

**UJI POTENSI EKSTRAK ETANOL DAUN KELOR (*Moringa Oleifera*)**

**SEBAGAI PENGHAMBAT PEMBENTUKAN BIOFILM *Pseudomonas***

***aeruginosa* SECARA *IN VITRO***

**TUGAS AKHIR**

**Untuk Memenuhi Persyaratan**

**Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran**



**Oleh :**

**Adinda Putri Nadhirah**

**NIM 155070100111006**

**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN**

**FAKULTAS KEDOKTERAN**

**UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**MALANG**

**2019**

<b>DAFTAR ISI</b>		
JUDUL .....		i
HALAMAN PENGESAHAN .....		ii
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN .....		iii
KATA PENGANTAR .....		iv
ABSTRAK .....		vi
ABSTRACT .....		vii
DAFTAR ISI .....		viii
DAFTAR TABEL .....		xii
DAFTAR GAMBAR .....		xiii
DAFTAR LAMPIRAN .....		xiv
DAFTAR SINGKATAN .....		xv
<b>BAB 1      PENDAHULUAN .....</b>		<b>1</b>
1.1      Latar Belakang .....		1
1.2      Rumusan Masalah .....		2
1.3      Tujuan Penelitian .....		3
1.3.1      Tujuan Umum .....		3
1.3.2      Tujuan Khusus .....		3
1.4      Manfaat Penelitian .....		3
1.4.1      Manfaat Akademis .....		3
1.4.2      Manfaat Praktis .....		3
<b>BAB 2      TINJAUAN PUSTAKA .....</b>		<b>4</b>
2.1      Pseudomonas Aeruginosa .....		4
2.1.1      Taksonomi .....		4





2.1.2	Morfologi	5
2.2	Biofilm	6
2.2.1	Mekanisme Pembentukan Biofilm	7
2.2.2	Struktur Biofilm	8
2.2.3	Fungsi dan Peranan terhadap Resistensi Bakteri	9
2.2.4	Pemeriksaan Biofilm	10
2.2.5	Strategi intervensi terhadap Biofilm	10
2.3	Daun Kelor	11
2.3.1	Taksonomi	11
2.3.2	Morfologi	12
2.3.3	Kandungan Daun Kelor	13
2.3.4	Manfaat Tanaman Kelor	14
2.4	Metode Ekstraksi	14
<b>BAB 3</b>	<b>KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN</b>	<b>17</b>
3.1	Kerangka Konsep	17
3.2	Hipotesis Penelitian	19
<b>BAB 4</b>	<b>METODE PENELITIAN</b>	<b>20</b>
4.1	Rancangan Penelitian	20
4.2	Populasi dan Sampel	20
4.3	Variabel Penelitian	21
4.3.1	Variabel Bebas	21
4.3.2	Variabel Tergantung	21
4.4	Lokasi dan Waktu penelitian	21
4.5	Alat dan Bahan	21
4.5.1	Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Daun Kelor	21



4.5.2	Alat dan Bahan Identifikasi Bakteri.....	21
4.5.3	Alat dan Bahan Deteksi Biofilm .....	22
4.6	Definisi Operasional .....	22
4.7	Prosedur Penelitian.....	23
4.7.1	Persiapan daun kelor.....	23
4.7.1.1	Ekstraksi dan Evaporasi.....	23
4.7.2	Persiapan Biofilm Pseudomonas aeruginosa.....	23
4.7.2.1	Pemeriksaan Mikroskopis.....	23
4.7.2.2	Pewarnaan Gram.....	24
4.7.2.3	Perbenihan pada media Muller Hilton Broth.....	24
4.7.2.4	Uji Biokimia.....	24
4.7.2.5	Pembuatan perbenihan cair bakteri.....	26
4.7.2.6	Uji Deteksi Pembentukan Biofilm.....	26
4.7.3	Uji Hambat Pembentukan Biofilm Pseudomonas aeruginosa.....	26
4.8	Analisa Data .....	28
4.9	Rancangan Operasional Penelitian .....	29
<b>BAB 5</b>	<b>HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA.....</b>	<b>30</b>
5.1	Hasil Penelitian.....	29
5.1.1	Hasil Ekstraksi Daun Kelor .....	29
5.1.2	Hasil Identifikasi Bakteri .....	29
5.1.3	Hasil Uji hambat pembentukan Biofilm.....	31
5.2	Analisis Data.....	33
5.2.1	Uji Normalitas Data.....	33
5.2.2	Uji Kruskal Wallis.....	34
5.2.3	Uji Mann Whitney .....	35



5.2.4 Uji Spearman .....	37
<b>BAB 6 PEMBAHASAN .....</b>	<b>38</b>
<b>BAB 7 PENUTUP .....</b>	<b>42</b>
7.1 Kesimpulan .....	42
7.2 Saran .....	42
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>43</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>46</b>



## HALAMAN PENGESAHAN

## TUGAS AKHIR

UJI POTENSI EKSTRAK ETANOL DAUN KELOR (*Moringa oleifera*)  
SEBAGAI PENGHAMBAT PEMBENTUKAN BIOFILM  
*Pseudomonas aeruginosa* SECARA IN VITRO

Oleh :

Adinda Putri Nadhirah  
155070100111006

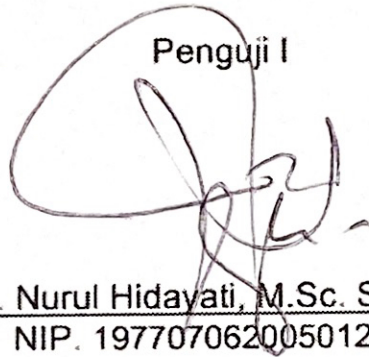
Telah diuji pada

Hari : Rabu

Tanggal : 13 November 2019

Dan dinyatakan lulus oleh :

Penguji I



dr. Nurul Hidayati, M.Sc. Sp.DLP  
NIP. 197707062005012001

Pembimbing I/Penguji II



Prof. Dr. dr. Sanarto Santoso,  
DTM&H, Sp.MK(K)  
NIP. 194812201980021002

Pembimbing II/Penguji III



Prof. Dr. dr. LOEKI ENGGAR  
FITRI, M.Kes., Sp.ParK  
NIP. 196410131991032001

Mengetahui,  
Ketua Program Studi Sarjana Kedokteran



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



## ABSTRAK

Nadhirah, Adinda Putri. 2019. **Uji Potensi Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*) Sebagai Penghambat Pembentukan Biofilm *Pseudomonas aeruginosa* Secara *In Vitro***. Tugas Akhir, Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Prof. Dr. dr. Sanarto Santoso, DTM&H, Sp.MK (K) (2) Prof. Dr. dr. Loeki Enggar Fitri, M.Kes., Sp.Park

*Pseudomonas aeruginosa* merupakan salah satu patogen penyebab infeksi nosokomial dengan kasus resistensi antibiotika yang tinggi. Resistensi bakteri tersebut diakibatkan proses pembentukan biofilm. Daun kelor (*Moringa oleifera*) sebagai bahan pengganti obat yang mengandung zat aktif tannin, flavonoid, dan alkaloid sebagai antibiofilm melalui mekanisme pencegahan quorum sensing pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui potensi ekstrak etanol daun kelor sebagai penghambat pembentukan biofilm *Pseudomonas aeruginosa* secara *in vitro*. Penelitian ini menggunakan metode tabung. Terdapat 7 kelompok dengan 6 kelompok perlakuan dengan konsentrasi 1,675%, 3,125%, 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, kontrol negatif berisi ekstrak konsentrasi 0%. Dengan pengulangan dan perapatan sebanyak 4 kali dengan konsentrasi 10%, 12,5%, 15%, 17,5%, 20%, 22,5%, 25%. Hasil penelitian dinilai dengan cara pengamatan secara langsung dan uji statistic nonparametrik meliputi Kolmogorov-Smirnov dan Shapiro-Wik, *Kruskall Wallis*, uji *Mann-Whitney*, dan uji korelasi *Spearman*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa, secara visual terlihat penipisan cincin biofilm pada tabung. Hasil analisis uji *Kruskal Wallis* didapatkan  $p=0,000$  ( $p<0,05$ ). Hasil uji *Spearman* yaitu 0,000. Kesimpulan penelitian ini adalah ekstrak etanol daun kelor dapat menghambat pembentukan biofilm pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* secara *in vitro* dengan signifikan.

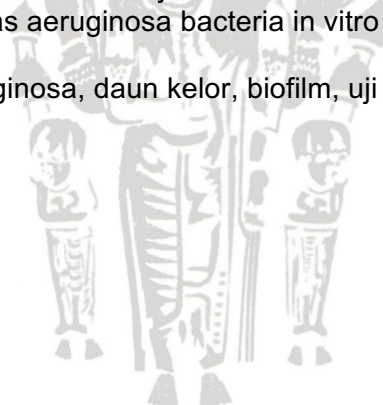
Kata kunci: *Pseudomonas aeruginosa*, daun kelor, biofilm, uji nonparametrik.

## ABSTRACT

Nadhirah, Adinda Putri. 2019. **Assesment on Kelor Leaf Etanol Extract (*Moringa oleifera*) as Inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation in vitro**. Final Assignment, Medical Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Adviser : (1) Prof. Dr. dr. Sanarto Santoso, DTM&H, Sp.MK(K) (2) Prof. Dr. dr. Loeki Enggar Fitri, M.Kes., Sp.ParK

*Pseudomonas aeruginosa* is one of a pathogen that causes common cases of nosocomial infection with antibiotic resistance. This resistance bacteria happens due to process of biofilm forming. Kelor leaf (*Moringa oleifera*) as the substitute of medicine in which consists of active substances such as tannin, flavonoid and alkaloid as antibiofilm through mechanism prevention quorum sensing in bacteria *Pseudomonas aeruginosa*. The objective of this study is to learn the potential benefit of extract of etanol in kelor leaf as a resistor in forming biofilm *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. This study is using tube test method. There are 7 groups with 6 groups concentration treatment 1,675%, 3,125%, 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, negative control consist of concentration extract 0%. With repetition and sealing as many as 4 times with concentration 10%, 12,5%, 15%, 17,5%, 20%, 22,5%, 25%. The result was rated with direct observation and statistical assessment nonparametrik comprise Kolmogorov-Smirnov and Shapiro-Wik, *Kruskal Wallis*, assessment *Mann-Whitney*, and assessment *Spearman* correlation. The study outcome shows visually, it is seen there are depletion on biofilm ring in tube. The outcome of *Kruskal Wallis* assessment is  $p=0,000$  ( $p<0,05$ ). The outcome of *Spearman* is 0,000. The finding of this study is etanol extract on kelor leaf can be resistor in forming biofilm on *Pseudomonas aeruginosa* bacteria in vitro significantly.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, daun kelor, biofilm, uji nonparametrik.





## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

*Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri oportunistik penyebab resistensi obat. Bakteri ini dapat menyebabkan infeksi saluran kemih, infeksi saluran pernafasan, dermatitis, infeksi jaringan lunak, bakteremia, infeksi tulang dan sendi, infeksi saluran pencernaan dan bermacam-macam infeksi sistemik, terutama pada penderita luka bakar berat, kanker, dan penderita *Acquired immunodeficiency syndrome* (AIDS) yang mengalami penurunan sistem imun (Todar, 2006).

Bakteri ini merupakan bakteri yang paling sering ditemui (diisolasi) pada pasien yang telah dirawat di rumah sakit lebih dari 1 minggu. Infeksi akibat *Pseudomonas aeruginosa* adalah infeksi yang sebagian besar terjadi di rumah sakit, dapat dilihat dari data surveilans yang dilakukan oleh Departemen Kesehatan RI pada tahun 1987 di 10 RSU Pendidikan, diperoleh angka infeksi nosokomial cukup tinggi yaitu sebesar 6 -16 % dengan rata-rata 9,8% (Nihi, 2011) dan di Jawa Timur sendiri mencapai angka 4,2%. Di Amerika, infeksi akibat *Pseudomonas aeruginosa* mencapai 51.000 kasus per tahun dengan 6.700 kasus menyebabkan *Multidrug- Resistant Pseudomonas* dan 440 diantaranya mengalami kematian (Wangi, *et al*, 2017).

Terjadinya resistensi pada *Pseudomonas aeruginosa* disebabkan karena bakteri ini dapat dengan mudah membentuk biofilm hanya dalam kurun waktu 24 jam. Bakteri yang tumbuh dalam biofilm berada dalam fase dorman sehingga dapat terhindar dari stres lingkungan, salah satunya pengaruh antibiotik.

Dibutuhkan antibiotik dengan dosis 100 hingga 1000 kali lebih tinggi untuk membunuh patogen yang dilindungi oleh biofilm (Wangi, *et al.*, 2017).

