

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini digunakan untuk mengetahui efek ekstrak bunga Cengkeh (*Syzygium aromaticum*) dalam menghambat pembentukan biofilm pada bakteri *S.aureus* secara *in vitro*. Untuk menilai kemampuan ekstrak bunga Cengkeh ini, digunakan metode *microtiter plate test* yang merupakan uji kuantitatif (Jain, 2008). Kemudian setelah melakukan prosedur yang telah ditentukan, maka kita akan mendapatkan suatu nilai yaitu OD (*Optical Density*) biofilm yang diukur dengan menggunakan spektrofotometer. Nilai ini kemudian dianalisis untuk menjawab pertanyaan dari tujuan penelitian ini.

Bakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah bakteri *S.aureus* isolat swab tenggorok milik Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Sebelum digunakan untuk penelitian, bakteri ini terlebih dahulu diinokulasikan pada medium *Chrom Agar* selama 24 jam, setelah itu akan terlihat koloni berwarna merah muda. Metode ini mempunyai sensitivitas 95,5% dan spesifitas 99,4% (Nurkusuma, 2009). Kemudian dilakukan tes identifikasi bakteri yaitu pengecatan Gram, dan uji katalase. Hasil dari pengecatan Gram dapat dilihat dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran obyektif 100x dengan terlebih dahulu diberi minyak emersi, dan didapatkan hasil bakteri yang berbentuk bulat berwarna biru keunguan yang merupakan pertanda bahwa ini adalah bakteri Gram positif. Warna ini merupakan warna dasar bakteri dan tetap bertahan setelah dilakukan proses pelunturan (*decolorized*) dengan alkohol 96%. Pada bakteri Gram positif, apabila diwarnai akan terbentuk kompleks protein

ribonukleat yang dapat mempertahankan warna dasar setelah dilakukan proses pelunturan, adanya ester fosforik, dan pada pH 2 bakteri Gram positif mempunyai titik isoelektrik lebih rendah (Dzen *dkk.*, 2010). Identifikasi selanjutnya adalah uji katalase, menunjukkan adanya gelembung udara yang berarti bahwa katalase positif, yaitu bakteri ini merupakan bakteri *Staphylococcus spp.* Untuk memastikan bahwa koloni ini adalah *Staphylococcus aureus*, dilakukan tes sensitivitas terhadap cakram antibiotik sefoksitin. Sensitivitas kuman akan dinilai berdasarkan ukuran area pada permukaan media yang diinhibisi oleh antibiotik, dan didapatkan koloni sensitif terhadap cakram. Seluruh pemeriksaan identifikasi bakteri tersebut maka dapat dibuktikan bahwa isolat bakteri yang dipakai dalam penelitian ini adalah *Staphylococcus aureus* (Todar, 2008).

Setelah proses identifikasi bakteri selesai, dilakukan uji pembentukan biofilm dengan menggunakan metode *Congo Red Agar*. *Congo Red Agar* merupakan metode kualitatif yang dapat digunakan dalam pendeteksian bakteri pembentuk biofilm (Jain, 2008). Komposisi yang ada pada *congo red* antara lain adalah *congo red dye* (0.8 Gram), sukrosa (36 Gram), *Brain Heart Infusion Agar* (52 Gram), dan air (1000 mL) (Freeman et al., 1989). Kemudian bakteri diinokulasikan pada medium *Congo Red Agar* selama 24 jam pada suhu 37°C. Hasil yang didapat adalah adanya koloni berwarna hitam yang menunjukkan bahwa bakteri ini menghasilkan biofilm. *Congo red agar* dapat berinteraksi secara langsung dengan *polysaccharide intercellular adhesin* dan membentuk suatu kompleks warna. Koloni berwarna hitam sepertinya didapatkan dari perubahan metabolik dari pewarna (Jain, 2008). Selain itu, ada penelitian lain yang menyatakan bahwa bakteri penghasil biofilm memiliki gen *icaA* dan *icaD*, yang jika terekspresi secara bersamaan akan menghasilkan biofilm. Dari kedua

gen inilah yang mungkin menyebabkan munculnya koloni bias berwarna hitam (Aricola *et al.*, 2002). Pengujian dengan media *Congo red agar* dilakukan karena tidak semua strain *Staphylococcus aureus* dapat membentuk biofilm, menurut Pace *et al* (2006) pertumbuhan biofilm dipengaruhi oleh ekspresi lima gen yang membantu bakteri biofilm untuk beradaptasi pada permukaan *adheren*. Tiga gen masing-masing mengkode sebuah enzim jalur glikolisis atau fermentasi, di mana dapat merefleksikan penurunan ketersediaan oksigen. Dua gen yang lain mengkode enzim yang dapat membantu *Staphylococcus aureus* beradaptasi pada keterbatasan nutrisi. Dalam penelitian ini didapatkan satu isolat bakteri *Staphylococcus aureus* pembentuk biofilm yang kemudian dipakai dalam uji hambat biofilm.

