

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek ekstrak daun jambu biji (*Psidium folium*) dalam menghambat pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus* *in vitro*. Pengamatan pembentukan biofilm dalam penelitian ini dilakukan dengan menggunakan metode tabung (*tube method*). Dengan metode ini akan diketahui *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC) yang diamati dari formasi cincin dan dinding berwarna ungu kebiruan pada tabung (Christensen *et al*, 2000). Pengamatan biofilm secara kuantitatif dilakukan dengan mengukur intensitas warnanya yang dinyatakan dalam *mean gray value*.

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat bakteri *Staphylococcus aureus* strain pembentuk biofilm yang berasal dari *stock culture* bakteri yang disimpan di laboratorium Mikrobiologi FKUB. Bakteri yang berasal dari *stock culture* diregenerasi kembali dalam medium *Nutrient Agar Plate* (NAP) lalu diinkubasi selama 18-24 jam. Setelah dilakukan regenerasi maka dilakukan identifikasi bakteri. Pemeriksaan pertama dilakukan secara makroskopis dengan melihat bentuk dan warna koloni bakteri yang dibentuk dalam medium NAP, pada bakteri *Staphylococcus aureus* didapatkan koloni bakteri yang berbentuk bulat, halus, menonjol, berkilau; berwarna abu-abu sampai kuning keemasan. Pemeriksaan selanjutnya adalah pewarnaan Gram. Pada pewarnaan Gram dan pengamatan di bawah mikroskop perbesaran 1000x didapatkan gambaran bakteri kokus berwarna ungu yang menunjukkan sifat Gram positif, serta bergerombol.

seperti anggur. Untuk membedakan antara genus *Staphylococcus sp* dan *Streptococcus sp*, dilakukan tes katalase. Hasil positif mengindikasikan bahwa biakan bakteri yang dites adalah genus *Staphylococcus sp*. Selanjutnya dilakukan tes koagulase untuk membedakan antara *Staphylococcus aureus* dengan *Staphylococcus* koagulase negatif. Hasil positif mengindikasikan bahwa biakan bakteri yang dites adalah *Staphylococcus aureus*. Dengan seluruh pemeriksaan identifikasi bakteri tersebut maka dapat dibuktikan bahwa isolat bakteri yang dipakai dalam penelitian ini adalah *Staphylococcus aureus* (Dzen dkk, 2003; Todar, 2008).

Sebelum melakukan uji hambat pembentukan biofilm, dilakukan penelitian pendahuluan untuk menentukan strain *Staphylococcus aureus* pembentuk biofilm. Untuk mengetahui apakah bakteri ini membentuk biofilm, maka dilakukan uji pembentukan biofilm dengan menginokulasi bakteri pada *Congo Red Agar*. Hasilnya menunjukkan bakteri yang memunculkan warna hitam yang menghasilkan biofilm. Hal ini 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 diseleksi satu isolat bakteri *Staphylococcus aureus* pembentuk biofilm yang kemudian dipakai dalam uji hambat biofilm.

Ekstrak yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak daun jambu biji (*Psidium folium*). Ekstrak didapatkan dengan cara metode maserasi. Ekstraksi dilakukan di Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang. Daun jambu biji mempunyai kandungan minyak atsiri, tannin, flavonoid dan saponin yang bersifat aromatik sehingga pelarut yang digunakan adalah pelarut organik golongan alkohol yaitu etanol 96%. Ekstraksi metode maserasi digunakan karena dengan metode ini, pelarut yang digunakan yaitu etanol 96% akan berkurang secara signifikan dan konsentrasi bahan aktif akan meningkat sehingga didapatkan hasil ekstrak yang murni.

Sebelum dimulai penelitian, dilakukan eksplorasi dahulu untuk mendapatkan konsentrasi perlakuan. Dari penelitian eksplorasi dapat diketahui rentang konsentrasi dimana sudah tidak didapatkan lagi pembentukan biofilm pada tabung. Berdasarkan hasil penelitian eksplorasi diketahui bahwa pembentukan biofilm tidak dapat diamati lagi pada konsentrasi 1.5%. Dari angka ini dapat ditentukan konsentrasi yang tepat pada penelitian. Konsentrasi ekstrak yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 0 g/dL (kontrol positif), 0.125%, 0.25%, 0.5%, 1% dan 1.5%. Konsentrasi dibuat secara serial untuk memudahkan pembuatan larutan ekstrak, selain itu jarak yang tidak terlalu dekat akan menurunkan kemungkinan kesalahan dalam pengambilan ekstrak.