Biofilm merupakan bentuk struktural dari sekumpulan mikroorganisme yang dilindungi oleh matrik ekstraseluler yang disebut *Extracellular Polymeric Substance* (EPS) adalah produk yang dihasilkan sendiri oleh mikroorganisme tersebut dan dapat melindungi dari pengaruh buruk lingkungan (Prakash, *et al.*, 2003). Biofilm saat ini dianggap sebagai mediator utama infeksi, dengan perkiraan 80% kejadian infeksi berkaitan dengan pembentukan biofilm (Archer, *et al.*, 2011). Pembentukan biofilm *Pseudomonas aeruginosa* menyebabkan peningkatan kesulitan pengendalian penyakit sehingga diperlukan pencarian bahan-bahan anti pembentukan biofilm. Sebagian tanaman di Indonesia dapat digunakan sebagai tanaman obat. Salah satu contoh tanaman obat Indonesia yang sudah lama digunakan adalah kelor (*Moringa oleifera*). Kelor adalah spesies family *moringaceae* yang paling banyak ditanam. Bagian-bagian tanaman kelor yang telah terbukti sebagai bahan antimikroba diantaranya daun, biji, minyak, bunga, akar, dan kulit kayu.

Daun kelor (*Moringa oleifera*) yang diekstraksi dengan menggunakan etanol mengandung zat aktif tannin dan flavonoid (Shahria, *et al.*, 2012), Flavonoid memiliki sifat lipofilik sehingga dimungkinkan akan merusak membran sel bakteri. Kemudian, senyawa tanin diduga berhubungan dengan kemampuannya dalam menginaktivasi adhesin mikroba, enzim, dan protein transport pada membran sel (Naim, 2004). Dikatakan zat aktif tersebut berpotensi sebagai antibiofilm karena dapat menghambat intercellular adhesion genes *icaA* dan *icaD* (Lee *et al.*, 2013). Gen *icaA* dan *icaD* dapat mensintesis *Polysaccharide Intercellular Adhesion* (PIA) yang mempunyai peran penting



dalam pembentukan biofilm (Rohde *et al.*, 2010 ; Archer *et al.*, 2011; Arciola *et al.*, 2012). Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek ekstrak

etanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dalam menghambat pembentukan biofilm *Pseudomonas aeruginosa* secara *in vitro*.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian diatas maka penelitian ini ditujukan untuk menjawab rumusan masalah sebagai berikut :

Apakah ekstrak etanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*) berpotensi menghambat pembentukan biofilm pada *Pseudomonas aeruginosa* secara *in vitro*?

## 1.3 Tujuan Penelitian

### 1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui potensi ekstrak etanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*) sebagai penghambat pembentukan biofilm pada *Pseudomonas aeruginosa* secara *in vitro*.

### 1.3.2 Tujuan Khusus

Untuk mengetahui nilai Kadar Hambat Biofilm Minimal (KHBM) dari ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) terhadap pembentukan biofilm bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

## 1.4 Manfaat

### 1.4.1 Manfaat Akademis

Manfaat penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Diharapkan penelitian ini dapat memberikan informasi ilmiah terkait manfaat ekstrak etanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*) sebagai penghambat pembentukan biofilm pada bakteri *Pesudomonas aeruginosa*.

2. Diharapkan penelitian dapat memberikan wawasan bagi masyarakat umum mengenai manfaat dari Daun Kelor (*Moringa oleifera*), yaitu sebagai penghambat pembentukan biofilm pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

#### 1.4.2 Manfaat Praktis

1. Diharapkan penelitian dapat dijadikan acuan untuk penelitian selanjutnya mengenai manfaat ekstrak etanol Daun Kelor (*Moringa oleifera*) sebagai penghambat pembentukan biofilm *Pseudomonas aeruginosa*.





## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* merupakan patogen utama bagi manusia karena bakteri ini mengkoloni dan dapat menimbulkan infeksi apabila fungsi pertahanan abnormal. *Pseudomonas aeruginosa* disebut patogen oportunistik, yaitu memanfaatkan kerusakan mekanisme pada inang untuk memulai infeksi.

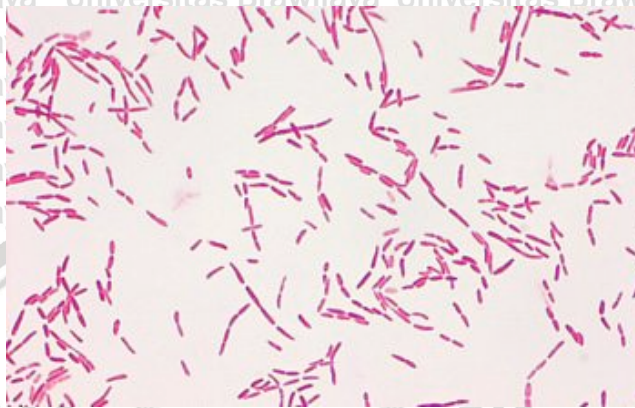
Bakteri ini dapat tumbuh pada manusia sehat dan bersifat saprofit pada usus dan kulit manusia. Selain itu, bakteri ini dapat menyebabkan nosokomial, yaitu infeksi yang didapat selama perawatan di rumah sakit (Mayasari, 2006).

#### 2.1.1 Taksonomi

Klasifikasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* :

Kingdom : Bakteri  
Phylum : *Proteobacteria*  
Class : *Schizomycetes*  
Ordo : *Pseudomonadales*  
Family : *Pseudomonadaceae*  
Genus : *Pseudomonas*  
Species : *Pseudomonas aeruginosa*  
(Holt, 1998)

### 2.1.2 Morfologi



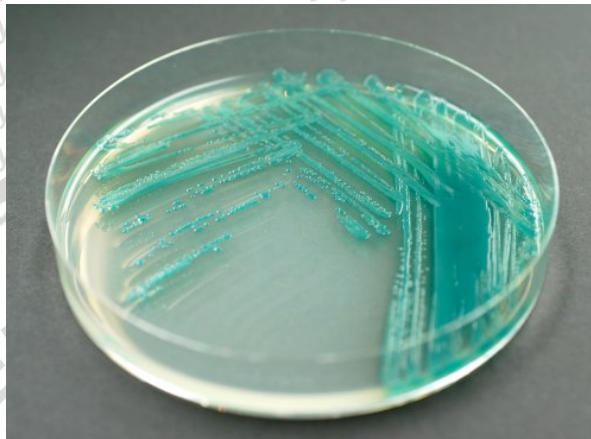
**Gambar 2.1** *Pseudomonas aeruginosa* dengan pengecatan Gram (Todar, 2006)

*Pseudomonas aeruginosa* (gambar 2.1) mempunyai ciri khas bergerak dan berbentuk batang, berukuran sekitar 0,6 x 2 mm. umumnya mempunyai flagel polar, tetapi kadang-kadang 2-3 flagel. Bakteri Gram-negatif dan terlihat sebagai bakteri tunggal, berpasangan, dan kadang-kadang membentuk rantai yang pendek. *Pseudomonas aeruginosa* dapat diidentifikasi berdasarkan morfologi koloni, kemampuan tumbuh dengan baik pada suhu 37- 42°C., tidak memfermentasi karbohidrat dan bersifat oksidase positif, dan adanya pigmen yang khas tetapi beberapa galur mengoksidasi glukosa, (Brooks *et al.*, 2007).

*Pseudomonas aeruginosa* adalah aerob obligat yang tumbuh dengan mudah banyak jenis perbenihan biakan. *Pseudomonas aeruginosa* membentuk koloni halus bulat dengan flouresensi kehijauan. Bakteri ini sering menghasilkan piosianin, pigmen kebiru-biruan yang tak berflouresensi, yang tidak berdifusi ke dalam agar dan mengandung chloroform. Banyak galur *Pseudomonas aeruginosa* juga menghasilkan pigmen pioverdin yang berflouresensi, yang memberi warna kehijauan pada agar. Beberapa galur menghasilkan piorubin



yang berwarna merah gelap atau pigmen piomelanin yang hitam. (Butel dan Morse, 2007).



**Gambar 2.2** Isolasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* pada MHA (Sivri, et al, 2013)

*Pseudomonas aeruginosa* pada biakan dapat membentuk berbagai jenis koloni. Setiap koloni dapat mempunyai aktivitas biokimia, enzimatik dan pola kerentanan antimikroba yang berbeda. Pada biakan pasien dengan fibrosis kistik sering membentuk koloni *Pseudomonas aeruginosa* yang mukoid akibat produksi berlebihan dari alginate, suatu eksopolisakarida yang berfungsi menghasilkan matriks sehingga organisme dapat hidup dalam biofilm (Brooks et al., 2007).

## 2.2 Biofilm

Biofilm merupakan bentuk struktural dari sekumpulan mikroorganisme yang dilindungi oleh matrik ekstraseluler yang disebut *Extracellular Polymeric Substance* (EPS) yang merupakan produk yang dihasilkan sendiri oleh mikroorganisme tersebut dan dapat melindungi dari pengaruh buruk lingkungan (Prakash et al., 2003). Bakteri di dalam biofilm mampu bertahan terhadap antibiotic, desinfektan, bahkan mampu tahan terhadap system imunitas hospesnya. Di dalam lapisan biofilm, mikroba cenderung tumbuh dan

berkembang dengan pesat hingga membentuk koloni terutama pada permukaan bahan yang lembab dan kaya akan nutrisi (Tarver,2009).

### 2.2.1 Mekanisme Pembentukan Biofilm

Tahap pertama terbentuknya biofilm dimulai dengan perlekatan sel mikroba planktonik pada permukaan substrat. Meskipun mikroba mempunyai kemampuan adhesi yang sama pada semua jenis substrat, namun sifat permukaan yang kasar lebih disenangi, dan lebih cepat terbentuk pada material hidrofobik seperti teflon dan plastik dibandingkan pada gelas dan logam. Sel-sel pada tahap perlekatan awal tidak melekat dengan kuat karena hanya mengandalkan kekuatan ikatan *van der Waals*. Setelah itu, koloni akan mengikatkan diri lebih kuat pada permukaan dengan menggunakan pili. Selama tahap ini, sel bakteri mengalami pertumbuhan logaritmik. Koloni awal berperan sebagai fasilitator bagi sel lainnya untuk mencari sisi perlekatan selanjutnya sebagai tempat pembuatan matriks biofilm. Bagi sel-sel yang tidak mampu melekat pada permukaan, melalui suatu *quorum sensing* (QS), sel tersebut berperan memacu sel-sel dalam koloni untuk pembentuk matriks. Pada *Pseudomonas aeruginosa*, *N-Acyl homoserine lactones* (AHL) diketahui merupakan molekul sinyal yang berperan penting dalam pensinyalan sel (*cell signaling*). Perlu diketahui bahwa perkembangan dan integritas struktur biofilm sangat tergantung pada QS yaitu molekul ekstraseluler, *pheromon*, yang dapat meningkatkan komunikasi diantara bakteri. Viabilitas atau kelangsungan hidup komunitas biofilm tergantung pada respon gen terhadap stres dan penghantaran sinyal yang diterima melalui QS yang didifusikan (Aparna and Yadav, 2008).

Tahap kedua, bakteri mengalami multiplikasi sambil mengeluarkan sinyal kimia untuk berkomunikasi secara internal. Substansi EPS mulai dihasilkan



berdasarkan mekanisme genetik. EPS kemudian akan mentrap nutrien dan bakteri planktonik. Agregat sel terbentuk sementara motilitas sel menjadi semakin menurun sejalan dengan semakin progresifnya lapisan agregat (Aparna and Yadav, 2008).

Tahap ketiga, selama tahap maturasi, biofilm terus tumbuh sejalan dengan pertumbuhan koloni. Semakin lama biofilm semakin berkembang dengan penambahan ukuran dan perubahan. Pada tahap ini, ketebalan biofilm lebih dari 10  $\mu\text{m}$  (Aparna and Yadav, 2008).

Tahap keempat, ketebalan lapisan biofilm pada tahap ini mencapai lebih dari 100mm (Aparna and Yadav, 2008) dan dapat mencapai 300-400 mm seperti yang dibentuk oleh *algal mats* (Characklis, 1990). Pada tahap dispersi, sel-sel dalam koloni akan terlepas sendiri atau bersama sebagian komponen matriks. Pada tahap ini, matriks ekstraseluler biofilm akan didegradasi oleh enzim *dispersin B* dan *deoxyribonuclease* (Kaplan *et al*, 2003; Izano *et al*, 2008), sekaligus enzim tersebut dapat dimanfaatkan sebagai agen anti-biofilm (Kaplan *et al*, 2004; Xavier *et al*, 2005). Pada *Pseudomonas aeruginosa* dan *Candida albicans*, asam lemak *cis-2-decenoic acid* diketahui mampu menginduksi dispersi dan menghambat pertumbuhan koloni biofilm (Davies *et al*, 2009). Beberapa penelitian terakhir menyebutkan bahwa biofilm memiliki struktur yang kompleks dan dinamis.