Ekstrak yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak bunga cengkeh (*Syzygium aromaticum*). Ekstrak didapatkan dengan cara ekstraksi metode maserasi menggunakan pelarut metanol 96%. Ekstraksi dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Menurut Cristina (2002) dan Mu'nisa (2012) hasil pemeriksaan fitokimia pada ekstrak metanol menunjukkan bahwa cengkeh dan fraksi-fraksi bunga cengkeh mengandung eugenol, tannin, polifenol, kuinon, triterpenoid dan flavonoid. Eugenol termasuk dalam senyawa fenol. Metanol merupakan pelarut yang paling baik dalam mengekstrak senyawa fenol (Przybylski *et al.*, 2001). Selain itu, pelarut metanol bereaksi netral dan stabil secara fisika dan kimia terhadap zat terlarut, dalam hal ini minyak bunga cengkeh.

Sebelum dilakukan perlakuan terhadap bakteri *S.aureus* penghasil biofilm ini, dilakukan eksplorasi konsentrasi ekstrak terlebih dahulu untuk menentukan konsentrasi yang akan dipakai. Dari hasil ekplorasi, ditemukan konsentrasi yang

akan digunakan untuk penelitian ini, yaitu konsentrasi 0% (kontrol positif), 0,0009375%, 0,00185%, 0,00375%, 0,0075%, 0,015%, 0,03%, dan 0,06%. Konsentrasi dibuat secara serial untuk memudahkan pembuatan larutan ekstrak. Kecilnya angka konsentrasi ekstrak yang digunakan peneliti disebabkan karena ekstrak yang begitu pekat mengganggu pewarnaan biofilm dan hasil yang didapatkan menjadi tidak valid, sehingga peneliti menurunkan dosis dibawah 1%.

Setelah menemukan konsentrasi yang akan digunakan, maka kita melakukan pengukuran terhadap OD Biofilm dengan menggunakan spektrofotometer. Metode dengan *microtiter plate test* ini memiliki sensitifitas 97,1%, spesifisitas 97,5% dan ketepatan 97,2% dalam mendeteksi pembentukan biofilm *Staphylococci* (Mathur *et al.*, 2006). Prosedur pemberian ekstrak terhadap bakteri pembentuk biofilm dan mengukur nilai OD Biofilm dengan menggunakan spektrofotometer ini diulang sebanyak delapan kali. Hasil yang didapatkan menunjukkan bahwa semua konsentrasi dapat menghambat pembentukan biofilm yang dihasilkan *S. aureus*, karena OD biofilm bakteri yang diberi perlakuan berupa ekstrak selalu lebih rendah dari OD biofilm bakteri yang tidak diberi ekstrak (kontrol kuman).

Langkah selanjutnya yang dilakukan adalah memastikan adanya hubungan antara pemberian ekstrak bunga cengkeh dengan OD biofilm bakteri menggunakan program SPSS 16.0 *for Windows*. Analisis yang digunakan pertama adalah metode *One-way Anova*, didapatkan nilai signifikansi $p = 0,000$ ($p < 0,05$), hal ini berarti terdapat setidaknya dua kelompok data yang memiliki perbedaan OD biofilm bakteri secara bermakna. Untuk mengetahui kelompok data yang memiliki perbedaan tersebut, maka dilakukan *Post-Hoc Multiple*

Comparison Test. Pada percobaan ini, konsentrasi ekstrak mulai dari 0.00185% sudah dapat menghambat pertumbuhan biofilm.

Selanjutnya untuk mengetahui seberapa besar pengaruh pemberian ekstrak bunga cengkeh terhadap penghambatan pembentukan biofilm dapat digunakan dengan melakukan Uji Korelasi *Pearson*. Hasil yang didapatkan menunjukkan *standart coefficient beta* (r)= -0.491, hal ini berarti pemberian ekstrak bunga cengkeh cukup kuat memiliki pengaruh yang tinggi terhadap penghambatan pembentukan biofilm. Hasil dari *standart coefficient beta* yang negatif menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi ekstrak bunga cengkeh maka semakin kecil OD biofilm nya, yang berarti semakin rendah kepadatan bakteri dan semakin rendah pembentukan biofilmnya.

