

**UJI EFEKTIVITAS EKSTRAK BAWANG PUTIH (*ALLIUM SATIVUM*) SEBAGAI
PENGHAMBAT PEMBENTUKAN BIOFILM *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*
SECARA IN VITRO**

TUGAS AKHIR

Untuk Memenuhi Persyaratan

Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran



Oleh :

Anisa Laili Fatimah

155070100111052

PROGRAM STUDI SARJANA KEDOKTERAN

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2019



HALAMAN PENGESAHAN

**UJI EFEKTIVITAS EKSTRAK BAWANG PUTIH (*ALLIUM SATIVUM*) SEBAGAI
PENGHAMBAT PEMBENTUKAN BIOFILM *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE***

SECARA IN VITRO

Oleh:

Anisa Laili Fatimah

NIM 155070101111052

Telah diuji pada

Hari : Selasa

Tanggal : 19 November 2019

Dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji-I



dr. Danik Agustin Purwantiningrum, M.Kes

NIP. 197208221998022002

Pembimbing-I/Penguji-II,



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

NIP. 194812201980021002

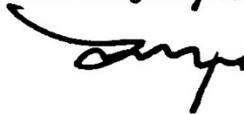
Pembimbing-II/Penguji-III,



dr. Aina Angelina, Sp.PA

NIP. 2012088509032001

Mengetahui,
Ketua Program Studi Kedokteran,



dr. Triwahyu Astuti, M.Kes., Sp.P(K)

NIP. 196310221996012001

KATA PENGANTAR

Segala puji bagi Allah SWT yang telah memberikan petunjuk dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir ini dengan lancar dan tepat waktu. Tugas Akhir disusun sebagai salah satu syarat dalam memperoleh gelar Sarjana Kedokteran dengan judul “Uji Potensi Ekstrak Bawang Putih (*Allium Sativum*) Sebagai Penghambat Pembentukan Biofilm *Streptococcus pneumoniae* Secara In Vitro”.

Penghargaan dan terima kasih yang setulus-tulusnya kepada Ayahanda tercinta Muhamad Nurdin dan Ibunda yang kusayangi Suprihatin yang telah mencurahkan segenap cinta dan kasih sayang serta perhatian moril maupun materil dan Adik ku tersayang Umi Azizah. Semoga Allah SWT selalu melimpahkan Rahmat, Kesehatan, Karunia dan keberkahan di dunia dan di akhirat atas budi baik yang telah diberikan kepada penulis. Serta ucapan terima kasih kepada :

Dengan selesainya Tugas Akhir ini, penulis mengucapkan terimakasih yang tak terhingga kepada:

1. Dr. dr. Wisnu Barlianto, M.Si.Med.,Sp.A(K), selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
2. dr. Triwahju Astuti, M.Kes.,Sp.P(K), selaku Ketua Program Studi Sarjana Kedokteran Universitas Brawijaya.
3. Prof.Dr.dr. Sanarto Santoso, DTM&H, Sp. MK(K), sebagai pembimbing pertama yang dengan sabar dan penuh perhatian dalam membimbing, memberikan ilmu, memberikan bantuan selama proses penelitian hingga

penulisan, dan senantiasa memberi semangat serta doa, sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir ini.

4. dr. Aina Angelina, sp. PA sebagai pembimbing kedua yang dengan sabar dan penuh perhatian dalam membimbing, senantiasa memberi semangat serta doa, sehingga penulis dapat menyelesaikan Tugas Akhir ini.

5. dr. Danik Agustin Purwantiningrum, M.Kes., sebagai penguji yang sudah menyempatkan waktu untuk menguji serta memberi masukan untuk menyempurnakan naskah Tugas Akhir.

6. dr. Elly mayangsari, M.Biomed., sebagai ketua Tim Penguji Ujian Tugas Akhir

7. Mbak Betty yang telah memberikan masukan untuk menyempurnakan dan melancarkan urusan administrasi Tugas Akhir.

8. Para analis dan staff di Laboratorium Mikrobiologi terutama Bu Uci yang telah membantu penulis menyelesaikan tugas akhir ini.

9. Teman penelitian, lyoh yang telah sabar dan selalu membantu dalam pembuatan Tugas Akhir ini.

10. Nabila,Dhita,Salis sahabat ku tersayang yang selalu membantu dan mendengar keluh kesah selama pengerjaan Tugas Akhira ini serta memberikan dukungan dan dorongan motivasi yang tiada henti.

11. Virginia,Haitsam,Deden,Vita dan teman-teman PBL 301 yang selalu memberikan support dan membantu penulis di kala susah mengerjakan Tugas Akhir ini.

12. Aldy Sitorus,Feby,Fauzan,Boby,Arip yang selalu menemani saya dan membantu kesulitan penulis dalam pengerjaan Tugas Akhir ini.



13. Chintya, Annisa, Elicia, Denna yang membantu penulis dari jauh dan selalu mendoakan penulis agar segera menyelesaikan Tugas Akhir ini.

14. Arief, Kama, Funando dan Rivalno sahabat malang yang selalu membantu penulis dalam kesulitan.

15. Maja Setya yang telah memberikan dukungan penuh dalam menyemangati saya untuk mengerjakan skripsi ini.

16. Semua pihak yang telah membantu menyelesaikan Tugas Akhir ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari penulisan Tugas Akhir ini masih jauh dari kata sempurna, oleh karena itu penulis membuka diri untuk segala saran dan kritik yang membangun. Akhirnya, semoga Tugas Akhir ini dapat bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang, 4 November 2019

Penulis

ABSTRACT

Fatimah, Anisa. 2019. **POTENTIAL TEST OF ETHANOL GARLIC (*Allium Sativum*) EXTRACT AS INHIBITORS FORMATION OF BIOFILM STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE IN VITRO**. Final Assignment, Medical Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Pembimbing: (1) Prof. Dr. dr. Sanarto Santoso, DTM&H, Sp. MK(K). (2) dr. Aina Angelina

