

UJI POTENSI EKSTRAK ETANOL BAWANG PUTIH (*Allium sativum*)

SEBAGAI PENGHAMBAT PEMBENTUKAN BIOFILM *Pseudomonas*

***aeruginosa* SECARA IN VITRO**

TUGAS AKHIR

Untuk Memenuhi Persyaratan

Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran



Oleh :

Maria Rinonce Dewantari

NIM 155070100111069

PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2018

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

UJI POTENSI EKSTRAK ETANOL BAWANG PUTIH (*Allium sativum*)
SEBAGAI PENGHAMBAT PEMBENTUKAN BIOFILM *Pseudomonas*
aeruginosa SECARA IN VITRO

Oleh:

Maria Rinonce Dewantari
155070100111069

Telah diuji pada
Hari : Selasa
Tanggal : 27 November 2018
dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji I



dr. Auriack Yudha Nagara Sp. EM

NIP. 2011018403161001

Penguji II/Pembimbing I



Prof. Dr. dr. Sanarto Sumarno,
Sp.MK, DHM&H Sp. MK
NIP. 198405162009122005

Penguji III/Pembimbing II



dr. Syifa Mustika Sp. PD
NIP. 197804302012122001

Mengetahui,
Ketua Progam Studi Kedokteran,



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

IDENTITAS TIM PENGUJI

Penguji 1 : dr. Aurick Yudha Nagara Sp.EM

NIP. 2011018403161001

Departemen Emergensi

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

Penguji 2 : Prof. Dr. dr. Sanarto Santoso, DTM&H, Sp.MK

NIP. 194812201980021001

Departemen Mikrobiologi

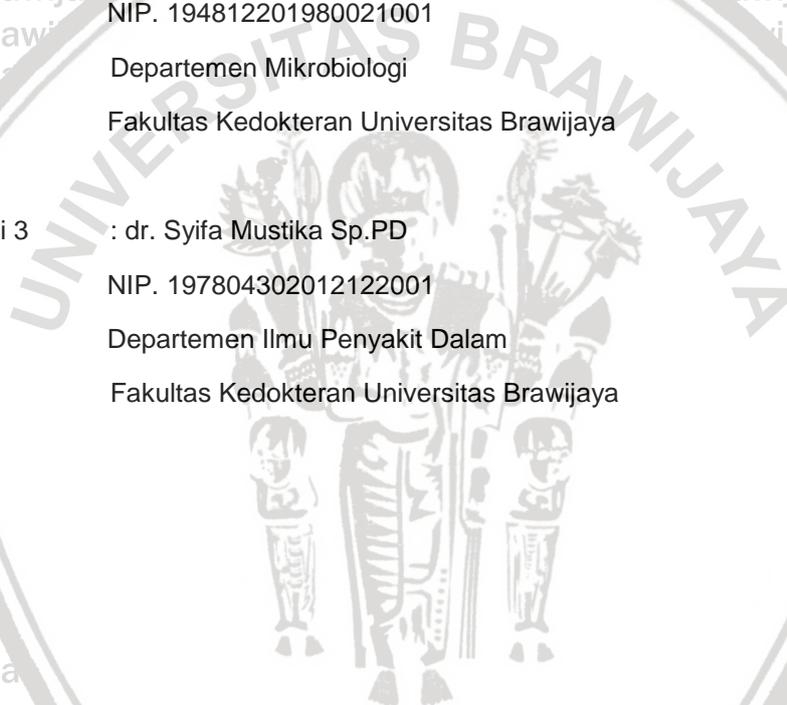
Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

Penguji 3 : dr. Syifa Mustika Sp.PD

NIP. 197804302012122001

Departemen Ilmu Penyakit Dalam

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya



PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Maria Rinonce Dewantari

NIM : 155070100111069

Program Studi : Program Studi Kedokteran Fakultas Kedokteran

Universitas Brawijaya

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar – benar hasil karya sendiri, bukan merupakan pengambilan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya sendiri. Apabila dikemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 27 November 2018

Yang membuat pernyataan,



Maria Rinonce Dewantari

NIM: 155070100111069

DAFTAR RIWAYAT HIDUP

IDENTITAS

Nama : MARIA RINONCE DEWANTARI
Tempat dan tanggal lahir : MOJOKERTO, 9 MEI 1996
Agama : KATOLIK
Alamat Rumah : DUSUN KRAJAN RT. 19 RW 03 DESA JARIT
KECAMATAN CANDIPURO
Asal Instansi : UNIVERSITAS BRAWIJAYA
Alamat Instansi : JL. VETERAN MALANG
Pendidikan Terakhir : SMA
Status Pernikahan : BELUM KAWIN
Alamat email : rinoncemaria@gmail.com
Telepon : -

RIWAYAT PENDIDIKAN

No.	Jenjang Pendidikan	Sekolah	Tahun Lulus
1.	TK	Dharma Wanita	2003
2.	SD	SDN Pasirian 1	2009
3.	SMP	SMPN 1 Sukodono	2012
4.	SMA	SMAN 2 Lumajang	2015
5.	S1	FKUB	

RIWAYAT PEKERJAAN

No.	Jabatan	Instansi	Tahun

PENGALAMAN PELATIHAN PROFESIONAL

No.	Tahun	Pelatihan	Penyelenggara

ABSTRAK

Rinonce, Maria. 2018. **Uji Potensi Ekstrak Etanol Bawang Putih (*Allium sativum*) Sebagai Penghambat Pembentukan Biofilm *P. 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) dr. Syifa Mustika Sp. PD.

P. aeruginosa merupakan salah satu patogen penyebab infeksi nosokomial dengan kasus resistensi antibiotika yang tinggi. Resistensi bakteri tersebut diakibatkan proses pembentukan biofilm. Bawang putih (*Allium sativum*) sebagai bahan pengganti obat yang memiliki senyawa organosulfur seperti *alilin*, *allicin*, *minyak atsiri* dan *ajoene* sebagai antibiofilm melalui mekanisme pencegahan quorum sensing pada bakteri *P. aeruginosa*. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui potensi ekstrak etanol bawang putih sebagai penghambat pembentukan biofilm *P. aeruginosa* secara *in vitro*. Penelitian ini menggunakan metode tabung dengan 4 kali pengulangan. Terdapat 6 kelompok dengan 5 kelompok perlakuan dengan konsentrasi 7%; 8%; 9%; 10%; 11%, kontrol negatif berisi ekstrak konsentrasi 0%. Hasil dari perlakuan tersebut didokumentasi lalu menghitung *mean gray value* dengan aplikasi Photoshop CS6. Hasil penelitian menunjukkan bahwa, secara visual terlihat penipisan cincin biofilm pada tabung dan dengan *mean gray value* terdapat peningkatan nilai yang searah dengan konsentrasi ekstrak. Uji One Way Anova didapatkan signifikansi $p=0,000$ ($p<0,05$) disertai hasil korelasi yang kuat antara konsentrasi dan nilai *mean gray value* (korelasi, $p<0,05$). Pada hasil akhir dengan uji regresi didapatkan KHBM 78% (Regresi, $p=105,4432$). Kesimpulan penelitian ini adalah ekstrak etanol bawang putih dapat menghambat pembentukan biofilm pada bakteri *P. aeruginosa* secara *in vitro* dengan signifikan.

Kata kunci: *P. aeruginosa*, bawang putih, biofilm, *mean gray value*.

ABSTRACT

Dewantari, Maria Rinonce. 2018. **Potential Test of Etanhol Garlic Extract (*Allium sativum*) as an Inhibitor of *P. aeruginosa* Biofilm Formation In Vitro**. Thesis. Medical Education Study Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Advisors: (1) Prof. Dr. dr. Sanarto Santoso, DTM&H, Sp.MK (K), (2) dr. Syifa Mustika Sp. PD.

P. aeruginosa is one of the pathogens causing nosocomial infections with high cases of antibiotic resistance. The bacterial resistance is caused by the process of biofilm formation. Garlic (*Allium sativum*) as a substitute for drugs has organosulfur compounds namely *alliin*, *allicin*, *volatile oil*, and *ajoene* as antibiofilm through the mechanism of quorum sensing prevention in *P. aeruginosa* bacteria. The purpose of this study is to determine the potential of ethanol extract of garlic as an inhibitor of *P. aeruginosa* biofilm formation in vitro. This study used a tube method with four repetitions. There were six groups consisting of five treatment controls with different concentrations (7%; 8%; 9%; 10%; 11%) and a negative control which contained 0% of extract concentration. The results of the treatment were documented and calculated by using Photoshop CS6 application to determine the mean gray value. The results of this study indicated that the biofilm ring appeared to be depleted in the tube. There was also an increase in value which was in line with the extract concentration based on mean gray value. From the results of one-way ANOVA test, it was shown that the significance of $p = 0,000$ ($p < 0,05$) accompanied by a strong correlation between concentration and mean gray value (correlation, $p < 0,05$). Moreover, the use of regression test showed a result of MBIC which was 78% (regression, $p=105,4432$). The conclusion of this study is that the ethanol extract of garlic could significantly inhibit biofilm formation in *P. aeruginosa* bacteria in vitro.

Keywords: *P. aeruginosa*, garlic, biofilm, mean gray value.

DAFTAR ISI

HALAMAN PERSETUJUAN	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
ABSTRAK	6
DAFTAR TABEL	10
DAFTAR GAMBAR	11
DAFTAR SINGKATAN	12
DAFTAR LAMPIRAN	13
BAB 1 PENDAHULUAN	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
1.1 LATAR BELAKANG	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
1.2 RUMUSAN MASALAH	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
1.3 TUJUAN PENELITIAN	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
1.3.1 <i>Tujuan Umum</i>	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
1.3.2 <i>Tujuan Khusus</i>	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
1.4 MANFAAT	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
1.4.1 <i>Manfaat Akademis</i>	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
1.4.2 <i>Manfaat Praktis</i>	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
2.1 P. AERUGINOSA	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
2.2 BIOFILM	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
2.2.4 <i>Pemeriksaan Biofilm</i>	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
2.2.5 <i>Strategi Intervensi terhadap Biofilm</i>	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
2.3 BAWANG PUTIH (ALLIUM SATIVUM)	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
2.3.1 <i>Taksonomi</i>	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
2.3.2 <i>Morfologi</i>	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
2.3.3 <i>Kandungan Bawang Putih (Allium sativum)</i>	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
2.4 METODE EKSTRAKSI	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
2.4.1 <i>Prinsip Proses Ekstraksi</i>	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
2.4.2 <i>Metode Ekstraksi Maserasi</i>	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	ERROR!
	BOOKMARK NOT DEFINED.
3.1 KERANGKA KONSEP	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
3.2 HIPOTESIS PENELITIAN	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
BAB 4 METODE PENELITIAN	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
4.1 RANCANGAN PENELITIAN	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
4.2 POPULASI DAN SAMPEL	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
4.3 VARIABEL PENELITIAN	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
4.3.1 <i>Variabel Bebas</i>	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
4.3.2 <i>Variabel Tergantung</i>	<i>Error! Bookmark not defined.</i>
4.5 DEFINISI OPERASIONAL	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
4.6 ALAT DAN BAHAN PENELITIAN	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
4.6.1 <i>Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Bawang Putih</i>	<i>Error! Bookmark not defined.</i>

4.6.3	Alat dan Bahan Deteksi Biofilm	Error! Bookmark not defined.
4.7	PROSEDUR PENELITIAN	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
4.7.1	Persiapan Bawang Putih (<i>Allium sativum</i>)	Error! Bookmark not defined.
4.7.2	Identifikasi Bakteri	Error! Bookmark not defined.
4.7.3	Pembuatan Perbenihan Cair Bakteri	Error! Bookmark not defined.
4.7.4	Uji Deteksi Pembentukan Biofilm (Metode Tube-test)	Error! Bookmark not defined.
4.7.5	Uji Hambat Pembentukan Biofilm pada <i>P. aeruginosa</i>	Error! Bookmark not defined.
4.8	ANALISIS DATA	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
4.8	ALUR PENELITIAN	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
		ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA . ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.		
5.1	HASIL PENELITIAN	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
5.1.1	Hasil Ekstraksi Bawang Putih (<i>Allium sativum</i>)...	Error! Bookmark not defined.
5.1.2	Hasil Identifikasi Bakteri	Error! Bookmark not defined.
5.1.3	Hasil Uji Hambat Pembentuk Biofilm	Error! Bookmark not defined.
5.2	ANALISIS DATA	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
5.2.1	Uji Normalitas dan Homogenitas	Error! Bookmark not defined.
5.2.2	Uji Oneway ANOVA	Error! Bookmark not defined.
5.2.4	Uji Korelasi Pearson	Error! Bookmark not defined.
BAB 6 PEMBAHASAN		
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN		
7.1	KESIMPULAN	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
7.2	SARAN	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
DAFTAR PUSTAKA		
LAMPIRAN		
		65

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 4.1 Hasil Perhitungan Ekstrak dan Supensi Bakteri Uji Pendahuluan.....	34
Tabel 4.2 Hasil Perhitungan Ekstrak dan Supensi Bakteri Uji Pengulangan....	36
Tabel 5.1 Hasil Pengukuran Mean Gray Value dengan Aplikasi Adobe Photoshop CS6.....	44
Tabel 5.2 Hasil Uji Normalitas Metode <i>Shapiro-Wilk</i>	48
Tabel 5.3 Hasil Uji Homogenitas.....	48
Tabel 5.4 Hasil Uji Oneway ANOVA.....	49
Tabel 5.5 Nilai Signifikan Kelompok Terhadap Kelompok Lainnya Pada Uji Post Hoc.....	50
Tabel 5.6 Rangkuman Hasil Uji Post Hoc.....	51
Tabel 5.6 Hasil Uji Korelasi <i>Pearson</i>	52

DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dengan pengecatan Gram.....	6
Gambar 2.2 Isolasi bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7
Gambar 2.3 Pembentukan Biofilm pada <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
Gambar 2.4 Bawang Putih	16
Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian	21
Gambar 4.1 Rancangan Operasional Penelitian	38
Gambar 5.1 Hasil Ekstrak Etanol Bawang Putih (<i>Allium sativum</i>).....	39
Gambar 5.2 Hasil Pewarnaan Gram Bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	40
Gambar 5.3 Hasil Oxidase Strip Test pada <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	41
Gambar 5.4 Hasil Perbenihan Bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pada media <i>MacConkey</i>	41
Gambar 5.5 Hasil Perbenihan Bakteri <i>P. aeruginosa</i> pada media NAP.....	41
Gambar 5.6 Hasil Uji Vitek Compact 2 Bakteri <i>P. aeruginosa</i>	42
Gambar 5.7 Hasil Uji Hambat Pembentukan Biofilm Pendahuluan	45
Gambar 5.8 Hasil Uji Hambat Pembentukan Biofilm Pengulangan 1 – 4.....	46
Gambar 5.9 Grafik Pengukuran Mean Gray Value.....	47

DAFTAR SINGKATAN

AHL	: <i>N-Acyl homoserine lactones</i>
ANOVA	: <i>Analysis of Variance</i>
CFU	: <i>Colony-forming Unit</i>
CLSM	: <i>Concofocal Laser Scanning Microscope</i>
DNA	: Deoksiribo Nukleat
EPS	: <i>Extracellular Polysaccharides Substance</i>
gr	: gram
ICU	: <i>Intensive Care Unit</i>
KHBM	: Kadar Hambat Biofilm Minimum
MBIC	: <i>Minimum Biofilm Inhibitory Concetration</i>
MDR	: <i>Multidrug Resistant</i>
MGV	: <i>Mean Gray Value</i>
mL	: mili liter
OD	: <i>Optical Density</i>
PBS	: <i>Phospate Buffer Saline</i>
PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PMN	: Polymorfo Nuclear
QS	: <i>Quorum Sensing</i>
RNA	: Ribonukleat
SPSS	: <i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TSB	: <i>Trypticase Soy Broth</i>
TSBglu	: <i>Trypticase Soy Broth Glucose</i>

DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

Lampiran 1. Surat Keaslian Ektstrak Bawang Putih (*Allium sativum*) 64

Lampiran 2. Surat Keterangan Simplisia Materia Medika 65

Lampiran 3. Proses Ekstraksi Etanol Bawang Putih (*Allium sativum*) 66

Lampiran 4. Penelitian Pendahuluan 67



BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit infeksi merupakan salah satu masalah kesehatan terbesar tidak saja di Indonesia, tetapi juga diseluruh dunia. Selain virus sebagai penyebabnya, bakteri juga tidak kalah pentingnya dalam menyebabkan penyakit infeksi (Mulholland, 2005). Salah satu bakteri penyebab infeksi yaitu *P. aeruginosa* dimana bakteri ini berperan utama pada infeksi nosokomial (Obritsch, M., et al, 2005). Infeksi nosokomial *P. aeruginosa* sebagian besar terjadi di rumah sakit, dapat dilihat dari hasil riset kesehatan dasar yang dilakukan oleh Kemenkes (2013), angka kejadian infeksi di Jawa Timur mencapai 4,2%, dan studi lain menyatakan bahwa 26,5% pasien dari ruang ICU Rumah Sakit Fatmawati, Jakarta terinfeksi *P. aeruginosa* (Radji, M., et al, 2011).

Banyaknya infeksi nosokomial tidak lepas dari *Multidrug resistant* (MDR). *Multidrug resistant P. aeruginosa* telah muncul di Mesir dan terutama terlihat pada infeksi nosokomial karena penggunaan antibiotik berlebihan (Mahmoud, A., et al, 2013). Di Amerika, infeksi akibat *P. aeruginosa* mencapai 51.000 kasus per tahun dengan 6.700 kasus menyebabkan *Multidrug- Resistant Pseudomonas* dan 440 diantaranya mengalami kematian (CDC, 2013).

Terjadinya resistensi pada *P. aeruginosa* disebabkan karena bakteri ini dapat dengan mudah membentuk biofilm hanya dalam kurun waktu 24 jam (Tolker dan Nielsen, 2013). Bakteri yang tumbuh dalam biofilm berada dalam fase dorman sehingga dapat terhindar dari stres lingkungan, salah satunya akibat pengaruh antibiotik (Crouzet M., et al, 2013). Dibutuhkan antibiotik dengan dosis

100 hingga 1000 kali lebih tinggi untuk membunuh patogen yang dilindungi oleh biofilm (Zhai H., *et al*, 2014). *P. aeruginosa* mudah beradaptasi dengan membentuk biofilm menggunakan sistem *quorum sensing* (Taga dan Bassler, 2003). *P. aeruginosa* memiliki molekul sinyal utama yaitu komponen *homoserin laktan* yang berfungsi sebagai agen kemostatik untuk mengumpulkan sel-sel *P. aeruginosa* yang berdekatan melalui mekanisme *quorum sensing* dan membentuk biofilm (Madigan, *et al*, 2006).

Bawang putih (*Allium sativum*) merupakan bahan makanan penting di seluruh dunia. Bawang putih telah lama dikenal memiliki efek antibakteri, antijamur, dan antivirus. Antimikroba utama penyusun bawang putih, *allicin*, dihasilkan oleh enzim *alliinase* ketika bawang putih dihancurkan (Lee, H., *et al*, 2011). Berdasarkan penelitian Persson *et al*, (2005), *Allium sativum* mempunyai senyawa aktif yang mampu menghambat sistem *quorum sensing* yang potensial yaitu *Alliin* dan derivat organosulfur lainnya, seperti *allicin*, *ajoene*, dan minyak atsiri. Sebagai agen antibiofilm, bawang putih dapat menghambat pembentukan biofilm melalui pencegahan proses adhesi dan *detachment* (Zhai H dalam Wangi, *et al*, 2017).

Pembentukan biofilm pada *P. 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 (Baker P., *et al*, 2016). Studi lain menunjukkan bahwa penekanan gen *pelFP. aeruginosa* oleh ekstrak *Allium sativum* memainkan peran dalam penghambatan pembentukan biofilm *P. Aeruginosa* (Nathaniel, N., *et al*, 2017).

Berdasarkan latar belakang masalah diatas, maka peneliti ingin mempelajari potensi pemberian ekstrak etanol bawang putih (*Allium sativum*) sebagai penghambat pembentukan biofilm pada *P. aeruginosa* secara *in vitro*.

1.2 Rumusan Masalah

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

1. Bagaimana potensi ekstrak etanol bawang putih (*Allium sativum*) dalam menghambat pembentukan biofilm pada *P. aeruginosa* secara *in vitro*?
2. Bagaimana korelasi ekstrak etanol bawang putih (*Allium sativum*) dalam menghambat pembentukan biofilm pada *P. aeruginosa* secara *in vitro*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui dan membuktikan potensi ekstrak etanol bawang putih (*Allium sativum*) sebagai penghambat pembentukan biofilm pada *P. aeruginosa* secara *in vitro*.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Untuk menentukannilai Konsentrasi Hambat Biofilm Minimum (KHBM)dari ekstrak etanol bawang putih (*Allium sativum*)terhadap pembentukan biofilm bakteri *P. aeruginosa*.
2. Untuk mengetahui korelasi ekstrak etanol bawang putih (*Allium sativum*) terhadap pembentukan biofilm bakteri *P. 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 bawang putih (*Allium sativum*) sebagai penghambat pembentukan biofilm pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

2. Diharapkan penelitian ini dapat memberikan wawasan bagi masyarakat umum mengenai manfaat dari bawang putih (*Allium sativum*), yaitu sebagai penghambat pembentukan biofilm pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

1.4.2 Manfaat Praktis

1. Diharapkan penelitian ini dapat dijadikan acuan untuk penelitian selanjutnya mengenai manfaat ekstrak etanol bawang putih (*Allium sativum*) sebagai penghambat pembentukan biofilm *P. aeruginosa*.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *P. aeruginosa*

P. aeruginosa merupakan salah satu kelompok pseudomonas dan tergolong kelompok patogen yang besar pada manusia, kadang membentuk koloni dalam tubuh manusia. *P. aeruginosa* bersifat invasif dan toksigenik sehingga pada pasien dengan daya tahan tubuh yang rendah dapat menyebabkan infeksi. *P. aeruginosa* merupakan patogen nosokomial yang penting di dunia. (Strateva, T dan Yordanov, D, 2009).

2.1.1 Taksonomi

Klasifikasi bakteri *P. aeruginosa*:

Kingdom : Bacteria

Phylum : Proteobacteria

Class : Gamma Proteobacteria

Order : Pseudomonadales

Family : Pseudomonadaceae

Genus : Pseudomonas

Species : *Pseudomonas aeruginosa* (ITIS, 2018)

1.1.2 Morfologi

P. aeruginosa dengan ciri khasnya berbentuk batang, motil dan berukuran sekitar 0,6 x 2 mm. Bakteri ini tergolong kelompok bakteri gram negatif dan dapat muncul dalam bentuk tunggal, berpasangan atau kadang-kadang dalam bentuk rantai pendek. *P. aeruginosa* dapat tumbuh dengan baik pada suhu 37- 42oC. Bakteri ini tidak memfermentasi karbohidrat dan bersifat oksidase positif, tetapi banyak strain mengoksidasi glukosa. *P. aeruginosa* dapat diidentifikasi

berdasarkan morfologi koloni, sifat oksidase-positif, adanya pigmen yang khas, dan pertumbuhan pada suhu 42oC (Brooks, Butel dan Morse, 2007).

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



P. aeruginosa adalah bakteri obligat aerob yang dapat tumbuh dengan mudah pada banyak jenis medium biakan dan beberapa strain dapat menyebabkan hemolisis darah. Koloni *P. aeruginosa* memiliki warna fluoresensi kehijauan. Bakteri ini sering menghasilkan piosianin yang tidak dihasilkan spesies pseudomonas lain, pigmen kebiru-biruan yang tidak berfluoresensi, yang berdifusi ke dalam agar, *P. aeruginosa* juga banyak memproduksi pigmen pioverdin yang berfluoresensi, yang memberikan warna kehijauan pada agar. Beberapa strain menghasilkan pigmen piorubin yang berwarna merah gelap atau pigmen piomelanin yang hitam (Brooks, Butel dan Morse, 2007).



Gambar 2.1 Isolasi bakteri *P. aeruginosa* pada MHA yang berdifusi biru kehijauan (Sivri, et al, 2013)

P. 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 *P. aeruginosa* yang mukoid akibat produksi berlebihan dari alginate, suatu eksopolisakarida yang berfungsi menghasilkan matriks sehingga organisme dapat hidup dalam biofilm (Brooks, Butel dan Morse, 2007).

2.1.3 Struktur Antigenik

Struktur dari permukaan sel yang menjulur pili (fimbria) membantu pelekatan pada sel epitel inang. Sifat endotoksik *P. aeruginosa* karena lipopolisakarida yang ada dalam berbagai immunotype. Jenis-jenis bakteri *P. aeruginosa* dapat dibedakan berdasarkan kerentanannya terhadap piosin (bakteriosin) dan immunotype lipopolisakarida. Kebanyakan bakteri *P. aeruginosa* yang diambil dari infeksi klinis menghasilkan enzim ekstraselular, termasuk elastase, protease, dan hemolisin (fosfolipase C dan glikolipid) (Brooks, Butel dan Morse, 2007).

Banyak strain *P. aeruginosa* yang menyebabkan nekrosis jaringan dan bersifat letal untuk binatang jika disuntikkan dalam bentuk murni dengan menghasilkan eksotoksin A. Mekanisme Toksin tersebut serupa seperti mekanisme toksin difteri yaitu dengan cara menghambat sintesis protein, walaupun struktur kedua toksin tersebut tidak sama. Beberapa serum manusia menunjukkan sifat antitoksin terhadap eksotoksin A termasuk pasien yang telah sembuh dari infeksi berat *P. aeruginosa* (Brooks, Butel dan Morse, 2007).

2.2 Biofilm

Biofilm merupakan kumpulan dari sel mikroba yang secara irreversible terikat pada permukaan, serta ditutupi oleh matriks polisakarida (Maric, S dan Vranes, J., 2007). Biofilm dapat menempel pada hampir semua permukaan termasuk alat-alat kesehatan, pipa-pipa industri, maupun jaringan hidup. Matriks biofilm cukup kompleks dan dapat mengandung berbagai material non-biofilm seperti kristal mineral, komponen darah, atau komponen tanah. Komposisi utama biofilm selain sel mikroba adalah *extracellular polysaccharides substance* (EPS) yang mencapai

hingga 50-90% dari biofilm. Sel-sel mikroba dalam biofilm berkomunikasi menggunakan sistem yang disebut *Quorum Sensing*. *Quorum sensing* merupakan kemampuan mikroba untuk mengukur densitas sel (jumlah mikroba) dengan mengukur jumlah akumulasi sekresi sinyal molekuler yang dihasilkan sel (Andika, 2015)

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 (Aparna and Yadav, 2008). 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 *P. aeruginosa*, *N-Acyl homoserine lactones* (AHL) diketahui merupakan molekul sinyal yang berperan penting dalam pensinyalan sel (*cell signaling*) (Aparna and Yadav, 2008). 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).

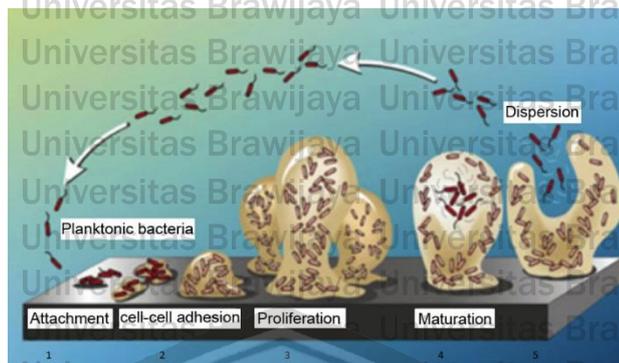
Tahap kedua, bakteri mengalami multiplikasi sambil mengeluarkan sinyal kimia

untuk berkomunikasi secara internal. Substansi EPS mulai dihasilkan berdasarkan mekanisme genetik. EPS kemudian akan mentrap nutrisi 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 μm (Aparna and Yadav, 2008).

