Keterangan:

V1 = Volume bakteri yang akan ditambah pengencer

N1 = Nilai absorbansi suspensi adalah 1,621 (hasil *spektrofotometri*)

V2 = Volume suspensi bakteri uji (10 mL)

$N_2 = OD (0,1 = \text{setara dengan } 10^8/\text{mL})$

3. Sehingga diperoleh volume (mL) bakteri yang akan ditambah pengencer untuk mendapatkan bakteri dengan konsentrasi  $10^8/\text{mL}$  sebanyak 10 mL.

4. Setelah diperoleh suspensi bakteri dengan konsentrasi  $10^8/\text{mL}$  sebanyak 10 mL, dilakukan pengenceran sebanyak 100 kali dengan menggunakan NaCl dan *nutrient broth*, sehingga konsentrasi bakteri menjadi  $10^6/\text{mL}$ . Kini bakteri telah siap digunakan untuk penelitian (Kart *et al.*, 2017)

### 4.7.3 Uji Hambat Pembentukan Biofilm pada *Escherichia coli*

#### 4.7.3.1 Penelitian Pendahuluan

1. Menyediakan 7 tabung steril untuk mencampurkan larutan ekstrak *TSBglu* sebagai medium serta perbenihan bakteri yang digunakan untuk uji hambat pembentukan biofilm serta 1 tabung propilen untuk mencampurkan *TSBglu* dan perbenihan bakteri.

2. Melakukan perhitungan jumlah ekstrak, *TSBglu*, serta perbenihan bakteri yang akan digunakan pada setiap tabung dengan konsentrasi berbeda.

Setiap tabung akan berisi 2 mL larutan konsentrasi akhir ekstrak daun kemangi. Perhitungan menggunakan rumus  $N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$ .

3. Perbenihan cair bakteri dengan konsentrasi bakteri  $1 \times 10^8 \text{ CFU/mL}$  dan *TSBglu* sejumlah hasil perhitungan dimasukkan ke dalam tabung propilen

dan dihomogenkan sehingga terbentuk perbenihan bakteri dengan konsentrasi  $1 \times 10^6$  CFU/mL.

4. Perbenihan bakteri konsentrasi  $1 \times 10^6$  CFU/mL kemudian dimasukkan ke dalam 7 tabung sesuai dengan hasil perhitungan tiap konsentrasi.

5. Mengisi larutan ekstrak ke dalam 7 tabung sebesar hasil perhitungan tiap konsentrasi. Rincian 7 tabung sebagai berikut:

Tabung 1 : 4 mL larutan *TSBglu* dan bakteri, tanpa ekstrak (0%) (kontrol positif)

Tabung 2 : 4 mL larutan *TSBglu* saja (kontrol negatif)

Tabung 3 : 4 mL larutan dengan konsentrasi akhir ekstrak daun kemangi sebesar 3,125%

Tabung 4 : 4 mL larutan dengan konsentrasi akhir ekstrak etanol daun kemangi sebesar 6,25%

Tabung 5 : 4 mL larutan dengan konsentrasi akhir ekstrak etanol daun kemangi sebesar 12,5%

Tabung 6 : 4 mL larutan dengan konsentrasi akhir ekstrak etanol daun kemangi sebesar 25%

Tabung 7 : 4 mL larutan dengan konsentrasi akhir ekstrak etanol daun kemangi sebesar 50%

6. Seluruh tabung diinkubasikan selama 48 jam dalam suhu 37°C.

7. Setelah 48 jam, tabung dikeluarkan dari inkubator dan dicuci dengan PBS (pH 7,3) dan dikeringkan.

8. Tabung yang sudah dikeringkan diberi kristal violet 0,1% hingga larutan kristal violet mengisi lebih tinggi dari batas larutan yang telah dibentuk pada masing-masing tabung, didiamkan selama 15 menit, lalu kristal violet dibuang dan tabung dicuci dengan air.

9. Tabung dikeringkan. Segera amati dan catat biofilm yang terbentuk (Cahyani, 2013). Dapat terlihat sebuah film melapisi sisi dan dasar tabung.

Hal ini diyakini sebagai indikasi pembentukan biofilm. Jumlah biofilm dinilai sebagai 0 = tidak ada, 1 = lemah, 2 = sedang atau 3 = kuat (Praharaj *et al.*, 2013).

#### 4.7.3.2 Penelitian Inti

1. Ekstrak daun kemangi (*Ocimum sanctum*) yang kental diambil sebanyak 1 gr dan dicampur dengan DMSO sebanyak 1 mL, sehingga didapatkan ekstrak daun kemangi dengan konsentrasi 50%.
2. Menyiapkan perbenihan cair bakteri dengan kepadatan  $10^6$  CFU/mL.
3. Membuat suspensi bakteri dalam medium TSBglu berdasarkan OD dari spektrofotometri.
4. Menyiapkan tujuh tabung steril yang akan diisi dengan bakteri dan konsentrasi ekstrak yang ditentukan setelah uji pendahuluan, yaitu 0% (kontrol); 20%; 25%; 30%; 35%; 40%; 45%.
5. Mengisi tabung reaksi 1 – 7 dengan suspensi bakteri dari medium TSBglu dan ekstrak etanol daun kemangi.
6. Kemudian keenam tabung tersebut diinkubasi dalam inkubator selama 48 jam pada suhu 37°C.

7. Setelah 48 jam, keenam tabung tersebut dicuci dengan larutan PBS (pH 7,3), lalu dikeringkan.
8. Setelah kering, seluruh tabung dicat dengan kristal violet 0,1% sebanyak 4 mL atau hingga larutan kristal violet mengisi lebih tinggi dari batas larutan yang telah dibentuk pada masing – masing tabung. Diamkan selama 15 menit, kemudian buang larutan kristal violet dan cuci dengan air, kemudian dikeringkan.
9. Semua buangan dari tabung dimasukkan ke dalam lisol. Pembentukan biofilm dapat diamati pada area *airfluid border* (area antara medium cair dan udara).

#### 4.7.4 Pengukuran *Mean Gray Value*

Hasil pembentukan biofilm pada tabung kemudian difoto dengan menggunakan kamera digital. Untuk mengetahui intensitas warna pada area cincin dan dinding tabung pada masing-masing kelompok maka digunakan program aplikasi *Adobe Photoshop CS6*. *Mean Gray Value* yang dinyatakan dalam skala 0 – 255. Semakin rendah nilai *Mean Gray Value* menunjukkan intensitas warna yang semakin tebal, sementara semakin tinggi nilai *Mean Gray Value* menunjukkan intensitas warna yang semakin tipis. Langkah-langkah dimulai dengan membuka aplikasi *Adobe Photoshop CS6*, pilih *File* dan masukkan hasil fotonya. Selanjutnya pilih *tab Window* dan pilih *Measurement Log*, blok area yang akan dilihat intensitas warnanya dengan menggunakan *Rectangular Marquee Tool*, lalu klik *Record Measurements* maka akan didapatkan nilai *Mean Gray Value* yang merupakan rata-rata dari intensitas warna pengecatan tabung (Goldman et al., 2015).

#### 4.8 Analisis Data

Penelitian ini menggunakan variabel numerik untuk mengetahui pengaruh antara berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) terhadap intensitas warna yang ditimbulkan oleh biofilm pada tabung (*Mean Gray Value*) dan untuk mengetahui hubungan antara masing-masing konsentrasi ekstrak daun kemangi (*Ocimum sanctum*) terhadap intensitas warna biofilm pada tabung. Analisis hasil penelitian menggunakan analisis statistik SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) versi 23.0 untuk *Windows*. Adapun tahapan analisis data yang dilakukan adalah sebagai berikut:

1. Uji normalitas data dengan menggunakan *Shapiro-wilk* untuk menguji apakah data tersebar normal (parametrik) atau tidak tersebar normal (nonparametrik) dan homogen atau tidak homogen. *Shapiro-Wilk test* dilakukan apabila data berjumlah kurang dari 50.
2. Uji komparasi dilakukan dengan cara :
  - a. ANOVA, dengan syarat sebaran data harus normal dan varian data harus sama (homogen).
  - b. Namun, jika data tidak homogen atau tidak tersebar normal maka digunakan metode *Kruskal Wallis*.
3. Uji Post Hoc dilakukan dengan cara :
  - a. *Tukey*, dengan syarat sebaran data harus normal dan varian data harus sama (homogen).
  - b. Namun, jika data tidak homogen atau tidak tersebar normal maka menggunakan metode *Mann Whitney*.
4. Uji Korelasi dilakukan dengan cara :

a. *Pearson*, dengan syarat sebaran data harus normal dan varian data harus sama (homogen).