Streptococcus pneumoniae is one of the causes of acute lower respiratory tract infections (ISNBA) in the lungs that can cause death if not handled properly. *Streptococcus pneumoniae* is a gram-positive bacteria and normal flora in the upper respiratory tract of humans. Acute lower respiratory tract infections are one of the most common illnesses in developing countries including Indonesia. The prevalence of pneumonia in Indonesia increased from 2.1% to 2.7% from 2007 to 2013 according to the 2013 Riskesdas survey while according to a survey conducted by WHO and UNICEF in 2009 that more than 2 million children under five die from pneumonia each year, while the use of inappropriate antibiotics can cause resistance to microbial strains of *Streptococcus pneumoniae* so that they are resistant to antibiotics. Therefore this resistance is a major public health problem, so researchers are looking for better alternative ingredients as this antimicrobial, one of which is garlic has the effect of inhibiting the biofilm ring caused by *Streptococcus pneumoniae*. This research was conducted from February to April at the FKUB Microbiology Laboratory. The independent variable of this study is the concentration of garlic extract (*Allium sativum*) with a concentration of 0%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25% and while the dependent variable is the bacterial biofilm of *Streptococcus pneumoniae*. This study uses the Kruskal-wallis test, the Mann-Whitney test and the rank-spearman test and the Kruskal-wallis test significance value of 0.000 ($p < 0.05$) shows that there is a significant difference in the concentration of garlic extract with the formation of *Streptococcus pneumoniae* biofilm, in the Rank-Spearman Test obtained a significance value of 0.000 ($p < 0.05$) this shows a significant relationship between variations in the administration of all concentrations of ethanol extract of garlic with the determination of *S. pneumoniae* biofilm, whereas in the mann-white test obtained a significance value of 0,000 ($p < 0.05$).

Keyword : *Streptococcus pneumoniae*, *Allium Sativum*, Biofilm, *In Vitro*

ABSTRAK

Fatimah, Anisa.2019. **UJI EFEKTIVITAS EKSTRAK ETANOL BAWANG PUTIH (*Allium sativum*) SEBAGAI PENGHAMBAT PEMBENTUKAN BIOFILM *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* SECARA IN VITRO**. Tugas Akhir, Program Studi Kedokteran, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Prof.Dr.dr. Sanarto Santoso, DTM&H, Sp. MK(K). (2) dr. Aina Angelina

Streptococcus pneumoniae merupakan salah satu penyebab penyakit Infeksi Saluran Napas Bawah Akut (ISNBA) diparenkim paru yang dapat menyebabkan kematian apabila tidak tertangani dengan baik. *Streptococcus pneumoniae* merupakan bakteri gram positif dan flora normal pada saluran pernafasan bagian atas manusia.

Infeksi Saluran Napas Bawah Akut merupakan salah satu penyakit paling banyak diderita oleh negara berkembang termasuk Indonesia. Prevalensi penyakit pneumonia di Indonesia terjadi peningkatan dari 2.1% menjadi 2.7% dari tahun 2007 sampai 2013 menurut survey risekdas tahun 2013 sedangkan menurut survey yang dilakukan WHO dan UNICEF pada tahun 2009 bahwa lebih dari 2 juta anak balita meninggal dunia karena pneumonia setiap tahunnya, sedangkan penggunaan antibiotik yang kurang tepat dapat menyebabkan resistensi strain mikroba

Streptococcus pneumoniae sehingga tahan terhadap antibiotic. Oleh karena itu resistensi ini merupakan masalah kesehatan masyarakat yang utama, maka peneliti mencari bahan alternatif yang lebih baik sebagai antimikroba ini, salah satunya bawang putih yang memiliki efek menghambat cincin biofilm yang disebabkan oleh *Streptococcus pneumoniae*. Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari sampai April di Laboratorium Mikrobiologi FKUB.

Variabel bebas penelitian ini yaitu konsentksi ekstrak bawang putih (*Allium sativum*) dengan konsentrasi 0%, 5%, 10%,15%, 20%, 25% dan sedangkan Variabel tergantung yaitu biofilm bakteri *Streptococcus pneumoniae*.

Penelitian ini menggunakan Uji *Kruskal-willlis*, Uji Mann-Whitney dan Uji rank-spearman dan didapatkan nilai signifikansi uji *Kruskal-willlis* sebesar 0.000 ($p<0.05$) hal ini menunjukkan bahwa ada perbedaan yang signifikan dari konsentrasi ekstrak bawang putih dengan pembentukkan biofilm *Streptococcus pneumoniae*, pada Uji Rank-Spearman didapatkan nilai signifikansi sebesar 0.000($p<0.05$) hal ini menunjukan hubungan signifikan antara variasi pemberian semua konsentrasi ekstrak etanol bawang putih dengan pembentukan biofilm *S.pneumoniae*, sedangkan pada uji mann-white didapatkan nilai signifikansi 0.000 ($p<0.05$).

Kata kunci: *Streptococcus pneumoniae*, *Allium Sativum*, Biofilm, *In Vitro*

DAFTAR ISI

Judul	i
Halaman Persetujuan	ii
Halaman Pengesahan	iii
Pernyataan Keaslian Tulisan	iv
Kata Pengantar	v
Abstrak	vii
Abstract	viii
Daftar Isi	ix
Daftar Tabel	xiii
Daftar Gambar	xiv
Daftar Lampiran	xv
Daftar Singkatan	xvi
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.3.1 Tujuan Umum	3
1.3.2 Tujuan Khusus	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
1.4.1 Manfaat Akademis	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	5