Tahap keempat, ketebalan lapisan biofilm pada tahap ini mencapai lebih dari 100 μm (Aparna and Yadav, 2008) dan dapat mencapai 300-400 μm 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*, 2003; Xavier *et al*, 2005). Pada *P. 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.



Gambar 2.3 Pembentukan Biofilm pada *P. aeruginosa* (Schultz, 2008)

2.2.2 Komposisi dan 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 Perannya terhadap Resistensi Bakteri

Telah terbukti secara epidemiologi bahwa biofilm mempunyai peranan dalam infeksi penyakit. Namun proses yang sebenarnya bagaimana biofilm dapat menimbulkan penyakit dalam tubuh manusia belum sepenuhnya dimengerti.

Beberapa mekanisme yang mungkin dapat menerangkan kaitan pembentukan biofilm dengan penyakit infeksi adalah :

1. Lepasnya sel-sel biofilm atau agregasi sel

Menurut (Gunardi, 2014), sel-sel biofilm yang lepas dapat menimbulkan infeksi.

Infeksi pada aliran darah dan traktus urinarius dapat berasal dari jumlah kuman yang sedikit. Lepasnya sel-sel biofilm ini dapat terjadi karena pengaruh pertumbuhan dan pembelahan di dalam sel, dan perubahan kecepatan dan arah aliran.

2. Produksi endotoksin

Bakteri Gram (-) dapat memproduksi endotoksin yang mungkin dapat mengurangi respon imun dalam tubuh pasien. Walaupun belum ada penelitian tentang tingkat dan kinetik dari endotoksin yang dilepaskan dari biofilm, Vincent dkk. memperlihatkan adanya bakteri dalam *hemodialyzer tubing* berhubungan dengan endotoksin.

3. Resistensi terhadap sistem imun hospes

Yasuda dkk. memperlihatkan sel-sel *E. coli* dalam biofilm kurang sensitif terhadap aktivitas penghancuran oleh sel PMN (polymorfo nuclear), dibanding sel planktoniknya. Meluleni dkk. menemukan bahwa *opsoning antibodi* pada pasien dengan *chronic cystic fibrosis* tidak efektif dalam memfasilitasi fagositosis dan eliminasi pertumbuhan sel. Ketahanan ini kemungkinan terjadi sebagai hasil dari peningkatan resistensi bakteri biofilm terhadap penghancuran lekosit PMN oleh karena PMN bekerja pada spesies yang oksigen aktif.

4. Menjadi tempat untuk penyebaran organisme yang resisten

Seperti telah dijelaskan di atas, bahwa dalam biofilm lebih mudah terjadi konyugasi yang berperan dalam pemindahan sifat resisten dalam plasmid.

5. Resistensi terhadap antibiotika

2.2.4 Pemeriksaan Biofilm

- a. 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.
- b. *Concofocal Laser Scanning Microscope* (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

- a. Melindungi permukaan dengan molekul yang menghambat perlekatan mikroba dan merusak matriks yang diproduksi, contohnya :
 - Melapisi alat-alat medik dengan *chlorhexidin-silver sulfadiazine*
 - Melapisi alat-alat medik dengan kombinasi minoksilin
 - Menggunakan rifampisin dan gelombang elektromagnetik atau *ultrasound* dikombinasi dengan antibiotika
 - Penggunaan aerosol antibiotika seperti fluorokuinolon pada pasien cystic fibrosis
- b. Menghambat sel-sel *signaling* sehingga mengganggu pertumbuhan biofilm
- c. Menggunakan antibiotika atau desinfektan untuk menghambat strategi pertahanan biofilm, contohnya :
 - Kombinasi Fosfomisin dan ofloksasin
- d. Menghambat gen-gen yang berperan dalam pembentukan biofilm dan gen yang mengatur sel-sel persister.
- e. Melalui mekanisme *self destruction* misalnya *P.fluorescent* akan menghasilkan lyase yang dapat menghancurkan matriks filmnya berupa alginat pada

lingkungan yang kekurangan oksigen. Hal ini mungkin terjadi untuk menjaga ketersediaan nutrisi bagi biofilm. Proses biofilm *self destruction* ini mungkin berperan gen- gen tertentu. Diharapkan dengan mengetahui gen-gen tersebut, dapat digunakan untuk eradikasi biofilm (Gunardi, 2014).

1.2.5 Strategi Intervensi terhadap Biofilm

2.2.5.1 *Microtiter Dish Assay*

Microtiter Dish Assay merupakan alat yang penting dalam penelitian mengenai pertumbuhan biofilm dan secara utama digunakan untuk meneliti biofilm bakteri maupun jamur. Metode ini menunjukkan pembentukan biofilm di dinding dan dasar dari *microtiter dish*. Metode ini telah dipakai untuk penelitian terhadap banyak jenis mikroba, yaitu *Pseudomonas*, *Vibrio cholera*, *Escherichia coli*, *Staphylococci*, *Enterococci*, *mycobacteria*, dan jamur, namun tidak terbatas mikroba itu saja. Prosedur yang dilakukan, yaitu melakukan kultur bakteri pada *microtiter dish*, menginkubasi selama 24 jam pada 37°C kemudian sel bakteri dibuang dan dilakukan pengecatan *microtiter dish* dengan Kristal violet (O'toole, 2011).

Kemudian dilakukan analisa *Optical Density* (OD) dengan menggunakan *micro ELISA auto reader* pada panjang gelombang 570 nm. Hasil OD menunjukkan index bakteri yang menempel di permukaan dan membentuk biofilm (Marthur, 2005).

2.2.5.2 Metode Tabung

Metode tabung merupakan pengamatan secara kualitatif terhadap pertumbuhan biofilm bakteri. Dilakukan inokulasi bakteri dalam TSB + *glucose* yang akan inkubasi dalam tabung selama 24 jam dengan suhu 37°C. Setelah itu larutan dibuang dan tabung di cat dengan Kristal violet dan dinilai 0 (tidak membentuk biofilm), 1 (lemah), 2 (sedang), dan 3 (kuat) Metode ini memiliki

korelasi yang baik dengan metode *Tissue Culture Plate* untuk bakteri pembentuk biofilm kuat (skor 3). Namun, cukup sulit untuk menentukan apakah suatu bakteri merupakan bakteri pembentuk biofilm sedang dan lemah (Mathur, 2005).

Secara kuantitatif, biofilm dapat diukur berdasarkan intensitas warna. Andiyani dan Hidayati (2013) melakukan uji hambat pembentukan biofilm dengan menggunakan *Adobe Photoshop* untuk mengukur *Mean Gray Value* (MGV). Roeselers, *et al.* (2007) melakukan pengukuran pertumbuhan biofilm, gambar biofilm diambil dengan *CanoScan LiDE 60 flatbed scanner* yang kemudian diukur intensitas warnanya, yaitu melalui pengukuran MGV dengan skala 0 – 225, dimana 0 menunjukkan hitam dan 225 menunjukkan putih. Selain itu, Wolfaardt, *et al.* (1994) juga menganalisis degradasi biofilm dan mengukur MGV 20 gambar biofilm menggunakan *Bio-Rad software* dengan skala yang sama.

2.2.5.3 Metode Congo Red Agar

Freeman *et al.* telah menjelaskan metode alternative dalam *screening* pembentukan biofilm pada isolate *Staphylococcus*. Metode ini membutuhkan persiapan khusus, yaitu medium padat *Brain Heart Infusion* (BHI) disuplementasi dengan sukrosa 5% dan *Congo Red*. *Plate* kemudian di inokulasi dan inkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Hasil positif diindikasikan dengan adanya koloni hitam dengan konsistensi *crystalline* kering. Eksperimen dilakukan di tiga *plate* dan di ulang tiga kali. Metode ini menunjukkan korelasi yang sangat kecil dibanding dengan metode lain, sensitivitas terhadap pertumbuhan biofilm rendah, yaitu 7,6% (Mathur, 2005).

2.3 Bawang Putih (*Allium sativum*)

2.3.1 Taksonomi

Bawang putih telah digunakan sebagai obat dalam herbal medicine sejak ribuan tahun yang lalu. Pada tahun 2700–1900 sebelum Masehi bawang putih

telah digunakan oleh pekerja-pekerja bangunan piramid sebagai obat penangkal penyakit dan rasa letih.

Sekitar tahun 460 sebelum Masehi khasiatnya telah dipuji oleh Hippocrates dan pada tahun 384 sebelum Masehi oleh Aristotle. Saat Perang Dunia tahun 1914–1918 bawang putih digunakan oleh tentara Perancis untuk mengobati luka, dan pada serangan wabah penyakit mulut dan kuku pada tahun 1968 para istri petani di Cheshire percaya bahwa bawang putih dapat berkhasiat melindungi ternak mereka dari wabah penyakit tersebut (Sunarto & Susetyo, 1995).

Kedudukan bawang putih secara botani

Divisi : Spermatophyta

Sub Divisi : Angiospermae

Kelas : Monocotyledonae

Bangsa : Liliales

Suku : Liliaceae

Marga : *Allium*

Jenis : *Allium sativum*

Bawang putih termasuk klasifikasi tumbuhan berumbi lapis atau siung yang bersusun. Bawang putih tumbuh secara berumpun dan berdiri tegak sampai setinggi 30-75 cm, mempunyai batang semu yang terbentuk dari pelepah-pelepah daun. Helaijan daunnya mirip pita, berbentuk pipih dan memanjang. Akar bawang putih terdiri dari serabut-serabut kecil yang berjumlah banyak. Setiap umbi bawang putih terdiri dari sejumlah anak bawang (siung) yang setiap siungnya terbungkus kulit tipis berwarna putih. Bawang putih yang semula merupakan tumbuhan daerah dataran tinggi, sekarang di Indonesia, jenis tertentu dibudidayakan di dataran rendah. Bawang putih berkembang baik pada ketinggian tanah berkisar 200-250 meter di atas permukaan laut (IPTEKnet, 2005).

2.3.2 Morfologi

Bawang putih merupakan tumbuhan terna berumbi lapis atau siung yang bersusun, memiliki batang semu yang terbentuk dari pelepah daun dan termasuk dalam genus *Allium*. Akar bawang putih terdiri dari serabut-serabut kecil, setiap umbi bawang putih terdiri dari sejumlah anak bawang (siung) yang setiap siungnya terbungkus kulit tipis berwarna putih. Bawang putih termasuk tumbuhan daerah dataran tinggi namun di Indonesia jenis tersebut juga dibudidayakan di dataran rendah. Bawang putih berkembang baik pada ketinggian tanah berkisar 200-250 meter di atas permukaan laut (Savitri, 2008).



Gambar 2.4 Bawang Putih (Departemen Pertanian, 2008)

Bawang putih termasuk klasifikasi tumbuhan berumbi lapis atau siung yang bersusun. Bawang putih tumbuh secara berumpun dan berdiri tegak sampai setinggi 30-75 cm, mempunyai batang semu yang terbentuk dari pelepah-pelepah daun. Helaian daunnya mirip pita, berbentuk pipih dan memanjang. Akar bawang putih terdiri dari serabut-serabut kecil yang bejumlah banyak. Setiap umbi bawang putih terdiri dari sejumlah anak bawang (siung) yang setiap siungnya terbungkus kulit tipis berwarna putih. Bawang putih yang semula merupakan tumbuhan daerah dataran tinggi, sekarang di Indonesia, jenis tertentu dibudidayakan di dataran rendah. Bawang putih berkembang baik pada ketinggian tanah berkisar 200-250 meter di atas permukaan laut (IPTEKnet,2005). Menurut Kartasapoetra (1992),

ciri-ciri bawang putih sebagai berikut :

1. Merupakan umbi majemuk dengan bentuk rata-rata hampir bulat, bergaris tengah sekitar 4 sampai 6 cm.
2. Berwarna putih, terdiri dari beberapa siung (8-20 siung), yang seluruhnya terbungkus oleh 3-5 selaput tipis berwarna putih.
3. Tiap siungnya diliputi atau terbungkus pula dalam selaput tipis, selaput luar berwarna mendekati putih dan agak longgar, sedangkan selaput dalam membungkus ketat-melekat pada bagian luar daging siung, berwarna merah jambu yang mudah dilepas atau dikupas.

2.3.3 Kandungan Bawang Putih (*Allium sativum*)

Diantara banyaknya kandungan sulfur yang terkandung dalam bawang putih, allicin merupakan komponen sulfur yang memiliki aktivitas antibakteri yang paling besar, selain itu pula, allicin juga merupakan komponen yang bertanggung jawab atas manfaat terapeutik bawang putih yang lainnya, seperti antijamur, dan antivirus (Salima, 2015). Allicin merupakan salah satu komponen aktif utama dalam bawang putih yang mempunyai efek antibakteri, antioksidan, dan antikarsinogenik (Nicolic, *et al*, 2004).

Allicin berhasil disintesis oleh dari bawang putih mentah yang telah dihancurkan terlebih dahulu (Yuniastuti, 2006). Jika *Allium sativum* dihancurkan maka akan terjadi pelepasan enzim *allinase* yang dengan cepat melisiskan *allin* dengan memecah ikatan karbon dan sulfur *allin* untuk memberntuk *sulfenic acid* (R-SOH) dan senyawa ini dengan segera akan berkondensasi menjadi *allicin* dan *thiosulfinat* lainnya (Singh dan Singh, 2008). Kandungan tersebut dapat menghambat secara total sintesis RNA dan DNA serta protein bakteri secara parsial. Walaupun dikatakan bahwa sintesis DNA dan protein juga mengalami penghambatan oleh aktivitas allicin, namun perlu diketahui bahwa RNA tetap menjadi target utama aktivitas antibakteri yang dimiliki allicin (Salima, 2015).