Tahap kelima, biofilm akan memasuki tahap kelima beberapa hari setelah tahap keempat. Pada tahap ini terjadi disperse sel sehingga memungkinkan beberapa bakteri meninggalkan biofilm untuk berkembang kembali menjadi sel planktonik.

## 2.2.2 Struktur Biofilm

Unit struktural dari biofilm adalah mikrokoloni dan proses dasar pembentukan dari biofilm seperti mekanisme *quorum sensing*, resistensi antimikroba, dan perlekatan yang dapat menerangkan interaksi fisiologis dari mikrokoloni dalam biofilm yang telah matang. Biofilm terutama terdiri dari materi matriks (85% dari volume) dan kumpulan sel-sel bakteri (15% dari volume). *Extracellular Polymerc Substances* (EPS) mungkin menyusun 50%-90% karbon organik biofilm dan dapat dianggap sebagai material matrik yang utama. EPS bervariasi secara fisik dan kimia, tapi terutama terdiri dari polisakarida. EPS bersifat hidrofilik karena dapat mengikat air dalam jumlah yang banyak, dengan tingkat kelarutan yang berbeda-beda (Gunardi, 2014).

## 2.2.3 Fungsi Biofilm dan Peranannya terhadap Resistensi Bakteri

Peran biofilm terhadap mikroba adalah sebagai perlindungan, pertahanan, nutrisi, dan variasi genetik. Perlindungan, bakteri mengeluarkan zat ekstrapolimer yang sangat penting yang dikenal sebagai eksopolisakarida. Matriks ini melindungi bakteri dari lingkungan eksternal seperti radiasi UV, pergeseran pH, suhu, gerakan osmotik, dan pengeringan tanpa mempengaruhi pasokan nutrisinya (Nichols *et al.*, 1988).

Biofilm berfungsi sebagai mekanisme pertahanan bagi bakteri dengan cara meningkatkan resistensi terhadap gaya fisik yang dapat menurunkan perkembangan sel-sel bakteri yang tidak menempel, fagositosis oleh sel imun dan penetrasi dari senyawa toksik bagi bakteri seperti antibiotik. Bakteri yang mempunyai biofilm lebih resisten 10-1.000 kali dibandingkan bila tidak mempunyai biofilm (Monroe, 2007)

Menurut Decho dan Flemming dalam Yuliandari (2015), kegiatan metabolisme bakteri dalam biofilm berbeda dengan sel-sel planktonik. Didalam



biofilm, bakteri memiliki akses terbatas terhadap nutrisi dan memiliki pasokan oksigen yang rendah. Mereka berkomunikasi satu sama lain dengan saluran selular dan sinyal lingkungan. Bakteri yang berkoloni di dalam biofilm akan lebih memudahkan dalam terjadinya transfer gen di antara populasi sehingga muncul bakteri resisten yang menjadi perhatian besar juga karena penggunaan antibiotik rekayasa genetika mikroorganisme dan sebagainya.

#### 2.2.4 Pemeriksaan Biofilm

Pemeriksaan biofilm dapat dilakukan dengan menggunakan mikroskop elektron dan *Concofocal Laser Scanning Microscope* (CLSM). Mikroskop elektron dapat memeriksa biofilm pada alat-alat medik dan pada infeksi manusia. Pada awalnya, mikroskop elektron ini merupakan alat yang penting dalam mempelajari biofilm. CLSM dengan fluorescen antisera dan fluoresen in situ hibridisasi, sehingga organisme yang spesifik dan untuk mengidentifikasi dalam komunitas campuran kuman (Gunardi, 2014).

#### 2.2.5 Strategi Intervensi terhadap biofilm

Untuk menghambat pembentukan biofilm diperlukan strategi intervensi yang mampu mengganggu atau mencegah terbentuknya biofilm, antara lain;

- a. Melindungi permukaan dengan molekul yang menghambat perlekatan mikroba dan merusak matriks yang diproduksi, contohnya melapisi alat-alat medis dengan *chlorhexidin-silver sulfadizine*.
- b. Menghambat sinyal molekuler dengan mengganggu mekanisme gen dalam bakteri, sehingga pertumbuhan biofilm tidak terjadi.
- c. Menggunakan antibiotik atau disinfektan untuk menghambat strategi pertahanan biofilm.
- d. Melalui mekanisme self destruction, misalnya *P. Fluorescent* akan menghasilkan lyase yang dapat menghancurkan matriks film berupa

alginate pada lingkungan yang kekurangan oksigen, sehingga biofilm bakteri akan hancur.

Keempat strategi tersebut dimungkinkan akan mengganggu perkembangan sel bakteri yang dapat mengeluarkan sinyal kimia diproses dari masing-masing gen bakteri yang berperan dalam pembentukan karakteristik biofilm menjadi lebih matang dan koordinasi aktivitas biofilm (Gunardi, 2014).

## 2.3 Daun Kelor (*Moringa Oleifera*)

### 2.3.1 Taksonomi

Daun Kelor (*Moringa oleifera*) tumbuh di dataran rendah maupun dataran tinggi sampai di ketinggian  $\pm 1000$  dpl. Kelor banyak ditanam sebagai tapal batas atau pagar di halaman rumah atau ladang. Daun kelor dapat dipanen setelah tanaman tumbuh 1,5 hingga 2 meter yang biasanya memakan waktu 3 sampai 6 bulan. Namun dalam budidaya intensif yang bertujuan untuk produksi daunnya, kelor dipelihara dengan ketinggian tidak lebih dari 1 meter. Pemanenan dilakukan dengan cara memetik batang daun dari cabang atau dengan memotong cabangnya dengan jarak 20 sampai 40 cm di atas tanah (Kurniasih, 2014).

Menurut Roloff (2009) dalam Nugraha (2013), klasifikasi tanaman kelor adalah sebagai berikut :

Regnum	: Plantae
Division	: <i>Spermatophyta</i>
Sub Division	: <i>Angiospermae</i>
Classis	: <i>Dicotyledonae</i>
Subclassis	: <i>Dialypetalae</i>



Ordo : *Rhoedales (Brassicales)*

Familia : *Moringaceae*

Genus : *Moringa*

Species : *Moringa Oleifera*

### 2.3.2 Morfologi

Tanaman Kelor (*Moringa oleifera*) merupakan tanaman yang berasal dari dataran sepanjang sub Himalaya yaitu India, Pakistan, Bangladesh, dan Afghanistan. Kelor termasuk jenis tumbuhan perdu berumur panjang berupa semak atau pohon dengan ketinggian 7-12 meter. Batangnya berkayu (lignosus), tegak, berwarna putih kotor, berkulit tipis dan mudah patah. Cabangnya jarang dengan arah percabangan tegak atau miring serta cenderung tumbuh lurus dan memanjang (Tilong, 2012).



Gambar 2.3 Daun Kelor (*Moringa Oleifera*) (Hsu et al., 2006)

Daun kelor (Gambar 2.3) berbentuk bulat telur, bersirip tak sempurna, beranak daun gasal, tersusun majemuk dalam satu tangkai, dan hanya sebesar ujung jari. Helaian daun kelor berwarna hijau, ujung daun tumpul, pangkal daun membulat, tepi daun rata, susunan pertulangan menyirip serta memiliki ukuran 1-2 cm (Yulianti, 2008). Bunga kelor muncul di ketiak daun, beraroma khas dan berwarna putih kekuning-kuningan. Buah kelor berbentuk segitiga, dengan panjang sekitar 20-60 cm dan berwarna hijau. Kelor berakar tunggang, berwarna putih, berbentuk seperti lobak, berbau tajam dan berasa pedas (Tilong, 2012).

### 2.3.3 Kandungan Daun Kelor

Menurut Simbolan *et al.*, (2007), kandungan kimia yang dimiliki daun kelor yakni asam amino yang berbentuk asam aspartat, asam glutamat, alanin, valin, leusin, isoleusin, histidin, lisin, arginin, venilalanin, triptopan, sistein dan methionin. Daun kelor juga mengandung makro elemen seperti potasium, kalsium, magnesium, sodium, dan fosfor, serta mikro elemen seperti mangan, zinc, dan besi. Daun kelor merupakan sumber provitamin A, vitamin B, Vitamin C, mineral terutama zat besi. Akar, batang dan kulit batang kelor mengandung saponin dan polifenol. Selain itu kelor juga mengandung alkaloida, tannin, steroid, flavonoid, gula tereduksi dan minyak atsiri. Akar dan daun kelor juga mengandung zat yang berasa pahit dan getir. Sementara biji kelor mengandung minyak dan lemak (Utami dan Puspaningtyas, 2013). Menurut Krisnadi (2014) teh daun kelor kaya dengan kandungan polifenol catechin, terutama *epigallocatechin gallate* (EGCG). EGCG berfungsi untuk menghambat pertumbuhan sel kanker, membunuh sel kanker, efektif dalam menurunkan kadar kolesterol LDL, dan menghambat pembentukan bekuan darah abnormal yang



menjadi penyebab utama serangan jantung dan stroke. Hasil studi kandungan EGCG pada daun kelor menunjukkan bahwa kandungan EGCG dari 3 g teh daun kelor yang dilarutkan dengan 200 ml air dengan suhu 90C yaitu 114.37 mg (Putri, 2014).

Berdasarkan data hasil penelitian yang diperoleh terlihat bahwa pemberian ekstrak daun kelor konsentrasi 50 % menunjukkan hasil yang paling signifikan dalam menekan aktivitas bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dibanding pemberian konsentrasi yang lain. Menurut Fuglie (2001), daun kelor mengandung senyawa antibakteri seperti saponin, triterpenoid, dan tanin yang memiliki mekanisme kerja dengan merusak membran sel bakteri. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Dahot (1998), bahwa dalam ekstrak daun kelor mengandung protein dengan berat molekul rendah yang mempunyai aktivitas antibakteri dan antijamur. Penelitian lain menyebutkan bahwa daun kelor memiliki zat antioksidan antara lain sitosterol dan glukopyranoside (Guevara et al., 1999). Daun kelor juga mengandung flavonoid yang berfungsi sebagai antioksidan yang mampu menjaga terjadinya oksidasi sel tubuh (Utami, 2013).

Menurut Gisvold (1982) dalam Sabir (2005) disebutkan bahwa flavonoid menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri, mikrosom, dan lisosom sebagai hasil interaksi antara flavonoid dengan DNA bakteri.

Adapun menurut Naim (2004), flavonoid memiliki sifat lipofilik sehingga dimungkinkan akan merusak membran sel bakteri. Kemudian, senyawa tanin diduga berhubungan dengan kemampuannya dalam menginaktivasi adhesin mikroba, enzim, dan protein transport pada membran sel. Selain itu, senyawa terpen atau terpenoid diketahui dapat bersifat aktif terhadap bakteri, fungi, virus,

dan protozoa. Mekanisme antimikrobal senyawa terpen diduga terlibat dalam perusakan membran sel oleh senyawa lipofilik.

### 2.3.4 Manfaat Tanaman Kelor

Tanaman kelor di daerah pedesaan biasanya digunakan sebagai tapal batas rumah atau ladang. Akar kelor dapat dimanfaatkan sebagai antilithic (pencegah terbentuknya batu urine), rubefacient (obat kulit merah), vesicant (menghilangkan kutil), antifertilitas dan antiinflamasi (peradangan). Batang kelor dimanfaatkan sebagai rubefacient, vesicant, menyembuhkan penyakit mata, untuk pengobatan pasien mengigau, mencegah pembesaran limpa dan untuk menyembuhkan bisul (Krisnadi, 2014).

Getah kelor dicampur dengan minyak wijen digunakan untuk meredakan sakit kepala, demam, keluhan usus, disentri, dan asma. Bunga kelor dapat digunakan untuk menyembuhkan radang, penyakit otot, histeria, tumor, dan pembesaran limpa dan menurunkan kolesterol. Daun kelor secara tradisional telah banyak dimanfaatkan untuk sayur hingga saat ini dikembangkan menjadi produk pangan modern seperti tepung kelor, kerupuk kelor, kue kelor, permen kelor dan teh daun kelor. Selain itu ekstrak daun kelor dapat berfungsi sebagai antimikroba dan biji kelor digunakan untuk menjernihkan air (Krisnadi, 2014).