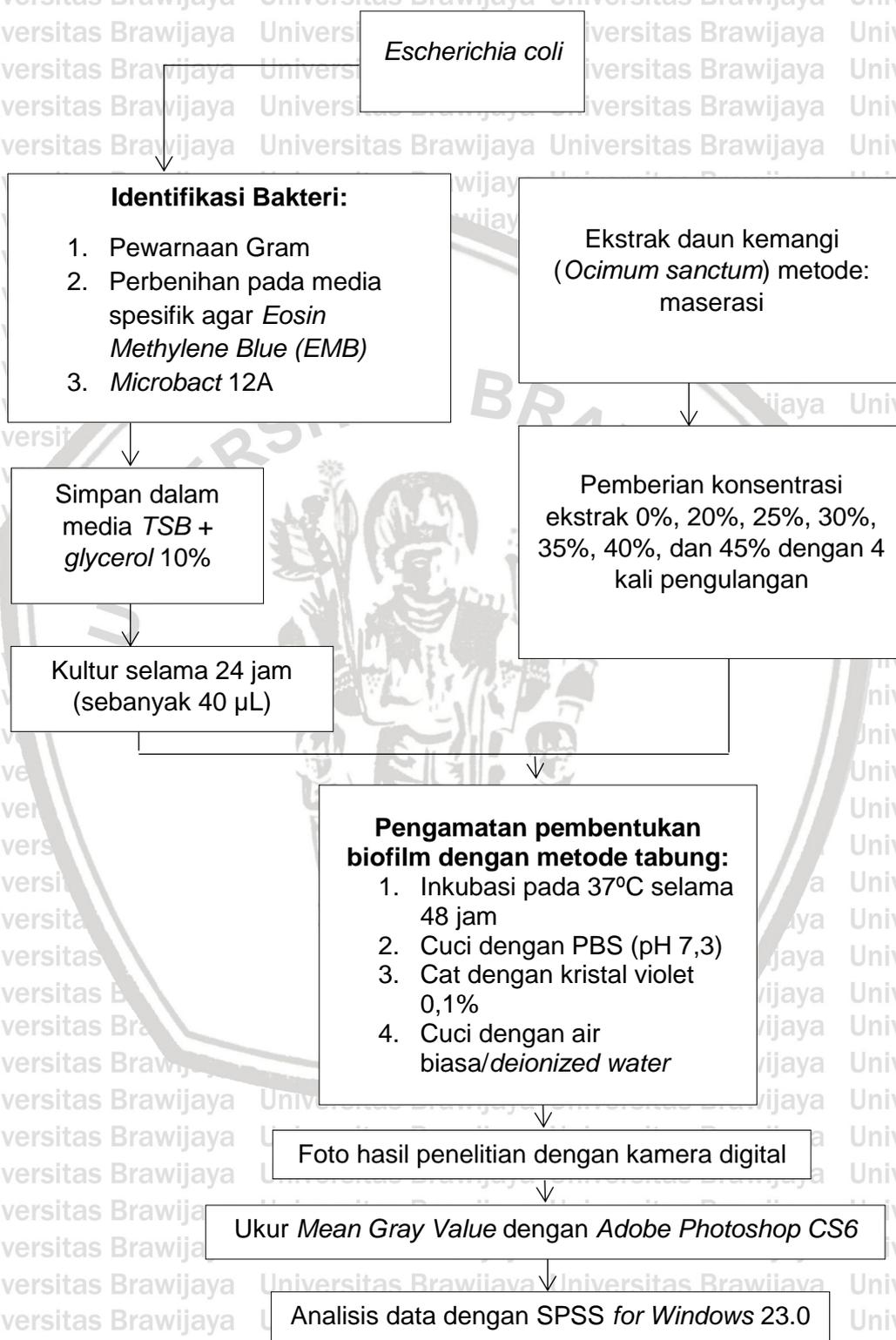
b. Namun, bila data tidak homogen atau tidak tersebar normal maka menggunakan metode *Spearman*.

5. Uji Regresi dilakukan untuk mengetahui pengaruh variabel independen (konsentrasi ekstrak daun kemangi) terhadap variabel dependen (intensitas warna pada tabung) setelah diketahui ada hubungan bermakna antara kedua variabel penelitian.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



#### 4.9 Rencana Operasional Penelitian



Gambar 4.1 Alur Kerja Penelitian



**BAB V****HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA****5.1 Hasil Penelitian****5.1.1 Hasil Ekstraksi Daun Kemangi (*Ocimum sanctum*)**

Metode yang digunakan untuk mendapatkan ekstrak dari daun kemangi (*Ocimum sanctum*) adalah teknik maserasi. Setelah dikeringkan, daun kemangi direndam dalam etanol 96% selama 2 x 24 jam dan sisa pelarut pada ekstrak dihilangkan dengan pengeringan menggunakan oven pada suhu 40° – 50°C hingga mencapai bobot konstan ekstrak.



**Gambar 5.1 Hasil Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum sanctum*)**

Keterangan: tanda panah menunjukkan cairan ekstrak daun kemangi berwarna hijau tua dan pekat.

**5.1.2 Hasil Identifikasi Bakteri**

Bakteri yang digunakan pada penelitian ini merupakan bakteri *Escherichia coli*. Dilakukan identifikasi ulang bakteri ini dengan metode pewarnaan Gram, penanaman pada media *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA), dan *Microbact*<sup>TM</sup>.

Pewarnaan Gram menunjukkan hasil berupa bakteri Gram negatif dengan bentuk batang. Pembenihan pada EMBA menunjukkan koloni bakteri dengan warna *green metallic sheen* yang dimiliki secara spesifik oleh bakteri *Escherichia coli*.

Pengujian dengan *Microbact*<sup>TM</sup> dilakukan untuk mendapatkan hasil yang lebih spesifik. Pada biakan bakteri *Escherichia coli* yang akan digunakan pada penelitian ini menunjukkan hasil 94,50% (gambar 5.4). Hasil ini memperkuat kesimpulan bahwa bakteri biakan yang diteliti merupakan bakteri *Escherichia coli*.



**Gambar 5.2 Hasil Pewarnaan Gram Bakteri *Escherichia coli***

Keterangan: tanda panah menunjukkan bakteri gram negatif berwarna merah dan berbentuk batang pada perbesaran 1000 kali.