Allicin (Diallyl Thiosulfinate) memiliki sifat yang kurang stabil, oleh karena itu, dalam beberapa jam dalam suhu ruangan, akan kembali mengalami metabolisme menjadi vinylthioliines atau diallyldisulfide atau yang disebut ajoene.

Senyawa sulfur ini memiliki aktivitas antibakteri yang bekerja dengan mekanisme yang sama dengan allicin, namun memiliki potensi yang lebih kecil daripada allicin (Salima, 2015). Ajoene memiliki aktivitas antistaphylococcal (bakterisidal) dengan Kadar Hambat Minimum (KHM) sebesar 16 µg/ml dan juga bersifat antibakteri terhadap species *Bacillus*, *Mycobacterium*, dan *Streptomyces* (Gibbons, 2004).

Senyawa sulfur ini memiliki aktivitas antibakteri yang bekerja dengan mekanisme yang sama dengan allicin, namun dengan potensi yang lebih kecil. Ajoene dianggap sebagai *Quorum Sensing Inhibitor* (QSI) utama yang terkandung di dalam bawang putih. Treatment menggunakan ajoene terhadap biofilm secara *in vitro* terbukti sinergis dengan efek antimikrobal dari tobramycin (Jakobsen *et al.*, 2012).

Bawang putih juga mengandung komponen minyak atsiri, yang juga memiliki aktivitas antibakteri yang bekerja dengan mekanisme menghambat pembentukan membran sel bakteri. Namun, potensi minyak atsiri sebagai antijamur dikenal jauh lebih besar dibanding potensinya sebagai antibakteri (Salima, 2015). Senyawa fenol pada minyak atsiri daun kemangi memiliki aktivitas antibakteri sehingga mengakibatkan terganggunya komunikasi *Quorum Sensing* pada koloni bakteri untuk membentuk biofilm (Ardani dkk., 2010). Kemungkinan mekanismenya dimulai dari pertumbuhan bakteri yang dihambat oleh senyawa fenol yang mengakibatkan jumlah bakteri berkurang sehingga kemampuan koloni bakteri untuk saling berkomunikasi menjadi terhambat. Hal ini membuat terganggunya produksi lapisan EPS oleh bakteri yang berfungsi menjaga integritas biofilm sehingga berakibat terhambatnya pembentukan biofilm (Susanto dkk, 2012).

2.4 Metode Ekstraksi

2.4.1 Prinsip Proses 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 yang dapat yang dapat ditentukan oleh tekstur, kandungan air bahan-bahan yang akan diekstrak dan senyawa-senyawa yang akan diisilasi (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).

2.4.2 Metode Ekstraksi Maserasi

Ekstrak bawang putih dibuat dengan ekstraksi maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Bawang putih yang telah didapat kemudian dibersihkan dengan menggunakan air kemudian dicacah halus atau diblender (tanpa air). Setelah diblender potongan bawang putih dikeringkan dengan cara dijemur. Setelah kering, timbang potong bawang putih seberat 200g kemudian potongan bawang putih 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 bawang putih dengan konsentrasi 100%.

Untuk membuat berbagai konsentrasi yang diperlukan dapat menggunakan rumus:

$$V1.M1 = V2.M2$$

Keterangan:

V1 = volume larutan mula-mula (ml)

M1 = konsentrasi mula-mula (%)

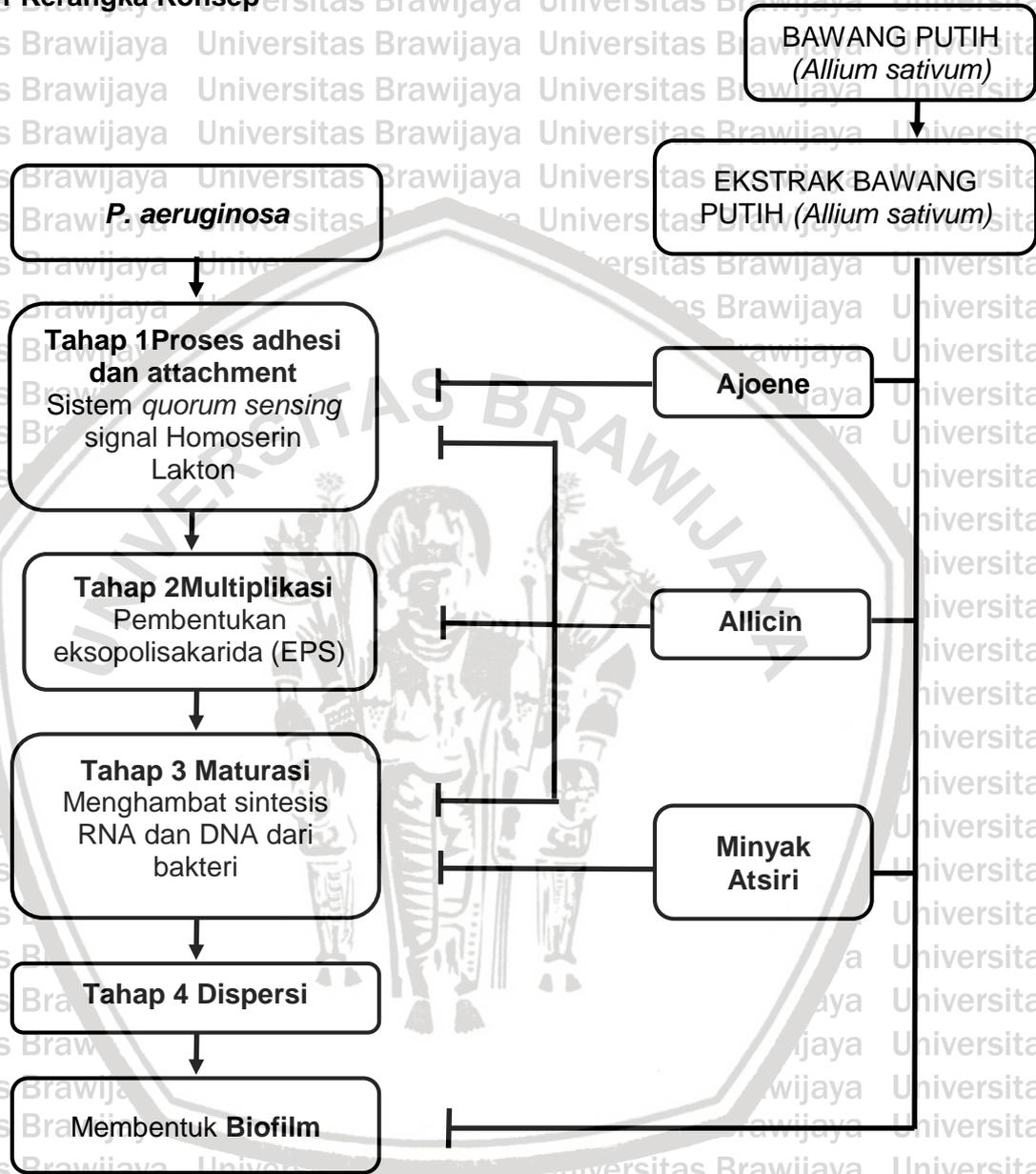
V2 = volume larutan sesudah diencerkan (ml)

M2 = konsentrasi sesudah diencerkan (%)

BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Keterangan :



: Proses



: Menghambat

Bagan 3.1. Kerangka Konsep Penelitian

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

Efek ekstrak bawang putih dapat mencegah pembentukan biofilm bakteri *P. aeruginosa* pada tahap pertama sampai ketiga karena terdapat kandungan 3 senyawa aktif didalamnya. *Ajoene* yang dapat mencegah pembentukan biofilm pada tahap awal dengan inhibisi proses *adhesi* dan *attachment* dan *Allicin* akan menghambat tumbuhnya biofilm dengan mencegah sistem *quorum sensing* pada *autoinducer homoserin lakton* serta menghambat terbentuknya eksopolisakarida (Wangi, et al, 2017). Penghambatan sintesis RNA maupun DNA bakteri diperankan oleh *allicin* serta minyak atsiri.

3.2 Hipotesis Penelitian

Ekstrak bawang putih (*Allium sativum*) berpotensi menghambat pembentukan biofilm terhadap *P. aeruginosa* secara *in vitro*.



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 bawang putih (*Allium sativum*) terhadap pembentukan biofilm pada bakteri *P. aeruginosa*, metode yang digunakan pada penelitian ini adalah *tube-test* (metode tabung).

4.2 Populasi dan Sampel

Penelitian ini menggunakan sampel *P. aeruginosa* pembentuk biofilm. Sampel ini diperoleh dari isolat *P. aeruginosa* pembentuk biofilm yang didapat dari Lab Mikrobiologi Universitas Brawijaya. Menurut Federer (1977), jumlah pengulangan penelitian dihitung dengan rumus sebagai berikut :

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

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

$$6n-6 \geq 15$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 3,5$$

$$n \text{ bulat} = 4$$

Keterangan:

n = jumlah pengulangan

p = jumlah perlakuan (dosis ekstrak bawang putih):

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

Kontrol : 0%

P1-P5 dengan konsentrasi = 7%, 8%, 9%, 10%, 11%

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 bawang putih (*Allium sativum*). Dalam penelitian ini digunakan konsentrasi 0%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%

4.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah derajat pembentukan biofilm bakteri dengan metode tabung yang dikuantifikasi dengan *Mean Gray Value*.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Julisampai dengan Agustus di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Pembuatan ekstrak bawang putih dilakukan di Politeknik Negeri Malang Fakultas Teknik Kimia.

4.5 Definisi Operasional

1. *P. aeruginosa* adalah bakteri gram negatif penyebab tersering dari infeksi nosokomial. Sampel ini diperoleh dari isolat *P. 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 *P. aeruginosa* yang terlihat dalam bentuk cincin berwarna ungu padamedium tabung.
3. Ekstrak bawang putih adalah hasil ekstraksi cair bawang putih dengan pelarut etanol. Ekstrak yang didapat dianggap memiliki kandungan ekstrak sebesar 100%. Bawang putih berasal dari Laboratorium Materia Medika.

4. Konsentrasi Hambat Biofilm Minimum (KHBM) adalah konsentrasi ekstrak Bawang Putih terendah yang mampu menghambat pembentukan biofilm yang ditandai dengan terjadinya penipisan bentuk cincin dan lapisan ungu kebiruan yang terdapat pada dinding dan dasar tabung.
5. *Mean Gray Value* adalah acuan skala intensitas warna yang terdapat pada program *Adobe Photoshop CS6*. Skala berkisar antara 0-255. Angka mendekati 0 menunjukkan semakin gelapnya intensitas warna (biofilm pekat). Sedangkan angka mendekati 255 menunjukkan intensitas warna terang (biofilm hilang).

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Bawang Putih

1. Bawang putih (*Allium sativum*)
2. Etanol 96%
3. Timbangan analitik
4. Gelas kimia
5. *Rotary Vacuum Evaporator*
6. Spatula
7. Kertas saring
8. Oven

4.6.2 Alat dan Bahan Identifikasi Bakteri

1. Alat
 - a. Tabung reaksi
 - b. Ose
 - c. Lampu spiritus dan Bunsen

d. Incubator

e. Spektrofotometer

f. Korek api

g. Label

h. Kertas strip

i. Larutan reagen *tetramethyl p-phenylenediamine dichloreide* 1% (Kovac's reagen)

j. *Object glass* dan Kaca penutup

1. Bahan

a. *P. aeruginosa*

b. Medium *MacConkey*

c. Suspense bakteri dari *Mueller-Hinton Broth* (MH Broth)

d. Bahan pewarnaan gram : kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin

e. Akuades steril

f. Kertas penghisap atau tisu

g. Minyak emersi

4.6.3 Alat dan Bahan Deteksi Biofilm

1. TSB $_{glu}$

2. Biakan *P. aeruginosa* pembentuk biofilm

3. Tabung reaksi

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

5. *Deionizedwater*

6. Kristal violet

7. Pipet

8. Ose

9. Inkubator

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Persiapan Bawang Putih (*Allium sativum*)

4.7.1.1 Ekstraksi dan Evaporasi

1. Sebanyak 500 gram bawang putih terlebih dahulu dikupas kulitnya dan dicuci bersih.
2. Bawang putih dikeringkan dalam oven pada suhu 40°C dan dihaluskan hingga menjadi serbuk kering.
3. Serbuk kering direndam dalam 2 liter pelarut etanol 96% selama 3x24 jam. Pengadukan pada metode maserasi dilakukan sebanyak 12 kali selama 15 menit.
4. Dilakukan penyaringan untuk memisahkan fitrat dari ampas.
5. Hasil saringan kemudian diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator* hingga kental untuk memisahkan larutan ekstrak bawang putih dengan pelarut etanol (Karina, 2013).

4.7.2 Identifikasi Bakteri

4.7.2.1 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 *P. 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.

4.7.2.2 Tes Oksidase

Kultur pada *MacConkey* diambil satu ose, kemudian dilakukan tes oksidase. Prosedur tes oksidase adalah sebagai berikut:

1. Pada penelitian ini dilakukan tes oksidase metode strip.
2. Kertas strip dibasahi dengan larutan reagen *tetramethyl p-phenylenediamine dichloride* 1%.
3. Bakteri yang diperiksa, digoreskan dengan ose platina/batang gelas pada kertas strip.
4. Tes positif apabila warna goresan tersebut menjadi ungu sampai hitam dalam waktu 10 detik.

4.7.2.3 Kultur untuk Identifikasi Bakteri

Bakteri *P. aeruginosa* dapat diidentifikasi dengan melakukan kultur pada media selektif, langkah-langkah sebagai berikut:

1. Pada penelitian ini dilakukan tes identifikasi *P. aeruginosa* dengan melakukan *streaking* (penggoresan) bakteri pada medium *MacConkey*.
2. Setelah itu, diinkubasi pada suhu 37°-42°C selama 18-24 jam dan dilihat penampakan koloni bakteri pada medium.
3. Koloni *P. aeruginosa* tidak memfermentasi laktosa sehingga tidak berwarna di medium *MacConkey*.