### 2.4 Metode Ekstraksi

Ekstraksi adalah teknik pemisahan senyawa berdasarkan perbedaan distribusi zat terlarut diantara 2 pelarut yang saling bercampur. Pada umumnya zat terlarut yang diekstrak bersifat tidak larut atau larut sedikit dalam suatu pelarut tetapi mudah larut dengan pelarut lain. Metode ekstraksi ang dapat yang



dapat ditentukan oleh tekstur, kandungan air bahan-bahan yang akan diekstraksi dan senyawa-senyawa yang akan diisolasi (Harborne, 1996).

Secara umum, ekstraksi dengan pelarut dapat dilakukan dengan metode ekstraksi bertingkat dan ekstraksi tunggal. Ekstraksi bertingkat dilakukan dengan cara merendam sampel dengan pelarut berbeda secara berurutan, dimulai dengan pelarut non polar lalu dengan pelarut yang kepolarannya menengah kemudian dengan pelarut polar, dengan demikian akan diperoleh ekstrak kasar yang mengandung berturut-turut senyawa non polar, semi polar, dan polar. Metode ini berguna ketika berkerja dengan skala gram. Sedangkan ekstraksi tunggal dilakukan dengan cara merendam sampel dengan satu jenis pelarut tertentu. Bila menggunakan beberapa pelarut yang berbeda maka pada setiap pelarut dicampurkan dengan sampel yang belum pernah dilarutkan dengan pelarut lain sebelumnya (Harborne, 1987).

Etanol merupakan pelarut golongan alkohol yang paling banyak digunakan dalam proses isolasi senyawa organik bahan alam karena dapat melarutkan seluruh senyawa metabolit sekunder, karena etanol mempunyai gugus alkil yang bersifat non polar. Etanol diertimbangkan sebagai pelarut karena etanol lebih selektif, tidak mudah ditumbuhi kapang dan jamur tidak beracun, netral dan absorbabsinya baik. Etanol dapat bercampur dengan segala perbandingan panas yang diperlukan untuk perekatan yang lebih sedikit (Hargono, 1986). Etanol disebut juga etil alkohol yang lebih dikenal sebagai alkohol yang merupakan senyawa organik. Dalam kondisi kamar, etanol berwujud cairan yang mudah menguap, mudah terbakar dan tak berwarna. Etanol biasanya digunakan untuk mengekstraksi senyawa-senyawa aktif yang bersifat antioksidan, antibakteri dan antijamur pada suatu bahan. Beberapa hasil

penelitian melaporkan bahwa pelarut etanol lebih baik dari pada air, metanol maupun pelarut lain dalam mengekstraksi senyawa antioksidan maupun antibakteri (Hirasawa, 1999).

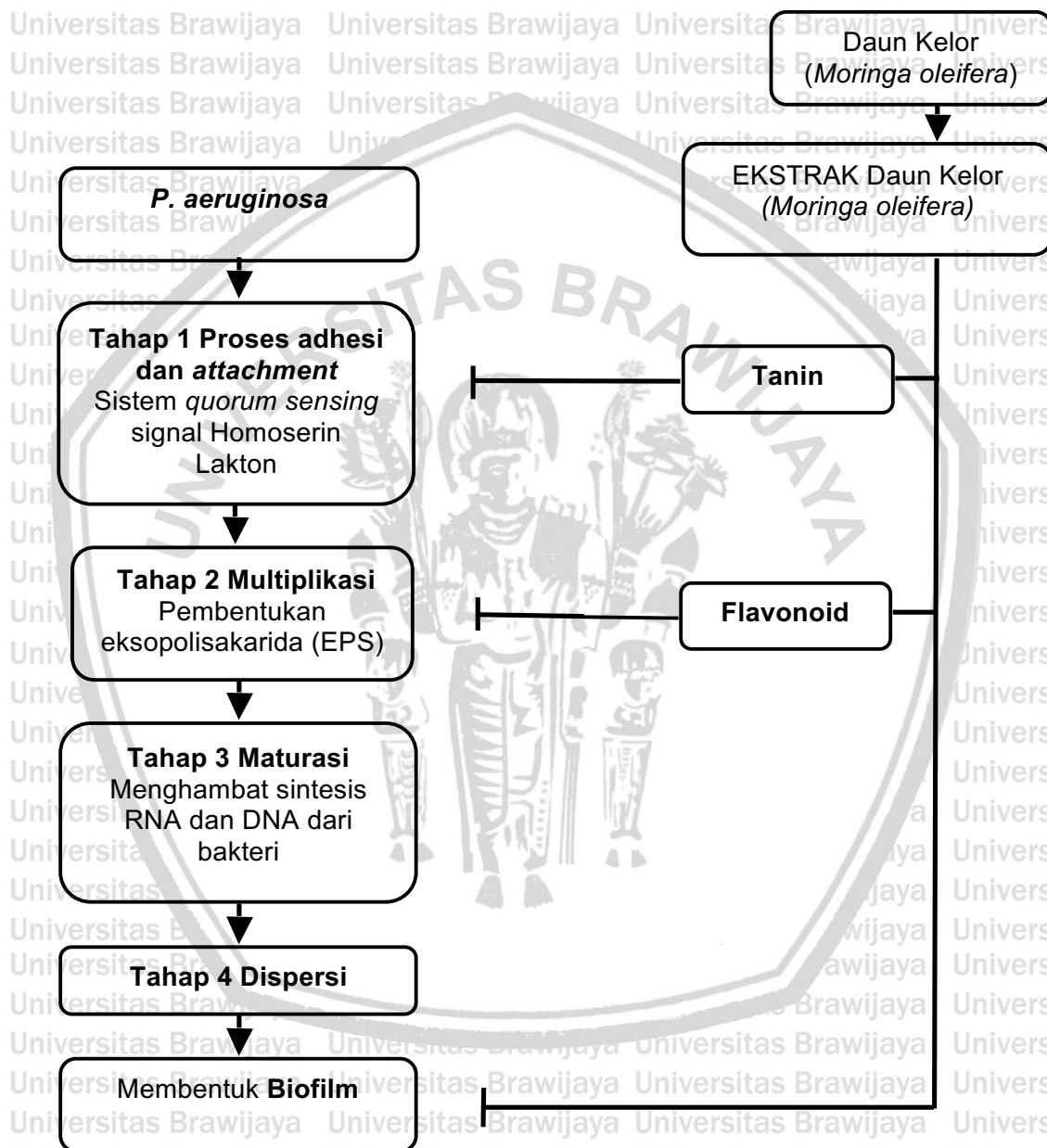




BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Keterangan:

→ : Proses

⊥ : Menghambat

Komunikasi antarsel penting bagi perkembangan dan pemeliharaan biofilm. *Pseudomonas aeruginosa* memiliki molekul sinyal utama yaitu homoserin lakton yang berfungsi sebagai agen kemostatik untuk mengumpulkan sel-sel *Pseudomonas aeruginosa* yang berdekatan (melalui mekanisme *quorum sensing*) dan membentuk biofilm. Selain itu, *Pseudomonas aeruginosa* terdiri atas beberapa macam substansi seperti eksopolisakarida, *extracellular DNA* (eDNA), protein, dan beberapa bahan lain seperti *fimbriae*, *type IV pili* (T4P), dan *flagella*. Eksopolisakarida yang terbentuk terdiri atas alginat, *polysaccharide encoding locus (pel)*, dan *polysaccharide synthesis locus (psl)*. Pembentukan biofilm pada *Pseudomonas aeruginosa* sangat tergantung pada keberadaan *psl* dan *pel*. Dalam hal ini, *psl* berfungsi sebagai pelindung terhadap reaksi imun tubuh berupa fagositosis oleh neutrofil dan sebagai pelindung terhadap adanya antibiotik yang ada di lingkungan sekitarnya. Sedangkan *pel* merupakan salah satu bahan yang menjadi penyebab terjadinya resistensi pada golongan beta-laktamase, fluorokuinolon, dan aminoglikosida.

Pembentukan biofilm *Pseudomonas aeruginosa* dimulai dari perlekatan awal mikroba pada permukaan suatu benda dan dapat diperentrai oleh *pili* (rambut halus sel). Setelah itu, dilanjutkan dengan perlekatan permanen bakteri *Pseudomonas aeruginosa* tersebut dengan bantuan eksopolisakarida (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 *Pseudomonas aeruginosa* melekat secara permanen, akan terbentuk mikrokoloni yang selanjutnya diikuti dengan proses maturasi tahap I dan tahap II sehingga mikroba siap menyebar dan berkolonisasi di tempat lain (dispersi). Kemudian bakteri *Pseudomonas aeruginosa* akan



melakukan *quorum sensing* dengan mensekresikan *inducer* atau *sel-sel signaling* berupa *lasR-lasI* dan *rh1R-rh1I* ke matriks/medium di sekitarnya. *Inducer* ini berperan untuk memanggil bakteri-bakteri lain di sekitar untuk menuju lokasi pembuat *inducer* tersebut dan menjadi koloni yang lebih besar lagi.

Efek ekstrak daun kelor dalam mencegah pembentukan biofilm bakteri *Pseudomonas aeruginosa* karena terdapat pada kandungan tannin dan flavonoid memiliki fungsi dalam menghambat mekanisme *quorum sensing* dengan autoinducer homoserin lakton pada *Pseudomonas aeruginosa*, pencegahan proses adhesi dan detachment, serta menghambat terbentuknya eksopolisakarida dan sintesis RNA maupun DNA bakteri (Wangi, et al, 2017).

### 3.1 Hipotesis Penelitian

Ekstrak daun kelor (*Moringa Oleifera*) berpotensi menghambat pembentukan biofilm terhadap *Pseudomonas aeruginosa*.

## BAB 4 METODE PENELITIAN

### 4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian dilakukan dengan rancangan *true experimental* dengan desain penelitian *post-test only control group design*. Untuk mengetahui pengaruh ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) terhadap pembentukan biofilm pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa*, metode yang digunakan pada penelitian ini adalah *tub-test* (metode tabung).

### 4.2 Populasi dan Sampel

Penelitian ini menggunakan sampel *Pseudomonas aeruginosa* pembentuk biofilm. Sampel ini diperoleh dari isolat *Pseudomonas aeruginosa* pembentuk biofilm yang didapat dari Lab Mikrobiologi Universitas Brawijaya.

Menurut Federer, jumlah pengulangan penelitian dihitung dengan rumus 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

p = jumlah perlakuan (dosis ekstrak daun kelor) :

Terdapat 6 kelompok dengan 5 kelompok perlakuan P1-P5 yaitu :



Kontrol : 0%

P1-P5 dengan konsentrasi = 1,675%, 3,125%, 6,25%, 12,5%, 25%

Berdasarkan hasil penghitungan menggunakan rumus tersebut, minimal harus dilakukan 4 kali pengulangan pada penelitian ini.

### 4.3 Variabel Penelitian

#### 4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian adalah konsentrasi ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) Dalam penelitian ini digunakan konsentrasi 1,675%, 3,125%, 6,25%, 12,5%, 25% dan kontrol negatif 0%.

#### 4.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah bakteri *Pseudomonas aeruginosa* pembentuk biofilm yang diukur dengan metode *tube-test*.

### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Juli di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Pembuatan ekstrak daun kelor dilakukan di Politeknik Negeri Malang.

### 4.5 Alat dan Bahan Penelitian

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

Alat dan bahan yang digunakan dalam pembuatan ekstrak daun kelor antara lain : daun kelor, etanol 96%, timbangan analitik, gelas kimia 250 ml, sokhet, cawan petri, penjepit cawan petri, desikator, spatula, pemanas aquades, kertas saring, thimbel, dan oven.

#### 4.5.2 Alat dan Bahan Identifikasi Bakteri

Alat dan bahan yang digunakan untuk mengidentifikasi bakteri antara lain : isolat *Pseudomonas aeruginosa*, bahan pengecatan gram, minyak imersi, mikroskop, ose, medium agar, lampu spiritus, dan tabung reaksi.

#### 4.5.3 Alat dan Bahan Deteksi Biofilm

Alat dan bahan yang digunakan untuk mendeteksi biofilm antara lain : biakan *Pseudomonas aeruginosa* pembentuk biofilm, TSB + *glycerol* 10%, PBS (*Phosphate Buffer Saline*) pH 7,3, deionized water, kristal violet, pipet, ose, beaker glass, dan inkubator.