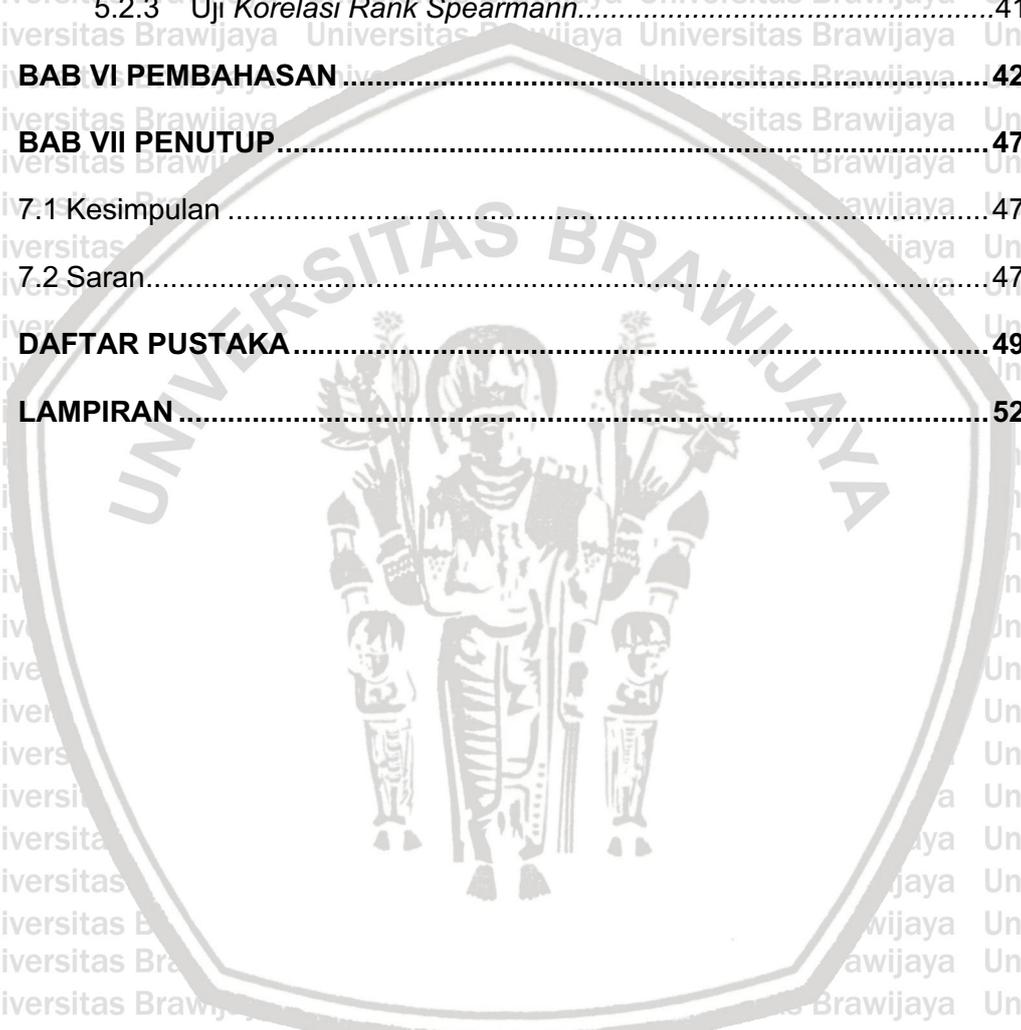
2.1.1 Toksonomi	6
2.1.2 Morfologi	6
2.1.3 Struktur Antigen	8
2.2 Biofilm	8
2.2.1 Mekanisme Pembentukan Biofilm	9
2.2.2 Struktur Biofilm	10
2.2.3 Fungsi Biofilm dan Peranannya terhadap Resistensi	10
2.2.4 Pemeriksaan Biofilm	11
2.2.5 Strategi Intervensi terhadap biofilm	12
2.3 Bawang Putih (<i>Allium sativum</i>)	12
2.3.1 Taksonomi	12
2.3.2 Morfologi	13
2.3.3 Kandungan Bawang Putih (<i>Allium sativum</i>)	14
2.4 Metode Ekstraksi	16
2.4.1 Prinsip Proses Ekstraksi	16
2.4.2 Metode Ekstraksi Maserasi	17
BAB III KERANGKA KONSEP	18
3.1 Kerangka Konsep	18
3.2 Hipotesis	20
BAB IV METODE PENELITIAN	21
4.1 Rancangan Penelitian	21
4.2 Populasi dan Sampel	21
4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian	22
4.4 Variabel Penelitian	22
4.4.1 Variabel Bebas	22



4.4.2	Variabel Tergantung.....	22
4.5	Alat dan Bahan.....	22
4.5.1	Alat dan Bahan Identifikasi Bakteri.....	23
4.5.2	Alat dan Bahan Deteksi Biofilm.....	23
4.6	Definisi Operasional.....	24
4.7	Prosedur Penelitian.....	25
4.7.1	Persiapan Bawang Putih (<i>Allium Sativum</i>).....	25
4.7.1.1	Ekstraksi.....	25
4.7.2	Persiapan Biofilm <i>Streptococcus pneumoniae</i>	25
4.7.2.1	Pemeriksaan Mikroskopis.....	25
4.7.2.2	Pewarnaan Gram.....	26
4.7.2.3	Pembuatan Media BHIA.....	26
4.7.2.4	Pembuatan Media BHIB.....	27
4.7.2.5	Regenerasi Bakteri <i>Streptococcus pneumoniae</i>	27
4.7.2.6	Pembuatan Inokulum <i>Streptococcus pneumoniae</i>	27
4.7.3	Uji Biokimia.....	27
4.7.4	Pembuatan Perbenihan Cair Bakteri.....	28
4.7.5	Uji Deteksi Pembentukan Biofilm.....	29
4.7.6	Uji Hambat Pembentukan Biofilm.....	29
4.8	Analisis Data.....	30
4.9	Rancangan Operasional.....	32
BAB V HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA.....		33
5.1	Hasil Penelitian.....	33
5.1.1	Hasil Ekstraksi Bawang Putih (<i>Allium Sativum</i>).....	33
5.1.2	Hasil Identifikasi Bakteri.....	34



5.1.3 Hasil Uji Hambat Pembentukan Biofilm.....	35
5.2 Analisis Data.....	39
5.2.1 Uji <i>Kruskal Wallis</i>	39
5.2.2 Uji <i>Mann-Whitney</i>	40
5.2.3 Uji <i>Korelasi Rank Spearmann</i>	41
BAB VI PEMBAHASAN	42
BAB VII PENUTUP	47
7.1 Kesimpulan.....	47
7.2 Saran.....	47
DAFTAR PUSTAKA	49
LAMPIRAN	52



DAFTAR TABEL

Tabel 5.1 Hasil Pengukuran Ketebalan cincin biofilm *Escherichia Coli*.....36

Tabel 5.2 Hasil Analisis Data Uji Mann-Whitney40



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Morfologi *Streptococcus pneumoniae* pada Pewarnaan Gram..7

Gambar 2.2. Makroskopik Bawang Putih (*Allium sativum*)14

Gambar 5.1 Hasil Kultur Bawang Putih (*Allium sativum*).....33

Gambar 5.2 Hasil pewarnaan gram bakteri *Streptococcus pneumoniae*34

Gambar 5.3 Hasil Uji Katalase.....35

Gambar 5.4 Hasil Uji Hambat Pembentukan Biofilm35



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Sertifikasi Determinasi Bawang Putih.....52