**Gambar 5.3 Hasil Perbenihan Bakteri *Escherichia coli* pada media *Eosin Methylene Blue Agar (EMBA)***

Keterangan: Tanda panah menunjuk pada koloni *Escherichia coli* yang berwarna *metallic sheen* pada media EMBA

OXOID MICROBACT™ IDENTIFICATION KITS		MICROBACT™ GNB 12A/B/E, 24E																										
		GNB 12A / 12E										GNB 12B																
Oxidase	Motility	Nitrate	Lysine	Ornithine	H <sub>2</sub> S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	V-P	Citrate	TDA	Gelatin	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine		
			+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-														
4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1		
Sum / Suma / Somme / Somme / Somma / Sum / Summa / Soma / Σσπομα			7		7		6		0																			
Identification / Identificación / Identifikation / Identificazione / Identifizierung / Identificação / Tauzontoloniq		Escherichia coli 94,50%																										

**Gambar 5.4 Hasil Uji *Microbact*™ pada Bakteri *Escherichia coli***

Keterangan: tanda panah menunjukkan hasil uji bakteri *Escherichia coli* dengan *Microbact*™ 94,50%

### 5.1.3 Hasil Uji Hambat Pembentukan Biofilm

Uji pendahuluan dilakukan terlebih dahulu untuk menentukan konsentrasi ekstrak yang akan diteliti. Sebanyak 7 konsentrasi berbeda digunakan pada uji pendahuluan yaitu 0%; 3,125% ;6,25% ;12,5%; 25% ; 50%; dan 100%. Penelitian pendahuluan menunjukkan konsentrasi 25% dan 50% sudah tidak ditemukan adanya pembentukan cincin biofilm pada batas udara dengan cairan (*airfluid border*). Mengacu pada hasil uji pendahuluan tersebut, konsentrasi yang akan digunakan pada penelitian inti yaitu 0%; 20%; 25%; 30%; 35%; 40% dan 45%. Konsentrasi 0% merupakan kelompok kontrol yang menggunakan NaCl tanpa pemberian ekstrak daun kemangi (*Ocimum sanctum*).

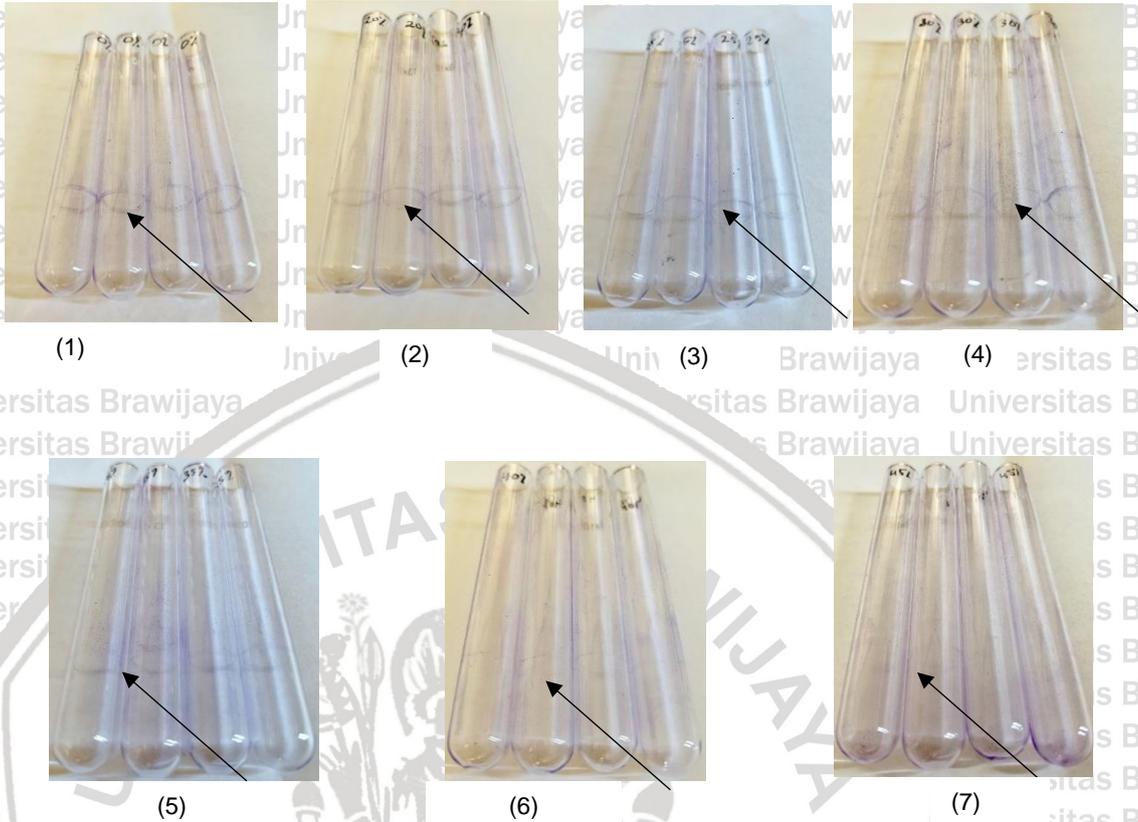
Pengamatan dilakukan terhadap Intensitas cincin yang terbentuk pada *airfluid border* yang menandakan terbentuknya *biofilm*. Setelah terbentuk, cincin *biofilm* difoto menggunakan kamera digital kemudian dilakukan kuantifikasi menggunakan aplikasi *Adobe Photoshop CS6* yang dinyatakan dalam skala 0 – 255. Pada tabung pengukuran *Mean Gray Value* (MGV) juga dilakukan pada

tabung kosong sebelum digunakan. Apabila *Mean Gray Value* pada kelompok yang mendapat perlakuan lebih kecil dari 10% dari *Mean Gray Value* tabung kosong yang masih baru, maka konsentrasi pada kelompok tersebut merupakan Kadar Hambat Biofilm Minimal (KHBM). Tabung kosong yang digunakan pada penelitian ini menunjukkan nilai *Mean Gray Value* sebesar 185,65. Kemudian nilai ini dibandingkan dengan nilai *Mean Gray Value* kelompok perlakuan seperti yang tertera pada Tabel 5.1, Gambar 5.5 dan 5.6

**Tabel 5.1 Hasil Pengukuran *Mean Gray Value* dengan Aplikasi Adobe Photoshop CS6**

Konsentrasi	Pengulangan				Mean ± SD
	I	II	III	IV	
0%	89,77	91,75	87,71	92,11	90,33 ± 2,03
20%	127,35	126,31	129,95	126,34	127,48 ± 1,71
25%	137,12	139,53	136,74	139,15	138,11 ± 1,43
30%	166,45	165,46	161,16	162,12	163,80 ± 2,55
35%	169,82	170,04	171,78	169,89	170,38 ± 0,94
40%	176,68	175,90	175,56	174,03	175,45 ± 1,11
45%	176,65	175,81	176,76	180,73	177,49 ± 2,20
Mean Gray Value	185,65				
Tabung Kosong					

Keterangan: Semakin kecil nilai *Mean Gray Value* mencerminkan biofilm yang terbentuk masih tebal. Sebaliknya, nilai *Mean Gray Value* yang tinggi berarti cincin biofilm sudah menipis. Kadar hambat biofilm minimal dicapai bila hasil rerata *Mean Gray Value* 10% di bawah *Mean Gray Value* tabung kosong, yaitu 167,086 (185,65 dikurangi 18,565). Dapat dilihat KHBM pada penelitian ini adalah pada konsentrasi 35%, di mana rerata *Mean Gray Value* 170,38.

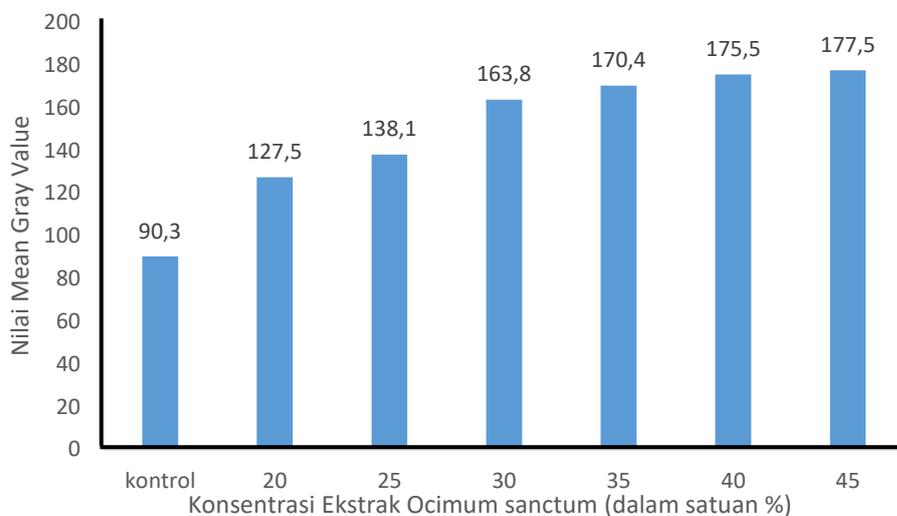


**Gambar 5.5 Hasil Uji Hambat Pembentukan Biofilm Pengulangan 4 Kali**

Keterangan: tanda panah menunjukkan bahwa terjadi penipisan cincin *biofilm* *Escherichia coli* seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak . *Biofilm* ditandai dengan cincin berwarna biru pada tabung. Pada penelitian, didapatkan tabung dengan pemberian konsentrasi 45% menghasilkan cincin biofilm paling tipis.