#### 4.6 Definisi Operasional

1. *Pseudomonas aeruginosa* adalah bakteri gram negatif penyebab tersering dari infeksi nosokomial. Sampel ini diperoleh dari isolat *Pseudomonas aeruginosa* pembentuk biofilm yang didapat dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Brawijaya.
2. Biofilm adalah agregat multiseluler yang akan membentuk lapisan padat pada permukaan suatu substrat atau medium. Pada penelitian ini biofilm dibentuk oleh *Pseudomonas aeruginosa* dengan medium tabung.
3. Ekstrak daun kelor adalah hasil ekstraksi cair daun kelor dengan pelarut etanol. Ekstrak yang didapat dianggap memiliki kandungan ekstrak sebesar 100%. Daun Kelor berasal dari Laboratorium Materia Medika.
4. Metode tabung adalah metode deteksi biofilm dengan menggunakan tabung sebagai medium yang bersifat kualitatif.
5. *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC) adalah konsentrasi ekstrak Daun Kelor terendah yang mampu menghambat pembentukan biofilm yang ditandai dengan terjadinya penipisan bentuk cincin dan lapisan ungu kebiruan yang terdapat pada dinding dan dasar tabung.



## 4.7 Prosedur Penelitian

### 4.7.1 Persiapan Daun Kelor (*Moringa oleifera*)

#### 4.7.1.1 Ekstraksi dan Evaporasi

Pertama dilakukan penelitian pendahuluan digunakan untuk pencarian konsentrasi. Diawali dengan konsentrasi ekstrak 0%, 1,675%, 3,125%, 6,25%, 12,5%, dan 25%. Setelah itu dilakukan perapatan konsentrasi berdasarkan hasil dari penelitian tersebut dan dilakukan pengulangan 4x pada rentang konsentrasi tertentu. Daun kelor yang telah didapat kemudian dibersihkan dengan menggunakan air kemudian dicacah halus atau diblender (tanpa air). Setelah diblender potongan daun kelor dikeringkan dengan cara dijemur. Setelah kering, timbang potong daun kelor seberat 500g. Kemudian potongan daun kelor direndam selama 24 jam di dalam ethanol 96% sebanyak 1000 ml untuk membuat larutan stok. Setelah direndam selanjutnya bahan tersebut disaring sehingga diperoleh hasil akhirnya berupa ekstrak daun kelor dengan konsentrasi 100%.

#### 4.7.2 Persiapan Biofilm *Pseudomonas aeruginosa*

##### 4.7.2.1 Pemeriksaan Mikroskopis

###### Pembentukan sediaan slide

1. *Object glass* dibersihkan dahulu 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).

#### 4.7.2.2 Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram bertujuan untuk mengetahui *Pseudomonas* termasuk bakteri Gram positif atau Gram negatif. Prosedur pewarnaan Gram, sebagai berikut (Brooks et al., 2013) :

1. Gelas obyek dibersihkan dengan kapas steril, kemudian dilewatkan diatas api lalu dibiarkan dingin.
2. Satu tetes akuades steril ditetaskan pada gelas obyek.
3. Dengan ose jarum yang steril, diambil sedikit bakteri *P. aeruginosa* yang tumbuh pada medium padat kemudian disuspensikan dengan satu tetes akuades steril yang sudah di teteskan terlebih dahulu pada gelas obyek. Hapusan sebaiknya dibuat tipis.
4. Hapusan dibiarkan kering diudara. Setelah kering hapusan difiksasi dengan cara melewatkan sediaan sebanyak tiga sampai lima kali diatas api. Sediaan siap diwarnai.
5. Sediaan ditetesi dengan kristal violet dan ditunggu selama satu menit. Kemudian sisa kristal violet dibuang dan dibilas dengan air mengalir perlahan-lahan.



6. Sediaan dituangi dengan lugol dan ditunggu selama satu menit setelah itu sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air mengalir perlahan-lahan.

7. Sediaan dituangi dengan alkohol 96% dan ditunggu 5-10 detik setelah itu sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air mengalir perlahan-lahan.

8. Sediaan dituangi dengan safranin dan ditunggu selama 30 detik setelah itu sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air mengalir perlahan-lahan.

9. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap, ditetesi minyak emersi lalu dilihat dibawah mikroskop dengan lensa objektif pembesaran 97-100x.

10. Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang teramati dibawah mikroskop berupa bakteri berbentuk batang dan berwarna merah. Hasil pewarnaan Gram menunjukkan bahwa *Pseudomonas aeruginosa* mengambil warna pembanding safranin yang berwarna merah sehingga termasuk dalam golongan bakteri Gram negatif.

#### 4.7.2.3 Perbenihan Pada media *Muller Hilton Broth* (MHB)

Pembuatan suspensi yang dilakukan Mueller Hinton Broth (MHB). Dibuat dengan cara mencampurkan 0,1 gram serbuk MHB dengan 5 ml aquadest.

Larutan MHB yang telah larut disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 30 menit. Setelah dingin dapat disimpan dalam lemari pendingin (Refrigerator) untuk digunakan kembali jika dibutuhkan.

#### 4.7.2.4 Uji Biokimia

Uji Produksi H<sub>2</sub>S pada media *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA) secara aseptis di inokulasikan biakan kuman dari media MHB ke media TSIA. Sampel *Pseudomonas aeruginosa* diambil 1 mata ose dan kemudian ditanam dengan cara digoreskan pada lereng media dan ditusuk pada dasar media, lalu inkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C. *Pseudomonas aeruginosa* tidak menghasilkan K/K H<sub>2</sub>S dan gas dan pada slant/butt agar akan terlihat warna merah/kuning atau kuning/kuning.

#### 4.7.2.5 Pembuatan Perbenihan Cair Bakteri

1. Beberapa koloni bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dipindahkan ke *broth* menggunakan ose, kemudian dilakukan *spektrofotometri* dengan panjang gelombang 625 nm untuk mengetahui nilai absorbansi dan suspensi.
2. Untuk mendapatkan suspensi bakteri, kultur inokulum bakteri gram negatif yang telah diremajakan dengan umur 24 jam diambil satu ose yang telah dipijarkan lalu dimasukkan dalam tabung reaksi yang berisi 5 ml medium MHB dan kemudian divortex dan dikocok dalam shaker inkubator pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
3. Untuk mendapatkan suspensi bakteri uji dengan konsentrasi bakteri sebesar 10<sup>8</sup>/mL yang setara dengan OD = 0,1 maka dilakukan perhitungan sebagai berikut

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

Keterangan:

V1 = Volume bakteri yang akan ditambah pengencer

N1 = Nilai absorbansi suspensi (hasil *spektrofotometri*)

V2 = Volume suspensi bakteri uji (10 mL)



N2 = OD (0,1 = setara dengan  $10^8$ /mL)

4. Sehingga diperoleh volume (mL) bakteri yang akan ditambah pengencer untuk mendapatkan bakteri dengan konsentrasi  $10^8$ /ml sebanyak 10 mL.

5. Setelah diperoleh suspensi bakteri dengan konsentrasi  $10^8$ /mL sebanyak 10 mL, dilakukan pengenceran sebanyak 100 kali dengan menggunakan NaCl dan *nutrient broth*, sehingga konsentrasi bakteri menjadi  $10^8$ /mL. Kini bakteri telah siap digunakan untuk penelitian.

#### 4.7.2.6 Uji Deteksi Pembentukan Biofilm (Metode *Tube-test*)

*Pseudomonas aeruginosa* yang sudah teridentifikasi disimpan dalam media TSB + *glycerol* 10% dan diinkubasi pada suhu  $37^\circ\text{C}$  semalam. Mikroba kultur semalam selanjutnya dimasukkan ke tabung TSBglu (10 ml) dan diinkubasikan  $37^\circ\text{C}$  selama 24 jam. Selanjutnya tabung dicuci dengan PBS (pH 7,3) dan dikeringkan airnya. Tabung yang sudah dikeringkan diberi kristal violet (0,1%) dan kelebihan warna dibuang dan tabung dicuci dengan *deionized water* hingga akhirnya tabung dikeringkan dan dilihat formasi biofilmnya. Formasi biofilm ini ditandai dengan adanya cincin berwarna ungu kebiruan yang melekat pada dinding tabung (Christensen, *et al*, 2000).

#### 4.7.3 Uji Hambat Pembentukan Biofilm pada *Pseudomonas aeruginosa*

Menyiapkan perbenihan cair bakteri dengan konsentrasi bakteri  $1 \times 10^8$  CFU/ml. Lalu membuat suspensi bakteri dalam medium TSB + *glycerol* 10% berdasarkan perhitungan OD dari spektrofotometri. Mengisi tabung reaksi 1-6 dengan suspensi bakteri dalam medium TSB + *glycerol* 10% 2ml, dan satu tabung lain (kontrol) diisi 4ml. Kemudian 2 ml dalam larutan ekstrak dalam tiap tabung kecil dicampurkan dalam tabung reaksi 1-6 sehingga didapatkan larutan

sebanyak 4 ml dengan konsentrasi ekstrak daun kelor pada masing-masing tabung sebagai berikut:

- a. Tabung 1 (Kontrol) : 0%
- b. Tabung 2 : 1,675%
- c. Tabung 3 : 3,125%
- d. Tabung 4 : 6,25%
- e. Tabung 5 : 12,5%
- f. Tabung 6 : 25%

Seluruh tabung diinkubasikan selama 24 jam dengan suhu 37°C. Setelah 24 jam, tabung dikeluarkan dari inkubator dan dicuci dengan PBS (pH 7,3) dan dikeringkan airnya. Tabung yang sudah dikeringkan diberi kristal violet (0,1%) 0,5 ml lalu kelebihan warna dibuang dan tabung dicuci dengan *deionized water*.

Keringkan tabung. 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 (Prahara, *et al*, 2013).

#### 4.8 Analisis Data

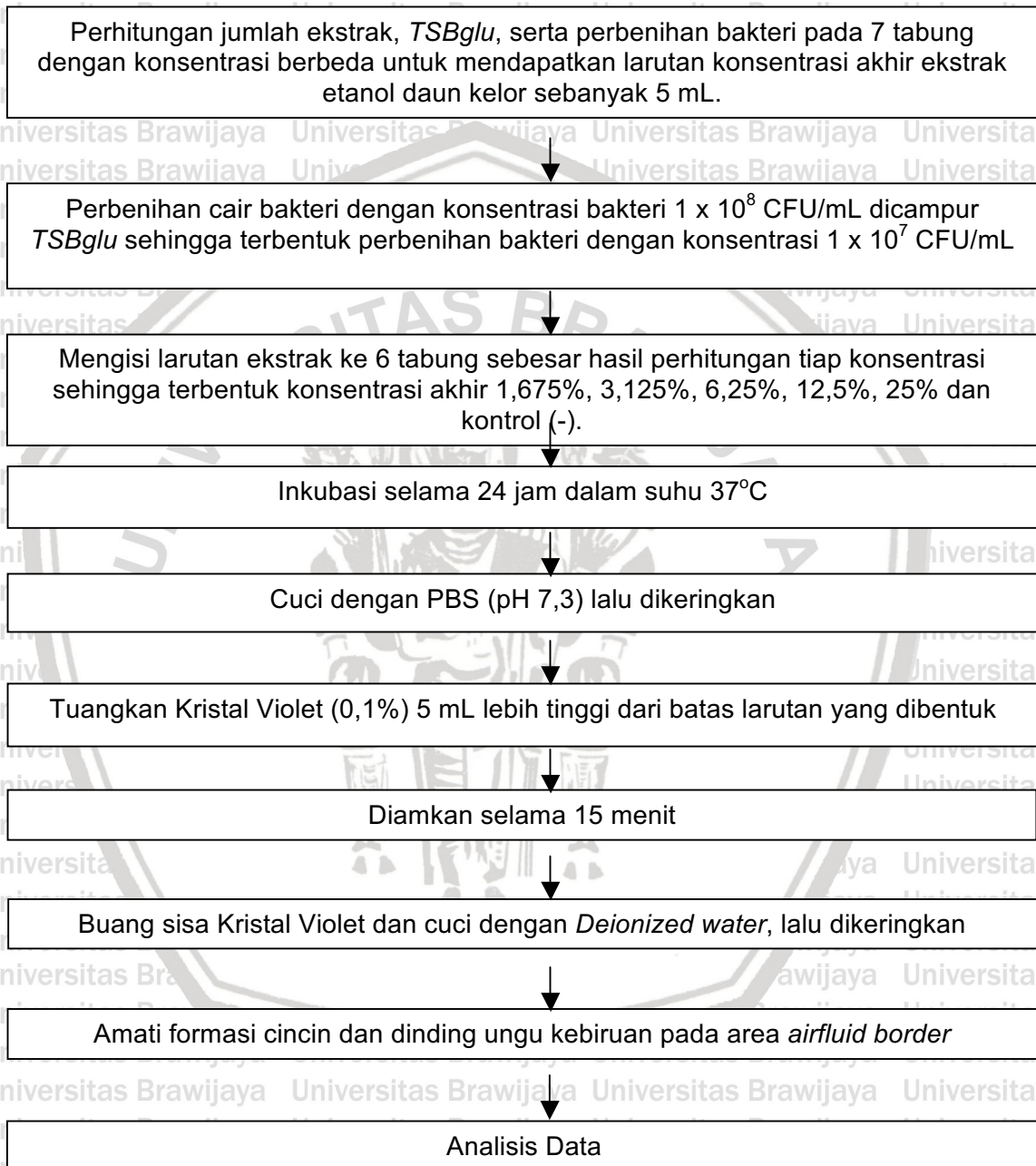
Hasil penelitian dinilai dengan cara pengamatan secara langsung dan uji statistik. Pada penelitian ini data merupakan data ordinal sehingga menggunakan analisis data berupa uji nonparametrik. Data ordinal dari penelitian ini adalah variabel penelitian berupa tingkat ketebalan cincin biofilm. Uji nonparametrik yang dilakukan meliputi uji Kolmogorov-Smirnov dan Shapiro-Wik, *Kruskal Wallis*, uji *Mann-Whitney*, dan uji korelasi *Spearman*. Analisis data menggunakan