4.7.2.3 Tes Vitek 2 Compact

Tes Vitek 2 *compact* merupakan pengujian bakteri secara otomatis menggunakan berbagai jenis *card identification*. Setelah sample dimasukkan ke dalam alat, sample akan dianalisis secara otomatis dengan *well* seperti uji biokimiawi yang telah dimodifikasi dan dimasukkan ke dalam *card*

identification. Hasil yang telah dianalisis berupa lembar print hasil identifikasi dengan keterangan sebagai berikut :

1. Tipe *card*, *number cassette*, status dan tanggal pengujian
2. Organisme yang berhasil diidentifikasi
3. Presentase kebenaran (*probability*)
4. *Biochemical details*

Hasil yang diperoleh dinyatakan dengan prosentase dan kebenaran organisme yang berhasil diidentifikasi. Jika %*probability* >85%, hasil tersebut masih dapat diterima. Jika %*probability* <85%, bakteri yang teridentifikasi masih meragukan dan harus diulang kembali dalam pemurnian (Setyawan, 2016).

4.7.3 Pembuatan Perbenihan Cair Bakteri

1. Beberapa koloni bakteri *P. aeruginosa* diambil 2 ml dari lempeng *Mueller-Hinton Broth* kemudian dimasukkan 20 ml media TSB + *glucose*.
2. Tabung reaksi lalu diinkubasikan dalam incubator pada suhu 37°C selama 18-24 jam.
3. Dilakukan spektrofotometri dengan panjang gelombang 625 nm untuk mengetahui OD (*Optical Density*) dari suspensi.
4. Untuk mendapatkan suspensi bakteri uji dengan konsentrasi bakteri sebesar 10^8 /mL yang setara dengan OD = 0,1 maka dilakukan perhitungan sebagai berikut:

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

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)

5 Sehingga diperoleh volume (mL) bakteri yang akan ditambah pengencer untuk mendapatkan bakteri dengan konsentrasi 10^8 /ml sebanyak 4 mL. Kini bakteri telah siap digunakan untuk penelitian.

4.7.4 Uji Deteksi Pembentukan Biofilm (Metode *Tube-test*)

P. aeruginosa yang sudah teridentifikasi disimpan dalam media TSB + *glucose* dan diinkubasi pada suhu 37°C semalam. Mikroba kultur semalam selanjutnya dimasukkan ke tabung TSBglu (4 ml) dan diinkubasikan 37°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*, 1982).

4.7.5 Uji Hambat Pembentukan Biofilm pada *P. aeruginosa*

4.7.5.1 Uji Pendahuluan

1. Menyiapkan perbenihan cair bakteri dengan konsentrasi bakteri 1×10^8 CFU/ml.
2. Membuat suspensi bakteri dalam medium TSB + *glucose* berdasarkan perhitungan OD dari spektrofotometri.
3. Menyiapkan tujuh tabung steril yang akan diisi dengan bakteri dan konsentrasi ekstrak yang ditentukan untuk uji pendahuluan, yaitu 0% (kontrol); 3,125%, 6,25%; 12,5%; 25%; 50%.
4. Mengisi tabung reaksi 1 dengan suspensi bakteri sebanyak 4 ml, tabung 2-7 dengan suspensi bakteri dalam medium TSB + *glucose* dan ekstrak bawang putih sesuai dengan hasil perhitungan sebagai berikut:

Tabel 4.1 Hasil Perhitungan Ekstrak dan Suspensi Bakteri Uji Pendahuluan

Konsentrasi	Banyaknya Ekstrak	Suspensi Bakteri
0%	0 ml	4 ml
3,125%	0,125 ml	3,875 ml
6,25%	0,25	3,75 ml
12,5%	0,5 ml	3,5 ml
25%	1 ml	3 ml
50%	2 ml	2 ml

5. Seluruh tabung diinkubasikan selama 24 jam dengan suhu 37°C
6. Setelah 24 jam, tabung dikeluarkan dari inkubator dan dicuci dengan PBS (pH 7,3) dan dikeringkan airnya.

7. Tabung yang sudah dikeringkan diberi kristal violet (0,1%) 4 ml lalu setelah 20 menit dibuang dan tabung dicuci dengan *deionized water*.

8. Tabung dikeringkan.

Segera amati dan catat biofilm yang terbentuk. Dapat terlihat sebuah film melapisi sisi tabung. Hal ini diyakini sebagai indikasi pembentukan biofilm (Prahara *et al.*, 2013).

4.7.5.2 Penelitian Inti

1. Menyiapkan perbenihan cair bakteri dengan konsentrasi bakteri 1×10^8 CFU/ml.

2. Membuat suspensi bakteri dalam medium TSB + *glucose* berdasarkan perhitungan OD darispektrofotometri.

3. Menyiapkan tujuh tabung steril yang akan diisi dengan bakteri dan konsentrasi ekstrak yang ditentukan untuk uji pendahuluan, yaitu 0% (kontrol); 7%; 8%; 9%; 10%; 11%.

4. Mengisi tabung reaksi 1 dengan suspensi bakteri sebanyak 4 ml, tabung 2-7 dengan suspensi bakteri dalam medium TSB + *glucose* dan ekstrak bawang putih sesuai dengan hasil perhitungan sebagai berikut Kemudian mengisi tabung dengan ekstrak bawang putih dalam tabung reaksi 1-5 sehingga didapatkan larutan sebanyak 4 ml dengan konsentrasi ekstrak bawang putih pada masing-masing tabung sebagai berikut:

Tabel 4.2 Hasil Perhitungan Ekstrak dan Suspensi Bakteri Uji Pengulangan

Konsentrasi	Banyaknya Ekstrak	Suspensi Bakteri
0%	0 ml	4 ml
7%	0,28 ml	3,72 ml
8%	0,32 ml	3,68 ml
9%	0,36 ml	3,64 ml
10%	0,4 ml	3,6 ml
11%	0,44 ml	3,56 ml

6. Seluruh tabung diinkubasikan selama 24 jam dengan suhu 37°C
7. Setelah 24 jam, tabung dikeluarkan dari inkubator dan dicuci dengan PBS (pH 7,3) dan dikeringkan airnya.
8. Tabung yang sudah dikeringkan diberi kristal violet (0,1%) 4 ml lalu setelah 20 menit dibuang dan tabung dicuci dengan *deionized water*.
9. Tabung dikeringkan.
10. Segera amati dan catat biofilm yang terbentuk. Dapat terlihat sebuah film melapisi sisi tabung. Hal ini diyakini sebagai indikasi pembentukan biofilm (Prahara *et al.*, 2013).

4.7.6 Pengukuran *Mean Gray Value*

Hasil pembentukan biofilm pada tabung kemudian difoto dengan menggunakan kamera digital. Untuk mengetahui intensitas warna pada area cincin dan dinding tabung pada masing-masing kelompok maka digunakan program aplikasi *Adobe Photoshop CS6* untuk mengetahui nilai *Mean Gray Value* pada biofilm yang terbentuk pada tabung dengan konsentrasinya masing-masing.

Pengukuran intensitas warna biofilm menggunakan *Mean Gray Value* ini telah

diulas dalam beberapa jurnal salah satunya yaitu "Heterotrophic Pioneers Facilitate Phototrophic Biofilm Development" *Department of Biotechnology, Delft University of Technology*, Julianalaan 67, NL-2628 BC Delft, *The Netherlands* yang mengulas bahwa intensitas warna biofilm yang terbentuk dapat dihitung secara kuantitatif melalui hasil foto biofilm dengan kamera digital dan ditentukan *mean* dan standar deviasi pada *gray value* melalui measurement tool (G. Roeselers *et al.*, 2007). Aplikasi *Adobe photoshop CS6* mampu mengukur *mean gray value* melalui *measurement tool*. *Mean Gray Value* dinyatakan dalam skala 0 – 255. Semakin rendah nilai *Mean Gray Value* menunjukkan intensitas warna yang semakin tebal, sementara semakin tinggi nilai *Mean Gray Value* menunjukkan intensitas warna yang semakin tipis. Langkah-langkah dimulai dengan membuka aplikasi *Adobe Photoshop CS6*, pilih *File* dan masukkan hasil fotonya. Selanjutnya pilih *tab Window* dan pilih *Measurement Log*, blok area yang akan dilihat intensitas warnanya dengan menggunakan *Rectangular Marquee Tool*, lalu klik *Record Measurements* maka akan didapatkan nilai *Mean Gray Value* yang merupakan rata-rata dari intensitas warna pengecatan tabung (Andiyani, 2013).

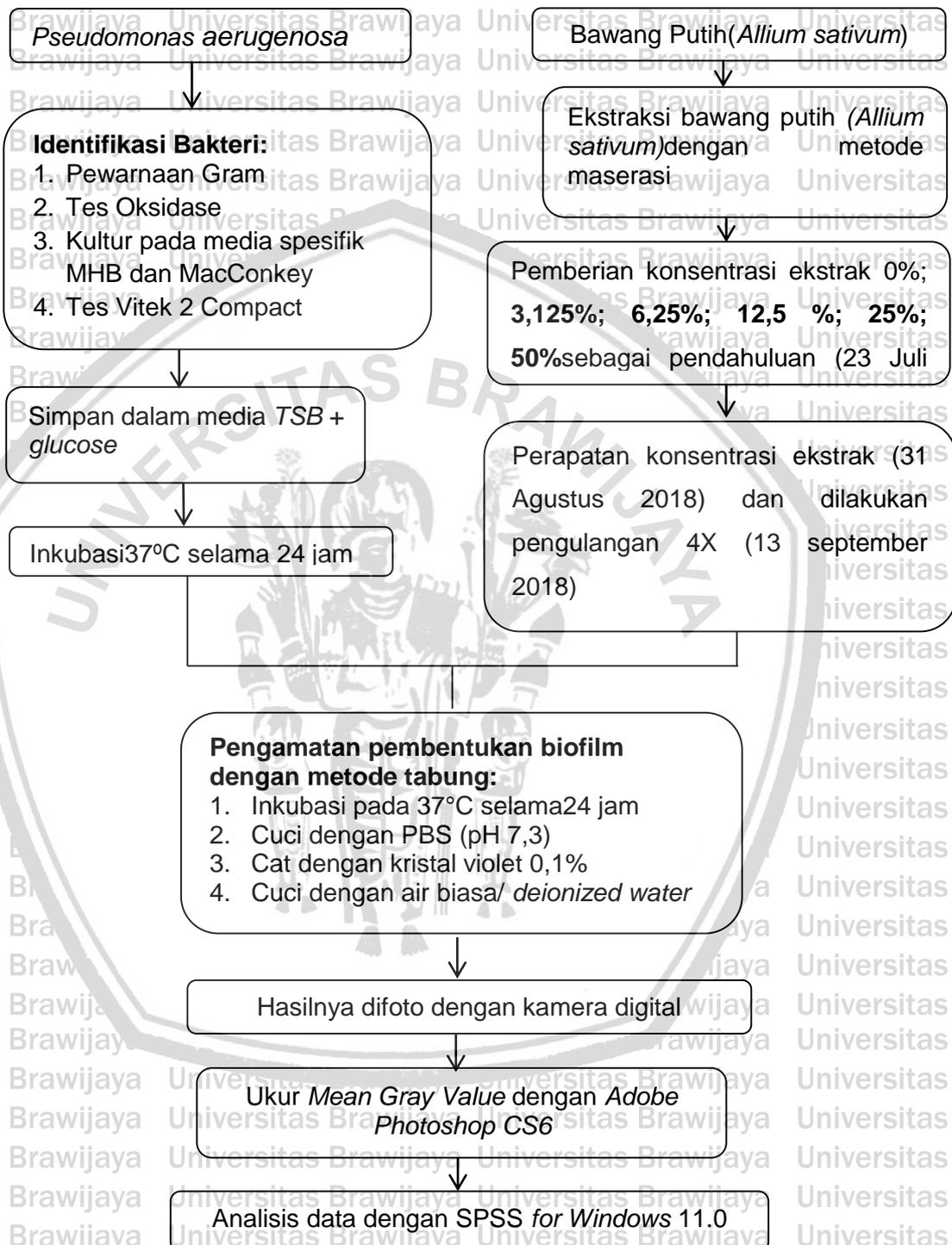
4.8 Analisis Data

Analisis hasil penelitian menggunakan aplikasi analisis statistik *SPSS Statistic* versi 11.0 untuk *Windows*. Langkah pertama yang dilakukan adalah menguji normalitas dan homogenitas dari hasil *Mean Gray Value*. Dianalisis dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk* untuk normalitas dan uji *Levene* untuk homogenitas. Kemudian dari hasil normalitas dan homogenitas dilanjutkan dengan uji komparasi dengan uji *Oneway ANOVA* untuk memastikan adanya perbedaan yang signifikan antara kelompok data. Kemudian dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Test* metode *Tukey* untuk mengetahui signifikansi suatu kelompok data terhadap

masing – masing kelompok data lainnya. Setelah itu dilakukan uji korelasi *Pearson* untuk mengetahui korelasi antara peningkatan konsentrasi ekstrak bawang putih terhadap *Mean Gray Value*.



4.8 Alur Penelitian



Bagan 4.1 Rancangan Operasional Penelitian



BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian

5.1.1 Hasil Ekstraksi Bawang Putih (*Allium sativum*)

Ekstrak bawang putih dibuat dengan ekstraksi maserasi menggunakan pelarut etanol 96%. Bawang putih yang telah didapat kemudian dibersihkan dengan menggunakan air kemudian dicacah halus atau diblender (tanpa air). Setelah diblender potongan bawang putih dikeringkan dengan cara dijemur. Setelah kering, timbang potong bawang putih seberat 200g kemudian potongan bawang putih 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 bawang putih konsentrasi 100%.



Gambar 5.1 Hasil Ekstrak Etanol Bawang Putih (*Allium sativum*).