Keterangan gambar:

- (1) Tabung dengan konsentrasi ekstrak 0% (kontrol)
- (2) Tabung dengan konsentrasi ekstrak 20%
- (3) Tabung dengan konsentrasi ekstrak 25%
- (4) Tabung dengan konsentrasi ekstrak 30%
- (5) Tabung dengan konsentrasi ekstrak 35%
- (6) Tabung dengan konsentrasi ekstrak 40%
- (7) Tabung dengan konsentrasi ekstrak 45%



**Gambar 5.6 Grafik Hasil Pengukuran Mean Gray Value**

Keterangan : Peningkatan nilai *Mean Gray Value* berbanding lurus dengan peningkatan konsentrasi ekstrak *Ocimum sanctum*. Semakin tinggi Nilai MGV mengindikasikan cincin biofilm yang terbentuk semakin tipis

## 5.2 Analisis Data

Analisis hasil penelitian menggunakan aplikasi analisis statistik IBM SPSS

*Statistic* versi 23.0 untuk *Windows*. Langkah pertama adalah menguji normalitas dan homogenitas berdasarkan data yang diperoleh dari pengukuran hasil *Mean Gray Value*. Uji normalitas menggunakan metode uji *Shapiro Wilk* karena jumlah data yang kurang dari 50 dan uji *Oneway ANOVA* dengan pilihan homogenitas.

Dari hasil kedua uji tersebut, kemudian dilakukan uji komparasi dengan *Oneway ANOVA* untuk memastikan adanya perbedaan signifikan antara kelompok data.

Selanjutnya, data diuji dengan *Post Hoc Test multiple comparison test* metode *Tukey* untuk melihat signifikansi suatu kelompok data terhadap masing-masing kelompok data lainnya. Selanjutnya dilakukan uji korelasi *Pearson* untuk mengetahui korelasi antara peningkatan konsentrasi ekstrak daun kemangi

(*Ocimum sanctum*) terhadap *Mean Gray Value*. Kemudian dilakukan uji regresi

linear untuk mengetahui besarnya pengaruh konsentrasi ekstrak daun kemangi (*Ocimum sanctum*) terhadap Mean Gray Value.

### 5.2.1 Uji Normalitas dan Homogenitas

Suatu data dianggap tersebar normal jika hasil uji normalitas menunjukkan  $p > 0,05$  dan dianggap homogen jika hasil uji homogenitas menunjukkan  $p > 0,05$ . Hasil uji normalitas *Shapiro-Wilk* menunjukkan nilai  $p = 0,210$  (lampiran 3) maka disimpulkan bahwa data berdistribusi normal. Kemudian dari hasil uji homogenitas *Levene*, didapatkan nilai  $p = 0,141$  (lampiran 4) maka disimpulkan bahwa data bervarian homogen. Berdasarkan hasil ini dapat dilakukan uji statistik parametrik.

### 5.2.2 Hasil Uji Oneway ANOVA

Uji *Oneway ANOVA* dilakukan untuk mengetahui tingkat perbedaan antara rerata tiap kelompok dalam keseluruhan data yang telah didapatkan. Data dianggap memiliki perberbedaan signifikan apabila  $p < 0,05$ . Hasil uji menunjukkan nilai  $p = 0,000$  (Lampiran 5) maka dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan antara rerata tiap kelompok.

5.2.3 Uji Post Hoc

Tabel 5.2 Nilai Signifikan Kelompok terhadap Kelompok Lainnya pada Uji

Post Hoc

	0%	20%	25%	30%	35%	40%	45%
0%		0,254	0,342	0,014	0,030	0,000	0,000
20%	0,132		0,235	0,621	0,020	0,022	0,000
25%	0,236	0,231		0,389	0,242	0,130	0,000
30%	0,028	0,139	0,822		0,562	0,121	0,002
35%	0,003	0,000	0,211	0,074		0,055	0,673
40%	0,001	0,001	0,011	0,087	0,433		0,231
45%	0,000	0,000	0,000	0,004	0,078	0,433	

Tabel 5.3 Rangkuman Hasil Uji Post Hoc

	0%	20%	25%	30%	35%	40%	45%
0%		-	-	+	+	+	+
20%	-		-	-	+	+	+
25%	-	-		-	-	+	+
30%	+	-	-		-	-	+
35%	+	+	-	-		-	-
40%	+	+	+	-	-		-
45%	+	+	+	+	-	-	

Keterangan :

(+) = Signifikan

(-) = Tidak signifikan

Uji *Post Hoc Multiple Comparison* digunakan untuk mengetahui signifikansi masing-masing kelompok data satu dengan lainnya. Metode *Post Hoc* yang digunakan adalah uji *Tukey HSD*. Perbedaan dianggap signifikan jika nilai  $p < 0,05$  pada masing-masing kelompok data.

Kelompok data pertama adalah perlakuan tanpa pemberian ekstrak daun kemangi atau disebut kelompok kontrol dengan konsentrasi ekstrak 0%. Hasilnya adalah didapatkan perbedaan *Mean Gray Value* yang tidak signifikan terhadap



konsentrasi 20% dan 25% ( $p>0,05$ ). Pada konsentrasi 30%, 35%, 40%, dan 45% terdapat perbedaan yang signifikan ( $p<0,05$ ).

Kemudian hasil komparasi kelompok data kedua, yaitu perlakuan dengan konsentrasi ekstrak 20% didapatkan perbedaan *Mean Gray Value* yang tidak signifikan terhadap konsentrasi 0% (kontrol), 25%, dan 30% ( $p>0,05$ ). Pada konsentrasi 35%, 40%, dan 45% terdapat perbedaan yang signifikan ( $p<0,05$ ).

Selanjutnya pada kelompok data ketiga, yaitu konsentrasi ekstrak 25% didapatkan perbedaan *Mean Gray Value* yang tidak signifikan terhadap konsentrasi 0% (kontrol), 20%, 30%, dan 35% ( $p>0,05$ ) sedangkan pada konsentrasi 40% dan 45% terdapat perbedaan yang signifikan ( $p<0,05$ ). Pada kelompok data keempat, yaitu dengan konsentrasi ekstrak 30% didapatkan perbedaan *Mean Gray Value* yang tidak signifikan terhadap konsentrasi 20%, 25%, 30%, 35% dan 40% ( $p>0,05$ ). Pada konsentrasi 0% (kontrol) dan 45% terdapat perbedaan yang signifikan ( $p<0,05$ ). Kemudian pada kelompok data kelima, yaitu konsentrasi 35% didapatkan perbedaan *Mean Gray Value* yang tidak signifikan terhadap konsentrasi 25%, 30%, dan 40%. Pada konsentrasi 0% (kontrol), 20% dan 45% terdapat perbedaan yang signifikan ( $p<0,05$ ). Pada kelompok data keenam, yaitu konsentrasi 40% didapatkan perbedaan *Mean Gray Value* yang tidak signifikan terhadap konsentrasi 30%, 35%, dan 45% ( $p>0,05$ ). Pada konsentrasi 0% (kontrol), 20%, dan 25% terdapat perbedaan yang signifikan ( $p<0,05$ ). Dan pada kelompok data terakhir, yaitu konsentrasi ekstrak 45% didapatkan perbedaan *Mean Gray Value* yang signifikan terhadap konsentrasi 0% (kontrol), 20%, 25%, dan 30% ( $p<0,05$ ). Sehingga dapat ditarik kesimpulan bahwa antar kelompok data yang berdekatan tidak terdapat signifikansi yang cukup. Namun, pada kelompok

data dengan konsentrasi tertinggi yaitu 45% terdapat perbedaan nilai *Mean Gray Value* yang signifikan terhadap empat konsentrasi terendah (Lampiran 6).