*Statistical Product of Service Solution (SPSS) versi 13.0.*



#### 4.9 Rancangan Operasional Penelitian

##### Uji Hambat Pembentukan Biofilm



Bagan 4.1 Rancangan Operasional Penelitian





## BAB 5

## HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

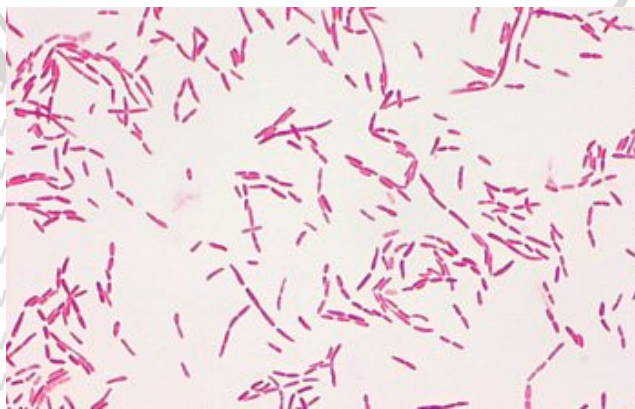
## 5.1 Hasil Penelitian

5.1.1 Hasil Ekstraksi Daun Kelor (*Moringa oleifera*)

Ekstrak daun kelor dibuat dengan ekstraksi maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Daun kelor yang telah didapat dibersihkan dengan menggunakan air kemudian diblender (tanpa air). Setelah diblender potongan daun kelor dikeringkan dengan cara dijemur. Setelah kering, potongan daun kelor seberat 500g direndam selama 24 jam di dalam ethanol 96% sebanyak 1000 ml untuk membuat larutan stok. Setelah direndam selanjutnya bahan tersebut disaring sehingga diperoleh hasil akhirnya berupa ekstrak daun kelor konsentrasi 100%.

## 5.1.2 Hasil Identifikasi Bakteri

Bakteri yang digunakan merupakan bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Identifikasi bakteri ini diawali dengan metode pewarnaan Gram, kultur bakteri pada media *MacConkey*, *Mueller Hinton*, dan *oxidase strip test*. Pewarnaan Gram menunjukkan hasil berupa bakteri Gram negatif dengan bentuk batang

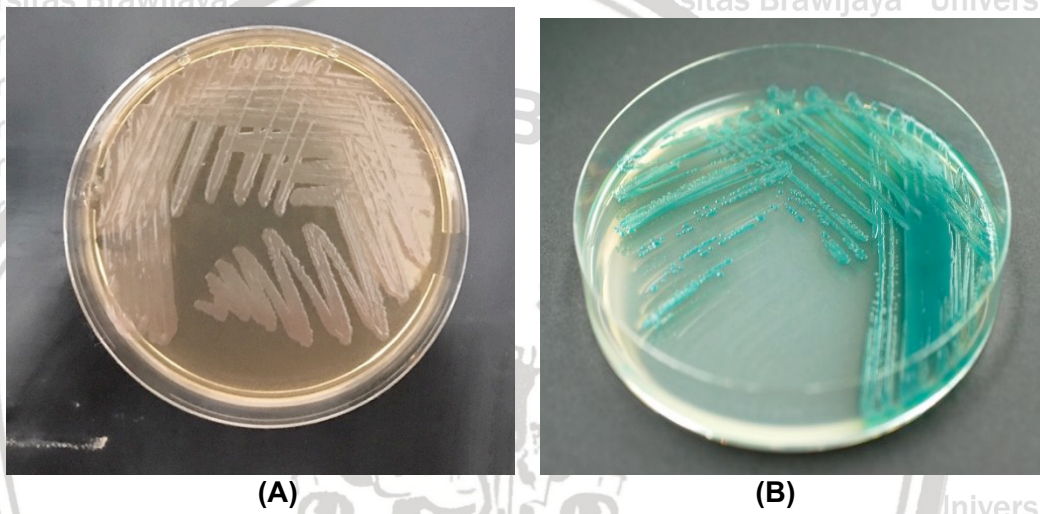


seperti pada **Gambar 5.1**.

**Gambar 5.1** Hasil Pewarnaan Gram Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

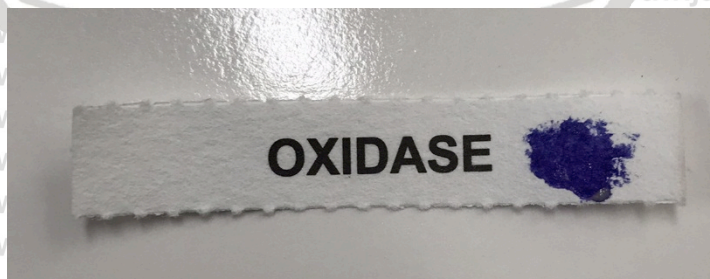


Perbenihan pada media *MacConkey* menunjukkan pertumbuhan koloni bakteri *Pseudomonas aeruginosa* tidak memfermentasi laktosa sehingga tidak berwarna di medium *MacConkey* dan pada media *nutrient agar plate* menunjukkan pertumbuhan koloni bakteri *Pseudomonas aeruginosa* memproduksi pigmen picyanin sehingga terbentuk wana biru kehijauan pada *nutrient agar plate* (Brooks et al., 2013).



**Gambar 5.2 (A)** Hasil Perbenihan Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* pada media *MacConkey* dan **(B)** pada media NAP.

Uji dilanjutkan dengan *oxidase strip test* dan didapatkan hasil berupa perubahan warna pada kertas uji dari putih menjadi ungu dalam waktu 10 detik sesuai **Gambar 5.3**. Hasil tersebut sesuai dengan *Pseudomonas aeruginosa*



yang memberikan hasil positif pada uji oksidase.

**Gambar 5.3** Hasil *Oxidase Strip Test* pada *Pseudomonas aeruginosa*



### 5.1.3 Hasil Uji Hambat Pembentuk Biofilm

Pada penelitian ini menggunakan metode dilusi tabung karena pembentukan cincin biofilm dapat dilihat secara langsung. Cincin biru keunguan yang terbentuk pada tabung didokumentasikan dalam bentuk foto yang kemudian dilakukan pengamatan dengan melihat intensitas warna cincin pada masing-masing tabung dan dikuantifikasikan dengan sistem skoring. Konsentrasi terendah dimana tidak ditemukan terbentuknya cincin biofilm pada dinding tabung ditetapkan sebagai KHBM.

Uji pendahuluan dilakukan untuk menentukan konsentrasi yang akan digunakan pada penelitian sesungguhnya (inti). Konsentrasi pada uji pendahuluan adalah 0%; 3,125%; 6,25%; 12,5%; 25%; 50%. Hasil uji pendahuluan menunjukkan bahwa pada konsentrasi 25% dan 50% sudah tidak ditemukan adanya pembentukan cincin biofilm pada area *airfluid* border. Berdasarkan hasil tersebut ditentukan konsentrasi yang akan digunakan pada penelitian inti yaitu 10%, 12,5%, 15%, 17,5%, 20%, 22,5%, 25%.

Pengamatan terhadap hasil penelitian inti dilakukan terhadap ketebalan bentukan cincin pada *airfluid* border yang menandakan terbentuknya biofilm. Ketebalan cincin tersebut diamati lalu dilakukan kuantifikasi dengan sistem skoring. Penilaian visual pada metode tabung ini dilakukan oleh tiga pengamat yaitu oleh peneliti sendiri, analis yang membantu peneliti dan pengamat non-peneliti dan non-analis, untuk mengurangi terjadinya bias dalam penilaian.

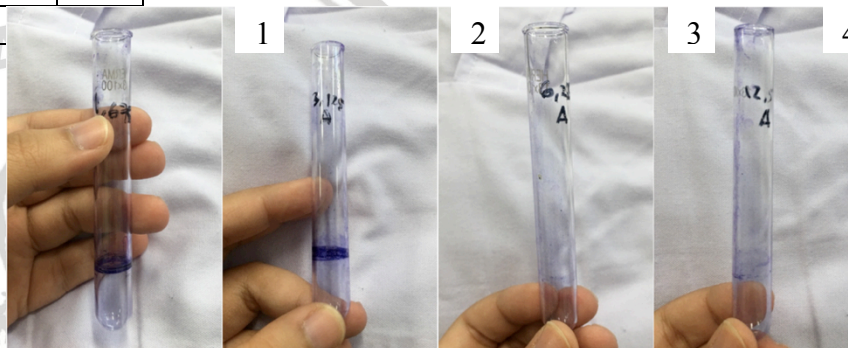


Tabel 5.1 Hasil Pengukuran

Konsentrasi	Pengulangan + Perapatan			
	I	II	III	IV
10%	3	3	3	3
12,5%	2	2	2	2
15%	2	2	1	1
17,5%	1	1	1	0
20%	0	0	0	0
22,5%	0	0	0	0
25%	0	0	0	0

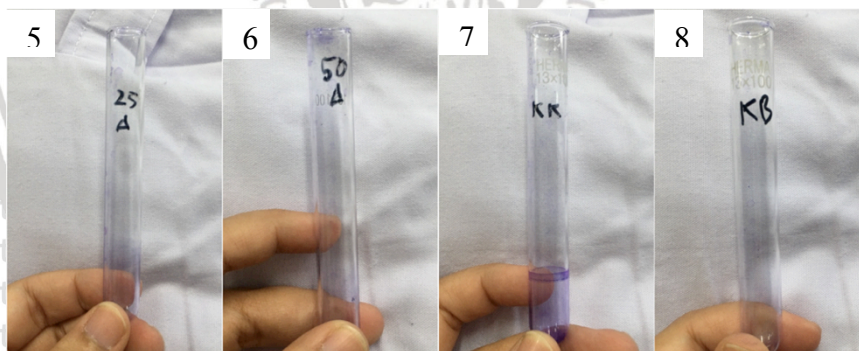
**Ketebalan cincin biofilm**

Keterangan : 0 = tidak terbentuk cincin biofilm  
 1= cincin sangat tipis  
 2 = cincin tipis  
 3 = cincin tebal



Gambar 5.4 Hasil Uji

Hambat Pembentukan Biofilm



**Pendahuluan**

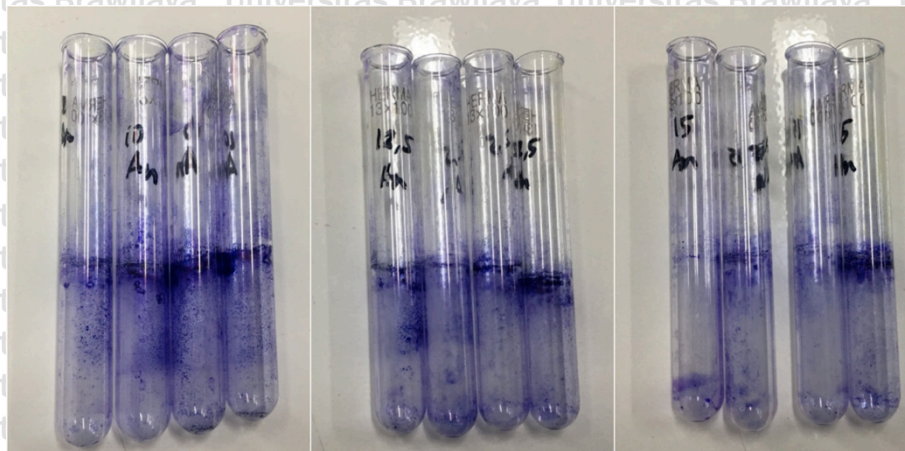
Keterangan :  
 (1) konsentrasi 1,675%,  
 (2) konsentrasi 3,125%,  
 (3) konsentrasi 6,25%, (4) konsentrasi 12,5%

(5) konsentrasi 25%, (6) konsentrasi 50%, (7) konsentrasi kuman, (8) konsentrasi ekstrak  
 Secara visual, cincin biofilm tidak nampak pada konsentrasi 25% dan 50%

Penelitian ini kemudian dilanjutkan dengan perapatan konsentrasi dari 10% sampai 25% menjadi 7 konsentrasi yaitu 10%, 12,5%, 15%, 17,5%, 20%, 22,5%, 25% dan pengulangan dilakukan sebanyak 4 kali. Hasil penelitian ini secara visual menunjukkan bahwa pada konsentrasi 20% sudah terjadi hambatan pembentukan biofilm *Pseudomonas aeruginosa*.