5.1.2 Hasil Identifikasi Bakteri

Bakteri yang digunakan merupakan bakteri *P. aeruginosa*. Identifikasi bakteri ini diawali dengan metode pewarnaan Gram, kultur bakteri pada media

MacConkey dan *Mueller Hinton*, *oxidase strip test*, dan tes *Vitek*. Pewarnaan Gram menunjukkan hasil berupa bakteri Gram negatif dengan bentuk batang seperti pada Gambar 5.2. Perbenihan pada media *MacConkey* menunjukkan pertumbuhan koloni bakteri *P. aeruginosa* tidak memfermentasi laktosa sehingga tidak berwarna di medium *MacConkey* dan pada media *nutrient agar plate* menunjukkan pertumbuhan koloni bakteri *P. aeruginosa* memproduksi pigmen piocyanin sehingga terbentuk wana biru kehijauan pada *nutrient agar plate* (Brooks et al., 2013).

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 *P. aeruginosa* yang memberikan hasil positif pada uji oksidase. Kemudian tes *Vitek Compact 2* untuk membuktikan bahwa koloni yang dikultur 99% adalah bakteri *P. aeruginosa*.



Gambar 5.2 Hasil Pewarnaan Gram Bakteri *P. aeruginosa*.



Gambar 5.3 Hasil Oxidase Strip Test pada *P. aeruginosa*



Gambar 5.4 Hasil Perbenihan Bakteri *P. aeruginosa* pada media MacConkey.



Gambar 5.5 Hasil Perbenihan Bakteri *P. aeruginosa* pada media NAP.

bioMérieux Customer: RS dr SYAIFUL ANWAR MALANG
 Microbiology Chart Report Printed Feb 9, 2018 07:38 CST

Patient Name: ARNOLDUS
 Location: RSI
 Lab ID: 08022018.2121
 Patient ID: 255175
 Physician:
 Isolate Number: 2

Organism Quantity:
 Selected Organism : Pseudomonas aeruginosa
 Source: P
 Collected:

Comments:

Identification Information:	Analysis Time: 6.00 hours 99% Probability Pseudomonas aeruginosa	Status: Final
Selected Organism	Bionumber: 0043053003500252	
ID Analysis Messages		

Susceptibility Information	Analysis Time: 11.25 hours	Status: Final			
Antimicrobial	MIC	Interpretation	Antimicrobial	MIC	Interpretation
ESBL			Ertapenem	<= 0.25	S
Ampicillin	>= 32	R	Meropenem	4	S
Ampicillin/Sulbactam	>= 32	R	Amikacin	<= 1	S
Piperacillin/Tazobactam	8	S	Gentamicin	<= 0.25	S
Cefazolin	>= 64	R	Ciprofloxacin	>= 8	R
Ceftazidime	4	S	Tigecycline	>= 512	R
Ceftriaxone			Nitrofurantoin	80	R
Cefepime	2	S	Trimethoprim/Sulfamethoxazole		
Aztreonam	8	S			

+ = Deduced drug * = AES modified ** = User modified

AES Findings	
Confidence:	Consistent

Gambar 5.6 Hasil Uji Vitek Compact 2 Bakteri *P. aeruginosa* .

1.1.3 Hasil Uji Hambat Pembentuk Biofilm

Sebelum melakukan penelitian inti, dilakukan penelitian pendahuluan untuk menentukan konsentrasi yang akan dirapatkan dan digunakan dalam penelitian inti. Pada penelitian pendahuluan, konsentrasi yang digunakan adalah 0%, 3,125%, 6,25%, 12,5%, 25%, 50%. Hasil dari penelitian pendahuluan secara visual menunjukkan pada konsentrasi 12,5% sudah terjadi hambatan pembentukan biofilm bakteri *P. aeruginosa* , sedangkan pada konsentrasi 25% dan 50% sudah tidak ada biofilm yang terbentuk. Penelitian ini kemudian dilanjutkan dengan perapatan konsentrasi dari 6,25% sampai 12,5% menjadi 6 konsentrasi yaitu 0%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11% dan pengulangan dilakukan sebanyak 4 kali. Hasil penelitian inti secara visual

menunjukkan bahwa pada konsentrasi 11% sudah terjadi hambatan pembentukan biofilm *P. aeruginosa*.

Pada penelitian 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 secara kuantitatif dengan melihat intensitas warna cincin pada masing-masing tabung (*Mean Gray Value*) dengan aplikasi *Adobe Photoshop CS6* yang dinyatakan dalam skala 0 – 255. Pengukuran *Mean Gray Value* juga dilakukan pada tabung yang masih baru untuk melihat nilai awal *Mean Gray Value* tabung kosong untuk tabung yang digunakan. Apabila *Mean Gray Value* pada kelompok perlakuan lebih kecil 10% dari *Mean Gray Value* tabung kosong yang masih baru, maka konsentrasi pada kelompok tersebut merupakan Kadar Hambat Biofilm Minimal (KHBM). Penilaian pada tabung kosong menunjukkan nilai *Mean Gray Value* sebesar 165,72. Nilai ini kemudian dibandingkan dengan nilai *Mean Gray Value* kelompok perlakuan, seperti terlihat pada tabel 5.1, Gambar 5.6 dan 5.7.

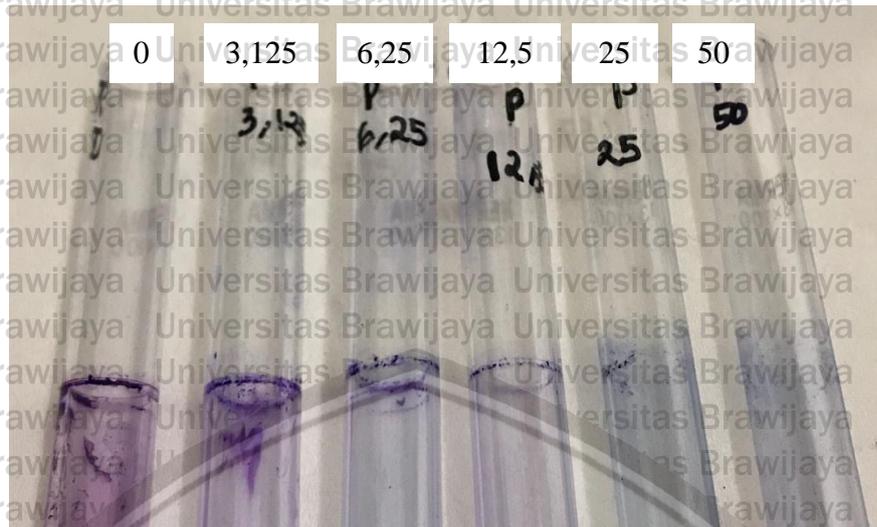
Tabel 5.1 Hasil Pengukuran Mean Gray Value dengan Aplikasi Adobe Photoshop CS6.

Konsentrasi	Pengulangan				Mean \pm SD	P-Value
	I	II	III	IV		
0%	122.54	105.73	97.77	105.76	107.95	
7%	123.19	120.51	126.85	117.62	122.0425	
8%	123.35	129.96	127.40	127.72	127.1075	
9%	126.78	138.46	132.80	136.05	133.5225	0.000
10%	138.52	140.60	137.78	142.21	139.7775	
11%	138.52	140.43	140.87	147.78	142.76*	
Mean Gray Value Tabung Kosong	151.23					

*) merupakan KHBM karena nilai berada dalam rentang 10% dari *Mean Gray Value* tabung kosong (151.23).

Keterangan :

P-Value < 0.05

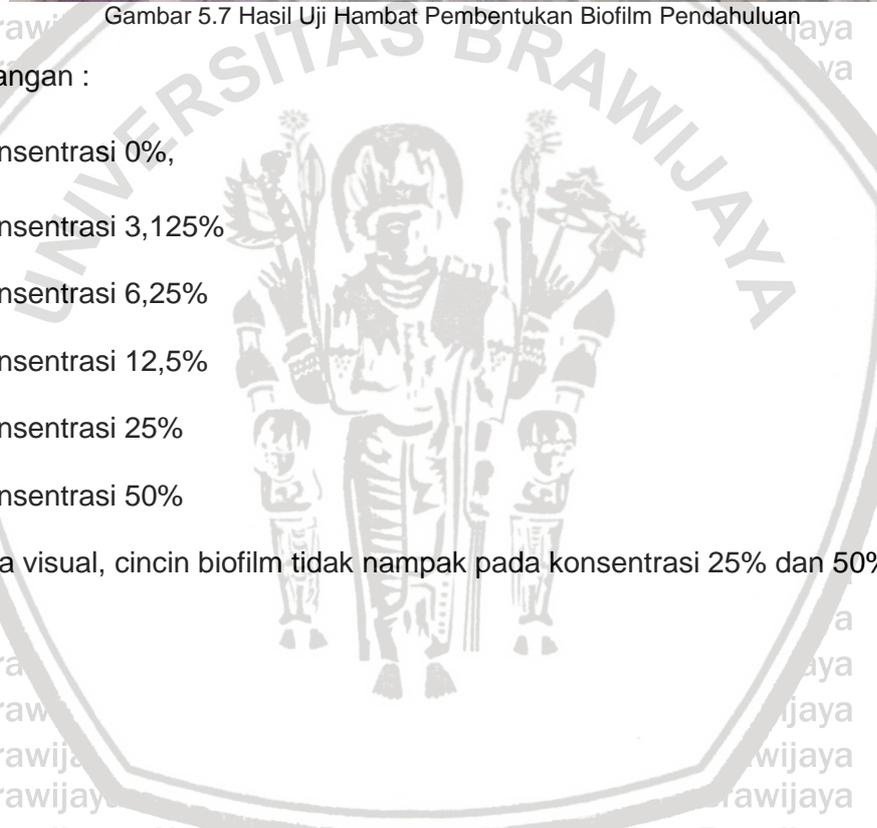


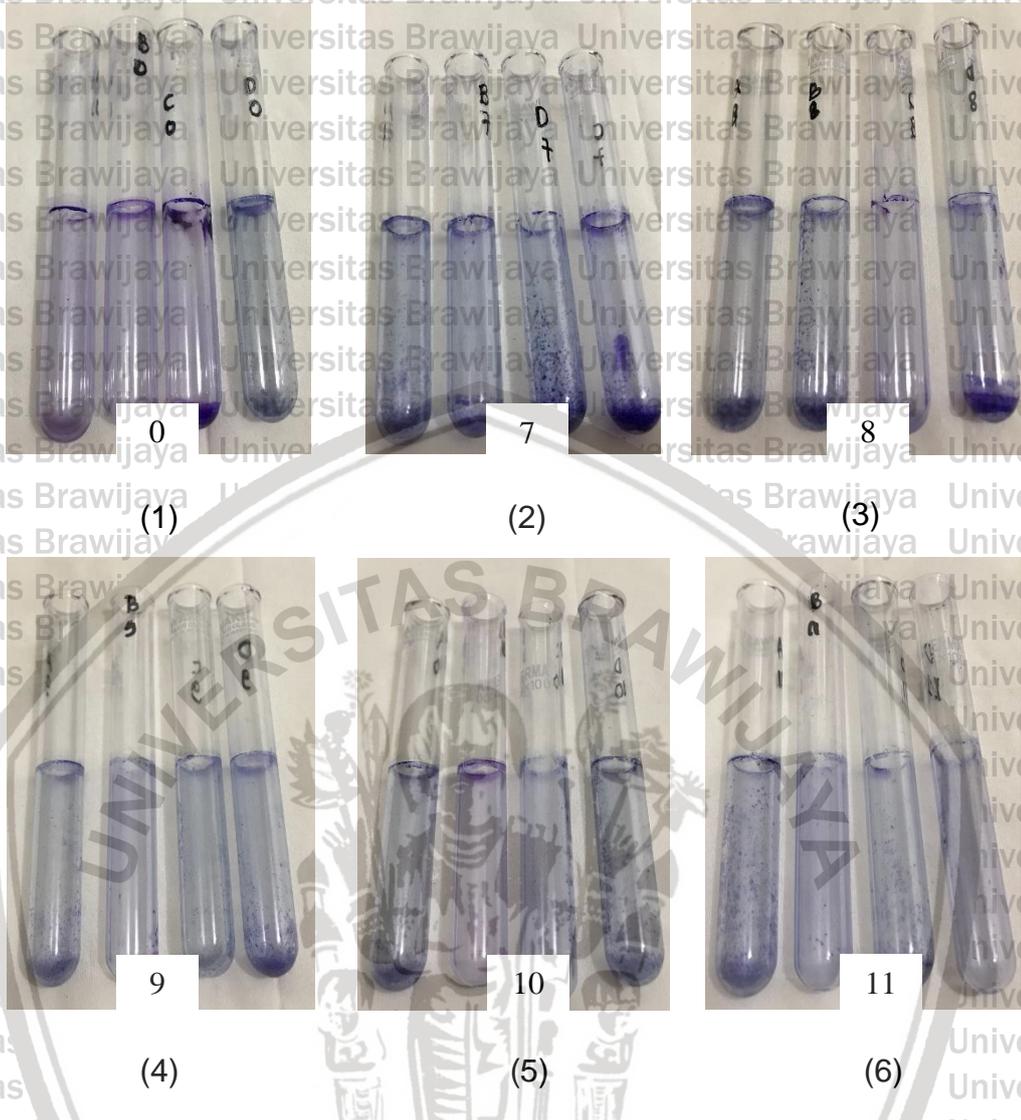
Gambar 5.7 Hasil Uji Hambat Pembentukan Biofilm Pendahuluan

Keterangan :

- (1) konsentrasi 0%,
- (2) konsentrasi 3,125%
- (3) konsentrasi 6,25%
- (4) konsentrasi 12,5%
- (5) konsentrasi 25%
- (6) konsentrasi 50%

Secara visual, cincin biofilm tidak nampak pada konsentrasi 25% dan 50%



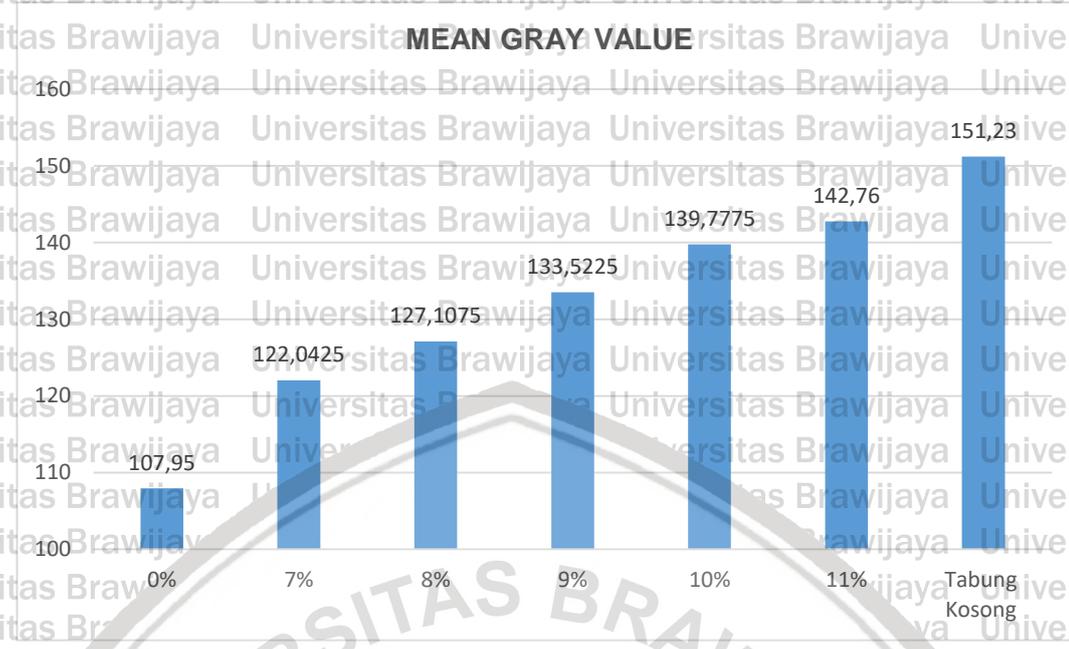


Gambar 5.8 Hasil Uji Hambat Pembentukan Biofilm Pengulangan 1 – 4.