#### 5.2.4 Uji Korelasi *Pearson*

Uji korelasi dilakukan untuk mengetahui keeratan dan bentuk hubungan antara dua variabel yang dinyatakan dengan koefisien korelasi. Hubungan signifikan ditunjukkan dengan  $p < 0,05$ , sedangkan nilai  $p > 0,05$  menunjukkan bahwa korelasi tidak signifikan.

Berdasarkan uji yang dilakukan, didapatkan hasil nilai  $p = 0,000$  dengan nilai korelasi 0,933 (Lampiran 7). Adapun klasifikasi nilai korelasi *Pearson* sebagai berikut (Sugiyono, 2009):

Nilai Korelasi 0 – 0,199 = sangat rendah

Nilai Korelasi 0,200 – 0,399 = rendah

Nilai Korelasi 0,400 – 0,599 = sedang

Nilai Korelasi 0,600 – 0,799 = kuat

Nilai Korelasi 0,800 – 1,000 = sangat kuat

Korelasi dapat bertanda positif dan negatif. Korelasi positif menunjukkan arah yang searah antar variabel. Sedangkan korelasi negatif menunjukkan arah yang berlawanan. Hasil uji korelasi *Pearson* menunjukkan hasil-hasil sebagai berikut:

1. Nilai  $p = 0,000$ , yang menandakan terdapat korelasi yang signifikan antara konsentrasi ekstrak daun kemangi dengan *Mean Gray Value*.
2. Nilai korelasi ( $r$ ) = 0,933, yang berarti korelasi antara konsentrasi ekstrak daun kemangi dengan *Mean Gray Value* atau ketebalan biofilm sangat kuat. Arah korelasi positif, sehingga disimpulkan semakin tinggi

konsentrasi ekstrak daun kemangi, semakin tinggi pula nilai *Mean Gray Value* yang menandakan semakin tipis cincin biofilm yang terbentuk.

### 5.2.5 Hasil Uji Regresi

Uji Regresi dilakukan untuk mengukur besarnya pengaruh variabel bebas terhadap variabel tergantung. Dimana rumus persamaan regresi linear sederhana

adalah:  $Y = a + bX$

Keterangan:

Y = Mean Gray Value

a = angka konstan dari unstandardized coefficients

b = angka koefisien regresi

X = Konsentrasi

Uji regresi yang dilakukan menghasilkan nilai  $a = 93,330$ ,  $b = 13,923$  (Lampiran 8).

Apabila data ini dimasukkan pada rumus  $Y = 93,330 + (13,923 \times 0,05)$ , maka hasilnya sebesar 94,02615. Berdasarkan nilai tersebut dapat disimpulkan bahwa

setiap penambahan konsentrasi ekstrak etanol daun kemangi sebanyak 5% akan

menaikkan nilai *Mean Gray Value* sebesar 94,02615. Nilai *R square* dari uji regresi

didapatkan sebesar 0,871 yang berarti bahwa terdapat kemungkinan sebesar

87,1% hambatan pembentukan biofilm yang dipengaruhi oleh pemberian ekstrak

daun kemangi dan sisanya dipengaruhi oleh *confounding factor*

## BAB VI PEMBAHASAN

Penelitian pendahuluan menunjukkan bahwa secara visual, konsentrasi 25% dan 50% sudah mampu menghambat pembentukan biofilm bakteri *Escherichia coli*. Hasil penelitian inti menunjukkan bahwa konsentrasi ekstrak yang secara visual mampu menghambat pembentukan biofilm *E.coli* adalah konsentrasi 45%. Hal ini ditandai dengan tidak terbentuknya cincin pada area *airfluid border* pada tabung.

Pengamatan pada konsentrasi 0% hingga 45% menunjukkan kenaikan rata-rata *Mean Gray Value* yang berbanding lurus dengan kenaikan konsentrasi ekstrak etanol daun kemangi. Pada penelitian ini didapatkan KHBM tercapai pada konsentrasi 35%. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) dapat menghambat pertumbuhan biofilm bakteri *Escherichia coli*. Pada penelitian ini terdapat peningkatan nilai *Mean Gray Value* yang berbanding lurus dengan peningkatan konsentrasi ekstrak etanol daun kemangi.

Penelitian ini selaras dengan penelitian yang dilakukan oleh Lalitya (2017) mengenai efek ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) terhadap pembentukan biofilm bakteri *Bulkholderia cepacea* menggunakan metode tabung.

Penelitian tersebut menemukan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) maka ketebalan cincin yang terbentuk pada dinding tabung semakin tipis. Kadar Hambat Biofilm Minimal (KHBM) dari ekstrak daun kemangi tersebut sebesar 30%, sedangkan pada penelitian didapatkan KHBM untuk *Escherichia coli* sebesar 35%. Hal ini dapat disebabkan karena

perbedaan bakteri dan lama simpan ekstrak daun kemangi yang digunakan pada penelitian.

Penelitian yang dilakukan oleh Akter *et al.* (2015) membandingkan dua ekstrak segar / *raw extract* tanaman yang dapat menghambat pertumbuhan biofilm pada bakteri *Escherichia coli*. Bakteri *Escherichia coli* dikultur pada media pertumbuhan M63 dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 6 jam. Kemudian 200 µl inokula dengan kepadatan koloni 10<sup>4</sup>CFU/mL dimasukkan pada 96 *microtiter plate* lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam pada kondisi statis. Setelah itu dimasukkan ekstrak etanol bawang (*Allium cepa*) dan daun kemangi (*Ocimum sanctum*) dengan konsentrasi 0%, 10%, 20%, 30%, dan 40%. Hasilnya, ekstrak daun kemangi (*Ocimum sanctum*) memiliki KHBM pada konsentrasi 30%, sedangkan ekstrak *Allium cepa* memiliki KHBM pada konsentrasi 40%. Hasil dari penelitian ini menunjukkan efektifitas ekstrak daun kemangi dalam menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* sangat baik. Perbedaan konsentrasi KHBM dapat disebabkan oleh perbedaan metode dan perbedaan dari kepadatan koloni pembentuk biofilm *E.coli*

Rajaraman *et al.* (2015) meneliti tentang efek *coating* / pelapisan ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) pada permukaan *biomaterial* dalam mencegah adhesi bakteri dan pertumbuhan biofilm. Pada penelitian ini digunakan 3 bakteri berbeda, yaitu *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Sumuran *Tissue Culture Polystyrene* (TCPS) digunakan sebagai permukaan substrat diisi dengan 500µl ekstrak *Ocimum sanctum* dan didiamkan selama 10 menit dalam suhu 37°C untuk meresap ke permukaan. Kemudian 1 ml suspensi bakteri dengan kepadatan 10<sup>4</sup> CFU/mL dimasukkan ke dalam sumuran dan diinkubasi selama 24 jam. Gambar diambil

dengan mikroskop phase contrast lalu jumlah bakteri adherent per  $\text{cm}^2$  dihitung dengan software ImageJ®. Jumlah bakteri *Escherichia coli* pada permukaan kontrol sebanyak  $14 \times 10^6/\text{cm}^2$  sedangkan pada permukaan yang terlapsi ekstrak sebanyak  $4 \times 10^5 /\text{cm}^2$ . Lalu jumlah bakteri *Staphylococcus aureus* pada permukaan kontrol sebanyak  $14 \times 10^6/\text{cm}^2$  sedangkan pada permukaan yang terlapsi ekstrak sebanyak  $5,6 \times 10^5/\text{cm}^2$ . Jumlah bakteri *Pseudomonas aeruginosa* pada permukaan kontrol sebanyak  $14 \times 10^6/\text{cm}^2$  sedangkan pada permukaan yang terlapsi ekstrak sebanyak  $6 \times 10^5 / \text{cm}^2$ . Data dianalisis dengan Tukey's HSD *post-hoc test* dan nilai  $p < 0,05$  yang berarti signifikan untuk ketiga bakteri yang digunakan pada penelitian ini dan membuktikan efektifitas dari ekstrak daun kemangi dalam menghambat pembentukan biofilm dengan mencegah adhesi bakteri. Dari hasil penelitian yang dilakukan Rajaraman *et al.* ini menunjukkan potensi ekstrak daun kemangi sebagai antibiofilm pada permukaan, misalnya digunakan pada implan.