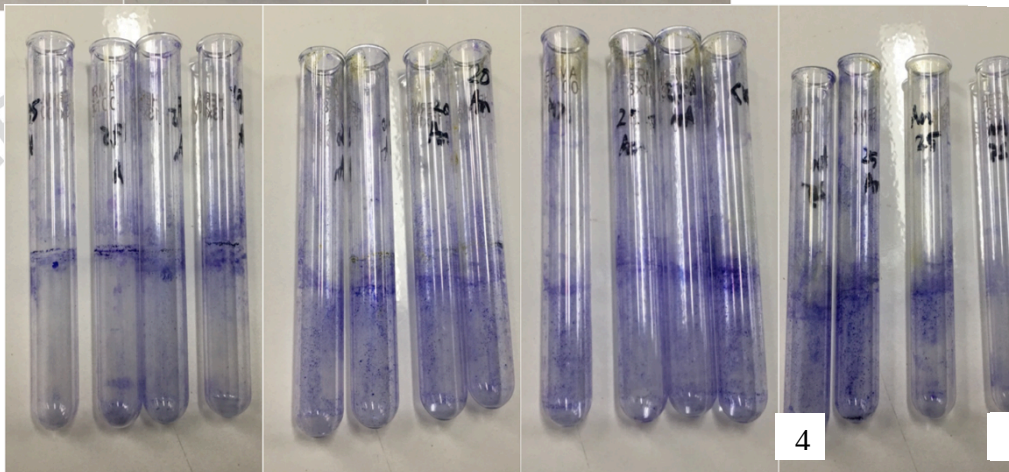


**Gambar 5.5**  
 Hasil Uji Hambat Pembentukan Biofilm perapatan dan pengulangan 1 – 4

Keterangan :

- (1) konsentrasi 10%,
- (2) konsentrasi 12,5%,
- (3) konsentrasi 15%,
- (4) konsentrasi 17,5%
- (5) konsentrasi 20%,
- (6) konsentrasi 22,5%,
- (7) konsentrasi 25%

Secara visual, cincin biofilm terhambat pada konsentrasi 20%.



**5.2 Analisis Data**

Hasil penelitian dinilai dengan cara pengamatan secara langsung dan uji statistik. Pada penelitian ini data merupakan data ordinal sehingga menggunakan analisis data berupa uji nonparametrik. Data ordinal dari penelitian ini adalah variabel penelitian berupa tingkat ketebalan cincin biofilm. Uji nonparametrik yang dilakukan meliputi uji Kolmogorov-Smirnov dan Shapiro-Wik, *Kruskal Wallis*, uji *Mann-Whitney*, dan uji korelasi *Spearman*.





Untuk menguji apakah sampel memiliki distribusi normal atau tidak maka digunakan uji statistik Kolmogorov-Smirnov dan Shapiro-Wik terhadap masing-masing variabel. Suatu data dianggap tersebar normal bila hasil uji normalitas menunjukkan  $p > 0,05$ , dan dianggap homogen jika hasil uji homogenitas menunjukkan  $p > 0,05$ .

Hasil uji normalitas Kolmogorov-Smirnov dan Shapiro-Wik menunjukkan  $p = 0,000$  maka dapat disimpulkan bahwa data tidak normal. Berdasarkan hasil ini dapat dilakukan uji statistik non parametrik.

Kemudian dilakukan uji Kruskal Wallis yaitu statistik non-parametrik. Uji ini dilakukan untuk mengetahui perbedaan beberapa konsentrasi ekstrak etanol daun kelor terhadap pertumbuhan biofilm. Hipotesis yang dibuat berdasarkan data yang ada adalah  $H_0$  dan  $H_1$ . Makna  $H_0$  dalam uji statistik ini adalah tidak terdapat perbedaan efek antibiofilm pada setiap pemberian ekstrak etanol daun kelor dalam beberapa konsentrasi terhadap pertumbuhan biofilm *Pseudomonas aeruginosa*. Makna  $H_1$  dalam uji statistik ini adalah terdapat perbedaan efek antibiofilm pada setiap pemberian ekstrak etanol daun kelor dalam beberapa konsentrasi terhadap pertumbuhan biofilm *Pseudomonas aeruginosa*. Hasil  $H_0$  diterima jika nilai signifikansi lebih dari 0,05 ( $p > 0,05$ ) dan ditolak jika nilai signifikansi kurang dari 0,05 ( $p < 0,05$ ).

Nilai signifikansi yang didapat melalui uji *Kruskal Wallis* adalah 0,000. Nilai signifikansi sebesar 0,000 ini mempunyai arti bahwa  $H_0$  ditolak dan  $H_1$  diterima. Hal ini dikarenakan nilai 0,000 adalah kurang dari 0,05. Kesimpulan yang dapat ditarik melalui hasil analisis uji *Kruskal Wallis* adalah terdapat perbedaan efek antibiofilm pada setiap pemberian ekstrak etanol daun kelor dalam beberapa konsentrasi terhadap pertumbuhan biofilm *Pseudomonas*



*aeruginosa*.

Uji Mann Whitney digunakan sebagai uji perbandingan berganda (*multiple comparison*) pada penelitian ini, yaitu data kuantitatif mengenai pembentukan cincin biofilm bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang dihasilkan pada media tabung. Uji ini dilakukan untuk mengetahui signifikan atau tidak, perbedaan yang didapatkan dari perbandingan setiap dua konsentrasi ekstrak.

**Tabel 5.1** merupakan ringkasan hasil uji *Mann-Whitney* dari tabel hasil uji *Mann-Whitney* yang ada pada lampiran. Perbedaan antar dua konsentrasi ekstrak yang berbeda dikatakan berbeda signifikan jika nilai signikansi kurang dari 0,05 ( $p < 0,05$ ) dan tidak berbeda signifikan jika nilai signifikansi lebih dari 0,05 ( $p > 0,05$ ).

**Tabel 5.1 Ringkasan Hasil Uji *Mann-Whitney***

Perbandingan Antarperlakuan		Sig.
0%	10%	1,000
	12,5%	0,029
	15%	0,029
	17,5%	0,029
	20%	0,029
	22,5%	0,029
	25%	0,029
10%	12,5%	0,029
	15%	0,029
	17,5%	0,029
	20%	0,029
	22,5%	0,029
12,5%	15%	0,343
	17,5%	0,029
	20%	0,029
	22,5%	0,029
	25%	0,029
15%	17,5%	0,200
	20%	0,029
	22,5%	0,029
	25%	0,029
17,5%	20%	0,114
	22,5%	0,114
	25%	0,114



20%	22,5%	1,000
	25%	1,000
22,5%	25%	1,000

Interpretasi dari hasil uji *Mann-Whitney* yang dapat dilihat pada tabel ringkasi di atas adalah sebagai berikut:

1. Pembentukan cincin biofilm bakteri *Pseudomonas aeruginosa* pada konsentrasi 0% berbeda signifikan terhadap konsentrasi 12,5%, 15%, 17,5%, 20%, 22,5% dan 25%, namun tidak berbeda signifikan terhadap konsentrasi 10%.
2. Pembentukan cincin biofilm bakteri *Pseudomonas aeruginosa* pada konsentrasi 10% berbeda signifikan terhadap konsentrasi 12,5%, 15%, 17,5%, 20%, 22,5% dan 25%.
3. Pembentukan cincin biofilm bakteri *Pseudomonas aeruginosa* pada konsentrasi 12,5% berbeda signifikan terhadap konsentrasi 17,5%, 20%, 22,5% dan 25%, namun tidak berbeda signifikan terhadap konsentrasi 15%
4. Pembentukan cincin biofilm bakteri *Pseudomonas aeruginosa* pada konsentrasi 15% berbeda signifikan terhadap konsentrasi 20%, 22,5% dan 25%, namun tidak berbeda signifikan terhadap konsentrasi 17,5%.
5. Pembentukan cincin biofilm bakteri *Pseudomonas aeruginosa* pada konsentrasi 17,5% tidak berbeda signifikan terhadap konsentrasi 20%, 22,5% dan 25%.
6. Pembentukan cincin biofilm bakteri *Pseudomonas aeruginosa* pada konsentrasi 20% tidak berbeda signifikan terhadap konsentrasi 22,5% dan 25%.



7. Pembentukan cincin biofilm bakteri *Pseudomonas aeruginosa* pada konsentrasi 22,5% tidak berbeda signifikan terhadap konsentrasi 25%.

Analisa data yang terakhir adalah uji *Spearman* yaitu uji korelasi yang dilakukan jika data berupa nonparametrik. Uji ini dilakukan untuk mengetahui hubungan antara pemberian ekstrak etanol daun kelor dalam beberapa konsentrasi terhadap biofilm bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Uji ini juga dilakukan untuk mengetahui arah hubungan tersebut. Uji variabel dikatakan mempunyai hubungan signifikan jika nilai signifikansi kurang dari 0,05 ( $p < 0,05$ ).

Nilai signifikansi dari hasil uji *Spearman* yaitu 0,000. Hal ini mempunyai arti bahwa terdapat hubungan yang signifikan antara pemberian ekstrak daun kelor dalam beberapa konsentrasi terhadap biofilm bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

Nilai koefisien korelasi dari hasil uji *Spearman* yaitu -0,950. Tanda negatif pada koefisien tersebut mempunyai arti bahwa arah hubungannya adalah berkebalikan. Arah hubungan berkebalikan diartikan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol daun kelor yang diberikan, maka pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* semakin menurun.

## BAB 6

### PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui potensi ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) dalam menghambat pembentukan biofilm bakteri *Pseudomonas aeruginosa* secara *in vitro*. Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ditanam pada tabung dengan medium *TSB Glucose* yang diberi perlakuan berupa pemberian ekstrak etanol daun kelor (*Moringa oleifera*) dengan konsentrasi tertentu. Ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) berasal dari serbuk atau simplisia daun kelor seberat 500gr yang diperoleh langsung dari Laboratorium Materia Medika Batu, Malang. Simplisia daun kelor (*Moringa oleifera*) tersebut kemudian diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol absolut di Laboratorium Fakultas Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang. Dengan menggunakan metode ini, prosedur dan peralatan yang digunakan lebih sederhana dan metode maserasi dilakukan tanpa adanya proses pemanasan sehingga bahan aktif yang dihasilkan lebih sesuai.

Hasil penelitian inti secara visual menunjukkan bahwa pada konsentrasi 20% sudah terjadi hambatan pembentukan biofilm *Pseudomonas aeruginosa*. Pengamatan pembentukan biofilm secara kualitatif dan Kadar Hambat Biofilm Minimal (KHBM) diketahui dengan melihat adanya pembentukan cincin pada dinding tabung yang berwarna biru keunguan. Sebelumnya, diberi perlakuan untuk meningkatkan keakuratan dan untuk mengidentifikasi biofilm secara kuantitatif dengan pemberian zat pewarna yaitu kristal violet 0,1%. Kristal violet



merupakan pewarna dasar yang mengikat molekul bermuatan negatif dan polisakarida dalam matriks ekstraseluler. Oleh karena itu, kristal violet akan mewarnai matriks biofilm. Tabung yang diisi kristal violet kemudian dibuang dan dicuci dengan air mengalir sehingga kristal violet akan tetap melekat pada bagian yang terdapat biofilm. Kadar Hambat Biofilm Minimal (KHBM) yang ditemukan pada penelitian ini, yaitu pada kadar 20%.