Lampiran 2 Sertifikasi Ekstraksi Bawang Putih.....53

Lampiran 3 Surat Keterangan Bakteri Streptococcus pneumoniae.....54

Lampiran 4 Hasil Uji Statistik.....55

Lampiran 5 Alat dan Bahan Penelitian.....64



DAFTAR SINGKATAN

BHIA : *Brain Heart Infusion Agar*

BHIB : *Brain Heart Infusion Broth*

S.pneumoniae : *Streptococcus pneumoniae*

SPSS : *Stastitical Product of Service Solution*

EPS : *Extracellular Polymeric Substances*

KHBM : *Kadar Hambat Biofilm Minimal*

KHM : *Kadar Hambat Minimal*

PBS : *Phosphate Buffered Saline*

QS : *Quorom Sensing*

QSI : *Quorom Sensing Inhibitor*

RNA : *Ribonucleic Acid*

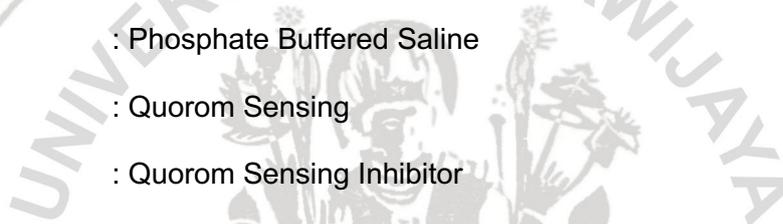
SAC : *S- Allil Cystein*

TSB : *Trypticase Soy Broth*

gr : *gram*

nm : *nanometer*

CFUtas : *Colony-forming Unit*



PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Streptococcus pneumoniae, adalah penyebab utama penyakit pneumonia bakteri, meningitis, dan sepsis pada anak-anak di seluruh dunia (Lancet *et al.*, 2005). *Streptococcus pneumoniae* merupakan bakteri gram positif dan bakteri penghuni flora normal pada saluran pernapasan bagian atas manusia. Pneumonia merupakan bentuk utama Infeksi Saluran Napas Bawah Akut (ISNBA) di parenkim paru yang dapat menimbulkan mortalitas yang tinggi (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2010). Perubahan lingkungan di nasofaring yang disebabkan oleh infeksi virus, perubahan microflora dan peradangan, akan memicu pelepasan zat aktif *pneumococcus* dari biofilm. *Streptococcus pneumoniae* mengalami evolusi dengan membentuk biofilm untuk mempertahankan hidupnya sebagai flora normal pada nasofaring (Li *et al.*, 2002).

Pneumonia adalah peradangan yang mengenai parenkim paru, distal dari bronkiolus terminalis yang mencakup bronkiolus respiratorius, dan alveoli, serta menimbulkan konsolidasi jaringan paru dan gangguan pertukaran gas setempat.

Pneumonia berdasarkan tempat didapatkannya dibagi dalam dua kelompok utama yakni, pneumonia komunitas (community acquired pneumonia, CAP) yang didapat di masyarakat dan pneumonia nosokomial (hospital acquired pneumonia, HAP)

Pneumonia komunitas (PK) atau community-acquired pneumonia (CAP)

masih menjadi suatu masalah kesehatan utama tidak hanya di negara yang sedang berkembang, tetapi juga di seluruh dunia. PK merupakan salah satu penyebab utama kematian di dunia dan merupakan penyebab kematian terbesar ke-6 di Amerika Serikat. Di Indonesia, Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) tahun 2001 mencatat kematian akibat pneumonia dan infeksi saluran nafas sebanyak 34 per 100.000 penduduk pada pria dan 28 per 100.000 penduduk pada wanita.

Prevalensi nasional pneumonia meningkat pada semua umur dari 2,1 persen di tahun 2007 menjadi 2,7 persen pada tahun 2013 (Riskesmas, 2013).

Survey dari Departemen Kesehatan RI terhadap 10 provinsi juga mendapatkan hasil bahwa *Streptococcus pneumoniae* merupakan bakteri patogen yang paling banyak menyebabkan pneumonia pada balita. WHO dan UNICEF pada tahun 2009 memperkirakan lebih dari 2 juta anak balita meninggal dunia karena pneumonia setiap tahun. Data tersebut menunjukkan bahwa terdapat lebih dari 1/5 bagian dari total 9 juta anak balita yang meninggal di setiap tahun (IDAI, 2010).

Penyakit pneumonia penyebab kematian nomor 1 di India, nomor 2 di Nigeria dan di Indonesia pada urutan ke 8 (IVAC, 2010).

Permasalahan yang terjadi saat ini adalah penggunaan antibiotik yang tidak tepat sehingga menyebabkan terjadinya resistensi mikroba seperti *Streptococcus pneumoniae* (Sembiring *et al.*, 2013). Penyebaran mikroba yang resisten terhadap antimikroba menjadi ancaman dunia. Resistensi antibiotik saat ini menjadi masalah kesehatan masyarakat dan menjadi masalah utama terhadap

bakteri patogen manusia seperti *Streptococcus pneumoniae* (Hastari, 2012). Oleh karena itu maka peneliti ingin menemukan bahan alternatif yang lebih baik sebagai antimikroba terhadap bakteri ini.

Bawang putih merupakan bahan yang sangat sering kita jumpai di masyarakat dan sangat mudah di dapatkan di Indonesia. Bawang putih dipercaya memiliki potensi sebagai pengganti antibiotik. Selain mudah untuk diaplikasikan sebagai obat, bawang putih merupakan salah satu tanaman tertua dan dibudidayakan manusia sehingga bawang putih dapat ditemukan di seluruh dunia. Manfaat bawang putih sangat banyak. Bawang putih dipercaya memiliki manfaat antispasme, ekspektoran, antiseptik, bakteriostatik, antiviral, antihelmintik dan antihipertensi (Kurian, 2010). Berdasarkan penelitian Persson *et al.* (2005), *Allium sativum* mempunyai senyawa aktif yang mampu menghambat sistem *quorum sensing* yang potensial. Berdasarkan latar belakang masalah diatas, maka peneliti ingin mengetahui potensi pemberian bawang putih (*Allium sativum*) sebagai penghambat pembentukan biofilm pada *Streptococcus pneumoniae* secara *in vitro*.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah ekstrak bawang putih (*Allium sativum*) efektif sebagai penghambat pembentukan biofilm *Streptococcus pneumoniae* secara *in vitro*?