Keterangan :

- (1) konsentrasi 0%
- (2) konsentrasi 7%
- (3) konsentrasi 8%
- (4) konsentrasi 9%
- (5) konsentrasi 10%
- (6) konsentrasi 11%

Secara visual, cincin biofilm terhambat pada konsentrasi 11%.



Gambar 5.9 Grafik Pengukuran Mean Gray Value

Keterangan :
P-Value < 0.05

5.2 Analisis Data

Analisis hasil penelitian menggunakan aplikasi analisis statistik *SPSS Statistic* versi 11.0 untuk *Windows*. Langkah pertama yang dilakukan adalah menguji normalitas dan homogenitas dari hasil *Mean Gray Value* yang didapat pada tabel

5.1. Dianalisis dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk* untuk normalitas dan uji *Levene* dengan pilihan homogenitas. Kemudian dari hasil normalitas dan homogenitas dilanjutkan dengan uji komparasi dengan uji *Oneway ANOVA* untuk memastikan adanya perbedaan yang signifikan antara kelompok data. Kemudian dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Test* metode *Tukey* untuk mengetahui signifikansi suatu kelompok data terhadap masing – masing kelompok data lainnya. Setelah itu dilakukan uji korelasi *Pearson* untuk mengetahui korelasi antara peningkatan konsentrasi ekstrak bawang putih terhadap *Mean Gray Value*.

5.2.1 Uji Normalitas dan Homogenitas

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 *Shapiro-Wilk* menunjukkan nilai $p = 0,074$, maka disimpulkan bahwa data berdistribusi normal. Kemudian didapatkan hasil uji homogenitas *Levene* dengan nilai $p = 0,146$, maka dapat disimpulkan bahwa data bervariasi sama atau homogen. Berdasarkan hasil ini dapat dilakukan uji statistik parametrik.

Tabel 5.2 Hasil Uji Normalitas Metode Shapiro-Wilk

	Kolmogorov-Smirnov			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
MGV	.131	24	.200*	.925	24	.074

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Tabel 5.3 Hasil Uji Homogenitas

Lavene Statistic	df1	df2	Sig.
1.892	5	18	.146

5.2.2 Uji Oneway ANOVA

Uji *Oneway ANOVA* dilakukan untuk mengetahui tingkat perbedaan antara antara rerata tiap kelompok dalam keseluruhan data yang telah didapatkan. Data dianggap berbeda signifikan bila $p < 0,05$. Hasil uji menunjukkan nilai $p = 0,000$ (kurang dari 0.05), maka disimpulkan bahwa terdapat perbedaan antara rerata tiap kelompok dan signifikan.

Tabel 5.4 Hasil Uji *Oneway ANOVA*

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3283.673	5	656.735	22.775	.000
Within Groups	519.034	18	28.835		
Total	3802.707	23			

5.2.3 Uji Post Hoc

Uji *Post Hoc* dilakukan untuk mengetahui perbandingan rata – rata secara signifikan dalam jumlah analisis varian. Bila nilai $p > 0,05$, maka dapat diartikan bahwa rata – rata adalah sama dan perbedaan rata – rata tidaklah signifikan.

Uji ini tidak wajib dilakukan apabila hasil *Oneway ANOVA* tidak memberikan hasil signifikan, namun dalam penelitian ini, uji ini dilakukan untuk memastikan kembali ada tidaknya perbedaan antar tiap-tiap kelompok perlakuan dalam penelitian. Tabel 5.5. dan Tabel 5.6. menggambarkan hasil perbandingan nilai p setiap kelompok konsentrasi terhadap konsentrasi lainnya. Nilai $p < 0,05$ menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan antara dua kelompok perlakuan.

Tabel 5.5 Nilai Signifikan Kelompok Terhadap Kelompok Lainnya Pada Uji Post Hoc

	0%	7%	8%	9%	10%	11%
0%		0,017	0,001	0,000	0,000	0,000
7%	0,017		0,763	0,068	0,002	0,000
8%	0,001	0,763		0,555	0,036	0,007
9%	0,000	0,068	0,555		0,580	0,197
10%	0,000	0,002	0,036	0,580		0,967
11%	0,000	0,000	0,007	0,197	0,967	

Tabel 5.6 Rangkuman Hasil Uji Post Hoc

	0%	7%	8%	9%	10%	11%
0%		+	+	+	+	+
7%	+		-	-	+	+
8%	+	-		-	+	+
9%	+	-	-		-	-
10%	+	+	+	-		-
11%	+	+	+	-	-	

Keterangan :

+ = $p < 0,05$

- = $p > 0,05$

Berdasarkan kedua tabel diatas diketahui bahwa tidak terdapat dua kelompok dengan perbedaan yang signifikan. Hasil ini memperkuat hasil uji *Oneway ANOVA* yang telah dilakukan sebelumnya, bahwa perbedaan yang terdapat antara kelompok perlakuan tidak signifikan.

5.2.4 Uji Korelasi *Pearson*

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

Tabel 5.7 Hasil Uji Korelasi *Pearson*

		Konsentrasi	MGV
Konsentrasi	Pearson Correlation	1	.893**
	Sig. (2-tailed)	.	.000
	N	24	24
MGV	Pearson Correlation	.893**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	.
	N	24	24

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Berdasarkan uji yang dilakukan, didapatkan hasil nilai $p=0,000$ dengan nilai korelasi 0,893. Adapun klasifikasi nilai korelasi *Pearson* sebagai berikut :

Nilai Korelasi 0 = tidak ada korelasi antara dua variabel

Nilai Korelasi $> 0 - 0,25$ = sangat lemah

Nilai Korelasi $> 0,25 - 0,5$ = cukup

Nilai Korelasi $> 0,5 - 0,75$ = kuat

Nilai Korelasi $> 0,75 - 0,99$ = sangat kuat

Nilai Korelasi 1 = sempurna

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

1. Nilai korelasi (r) = 0,893, yang berarti korelasi antara konsentrasi ekstrak bawang putih dengan *Mean Gray Value* atau ketebalan biofilm kuat.
2. Arah korelasi positif, sehingga disimpulkan semakin tinggi konsentrasi ekstrak bawang putih, semakin tinggi pula nilai *Mean Gray Value* yang menandakan semakin tipis cincin biofilm yang terbentuk.
3. Nilai $p = 0,000$, yang menandakan terdapat korelasi yang signifikan antara konsentrasi ekstrak bawang putih dengan *Mean Gray Value*

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan bakteri *P. aeruginosa* yang didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Bakteri *P. aeruginosa* ditanam pada tabung dengan medium *TSB Glucose* yang diberi perlakuan berupa pemberian ekstrak etanol bawang putih (*Allium sativum*) dengan konsentrasi tertentu. Ekstrak bawang putih (*Allium sativum*) berasal dari serbuk atau simplisia bawang putih sberat 500 yang diperoleh langsung dari Laboratorium Materia Medika Batu, Malang. Simplisia bawang putih (*Allium sativum*) tersebut kemudian diekstraksi menggunakan metode maserasi dimana simplisia akan dilarutkan dalam 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 dari bawang putih seperti minyak atsiri *ajoene*, dan *allicin* lebih sesuai. Pelarut akan menembus dinding sel yang mengandung zat aktif dalam sel dengan luar sel, sehingga larutan yang terpekat didesak keluar (Pratiwi, 2010).

Sebelum melakukan penelitian inti, dilakukan penelitian pendahuluan untuk menentukan konsentrasi yang akan dirapatkan dan digunakan dalam penelitian inti. Pada penelitian pendahuluan, konsentrasi yang digunakan adalah 0%, 3,125%, 6,25%, 12,5%, 25%, 50%. Hasil dari penelitian pendahuluan secara visual menunjukkan pada konsentrasi 12,5% sudah terjadi hambatan pembentukan biofilm bakteri *P. aeruginosa*, sedangkan pada konsentrasi 25% dan 50% sudah tidak ada biofilm yang terbentuk. Penelitian ini kemudian dilanjutkan dengan perapatan konsentrasi dari 6,25% sampai 12,5% menjadi 6 konsentrasi yaitu 0%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11% dan pengulangan dilakukan

sebanyak 4 kali. Hasil penelitian ini secara visual menunjukkan bahwa pada konsentrasi 11% sudah terjadi hambatan pembentukan biofilm *P. aeruginosa*.

Pada penelitian 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 secara kuantitatif dengan melihat intensitas warna cincin pada masing-masing tabung (*Mean Gray Value*) dengan aplikasi *Adobe Photoshop CS6*. Hasil pengamatan pada konsentrasi 0% hingga 50% menunjukkan adanya kenaikan rata-rata *Mean Gray Value* yang berbanding lurus dengan kenaikan konsentrasi ekstrak etanol bawang putih (*Allium sativum*). Semakin tinggi nilai *Mean Gray Value* menunjukkan semakin tipisnya cincin yang terbentuk. Kadar Hambat Biofilm Minimal (KBHM) juga dapat ditemukan pada penelitian ini, yaitu pada kadar 11%.

Hasil penelitian ini membuktikan bahwa ekstrak etanol bawang putih (*Allium sativum*) mampu menghambat pembentukan biofilm bakteri *P. aeruginosa*. Hal ini dapat dilihat berdasarkan peningkatan nilai *Mean Gray Value* yang searah dengan peningkatan konsentrasi ekstrak etanol bawang putih (*Allium sativum*) yaitu pada konsentrasi 11% didapatkan MGV lebih dari 136,107 (MGV tabung kosong dikurangi 10% dari MGV tabung kosong).

Penelitian ini selaras dengan sebuah penelitian yang membuktikan potensi ekstrak bawang putih dalam menghambat pertumbuhan biofilm pada 6 bakteri yaitu 3 Gram negatif dan 3 bakteri Gram positif. Dari hasil penelitian tersebut daya hambat pertumbuhan biofilm tertinggi terdapat pada bakteri Gram positif yaitu *Streptococcus pneumoniae* dan *Bacillus cereus*. Hal ini membuktikan bahwa ekstrak bawang putih mempunyai daya hambat yang lebih poten terhadap bakteri Gram positif daripada Gram negatif (Mohsenipour dan Hassanshahian, 2015).

Penelitian lain yang dilakukan oleh Lihuan (2012), menguji efek *allicin* dari bawang putih (*Allium sativum*) dalam menghambat pembentukan biofilm *P. aeruginosa*. Pada penelitian tersebut disampaikan bahwa hasil analisis dari bahan aktif *allicin* dapat mempengaruhi sistem *quorum sensing* dengan menghambat pembentukan EPS (Ekstrapolisakarida). Selain itu, *allicin* mampu mencegah perlekatan awal bakteri pada permukaan. Ekstrak etanol *Allium sativum* terbukti dapat mensupresi gen biofilm *pelF* yang terdeteksi dengan *polymerase chain reaction* (PCR) dan *agarose gel electrophoresis*. Gen *pelF* yang tersupresi menghambat sistem *quorum sensing* bakteri *P. aeruginosa* sehingga pertumbuhan biofilm terhambat (Ninyio, et al, 2017).

Birring OJ (2015), mengatakan bahwa pada konsentrasi 40% dan 70% ekstrak bawang putih signifikan mencegah pertumbuhan biofilm dari bakteri *Enterobacter fecalis* (Gram positif) dan pada penelitian Zakaria (2004), menyatakan bahwa ekstrak bawang putih mencegah pertumbuhan biofilm pada bakteri Gram positif maupun negatif.

Manfaat klinis yang dapat dikembangkan dari hasil penelitian ini adalah penggunaan bawang putih sebagai alternatif terapi pada infeksi *P. aeruginosa*. Diharapkan bahwa pembentukan biofilm *P. aeruginosa* dapat dicegah sehingga dapat mengurangi morbiditas penyakit infeksi dan resistensi antibiotik.