Faktor penurunan pertumbuhan cincin biofilm bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dalam penelitian ini diduga karena ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) memiliki efek untuk menghambat biofilm *Pseudomonas aeruginosa* dengan senyawa-senyawa kimia aktif yang dimilikinya seperti flavonoid, tannin, dan alkaloid. Senyawa aktif tersebut dapat berperan dalam menghambat pembentukan biofilm dengan menghambat ekspresi gen *icaA* dan *icaD* (Lee *et al.*, 2013). Gen *icaA* dan *icaD* dapat meregulasi pembentukan *Polysaccharide Intercellular Adhesin* (PIA) melalui aktivasi faktor sigma yang dapat mengaktifkan *Staphylococcal accessory regulator A* (*sarA*), yang kemudian *sarA* dapat mengaktifkan bagian promotor *ica* (Arciola *et al.*, 2012). Dengan penghambatan ekspresi gen *ica* ini, tanin dan flavonoid juga dapat menghambat adhesi sel bakteri, baik perlekatan bakteri dengan permukaan substrat maupun perlekatan antar bakteri, dengan adhesi merupakan faktor utama dalam pembentukan biofilm (Nuryastuti, 2010).

Penelitian Vikram, *et al.* (2010) dan Taganna, *et al.* (2011) menunjukkan bahwa flavonoid dan tanin dapat menghambat *quorum sensing* pada bakteri *Chromobacterium violaceum*, *Escherichia coli* dan *Vibrio harveyi*. *Quorum sensing* atau komunikasi antar sel merupakan faktor yang berpengaruh dalam proses pembentukan biofilm (Yarwood, *et al.*, 2004). Selain itu, tanin dan

flavonoid merupakan golongan polifenol yang dapat berperan dalam menghambat pembentukan biofilm dengan cara mereduksi sifat hidrofobik bakteri yang menjadi faktor penting dalam adhesi sel bakteri ke substrat (Jagani *et al.*, 2008 ; Okada *et al.*, 2008).

Dilakukan tes *Mann Whitney* sebagai uji perbandingan berganda (*multiple comparison*) untuk mengetahui signifikan atau tidak, perbedaan yang didapatkan dari perbandingan setiap dua konsentrasi ekstrak. Nilai  $p < 0,05$  menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara dua kelompok perlakuan. Didapatkan hasil antar masing-masing kelompok konsentrasi yang dibandingkan memiliki efek yang signifikan. Setelah itu, dilakukan Uji Korelasi Pearson untuk mengetahui hubungan antara pemberian ekstrak etanol daun kelor dalam beberapa konsentrasi terhadap biofilm bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Hasil uji korelasi *spearman* pada penelitian ini adalah  $R = -0.950$  dan  $p = 0.000$  ( $p < 0,05$ ) memiliki arti adanya signifikansi yang memiliki arah korelasi negatif dan korelasi sangat yang kuat.

Berdasarkan hasil penelitian dan analisis data, ekstrak daun kelor memiliki efek menghambat biofilm *Pseudomonas aeruginosa* secara *in vitro*. Penebalan cincin biofilm semakin berkurang pada setiap kenaikan konsentrasi dari ekstrak etanol daun kelor dan tidak terlihat pada konsentrasi 20%. Efek penambahan konsentrasi ekstrak tersebut berpengaruh secara signifikan terhadap pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Dari penjelasan diatas, maka ekstrak daun kelor, sesuai dengan hipotesa, dapat digunakan sebagai antibiofilm.

Manfaat klinis yang dapat dikembangkan dari hasil penelitian ini adalah penggunaan daun kelor sebagai alternatif terapi pada infeksi *Pseudomonas*



*aeruginosa*. Diharapkan bahwa pembentukan biofilm *Pseudomonas aeruginosa* dapat dicegah sehingga dapat mengurangi morbiditas penyakit infeksi dan resistensi antibiotik.

Keterbatasan pada penelitian ini adalah terdapat factor perancu atau *cofounding factor* yang belum dapat dikendalikan, sehingga dapat mempengaruhi hasil penelitian. Penelitian ini tidak menggunakan zat aktif daun kelor secara langsung dikarenakan proses ekstraksi yang tidak secara spesifik menghasilkan satu jenis zat aktif. Berdasarkan keterbatasan tersebut, belum diketahui secara pasti zat aktif manakah yang paling berperan dalam menghambat proses pembentukan biofilm. Oleh karena itu, dibutuhkan penelitian lebih lanjut mengenai masing-masing zat aktif yang terkandung dalam daun kelor dalam menghambat pembentukan biofilm.

Penelitian ini bersifat *in vitro* sehingga perlu dilakukan penelitian lanjutan secara *in vivo* untuk mengetahui efisiensi ekstrak etanol daun kelor terhadap pertumbuhan biofilm yang terdapat pada jaringan hidup.

## BAB 7

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 7.1 Kesimpulan

Kesimpulan dari penelitian ini adalah ekstrak etanol dari daun kelor (*Moringa oleifera*) mampu menghambat pembentukan biofilm *Pseudomonas aeruginosa* secara *in vitro*. Kadar Hambat Biofilm Minimal (KHBM) ekstrak daun kelor untuk menghambat pembentukan biofilm bakteri *Pseudomonas aeruginosa* adalah sebesar 20% dan Hasil uji korelasi spearman menunjukkan terdapat hubungan yang signifikan antara pemberian ekstrak daun kelor dalam beberapa konsentrasi terhadap biofilm bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

#### 7.2 Saran

Berdasarkan hasil dan proses penelitian dari saya menyarankan hal-hal sebagai berikut:

1. Penelitian dengan ekstrak yang berbeda pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dalam menghambat biofilm.
2. Penelitian lebih lanjut mengenai zat aktif yang terkandung dalam daun kelor (*Moringa oleifera*) yang dapat berperan sebagai penghambat pembentukan biofilm.
3. Potensi untuk mengembangkan penelitian yang menggunakan ekstrak daun kelor dalam menghambat biofilm pada bakteri yang lain atau jamur.
4. Dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengikuti perjalanan pengaruh ekstrak etanol daun kelor dalam menghambat pembentukan biofilm *Pseudomonas aeruginosa* dalam waktu ke waktu.





## DAFTAR PUSTAKA

Aini N., dan Setyawan AD. Senyawa Bioaktif Penghambat Sistem *Quorum Sensing* pada Bakteri Gram Negatif. 2006, hal. 34-38.

Aparna, M.S. and S. Yadav. 2008. *Biofilm: microbes and disease, Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 12:6.

Archer, N.K., M.J. Mazaitis, J.W. Costerton, J.G. Leid, M.E. Powers, M.E. Shirtliff. 2011. *Staphylococcus Aureus Biofilms Properties, Regulation and Roles in Human Disease*. Landes Bioscience. *Virulence* 2:5, 445- 459.

Arciola, C.R., D. Campoccia, P. Speziale, L. Montanaro, J.W. Costerton. 2012. *Biofilm Formation in Staphylococcus Implant Infections. A Review of Molekular Mechanisms and Implications for Biofilm- Resistant*. Elsevier. *Biomaterial*, vol 33, issue 26.

Brooks, G.F., Carroll, K.C., Butel, J.S., dan Morse, S.A. 2007. *Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology*. 24th ed. United States of America: The McGraw-Hill Companies, Inc.

Characklis, W., & Marshall, K. C. 1990. *Biofilms: A basis for an interdisciplinary approach, 3-15. Biofilms*. Wiley-Interscience, New York, NY.

Davies, D. G., & Marques, C. N. 2009. *A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms*. *Journal of bacteriology*, 191(5), 1393-1403.

Gunardi, W. D. 2014. *Peranan Biofilm dalam Kaitannya dengan Penyakit Infeksi*. *Jurnal Kedokteran Meditek*, 15(39A).

Harborne, J. B. 1996. *Metode Fitokimia. Terbitan ke-II*. a.b. Kosasih Padmawinata. Penerbit ITB. Bandung.

Hargono, D. dkk., 1986. *Sediaan Galenik*, Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan (BPOM), Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta.

Hirasawa M, et al., 1999. *The Kinds of Antibacterial Substances from Lentinus adobes Singshitake an Edible Mushroom*, *International Journal of Antibacterial Agents* 11:1561-157.

Jagani, S., R. Chelikani, D. Kim, 2008. *Effect of Phenol and Natural Phenolic Compounds on Biofilm Formation by Pseudomonas auginosa*. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research* Volume 25, Issue 4.



Kining E., Falah S., dan Nurhidayat N. Aktivitas Antibiofilm Ekstrak Air Daun Pepaya (*Carica papaya* L.) terhadap Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* secara *In Vitro*. *Current Biochemistry*, 2016, vol. 2 (3): 150-155.

Koh, C.-L., Sam, C.-K., Yin, W.-F., Tan, L., Krishnan, T., Chong, Y. and Chan, K.-G. (2013). Plant-Derived Natural Products as Sources of Anti-Quorum Sensing Compounds. *Sensors*, 13(5), pp.6217–6228.

Lee, J-H., J.H. Park, H.S. Cho, S.W. Joo, M.H. Cho, J. Lee. 2013. Anti- biofilm Activities of Quercetin and Tannic Acid Against *Staphylococcus aureus*. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*. Vol 29, Issue 5.

Marić, S., & Vraneš, J. 2007. Characteristics and significance of microbial biofilm formation. *Periodicum Bilogorum*, 109, 115-121.

Nihi, S. 2010. Gambaran penderita infeksi nosokomial pada pasien rawat inap di rsup dr. Wahidin sudirohusodo tahun 2010. *Skripsi*. Universitas Hasanuddin. Makassar.

Nuryastuti, T. 2010. Environmental Signals Affecting *ica*-expression in *Staphylococcus epidermidis* Biofilm [Thesis]. University Medical Center Groningen, University of Groningen, Netherlands.

Okada, A., E. Sato, T. Kouchi, R. Kimizuka, T. Kato, K. Okuda. 2008. Inhibitory Effect of Cranberry Polyphenol on Cariogenic Bacteria. *Bull Tokyo Dent Coll*, 49(3):107-112.

Prakash B., B.M. Veeregowda and G. Krishnappa. 2003. Biofilms: A Survival Strategy of Bacteri. *Current Sci.*, 85: 1299-1307

Puspitasari Y. Aktivitas Ekstrak Etanol 96% Daun Cincau Hijau (*Cyclea barbata* L. Miers) Sebagai Penghambat Pembentukan Biofilm *Eschericia coli*. *Skripsi*. Tidak Diterbitkan. Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Jember. 2015, hal. 8-9.

Radji, M., Fauziah, S., & Aribinuko, N. 2011. Antibiotic sensitivity pattern of bacterial pathogens in the intensive care unit of Fatmawati Hospital, Indonesia. *Asian Pacific Journal Of Tropical Biomedicine*, 1(1), 39-42.

Rohde, H., S. Frankenberger, U. Zahringer, D. Mack. 2010. Structure, Function and Contribution of Polysaccharide Intercellular Adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* Biofilm Formation and Pathogenesis of Biomaterial- Associated Infections. Elsevier. *European Journal of Cell Biology*, vol 89, issue 1.

Shahriar, M., I. Hossain, A.N. Mahar, S. Akhter, A. Haque, M.A Bhuiyan. 2012. Preliminary Phytochemical Screening, In-Vitro Antioxidant and Cytotoxic Activity of Five Different Extracts of Moringa Oleifera Leaf. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 02 (05); 65-68.

Taganna, J.C., J.P. Quanico, R.M. Perono, E.C. Amor, W.L. Rivera. 2011. Tannin-rich Fraction from Terminalia catappa Inhibits Quorum Sensing (QS) in Chromobacterium violaceum and the QS-Controlled Biofilm Maturation and LasA Staphylolytic Activity in Pseudomonas aeruginosa. *Journal Ethnopharmacol.* 2011 Apr 12;134(3):865-71.

Todar, K. 2006. *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. Madison, Wisconsin: University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology.

Trad and Med, J. 2013. Anti quorum sensing activity of kayu manis leaves extracts (Cinnamomun burmannii Ness. Ex Bl.) Against Pseudomonas Aeruginosa Daya Anti Quorum Sensing Ekstrak Daun Kayu Manis (Cinnamomun Burmannii Ness. Ex Bl.) Terhadap Pseudomonas aeruginosa. *Traditional Medicine Journal*, 18(3), p.2013.

Vikram, A., G.K. Jayaprakasha, P.R. Jesudhasan, S.D. Pillai, B.S. Patil. 2010. Suppression of Bacterial Cell-Cell Signalling, Biofilm Formation and Type III Secretion System by Citrus Flavonoids. *Journal Appl Microbiol.* 2010 Aug;109(2):515-27.

Wangi, R. P. L., Suswati, E., & Wisudanti, D. D. 2017. *Aktivitas Ekstrak Metanol Bawang Putih (Allium sativum) sebagai Penghambat Pembentukan Biofilm pada P. aeruginosa (The Activity of Methanolic Extract of Garlic (Allium sativum) in Inhibiting Growth of Biofilm in P. aeruginosa ). Pustaka Kesehatan*, 5(3), 537-543.