Bhatwalkar *et al.* (2019) meneliti efek ekstrak bawang putih (*Allium sativum*) sebagai penghambat pembentukan biofilm *E.coli.* bakteri dengan kepadatan koloni  $10^6\text{CFU/mL}$  digunakan pada penelitian ini. Digunakan 4 jenis konsentrasi berbeda yaitu 0%, 20%, 30% dan 40%. Setelah terbentuk biofilm, dilakukan pengukuran jumlah protein dan karbohidrat. Hasilnya ekstrak bawang putih dengan konsentrasi 40% menurunkan pembentukan biofilm *E.coli* paling signifikan dengan cara mengubah komposisi biofilm dan menurunkan jumlah polisakarida dalam biofilm. Dapat diambil kesimpulan bahwa ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) lebih baik dalam menghambat biofilm *E.coli* jika dibandingkan dengan ekstrak bawang putih (*Allium sativum*).

Senyawa aktif terbesar dalam daun kemangi (*Ocimum sanctum*) adalah eugenol. Eugenol pada konsentrasi 0,005% menghambat pembentukan biofilm

*E.coli* >50% dibandingkan dengan kelompok kontrol (Kim *et al.*, 2016). Hal ini dikarenakan eugenol memiliki rantai C-4 alkana dan memiliki grup hidroksil yang diperlukan sebagai penghambat biofilm. Eugenol dapat menghambat pertumbuhan fimbria *E.coli* dengan menghambat ekspresi gen curli fimbriae (csgABDFG). Dengan berkurangnya jumlah fimbria pada *E.coli*, maka adhesi bakteri akan terganggu sehingga menghambat terbentuknya biofilm. Eugenol juga memengaruhi ekspresi gen *quorum sensing* (*luxS*, *luxR* dan *tnaA*) sehingga komunikasi antar bakteri juga terhambat. Selain itu, eugenol juga menurunkan ekspresi gen *ler* (LEE-encoded regulator) yang berfungsi untuk melekat dan menimbulkan lesi pada sel epitel dari inang. Ekstrak daun kemangi juga mengandung quercetin yaitu senyawa flavonoid yang terdapat pada daun kemangi. Quercetin menghambat C6-Acylhomoserine Lactone (AHL). C6-AHL memiliki peran sebagai molekul pembawa pesan pada mekanisme *quorum sensing E.coli* sehingga dengan adanya senyawa quercetin ini, pertumbuhan biofilm *E.coli* terhambat karena adanya gangguan komunikasi bakteri. (Erdonmez *et al.*, 2018)

Keterbatasan pada penelitian ini adalah pengamatan yang hanya dilakukan setelah masa inkubasi selesai (48 jam), tidak dilakukan sepanjang waktu dan secara *real time*. Oleh karena itu belum dapat dilihat dengan detail proses pembentukan biofilm secara langsung. Kemudian pada penelitian ini juga belum diketahui secara spesifik zat apa yang menghambat pertumbuhan biofilm *E. coli* secara spesifik. Kemudian hasil dari ekstrak yang berupa larutan kental dan pekat memiliki partikel ekstrak yang berukuran besar sehingga lebih mudah menempel

pada dinding tabung. Hal ini menyebabkan partikel ekstrak menyerap cat kristal violet dan menyulitkan pengamatan secara visual, sehingga perlu dieksplorasi kembali metode ekstraksi untuk daun kemangi yang digunakan untuk uji biofilm ke depannya. Keterbatasan lain adalah belum diketahuinya efek lama penyimpanan ekstrak terhadap kandungan dan efektivitas zat aktif dalam ekstrak etanol daun kemangi.





## BAB VII

## PENUTUP

### 7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil pemberian ekstrak daun kemangi (*Ocimum sanctum*) terhadap pembentukan biofilm *Escherichia coli*, dapat disimpulkan bahwa :

1. Ekstrak daun kemangi (*Ocimum sanctum*) dapat menghambat pembentukan biofilm *Escherichia coli* secara *in vitro*.
2. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun kemangi (*Ocimum sanctum*), semakin besar daya hambat pembentukan biofilm *Escherichia coli* secara *in vitro*.
3. Kadar Hambat Biofilm Minimum (KHBM) dari ekstrak daun kemangi (*Ocimum sanctum*) terhadap pembentukan biofilm *Escherichia coli* secara *in vitro* adalah pada konsentrasi 35%

### 7.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan saya menyarankan hal-hal sebagai berikut:

1. Penelitian lebih lanjut mengenai jenis ekstraksi untuk memperoleh zat aktif murni dari daun kemangi (*Ocimum sanctum*) untuk menghambat pembentukan biofilm *Escherichia coli*.
2. Penelitian lebih lanjut mengenai efek lama simpan ekstrak terhadap efektivitas ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) sebagai penghambat biofilm *Escherichia coli*.

3. Penelitian lebih lanjut mengenai dosis efektif daun kemangi (*Ocimum sanctum*) sebagai penghambat pembentukan biofilm tanpa menimbulkan efek toksik.
4. Penelitian lebih lanjut mengenai uji toksisitas ekstrak daun kemangi (*Ocimum sanctum*).
5. Potensi untuk mengembangkan penelitian yang menggunakan ekstrak daun kemangi (*Ocimum sanctum*) sebagai penghambat pembentukan biofilm *Escherichia coli* secara *in vivo*.



## DAFTAR PUSTAKA

Allen, R.C., McNally, L., Popat, R. and Brown, S.P., Quorum sensing protects bacterial co-operation from exploitation by cheats. *The ISME Journal*, 2016. 10(7): 1706.

Agarwal, P., Nagesh, L., Murlikhrisnan, Evaluation of the antimicrobial activity of various concentrations of Tulsi (*Ocimum sanctum*) extract against *Streptococcus mutans*: An in vitro study. *Indian Journal of Dental Research*, 2010, 21(3): 357 – 359

Akter, M., Begum, F.L., Mohsina K., Effects of Azadirachta indica, Allium cepa and Ocimum tenuiflorum extracts on Biofilm Inhibition and Degradation. *Advances in Environmental Biology*, 2015, 9(14): 112 – 116

Alyamani, E., Khiyami, A.L., Booq, R., Majrashi, R.M., Bahwerth, F., and Rechkina, E., The occurrence of ESBL-producing Escherichia coli carrying aminoglycoside resistance genes in urinary tract infections in Saudi Arabia. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 2017, 16(1): 2-13

Aparna, M.S., Yadav, S., Biofilms: microbes and disease. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 2008, 12(6): 526-530.

Azfour, H.Z., Anti-Quorum Sensing Natural Compounds. *Journal of Microscopy Ultrastructure*, 2008, 2(6):1-10

Bachir, G., Abouni, B., 2015. The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs. Microbiology Book Series, Spain

Beloin, C., Roux, A. and Ghigo, J.M., 2008. Escherichia coli biofilms. In *Bacterial Biofilms*, Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 249-289.

Beitelshees, M., Hill, A., Jones, C.H. and Pfeifer, B.A., Phenotypic Variation during Biofilm Formation: Implications for Anti-Biofilm Therapeutic Design. *Materials*, 2018, 11(7): 1086.