1.3 Tujuan penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Mengetahui efektivitas ekstrak bawang putih (*Allium sativum*) sebagai penghambat pembentukan biofilm *Streptococcus pneumoniae* secara *in vitro*

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Untuk menentukan Kadar Hambat minimal dari ekstrak bawang putih (*Allium sativum*) yang dapat menghambat pembentukan biofilm (MBIC = *Minimal Biofilm Inhibitory Concentration*) pada bakteri *Streptococcus pneumoniae* secara *in vitro*.
2. Untuk menentukan pengaruh pemberian ekstrak bawang putih terhadap pembentukan biofilm pada bakteri *Streptococcus pneumoniae* secara *in vitro*.

1.4 Manfaat

1.4.1 Manfaat akademis

1. Dapat digunakan sebagai dasar teori untuk menambah ilmu pengetahuan dalam bidang kesehatan mengenai manfaat dari ekstrak bawang putih (*Allium sativum*) sebagai penghambat pembentukan biofilm *Streptococcus pneumoniae*.
2. Mendapatkan informasi baru terkait dengan studi biofilm mengenai bakteri *Streptococcus pneumoniae*.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus merupakan bakteri berbentuk bulat gram (+) positif khasnya membentuk rantai selama pertumbuhan. Bakteri ini tersebar luas di alam. Beberapa adalah anggota mikrobiota normal pada manusia dan dikaitkan dengan penyakit penting pada manusia yang disebabkan oleh efek langsung dari infeksi atau pada kasus lain terhadap respons kekebalan tubuh. *Streptococcus* menguraikan berbagai substansi dan enzim ekstraselular (Jawetz *et al.*, 2016).

Streptococcus pneumoniae ditransmisikan secara horisontal melalui droplet yang diaspirasi ke saluran pernapasan. Bakteri ini lalu menempel pada epitel saluran pernapasan dan membentuk koloni. Sifatnya komensal di saluran pernapasan manusia. Akan tetapi, infeksi ini dapat menjadi oportunistik tergantung pada kekebalan host dan perkembangan patogenesisnya tergantung pada organ tempat penyebaran secara lokal maupun hematogen. (Jawetz *et al.*, 2016).

2.1.1 Taksonomi

Klasifikasi bakteri *Streptococcus pneumoniae* sebagai berikut :

Kingdom : *Bacteria*

Phylum : *Firmicutes*

Class : *Diplococcic*

Ordo : *Lactabacillales*

Family : *Streptococcaceae*

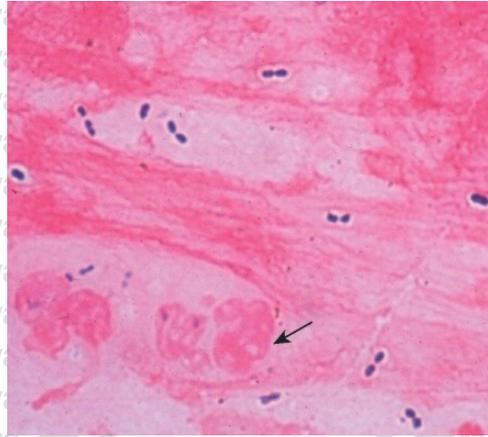
Genus : *Streptococcus*

Spesies : *Streptococcus pneumoniae*

2.1.2 Morfologi

A. Organisme Tipikal

Diplokokus gram positif berbentuk lanset khas yang sering ditemukan dalam specimen biakan berusia muda. Dalam sputum atau pus ada kokus tunggal. Dengan bertambahnya usia biakan, organisme cepat berubah menjadi gram negatif dan cenderung mengalami lisis spontan. Autolisis pneumokokus sangat ditingkatkan oleh bahan yang aktif terhadap permukaan. Lisis pneumokokus terjadi dalam beberapa menit ketika empedu lembu (10%) atau natrium diklofenat (2%) ditambahkan ke dalam biakan suspensi organisme dalam suasana pH netral. Pada medium solid, pertumbuhan pneumokokus di sekitar cakram optochin terhambat (Jawetz *et al.*, 2016).



Gambar 2.1 Streptococcus pneumoniae pada pewarnaan gram menunjukkan bakteri gram positif berbentuk diplococcus

B. Biakan

Pneumococcus membentuk koloni bulat kecil, pada awalnya berbentuk kubah dan kemudian membentuk lekuk sentral dengan tepi meninggi. Pneumococcus bersifat alpha hemolitik pada agar darah. Pertumbuhan dipacu CO₂ 5-10% (Jawetz *et al.*, 2016).

C. Karakteristik Pertumbuhan

Sebagian energi diperoleh dari fermentasi glukosa. Hal tersebut disertai dengan produksi cepat asam laktat yang membatasi pertumbuhan. Penetrasi biakan kaldu dengan basa pada interval tertentu menyebabkan pertumbuhan massif (Jawetz *et al.*, 2016).

D. Variasi

Isolat pneumococcus yang membentuk kapsul dalam jumlah banyak menghasilkan koloni mukoid besar. Produksi kapsul tidak esensial untuk pertumbuhan pada medium agar sehingga pembentukan kapsul tidak lagi terjadi setelah beberapa kali pembiakan subkultur. Tapi, pneumococcus akan kembali memproduksi kapsul dan memiliki virulensi yang meningkat ketika disuntikan ke tikus. (Jawetz *et al.*, 2016).

