

## BAB 6

## PEMBAHASAN

Penelitian ini digunakan untuk mengetahui efek ekstrak biji pare (*Momordica charantia*) dalam menghambat pembentukan biofilm pada bakteri *S.aureus* secara *in vitro*. Untuk menilai kemampuan ekstrak biji pare 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 *micro plate reader*. 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 biji pare (*Momordica charantia*). Ekstrak didapatkan dengan cara ekstraksi metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Ekstraksi dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Menurut Cristina (2002) dan Mu'nisa (2012) hasil pemeriksaan fitokimia pada ekstrak etanol menunjukkan bahwa biji pare dan fraksi-fraksi biji pare mengandung eugenol, tannin, polifenol, kuinon, triterpenoid dan flavonoid. Selain itu, pelarut etanol bereaksi netral dan stabil secara fisika dan kimia terhadap zat terlarut, dalam hal ini ekstrak biji pare.

Sebelum dilakukan perlakuan terhadap bakteri *S.aureus* penghasil biofilm ini, dilakukan eksplorasi konsentrasi ekstrak terlebih dahulu untuk menentukan konsentrasi yang akan dipakai. Dari hasil eksplorasi, ditemukan konsentrasi yang akan digunakan untuk penelitian ini, yaitu konsentrasi 0% (kontrol kuman), 0,00244141%, 0,0046875%, 0,009375%, 0,01875%, 0,0375%, 0,075% dan

0,15%. 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 *micro plate reader*. 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 *micro plate reader* ini diulang sebanyak delapan kali. Hasil yang didapatkan menunjukkan bahwa semua konsentrasi dapat menghambat pembentukan biofilm yang dihasilkan *S. aureus*.

Langkah selanjutnya yang dilakukan adalah memastikan adanya hubungan antara pemberian ekstrak biji pare 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 0,00244141% sudah dapat menghambat pertumbuhan biofilm.

Selanjutnya untuk mengetahui seberapa besar pengaruh pemberian ekstrak biji pare terhadap penghambatan pembentukan biofilm dapat digunakan dengan melakukan Uji Korelasi *Pearson*. Hasil yang didapatkan menunjukkan

*standart coefficient beta*  $r = -0,116$ , hal ini berarti pemberian ekstrak biji pare memiliki pengaruh yang lemah terhadap penghambatan pembentukan biofilm. Hasil dari *standart coefficient beta* yang negatif menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi ekstrak biji pare maka semakin kecil OD biofilm nya, yang berarti semakin rendah kepadatan bakteri dan semakin rendah pembentukan biofilmnya. Hal ini sejalan dengan penelitian Santosaningsih *dkk.* (2011) dimana ekstrak buah delima yang mengandung tannin, flavonoid, dan saponin dapat menghambat pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus*.

Dari hasil analisis yang didapat menunjukkan bahwa ekstrak etanol biji pare dapat menghambat pertumbuhan biofilm dari bakteri *S.aureus* mulai dari konsentrasi 0,009375%. Kandungan pada biji pare yang berperan dalam menghambat pembentukan biofilm adalah alkaloid, terpenoid, flavonoid, tannin, terpenoid.

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, disrupti membran (Cowan, 1999) yang dapat mencegah perlekatan awal. Seperti halnya *tannin*, *terpenoid* digunakan untuk disrupti 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*.

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

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