Berne, C., Ducret, A., Hardy, G.G. and Brun, Y.V., Adhesins involved in attachment to abiotic surfaces by Gram-negative bacteria. *Microbiology spectrum*, 2015, 3(4): 23-34

Bhatt, K.J., Ocimum Sanctum: The Indian Medicinal plant. *International Journal of Chemtech Applications*, 2012, 3(1): 53-57.

Bhasin, M., Ocimum-Taxonomy, Medicinal potentialities and economic value of essential oil. *Journal of Biosphere*, 2016, 1: 48-50.

Bhatwalkar, S.B., Gound, S.S., Mondal, R., Srivastava, R.K. and Anupam, R., Anti-biofilm and Antibacterial Activity of Allium sativum Against Drug Resistant Shiga-Toxin Producing Escherichia coli (STEC) Isolates from Patient Samples and Food Sources. *Indian Journal of Microbiology*, 2019, 59(2): 171-179.

Brooks GF, Butel JS, Ornston LN, 2008, Jawetz, Melnick & Adelberg Mikrobiologi Kedokteran (terj.), Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta : pp.627-629.

Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA, 2013. *Jawetz Melnick & Adelbergs Medical Microbiology 26 Ed.* McGraw Hill Professional.

Cahyani, D.P., 2013. *Pengaruh Ekstrak Etanol Kulit Jeruk Nipis (Citrus aurantifolia) Terhadap Perbaikan Sel Epitel Gingiva Tikus Putih Galur Wistar (Rattus Novvergicus) yang diinduksi Actinobacillus actinomycetemcomitans.* Tugas Akhir. Tidak dipublikasikan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Chen, X., Schauder, S., Potier, N., Van Dorselaer, A., Pelczer, I., Bassler, B.L. and Hughson, F.M., Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature*, 2002, 415(6): 545.

Christophe, B., Sandra, D.R., Jaione, V., Nicolas, C.L., Identification of Commensal *Escherichia coli* Genes Involved in Biofilm Resistance to Pathogen Colonization. *PLoS ONE, Public Library of Science*, 2013, 8 (5): 616 – 628.

Cushnie, T.P. & Lamb, A.J., Antimicrobial activity of flavonoids, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2005, 26(2): 343–356.

Dahlan, M.S., 2009. *Statistik untuk Kedokteran Kesehatan.* Jakarta: Salemba Medika.

Danasekaran, R., Mani, G. and Annadurai, K., Prevention of healthcare-associated infections: protecting patients, saving lives. *International Journal of Community Medicine and Public Health*, 2017, 1(1): 67-68.

Donlan, R.M., 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases*, 8(9), p.881.

Erdonmez, D., Kenar, N., Erkan, T., Screening for Anti-Quorum Sensing and Anti-Biofilm Activity in *Viscum album* Extracts and its Biochemical Composition. *Trakaya University Journal of Natural Sciences*, 2018, 19(2): 175 – 186.

Flannelly, L.T., Flannelly, K.J. and Jankowski, K.R., Independent, dependent, and other variables in healthcare and chaplaincy research. *Journal of health care chaplaincy*, 2014, 20(4): 161-170.

Flemming, H.C. and Wingender, J., The Biofilm Matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8(9): 623.

Forbes, B.A., Sahm, D.F. and Weissfeld, A.S., 2007. Study guide for Bailey & Scott's diagnostic microbiology. USA: Mosby.

Garry, L., Alkawareek, M.Y. and Gilmore, B.F., The in vitro susceptibility of biofilm forming medical device related pathogens to conventional antibiotics. *Dataset Papers in Science*, 2014, 2(3): 11-18.

Goldman, E. and Green, L.H., 2015. Practical handbook of microbiology. CRC press. Tersedia dari URL <https://www.taylorfrancis.com/books/9781420009330>. Diakses pada tanggal 26 November 2018

Harijani, N., Rahadi, U.S., Nazar, D.S., Isolasi *Escherichia coli* pada Daging yang diperoleh dari Beberapa Pasar Tradisional di Surabaya. *Veterinaria Medika*, 2013, 6: 39-43

Harnani, E.D., Da'i, M. and Munawaroh, R., 2010. Perbandingan Kadar Eugenol Minyak Atsiri Bunga Cengkeh (*Syzygium aromaticum* (L.) Meer. & perry) dari Maluku, Sumatera, Sulawesi, dan Jawa dengan Metode GC-MS.

Irie, Y. and Parsek, M.R., 2008. Quorum sensing and microbial biofilms. In *Bacterial biofilms*. Springer, Berlin, Heidelberg. pp. 67-84

Jacobsen, S.M., Stickler, D.J., Mobley, H.L.T. and Shirliff, M.E., Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clinical microbiology reviews*, 2008, 21(1): 26-59.

Jamal, M., Tasneem, U., Hussain, T. and Andleeb, S., Bacterial biofilm: its composition, formation and role in human infections. *RRJMB*, 2015, 4(2): 1-14.

Kaplan, J.Á., Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *Journal of Dental Research*, 2010, 89(3): 205-218.

Kart, D., Kustimur, A.S., Sağiroğlu, M. and Kalkanlı, A., Evaluation of antimicrobial durability and anti-biofilm effects in urinary catheters against *Escherichia coli* clinical isolates and reference strains. *Balkan Medical Journal*, 2017, 34(6): 546-552.

Khan, H.A., Ahmad, A. and Mehboob, R., Nosocomial infections and their control strategies. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2015, 5(7): 509-514.

Khan, V., Najmi, A.K., Akhtar, M., Aqil, M., Mujeeb, M. and Pillai, K.K., A pharmacological appraisal of medicinal plants with antidiabetic potential. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 2012, 4(1): 27.

Kim, Y.G., Lee, J.H., Gwon, G., Kim, S.I., Park, J.G. and Lee, J., Essential oils and eugenols inhibit biofilm formation and the virulence of *Escherichia coli* O157: H7. *Scientific reports*, 2016, 6(1): 363-377.

Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M. and Hultgren, S.J., Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2013, 3(4): 103-106.

Kumar S and Pandey AK., Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, 2013, 4(1): 2-16.

Lalitya, Wandira. 2017. Efek Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum Sanctum*) Sebagai Penghambat Pembentukan Biofilm *Burkholderia Cepacia* Secara *In Vitro*. Sarjana thesis, Universitas Brawijaya.

Lasaro, M.A., Salinger, N., Zhang, J., Wang, Y., Zhong, Z., Goulian, M. and Zhu, J., F1C fimbriae play an important role in biofilm formation and intestinal colonization by the *Escherichia coli* commensal strain Nissle 1917. *Applied Environmental Microbiology Journal*, 2009, 75(1): 246-251.

Leo, J.C., Grin, I. and Linke, D., Type V secretion: mechanism (s) of autotransport through the bacterial outer membrane. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2012, 367(1592): 1088-1101.

Macia, M.D., Rojo-Moliner, E. and Oliver, A., Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. *Clinical Microbiology and Infection*, 2014, 20(10): 981-990.

Malav, P., Pandey, A., Bhatt, K.C., Krishnan, S.G. and Bisht, I.S., Morphological variability in holy basil (*Ocimum tenuiflorum* L.) from India. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2015, 62(8): 1245-1256.

Milojević, L., Velebit, B., Baltić, T., Nikolić, A., Mitrović, R. and Đorđević, V., Characterization of biofilms produced by *Escherichia coli* O157 isolated from cattle hides. *Earth and Environmental Science*, 2017, 85(1): p 120-126).

Mohawk, K.L. and O'Brien, A.D., Mouse models of *Escherichia coli* O157: H7 infection and shiga toxin injection. *BioMed Research International*, 2011, 5(3): 33-43.

Neelma, A., Abid, R., Anam, R., Ashraf, M., Sarwar, A., Morpho-biochemical Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacterial Isolates from Chicken Eggs in District Faisalabad. *International Journal of Antibiotic Research*, 2018, 1(1): 2 – 9.