Keterbatasan yang ada pada penelitian ini salah satunya adalah tekstur ekstrak yang kasar, ekstrak tersebut mudah menempel pada tabung. Saat dilakukan pengecatan ekstrak tersebut tidak hilang saat dicuci sehingga harus digosok menggunakan pipet dan akibatnya biofilm juga ikut tergores pipet sehingga tidak menjadi bentuk cincin yang utuh. Ekstrak bawang putih yang kasar juga dipengaruhi oleh lamanya penyimpanan ekstrak di lemari pendingin sehingga konsistensi lebih kental dan mudah mengendap pada tabung, semakin lama ekstrak disimpan akan semakin mempengaruhi potensinya dalam menghambat

pembentukan biofilm. Kesalahan pengukuran dan kurang teliti saat observasi juga dapat mempengaruhi hasil dari penelitian ini. Keterbatasan lain dari penelitian ini adalah pengukuran *Mean Gray Value* yang dipengaruhi oleh cahaya, posisi tabung, dan cincin yang terdokumentasi. Karena penelitian ini bersifat *in vitro*, perlu dilakukan penelitian berikutnya secara *in vivo* untuk mengetahui efisiensi ekstrak etanol bawang putih terhadap pertumbuhan biofilm yang terdapat pada jaringan hidup.



BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

1. Berdasarkan dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol bawang putih (*Allium sativum*) memiliki potensi menghambat pembentukan biofilm *P. aeruginosa* secara *in vitro*.
2. Berdasarkan dari hasil penelitian ditemukan Konsentrasi Hambat Biofilm Minimum (KHBM) dari ekstrak etanol bawang putih (*Allium sativum*) dalam menghambat pembentukan biofilm bakteri *P. aeruginosa* sebesar 11%.
3. Berdasarkan dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa terdapat korelasi antara ekstrak etanol bawang putih (*Allium sativum*) terhadap penghambatan pembentukan biofilm bakteri *P. aeruginosa*.

7.2 Saran

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

1. Penelitian dengan ekstrak yang berbeda pada bakteri *P. aeruginosa* dalam menghambat biofilm.
2. Metode ekstrak bawang putih (*Allium sativum*) tetap menghasilkan konsentrasi 100% serta menghasilkan ekstrak yang tidak terlalu pekat sehingga tidak mengendap atau menempel di dinding tabung.
3. Potensi untuk mengembangkan penelitian yang menggunakan ekstrak bawang putih dalam menghambat biofilm pada bakteri yang lain atau jamur.
4. Dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengikuti perjalanan pengaruh ekstrak etanol bawang putih dalam menghambat pembentukan biofilm *P. aeruginosa* dalam waktu ke waktu.

5. Perlu dilakukan penelitian tentang efek lama penyimpanan ekstrak terhadap kandungan dan efektivitas zat aktif dalam ekstrak.
6. Dilakukan masa inkubasi lebih dari 24 jam agar biofilm yang dihasilkan lebih tebal dan untuk mengetahui sejauh mana potensi ekstrak bawang putih dapat menghambat biofilm tersebut.



DAFTAR PUSTAKA

- Aini, N., & Setyawan, A. 2006. *Bioactive compound that inhabit quorum sensing system in gram negative bacteria*. Biofarmasi Journal Of Natural Product Biochemistry, 4(1), 34-40.
- Andika, a., & pratiwi, s. U. T. 2015. *Pengaruh kombinasi minyak atsiri siri (piper betle l.) Dengan antibiotik kloramfenikol, streptomisin, dan eritromisin terhadap pembentukan biofilm staphylococcus aureus*. Universitas Gadjah Mada.
- Andiyani, P. D. Z., & Hidayati, D. Y. N. 2013. *Efectivit test of red ginger (Zingiber official var Rubra) to biofilm inhibition of Staphylococcus aureus bacteria in vitro*.
- Aparna, M.S. and S. Yadav. 2008. *Biofilm: microbes and disease, Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 12:6.
- Ardani, M., Pratiwi, S.U.T. and Hertiani, T., 2010. Efek campuran minyak atsiri daun cengkeh dan kulit batang kayu manis sebagai antiplak gigi. *Majalah Farmasi Indonesia*, 21(3), pp.191-201.
- Baker P, Hill PJ, Snarr BD, Alnabelsaya N, Pestrak MJ, Lee MJ, et al. 2016. *Exopolysaccharide biosynthetic glycoside hydrolases can be utilized to disrupt and prevent P. aeruginosa biofilms*. Sci Adv (2): 1-3.
- Birring, O. J., Vioria, I. L., & Nunez, P. 2015. *Anti-microbial efficacy of Allium sativum extract against Enterococcus faecalis biofilm and its penetration into the root dentin: An in vitro study*. Indian Journal of Dental Research, 26(5), 477.
- 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.
- CDC. 2013. *Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013*. United States: Centers for Disease Control and Prevention.
- Characklis, W., & Marshall, K. C. 1990. *Biofilms: A basis for an interdisciplinary approach*, 3-15. *Biofilms*. Wiley-Interscience, New York, NY.
- Christensen GD, Bisno AL, Simpsom WA, Beachey EH. 1982. *Adherence of slime producing strains of Staphylococcus epidermidis to smooth surfaces*. Infect Immun;37:318-326.
- Crouzet M, Senechal CL, Brozel VS, Costaglioli P, Barthe C, Bonneu M, et al. 2014. *Exploring early steps in biofilm formation: set-up of an experimental*

- system for molecular studies. *BMC Microbiology* (14): 253.
- 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.
- Departemen Pertanian. 2008. *Impor beras per negara asal*. www.deptan.go.id. [20 Agustus 2018].
- Federer, W. T. 1977. *Experimental Design Theory And Application, Third Edition*. New Delhi Bombay Calcuta: Oxford and IBH Publishing Co.
- Gibbons, S., 2004. Anti-staphylococcal plant natural products. *Natural product reports*, 21(2), pp.263-277.
- 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.
- Harborne, J.B. 1987. *Metode Fitokimia, Edisi ke dua*, 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.
- Iptek Net. 2005. *Pemanfaatan Pati Ubi Kayu dalam Berbagai Industri*.<http://www.ipknet.com>. (Diakses pada 15 November 2017).
- ITIS Standard Report Page: *P. aeruginosa* . 2018. Retrieved from https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=965278#null/.(Diakses pada 16 November 2017).
- Izano, E. A., Sadovskaya, I., Wang, H., Vinogradov, E., Ragnath, C., Ramasubbu, N., ... & Kaplan, J. B. 2008. *Poly-N-acetylglucosamine mediates biofilm formation and detergent resistance in Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Microbial pathogenesis*, 44(1), 52-60.
- Jakobsen, T.H., van Gennip, M., Phipps, R.K., Shanmugham, M.S., Christensen, L.D., Alhede, M., Skindersoe, M.E., Rasmussen, T.B., Friedrich, K., Uthe, F. and Jensen, P.Ø., 2012. Ajoene, a sulfur-rich molecule from garlic, inhibits genes controlled by quorum sensing. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(5), pp.2314-2325.

- Kaplan, J. B., Rangunath, C., Ramasubbu, N., & Fine, D. H. 2003. *Detachment of Actinobacillus actinomycetemcomitans biofilm cells by an endogenous β -hexosaminidase activity*. Journal of bacteriology, 185(16), 4693-4698.
- Karina, R. 2013. *Pengaruh Ekstrak Bawang Putih (Allium sativum) terhadap Pertumbuhan Bakteri Streptococcus mutans secara In Vitro*. <http://repository.uinjkt.ac.id/dspace/handle/123456789/26406>
- Kartasapoetra, G. 1992. *Budidaya Tanaman Berkhasiat Obat*. Jakarta: Penerbit Rineka Cipta.
- Kemenkes. *Riset Kesehatan Dasar 2013*. 2013. Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian Kesehatan RI.
- Lihua, L., Jianhui, W., Jialin, Y., Yayin, L., & Guanxin, L. 2013. *Effects of Allicin on the Formation of P. aeruginosa Biofilm and the Production of Quorum-Sensing Controlled Virulence Factors*. Polish journal of microbiology, 62(3), 243-251.
- Madigan MT, Martinko JM, Brock TD. 2006. *Brock Biology of Microorganisms*. 11th Ed. New Jersey: Pearson Prentice Hall. Hal : 617-619
- Mahmoud, A., Zahran, W., Hindawi, G., Labib, A., & Galal, R. 2013. *Prevalence of Multidrug-Resistant P. aeruginosa in Patients with Nosocomial Infections at a University Hospital in Egypt, with Special Reference to Typing Methods*. Journal Of Virology & Microbiology, 1-13.
- Marić, S., & Vraneš, J. 2007. *Characteristics and significance of microbial biofilm formation*. Periodicum Bilogorum. 109, 115-121.
- Mathur, T., Singhal, S., Khan, S., Upadhyay, D. J., Fatma, T., & Rattan, A. (2006). *Detection of biofilm formation among the clinical isolates of staphylococci: an evaluation of three different screening methods*. Indian journal of medical microbiology, 24(1), 25.
- Mohsenipour, Z., & Hassanshahian, M. 2015. *The effects of Allium sativum extracts on biofilm formation and activities of six pathogenic bacteria*. Jundishapur journal of microbiology, 8(8).
- Mulholland, E. and Adegbola, R. 2005. *Bacterial Infections — A Major Cause of Death among Children in Africa*. New England Journal of Medicine, 352(1), pp.75-77.
- Nathaniel, N., Hadiza, B., Mariama, O., Tayaza, Raji, A. and Lucy, M. 2017. *Ethanollic Allium sativum extract down-regulates the pelF gene involved in P. aeruginosa biofilm formation*. African Journal of Biotechnology, 16(12), pp.585-593.

Nicolic, V., Stankovic, M., Lj. Nikolic., D. Cvetkovic. 2004. *Mechanism and Kinetics of Synthesis of Allicin*.

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

Ninyio, N. N., Gidado, H. B., Yahaya, M. O., Fadason, T. B., Bamanga, R. A., & Yaki, L. M. 2017. *Ethanollic Allium sativum extract down-regulates the pelF gene involved in P. aeruginosa biofilm formation*. African Journal of Biotechnology, 16(12), 585-593.

Obritsch, M., Fish, D., MacLaren, R., & Jung, R. 2005. *Nosocomial Infections Due to Multidrug-Resistant P. aeruginosa : Epidemiology and Treatment Options*. Pharmacotherapy, 25(10), 1353-1364.

Persson, T., T.H. Hansen, T.B. Rasmussen, S.E. Skindersoe, M. Givskov, and J. Nielsen. 2005. *Rational design and synthesis of new quorum sensing inhibitors derived from acylated homoserine lactone and natural product from garlic*. Royal Society 3 (2): 253-262.

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.

Roeselers, G., Van Loosdrecht, M. C. M., & Muyzer, G. 2007. *Heterotrophic pioneers facilitate phototrophic biofilm development*. Microbial Ecology, 54(3), 578-585.

Salima, J. 2015. *Antibacterial Activity of Garlic (Allium sativum L.)*. Jurnal Majority, 4(2).

Savitri, sandi, Evika, MP. 2008. *Petunjuk Praktikum Struktur Perkembangan Tumbuhan (Anatomi Tumbuhan)*. Malang : UIN Press

Schultz-Fademrecht, C., Wichern, M., & Horn, H. 2008. *The impact of sunlight on inactivation of indicator microorganisms both in river water and benthic biofilms*. Water research, 42(19), 4771-4779.

Setyawan, Febby Hadi. 2016. *Teknik Identifikasi Bakteri pada Ikan Konsumsi Air Tawar dengan Metode Automatic Identification System menggunakan Vitek 2 Compact di Loka Pemeriksaan Penyakit Ikan dan Lingkungan (LP2IL) Serang Banten*. Malang.

Singh, V.K. and Singh, D.K. 2008. *Pharmacological effect of Garlic (Allium sativum L.)*. Annu Rev Biomed Sci. 10: 6-26.

Sivri, N., Jones, M., & Allen, M. J. 2014. *P. aeruginosa isolated from the marine environments in the Istanbul coastal area (turkey)*. FRESENIUS ENVIRONMENTAL BULLETIN, 23(12 B), 3340-3344.

- Strateva, T., & Yordanov, D. 2009. *P. aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. *Journal Of Medical Microbiology*, 58(9), 1133-1148.
- Sunarto, P dan Susetyo, B. 1995. *Pengaruh garlic terhadap penyakit jantung*.
- Susanto, L.R.D., Nuryanti, A. and Wahyudi, I.A., 2012. Efek Minyak Atsiri Daun Kemangi (*Ocimum Basilicum* L.) Sebagai Agen Penghambat Pembentukan Biofilm *Streptococcus Mutans*. *Insisiva Dental Journal*, 2(1).
- Taga, M.E., Bassler, B.L. 2003. Chemical communication among bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 100, 14549-14554.
- Todar, K. 2006. *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. Madison, Wisconsin: University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology.
- Tolker-Nielsen. 2013. *P. aeruginosa biofilm infections: From molecular biofilm biology to new treatment possibilities*. *Acta Pathologica, Microbiologica Et Immunologica Scandinavica* (122): 10.
- 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.
- Wolfaardt, G. M., Lawrence, J. R., Headley, J. V., Robarts, R. D., & Caldwell, D. E. 1994. Microbial exopolymers provide a mechanism for bioaccumulation of contaminants. *Microbial ecology*, 27(3), 279-291.
- Xavier, J. B., Picioeanu, C., Rani, S. A., van Loosdrecht, M. C., & Stewart, P. S. 2005. *Biofilm-control strategies based on enzymic disruption of the extracellular polymeric substance matrix—a modelling study*. *Microbiology*, 151(12), 3817-3832.
- Yuniastuti, K. 2006. *Ekstraksi dan Identifikasi Komponen Sulfida Pada Bawang Putih (allium sativum)* (Doctoral dissertation, Universitas Negeri Semarang).
- Zakaria EA. 2004. *The inhibitory action of aqueous garlic extract on the growth of certain pathogenic bacteria*. *Eur Food Res Techno*, 218:460-4.
- Zhai H, Pan J, Pang E, Bai B. 2014. *Lavage with Allicin in Combination with Vancomycin Inhibits Biofilm Formation by Staphylococcus epidermidis in a Rabbit Model of Prosthetic Joint Infection*. *PLOS ONE* 9(7): 1-5.