2.1.3 Struktur Antigen

Dinding sel pneumococcus mengandung peptidoglikan dan asam teikoat seperti streptokokus lainnya. Polisakarida kapsul terikat secara kovalen ke peptidoglikan dan ke polisakarida dinding sel. Polisakarida kapsul tersebut berbeda secara imunologi untuk masing-masing 91 tipe yang ada. Polisakarida C yang ditemukan di dinding sel semua *S.pneumoniae* dapat dideteksi dalam urin cairan serebrospinal sebagai tes diagnostic penting untuk infeksi pneumokokus. (Jawetz *et al.*, 2016)

2.2 Biofilm

Biofilm merupakan kumpulan dari sel mikroba yang secara irreversible terikat pada permukaan, serta ditutupi oleh matriks polisakarida. 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 molekul yang dihasilkan sel (Andika, 2015). Biofilm terbentuk dari koloni bakteri, proses pembentukan dan maturasi biofilm masih belum diketahui, tidak ada mekanisme pengaturan ukuran koloni bakteri dan spesies. Biofilm biasanya terbentuk diatas permukaan yang tergenang dalam suatu cairan dan biasanya tahan terhadap antibiotik, desinfektan dan cairan pembersih (Armitage, 2005).

2.2.1 Mekanisme Pembentukan Biofilm

Biofilm tumbuh melalui tiga tahap proses yaitu tahap awal yang terdiri dari perlekatan bakteri pada substrat, bakteri tumbuh dan membelah kemudian membentuk kolonisasi di lingkungan sekitar akhirnya dan terbentuklah biofilm. Bakteri ini tidak bekerja secara individual untuk membentuk biofilm, tetapi berkumpul menjadi rantai yang panjang untuk membantu mengawali tahap awal pembentukan biofilm (Armitage, 2005).

Biofilm terbentuk dari melekatnya beberapa bakteri yang hidup bebas di suatu permukaan dan kemudian memperbanyak diri dengan membentuk suatu lapisan tipis (*monolayer*) biofilm. Sel biofilm akan menghasilkan EPS (*Extracellular Polymeric Substances*) yang akan melekatkan mereka pada suatu permukaan dan satu sama lain untuk membentuk suatu mikrokoloni yang selanjutnya akan terus tumbuh dan semakin menebal. Dalam perkembangannya, sel-sel bakteri akan mengeluarkan sinyal kimia yang berperan dalam membentuk karakteristik biofilm yang lebih matang. Aksi dari sinyal ini merupakan proses *Quorum Sensing*, yaitu komunikasi antar sel dan kemampuan molekul untuk mencetuskan aksi bergantung pada konsentrasi sinyal pada lingkungan (Gunardi, 2014).

Quorum Sensing pada *Streptococcus pneumoniae* meregulasi beberapa fenotip, yaitu pembentukan biofilm, induksi kompetensi, *Acid Tolerance Response (ATR)*, dan produksi bakteriosin. Selain itu, *Quorum Sensing* memungkinkan bakteri untuk mengubah ekspresi gen mereka ketika bakteri mencapai populasi sel dengan kepadatan yang kritis. *Quorum Sensing* diinduksi oleh pembawa pesan kimia (*chemical messenger*) yang dilepaskan bakteri ke lingkungannya dalam konsentrasi yang proporsional dengan pertumbuhan populasi bakteri tersebut (Senadheera dan Cvitkovitch, 2008). Sistem sinyal *Quorum Sensing* penting untuk kompetensi genetik pada *Streptococcus pneumoniae* dan juga dalam proses pembentukan biofilm pada organisme gram positif ini.

2.2.2 Struktur Biofilm

Unit struktural dari biofilm adalah mikrokoloni dan proses dasar pembentukan dari biofilm seperti mekanisme *Quorum Sensing*, resistensi antimikroba, dan perlekatan yang dapat menerangkan interaksi fisiologis dari mikrokoloni dalam biofilm yang telah matang. Biofilm terutama terdiri dari materi matriks (85% dari volume) dan kumpulan sel-sel bakteri (15% dari volume).

Extracellular Polymerc Substances (EPS) mungkin menyusun 50%-90% karbon organik lovebiofilm 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 (Donlan dan Cossteron, 2002).

Biofilm adalah kumpulan mikroba yang terikat pada suatu permukaan dan dilindungi oleh matriks polimer yang dihasilkan sendiri. *Streptococcus pneumoniae* dapat memodulasi berbagai sifat fisiologis dan fisik yang akan bermanfaat bagi pertumbuhan, keselamatan, dan keberadaannya. Beberapa faktor lingkungan dalam pembentukan biofilm pneumokokus seperti sumber karbon, kecepatan aliran dan sifat fisik permukaan yang melekat pada bakteri, seperti hidrofobik dan kekesatan, dapat menyebabkan perbedaan dalam struktur dan komposisi biofilm yang dihasilkan (Stoodley *et al.*, 1999).

2.2.3 Fungsi Biofilm dan Peranannya terhadap Resistensi Bakteri

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

Biofilm berfungsi sebagai mekanisme pertahanan bagi bakteri dengan cara meningkatkan resistensi terhadap gaya fisik yang dapat menurunkan perkembangan sel-sel

bakteri yang tidak menempel, fagositosis oleh sel imun dan penetrasi dari senyawa toksik bagi bakteri seperti antibiotik. Bakteri yang mempunyai biofilm lebih resisten 10-1.000 kali dibandingkan bila tidak mempunyai biofilm (Monroe, 2007)

Menurut Decho dan Flemming dalam Yuliandari (2015), kegiatan metabolisme bakteri dalam biofilm berbeda dengan sel-sel planktonik. Didalam biofilm, bakteri memiliki akses terbatas terhadap nutrisi dan memiliki pasokan oksigen yang rendah. Mereka berkomunikasi satu sama lain dengan saluran selular dan sinyal lingkungan. Bakteri yang berkoloni di dalam biofilm akan lebih memudahkan dalam terjadinya transfer gen di antara populasi sehingga muncul bakteri resisten yang menjadi perhatian besar juga karena penggunaan antibiotik rekayasa genetika mikroorganisme dan sebagainya (Scink B,1997).

2.2.4 Pemeriksaan Biofilm

Pemeriksaan biofilm dapat dilakukan dengan menggunakan mikroskop elektron dan Concofocal Laser Scanning Microscope (CLSM). Mikroskop elektron dapat memeriksa biofilm pada alat-alat medik dan pada infeksi manusia. Pada awalnya, mikroskop elektron ini merupakan alat yang penting dalam mempelajari biofilm. 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

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

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

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

2.3 Bawang Putih (*Allium sativum*)

2.3.1 Taksonomi

Tanaman bawang putih merupakan salah satu herba semusim famili Liliaceae. Salah satu manfaat medis bawang putih yang telah lama dipelajari oleh para klinisi ialah kemampuan atau potensi bawang putih sebagai antibiotik. Sudah banyak penelitian menyatakan bahwa ekstrak bawang putih dengan efektif menunjukkan aktivitas yang baik terhadap banyak jenis bakteri, baik itu bakteri gram negatif ataupun gram positif. Hal ini menjadikan ekstrak bawang putih memiliki sifat antibakteri berspektrum luas (Salima, 2015).