Nilsson, A., Berg, O., Aspevall O, Kahlmeter, G., Andersson, D., Biological cost and mechanism of fosfomycin resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 2003, 47(2): 2850-2858

Noorhamdani, Santoso, S., Sumarno, Dzen, S.M., Roekistiningsih, Winarsih S., 2017. *Bakteriologi Medik, Edisi Ketiga*. Malang: Laboratorium Mikrobiologi FKUB.

Notobroto, B.H., 2005. *Penelitian Eksperimental dalam Materi Praktikum Teknik Sampling dan Penghitungan Besar Sampel Angkatan III*. Surabaya: Lembaga Penelitian Universitas Airlangga.

Nugraheni, R. and Winarni, S., Infeksi nosokomial di RSUD setjonegoro kabupaten wonosobo. *Media Kesehatan Masyarakat Indonesia*, 2012,11(1): 94-100.

Okada, M., Sato, I., Cho, S.J., Iwata, H., Nishio, T., Dubnau, D. and Sakagami, Y., Structure of the *Bacillus subtilis* quorum-sensing peptide pheromone ComX. *Nature Chemical Biology*, 2005, 1(1): 23.

Panche, A.N., Diwan, A.D. and Chandra, S.R., Flavonoids: an overview. *Journal of nutritional science*, 2016, 5(3): 39-65.

Pandey, G., Sharma, M., Pharmacological activities of *Ocimum sanctum* (Tulsi): A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 2014,61(3): 21-32.

Papenfort, K. and Bassler, B.L., Quorum sensing signal–response systems in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*,2016, 14(9): 576.

Pattanayak, P., Behera, P., Das, D. and Panda, S.K., *Ocimum sanctum* Linn. A reservoir plant for therapeutic applications: An overview. *Pharmacognosy reviews*, 2010, 4(7): 95.

Pereira, C.S., Thompson, J.A. and Xavier, K.B., AI-2-mediated signalling in bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 2013, 37(2): 156-181.

Praharaj, A.K. and Kumar, S., Differences in vancomycin MIC among MRSA isolates by agar dilution and E test method. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 2012,30(4): 453.

Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E., & Sintim, H. O. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Medicinal Chemistry*, 2015 7(4): 493–512

Rahayu, S.A. and Gumilar, M.M.H., Uji cemaran air minum masyarakat sekitar Margahayu Raya Bandung dengan identifikasi bakteri *Escherichia coli*. *Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 2017, 4(2): 50-56.

Rajaraman, S., Guruprakash, S., Subashini, R., *Ocimum sanctum* Extract Coating on Biomaterial Surfaces to Prevent Bacterial Adhesion and Biofilm Growth. *Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 2015, 8(3): 230 – 232

Rauha, J.P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kähkönen, M., Kujala, T., Pihlaja, K., Vuorela, H. and Vuorela, P., Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 2000, 56(1): 3-12.

Rezzonico, F., Smits, T.H. and Duffy, B., Detection of AI-2 receptors in genomes of Enterobacteriaceae suggests a role of type-2 quorum sensing in closed ecosystems. *International Journal of Applied Microbiology*,2012, 12(5): 6645-6665.

Ruchi, T., Sujata, B. and Anuradha, D., Comparison of phenotypic methods for the detection of biofilm production in uro-pathogens in a tertiary care hospital in India.

*International Journal of Currative Microbiology Applied Science*, 2015, 4(9): 840-49.

Rutherford, S.T. and Bassler, B.L., Bacterial quorum sensing: its role in virulence and possibilities for its control. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2012, 2(11):124-127.

Saeed, S. and Tariq, P., In vitro antibacterial activity of clove against Gram negative bacteria. *Pakistan Journal of Botany*, 2008, 40(5): 2157-2160.

Saleem, S., Ullah, N. and Mirza, B., In vitro assessment of antioxidant potential and determination of polyphenolic compounds of *Hedera nepalensis* K. Koch. *Arabian Journal of Chemistry*, 10(2): 3699-S706.

Samal, S. and Das, P.K., Microbial Biofilms: Pathogenicity and Treatment Strategies. *Pharma Tutor Journal and Review*, 2018, 6(1):16-22.

Simoes, M., Ferreira, C., Pereira, A.M., and Melo, L.F., Advances in industrial biofilm control with micro-nanotechnology. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 2010, 2(2)845-854.

Siva, M., Shanmugam, K.R., Shanmugam, B., Venkata, S.G., Ravi, S., Sathyavelu, R.K. and Mallikarjuna, K., *Ocimum sanctum*: A review on the pharmacological properties. *International Journal of Basic Clinical Pharmacology*, 2016, 5(2): 558-65.

Slawa, S., Khalek, A.E., Temawy, E.A., Gammal, M.N., Biofilm Formation by *E. Coli* Causing Catheter Associated Urinary Track Infection (CAUTI) in Assiut University Hospital. *Egyptian Journal of Medical Microbiology*, 2015, 22(4): 101-103

Sperandio, V., SdiA sensing of acyl-homoserine lactones by enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) serotype O157: H7 in the bovine rumen. *IJCM*, 2010, 1(6): 432-435.

Sudarmadji, S., Haryono, B.S., 2003. *Analisa Bahan Makanan dan Pertanian*. Yogyakarta: Liberty.

Sugiyono. 2009. *Metode Penelitian Kuantitatif Kualitatif dan R&D*. Bandung: Alfabeta.

Tenailon, O., Skurnik, D., Picard, B. and Denamur, E., The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8(3): 207.

Thairu, Y., Nasir, I.A. and Usman, Y., Laboratory perspective of gram staining and its significance in investigations of infectious diseases. *Sub-Saharan African Journal of Medicine*, 2014, 1(4): 168.

Thompson, J.A., Oliveira, R.A., Djukovic, A., Ubeda, C. and Xavier, K.B., Manipulation of the quorum sensing signal AI-2 affects the antibiotic-treated gut microbiota. *Cell reports*, 2015, 10(11): 1861-1871.

Tsou, L.K., Lara-Tejero, M., RoseFigura, J., Zhang, Z.J., Wang, Y.C., Yount, J.S., Lefebre, M., Dossa, P.D., Kato, J., Guan, F. and Lam, W., Antibacterial flavonoids from medicinal plants covalently inactivate type III protein secretion substrates. *Journal of the American Chemical Society*, 2016, 138(7): 209-218.

Van Elsas, J.D., Semenov, A.V., Costa, R. and Trevors, J.T., Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. *The ISME journal*, 2011, 5(2): 173.

Shasany, A.K., The Holy basil (*Ocimum sanctum* L.) and its genome. *Indian Journal of History Science*, 2016, 51: 343-350.

Sutherland, I.W., Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Journal of Microbiology*, 2001, 147(1): 3-9.

Wang, L., Li, J., March, J.C., Valdes, J.J. and Bentley, W.E., luxS-dependent gene regulation in *Escherichia coli* K-12 revealed by genomic expression profiling. *Journal of Bacteriology*, 2001, 187(24): 8350-8360.

Wang, T.Y., Li, Q. and Bi, K.S., Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2018, 13(1): 12-23.

Wu, E.L., Fleming, P.J., Yeom, M.S., Widmalm, G., Klauda, J.B., Fleming, K.G. and Im, W., *E. coli* outer membrane and interactions with OmpLA. *Biophysical Journal*, 2014, 106(11): 2493-2502.

Wu, T., Zang, X., He, M., Pan, S. and Xu, X., Structure-activity relationship of flavonoids on their anti-*Escherichia coli* activity and inhibition of DNA gyrase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(34): 8185-8190.

Xiao, J., Klein, M.I., Falsetta, M.L., Lu, B., Delahunty, C.M., Yates III, J.R., Heydorn, A. and Koo, H., The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm. *PLoS Pathogens*, 2012, 8(4): 126-129.