Metode yang digunakan dalam uji hambat pembentukan biofilm adalah metode tabung. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Mathur (2006), metode tabung mempunyai angka sensitivitas sebesar 77,9% dan spesifisitas sebesar 96 %. Pengamatan biofilm dilakukan dengan dua cara, yang pertama adalah pengamatan langsung untuk menentukan MBIC, sedangkan yang kedua

adalah pengamatan secara kuantitatif untuk melihat efek hambat dari masing-masing kelompok konsentrasi.

Pengamatan langsung dilakukan dengan mengamati formasi cincin dan dinding berwarna ungu kebiruan. Hasil pengamatan hanya dinyatakan dengan “pembentukan positif” (+) dan “pembentukan negatif” (-), hal ini dilakukan karena metode ini tidak mampu membedakan antara pembentukan biofilm kuat, sedang, dan lemah. Berdasarkan hasil pengamatan langsung, pada pengulangan ke-1, 2, 3 dan 4 didapatkan bahwa pada konsentrasi 1.5% sudah tidak didapatkan pembentukan biofilm lagi. Dari keseluruhan hasil pengamatan tersebut lalu ditentukan besar MBIC-nya dengan melihat konsentrasi terkecil dimana sudah tidak didapatkan pembentukan biofilm pada semua pengulangan. Pada penelitian ini disimpulkan bahwa MBIC ekstrak daun jambu biji adalah sebesar 1.5%.

Pengamatan secara kuantitatif dilakukan dengan mengukur intensitas warna hasil pengecatan tabung. Nilai ini dinyatakan dengan *Mean Gray Value* (MGV). Skala yang dapat ditunjukkan MGV berkisar antara 0 sampai 255. Semakin mendekati angka 0 maka intensitas warnanya semakin pekat, sebaliknya bila mendekati angka 255 maka intensitas warnanya semakin terang. Intensitas warna ini menunjukkan efek pembentukan biofilm pada tabung. Semakin pekat warna tabung mengindikasikan semakin tebal permukaan biofilm, begitu pula sebaliknya.

Hasil pengukuran MGV kemudian dianalisa dengan program SPSS 13. Uji statistik yang digunakan adalah Uji *One Way ANOVA* dan Uji korelasi *Pearson*. Dari Uji *One Way ANOVA* didapatkan nilai signifikansi $p=0,000$ ($p < 0,05$), hal ini berarti terdapat perbedaan efek yang bermakna antara tiap konsentrasi ekstrak

daun jambu biji. Hasil Uji *Pearson* menunjukkan nilai $r = 0,885$, hal ini membuktikan adanya korelasi yang sangat kuat ($r > 0,75$) antara ekstrak daun jambu biji dan *Mean Gray Value*. Tanda korelasi positif menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi ekstrak daun jambu biji maka semakin besar MGVnya, yang berarti semakin rendah kepekatan warnanya dan semakin rendah pembentukan biofilmnya. Hal ini diduga disebabkan oleh kandungan minyak atsiri, tannin, flavonoid, saponin dalam ekstrak daun jambu biji yang dapat menghambat pembentukan biofilm. Tannin mempunyai mekanisme untuk menginaktivasi adhesin, inhibisi enzim, dan disrupti membran (Cowan, 1999). Saponin menyebabkan destruksi membran sel dan dapat mereduksi kemampuan permukaan sel dalam mempertahankan biofilm sehingga dapat melepaskan biofilm. Flavonoid mempunyai efek inaktivasi terhadap adhesin (Cowan 1999; Crespo et al., 2008). Minyak atsiri merusak perlekatan biofilm dan diduga dapat menghambat pertumbuhan biofilm. Keempat bahan aktif tersebut diduga secara sinergis mengganggu pembentukan biofilm.