Menurut Syamsuhidayat dan Hutapea (1991) dalam Solikhah (2009), taksonomi bawang putih (*Allium sativum*) sebagai berikut :

Kingdom : Plantae

Devisi : Spermatophyta

Kelas : Monocotyledone

Ordo : Liliales

Famili : Liliceae

Genus : Allium

Spesies : Allium sativum

2.3.2 Morfologi

Bawang putih merupakan tanaman herbal parenial yang membentuk umbi lapis. Tanaman ini tumbuh secara berumpun dan berdiri tegak sampai setinggi 30-75 cm. Batang yang nampak di atas permukaan tanah adalah batang semu yang terdiri dari pelepah-pelepah daun. Sedangkan batang yang sebenarnya berada di dalam tanah. Dari pangkal batang tumbuh akar berbentuk serabut kecil yang banyak dengan panjang kurang dari 10 cm. Akar yang tumbuh pada batang pokok bersifat rudimenter, berfungsi sebagai alat penghisap makanan (Santoso, 2000).

Bawang putih membentuk umbi lapis berwarna putih. Sebuah umbi terdiri dari 8–20 siung (anak bawang). Antara siung satu dengan yang lainnya dipisahkan oleh kulit tipis dan liat, serta membentuk satu kesatuan yang kuat dan rapat. Di dalam siung terdapat lembaga yang dapat tumbuh menerobos pucuk siung menjadi tunas baru, serta daging pembungkus lembaga yang berfungsi sebagai pelindung sekaligus gudang persediaan makanan. Bagian dasar umbi pada hakikatnya adalah batang pokok yang mengalami rudimentasi (Santoso, 2000; Zhang, 1999).



Gambar 2.2 Bawang Putih (*Allium sativum*) (Litbang Departemen Pertanian, 2008)

2.3.3 Kandungan Bawang Putih (*Allium sativum*)

Kandungan kimia dari *Allium sativum* L. yang memiliki aktivitas biologi dan bermanfaat dalam pengobatan adalah senyawa organosulfur (Martinez, 2007). Jika *Allium sativum* dihancurkan maka akan terjadi pelepasan enzim *allinase* yang dengan cepat melisiskan *allin* dengan memecah ikatan karbon dan sulfur *allin* untuk membentuk *sulfenic acid* (R-SOH) dan senyawa ini dengan segera akan berkondensasi menjadi *allicin* dan *thiosulfinat* lainnya (Singh dan Singh, 2008)

Allicin baru akan muncul dari metabolise *allin* oleh *allinase* apabila sebuah bawang putih mengalami kerusakan sel akibat dipotong atau ditumbuk. Ini dapat menghambat secara total sintesis RNA bakteri dan menghambat sintesis DNA dan protein bakteri secara parsial. Walaupun dikatakan bahwa sintesis DNA dan protein juga mengalami penghambatan oleh aktivitas *allicin*, RNA tetap menjadi target utama aktivitas antibakteri yang dimiliki *allicin* (Salima, 2015).

Diantara banyaknya kandungan sulfur yang terkandung dalam bawangputih, *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. *Allicin* (Diallyl Thiosulfinate) memiliki sifat yang kurang stabil, oleh karena itu, dalam beberapa jam dalam suhu ruangan, akan kembali mengalami metabolisme menjadi *vinylthidiines* atau *dyallildisulfide* atau yang disebut *ajoene*.

Ajoene memiliki aktivitas antistaphylococcal (bakterisidal) dengan MIC sebesar 16 $\mu\text{g/ml}$ 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 (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 eksopolisakarida (EPS) oleh bakteri yang berfungsi menjaga integritas biofilm sehingga berakibat terhambatnya pembentukan biofilm (Susanto dkk,2012).

Allium sativum juga mengandung senyawa sulfur larut air yang non volatil seperti S-allil sistein (SAC), yang terbentuk dari reaksi enzimatis γ -glutamilsisteine ketika bawang putih diekstraksi dengan air (Amagase, 2001). SAC banyak terdapat dalam berbagai macam sediaan bawang putih, merupakan senyawa yang memiliki aktivitas biologis, sehingga adanya SAC dalam sediaan bawang putih sering dijadikan standar bahwa sediaan bawang putih tersebut layak dikonsumsi atau tidak (Amagase,2001).

Diithins terbentuk dari *allicin* yang tidak stabil memiliki kemampuan antibiotik dan anti-clotting yang digunakan sebagai *coating* pada katup jantung. Selain senyawa-senyawa *thiosulfinat* tersebut, senyawa flavonoid serta beberapa saponin, senyawa aktif permukaan yang kuat juga terkandung dalam bawang putih serta memiliki daya antibakteri.

2.4 Metode Ekstraksi

2.4.1 Prinsip Proses Ekstraksi

Ekstraksi adalah teknik pemisahan senyawa berdasarkan perbedaan distribusi zat terlarut antara 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 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 absorbansinya 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 (%)