Dari hasil analisis yang didapat menunjukkan bahwa ekstrak metanol bunga cengkeh dapat menghambat pertumbuhan biofilm dari bakteri *S.aureus* mulai dari konsentrasi 0,00185%. Kandungan pada bunga cengkeh yang berperan dalam menghambat pembentukan biofilm adalah eugenol, flavonoid, tannin, terpenoid. Burt (2004) menyatakan bahwa kemampuan minyak cengkeh dalam menghambat pertumbuhan bakteri disebabkan adanya kandungan *eugenol* yang tinggi. Bunga cengkeh mengandung minyak atsiri dengan eugenol sebesar 72,98% (Sukandar, 2010). Eugenol merupakan salah satu senyawa fenol. Ekstrak metanol cengkeh mengandung total fenol $63,14 \pm 1.86$ mg/ml lebih tinggi daripada plarut etanol dan aquades. Li *et al* (2012) dalam penelitiannya menerangkan eugenol penting dalam menghambat pembentukan biofilm melalui pengahambatan pada glukon. Karakteristik eugenol yang terpenting sebagai antibakteri yaitu sifat *hydrophobicity*. Kondisi ini menyebabkan eugenol mampu masuk ke dalam fosfolipid yang terdapat dalam membran sel bakteri dan

merusak struktur selnya. Sehingga bakteri tidak dapat tumbuh. Niu dan Gilbert (2004) menyatakan bahwa senyawa eugenol dan sinamaldehida memiliki aktivitas antibiofilm. Eugenol dalam minyak bunga cengkeh menurut tabel Davis Stout masuk dalam kategori antibakteri kerja sedang.

Efek eugenol terhadap *adherent cell* dan *subsequent* pembentukan biofilm tergantung pada waktu mula perlekatan dan konsentrasi eugenol. Pada penelitian lain, eugenol dapat menghambat pertumbuhan filamen pada sel *Candida albicans*, sehingga eugenol berpotensi dalam menghambat aktifitas biofilm candida (He M *et al.*, 2007).

Tannin memiliki kemampuan menghambat pembentukan biofilm dengan cara menghambat terjadinya koagulasi plasma yang diperlukan oleh *S.aureus* untuk membentuk *fibrin-rich biofilm*. Penghambatan koagulasi plasma ini disebabkan oleh menurunnya konsentrasi ion kalsium, terhambatnya produksi enzim, dan terganggunya reaksi enzimatik pada bakteri *S.aureus* oleh karena pemberian tannin ini (Akiyama *et al.*, 2001). *Tannin* mempunyai mekanisme untuk menginaktivasi adhesin, inhibisi enzim, disrupsi membran (Cowan, 1999) yang dapat mencegah perlekatan awal. Seperti halnya *tannin*, *terpenoid* digunakan untuk disrupsi membran dan diharapkan dapat mengganggu pembentukan biofilm pada *primary attachment*. Terpenoid dapat terakumulasi dalam jaringan lipid membran sel bakteri, dan menyebabkan terganggunya struktur dan fungsi dari membran sel disebabkan oleh ekspansi (pembengkakan) membran sel dan perubahan permeabilitas membran sel bakteri (Sikkema, 1994). Pembentukan biofilm juga dapat dihambat komunikasi mikroba atau penghambatan *quorum sensing*. Menurut Khan *et al.* (2008) minyak cengkeh mempunyai aktivitas sebagai anti-*quorum sensing* pada bakteri.

Pada penelitian yang lain (Taufik *dkk.*, 2011) didapatkan bahwa minyak cengkeh dengan konsentrasi (ekstrak:metanol) 1:1, 1:2 dan 1:3 mampu menghambat bakteri Gram Positif (*B.cereus* dan *S.aureus*) dan Gram Negatif (*E.coli* dan *Shigella sp*), daya hambat minyak cengkeh terhadap bakteri semakin besar dengan semakin tingginya konsentrasi, kemampuan penghambatan minyak cengkeh terhadap bakteri Gram positif lebih baik dibanding bakteri Gram negatif. Didukung pula dengan hasil penelitian yang menunjukkan bahwa cengkeh mempunyai aktivitas antibakteri yang paling tinggi dibandingkan rempah lainnya (bawang putih, (Leuschner dan Zamparini, 2002). Penelitian Enayati (2009) menyatakan bahwa ekstrak metanol bunga cengkeh mempunyai aktivitas untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*. Penelitian Santosaningsih *dkk.* (2011) ekstrak buah delima yang mengandung tannin, flavonoid, dan saponin dapat menghambat pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus*.

Pada setiap penurunan konsentrasi ekstrak metanol bunga cengkeh terjadi pengurangan zat aktif dari bunga cengkeh, sehingga aktivitas antibiofilmnya berkurang yang dapat ditunjukkan dengan tetap tingginya angka OD biofilm yang seiring dengan penurunan konsentrasi ekstrak bunga cengkeh. Semakin tinggi konsentrasi semakin tinggi pula kandungan zat aktif sehingga antibiofilmnya akan semakin besar dan juga sebaliknya semakin rendah konsentrasi ekstrak bunga cengkeh maka semakin sedikit kandungan zat aktif sehingga aktifitas antibiofilm akan semakin berkurang.

Aplikasi penggunaan ekstrak bunga cengkeh dapat digunakan dalam kehidupan sehari-hari, dunia medis, dan lainnya. Namun masih dibutuhkan penelitian lebih lanjut.