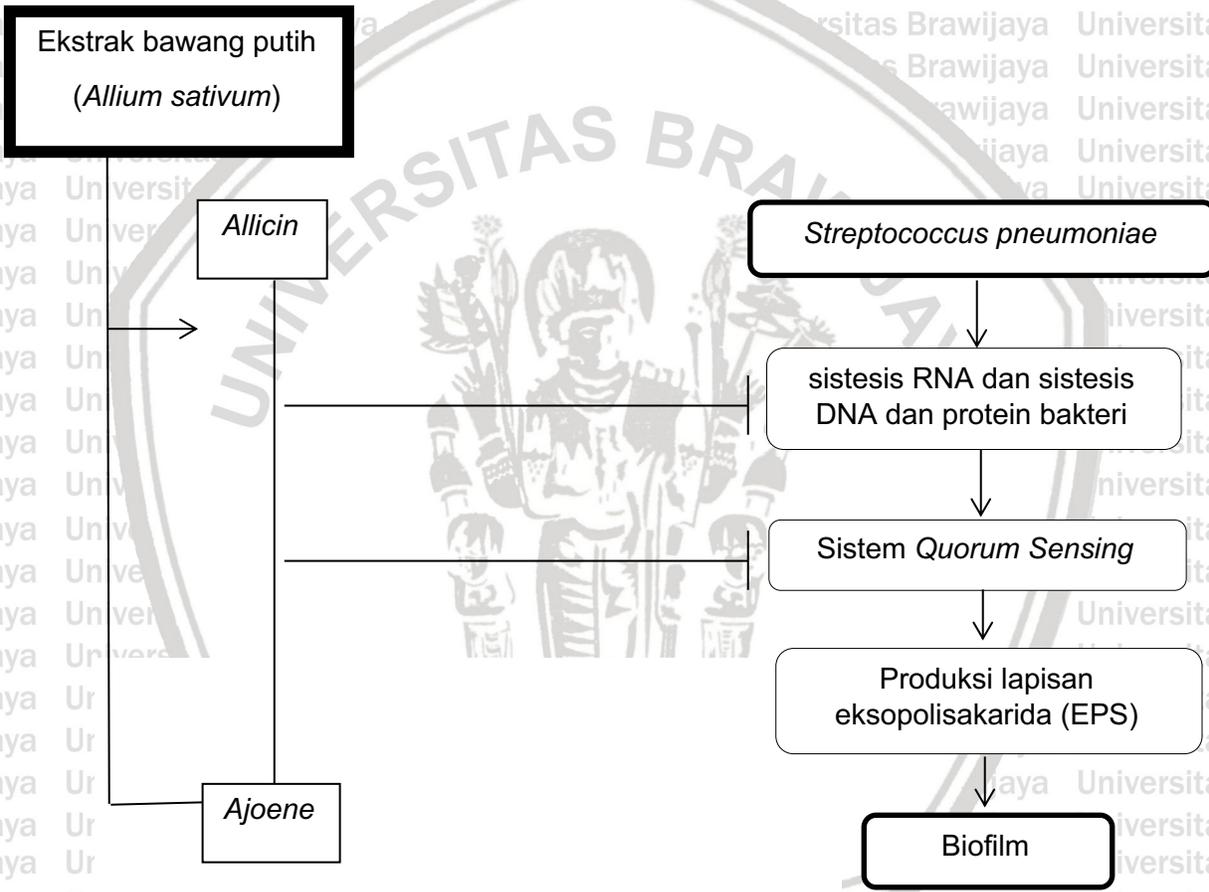
V2 = volume larutan sesudah diencerkan (ml)

M2 = konsentrasi sesudah diencerkan (%)

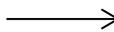
BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 3.1. Kerangka Konsep dan Hipotesis Penelitian

- Keterangan :
-  : variabel yang diteliti
 -  : penghambat pembentukan biofilm
 -  : memiliki kandungan

Streptococcus pneumoniae membentuk sebuah biofilm yang terbentuk dari melekatnya beberapa bakteri yang hidup bebas di suatu permukaan dan kemudian memperbanyak diri dengan membentuk suatu lapisan tipis (*monolayer*) biofilm. Sel biofilm akan menghasilkan EPS (*Extracellular Polymeric Substances*) yang akan melekatkan mereka pada suatu permukaan, dan selanjutnya akan terus tumbuh dan semakin menebal. Dalam perkembangannya, sel-sel bakteri akan mengeluarkan sinyal kimia yang berperan dalam membentuk karakteristik biofilm yang lebih matang.

Aksi dari sinyal ini merupakan proses *Quorum Sensing*, yaitu komunikasi antar sel dan kemampuan molekul untuk mencetuskan suatu aksi.

Komponen sulfur utama ekstrak bawang putih, *allicin*, dapat menghambat secara total sintesis RNA bakteri dan menghambat sintesis DNA dan protein bakteri secara parsial. Sedangkan *ajoene* memiliki aktivitas antibakteri yang bekerja dengan mekanisme yang sama dengan *allicin*, namun dengan potensi yang lebih kecil. *Ajoene* adalah senyawa bioaktif utama pada ekstrak bawang putih dalam perannya sebagai *Quorum Sensing Inhibitor* (QSI). Bawang putih juga mengandung komponen minyak atsiri, yang memiliki aktivitas antibakteri sehingga mengakibatkan terganggunya produksi lapisan eksopolisakarida (EPS) yang berfungsi menjaga integritas biofilm.

Quorum sensing merupakan sistem komunikasi yang digunakan oleh bakteri patogen untuk menyesuaikan ekspresi gen spesifik yang terlibat dalam patogenitas.

Untuk *Streptococcus pneumoniae*, *Quorum Sensing* adalah hal yang esensial untuk

kompetensi genetik dalam membentuk biofilm. Dengan menghambat sistem *Quorum Sensing*, kemampuan bakteri untuk berkomunikasi akan berkurang sehingga proses pembentukan biofilm terhambat.

3.1 Hipotesis

Ekstrak bawang putih (*Allium sativum*) memiliki efek antimikroba sebagai penghambat pembentukan biofilm terhadap *Streptococcus pneumoniae*



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 *Streptococcus pneumoniae*, metode yang digunakan pada penelitian ini adalah *tub-test* (metode tabung).

4.2 Populasi dan Sampel

Penelitian ini menggunakan sampel *Streptococcus pneumoniae* pembentuk biofilm. Sampel ini diperoleh dari isolat *Streptococcus pneumoniae* pembentuk biofilm yang didapat dari Lab Mikrobiologi FKUB (Menurut Federer, jumlah pengulangan penelitian dihitung dengan rumus sebagai berikut :

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

$$(6-1) (n-1) \geq 15$$

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n = 4$$

Keterangan:

n = jumlah pengulangan

p = jumlah perlakuan (dosis ekstrak bawang putih)

4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Februari sampai April di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Pembuatan ekstrak bawang putih dilakukan di Laboratorium Farmakologi Universitas Brawijaya.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas penelitian adalah konsentrasi ekstrak bawang putih (*Allium sativum*). Dalam penelitian ini digunakan konsentrasi 5%, 10%, 15%, 20%, 25% dan kontrol 0%.

4.4.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah biofilm bakteri *Streptococcus pneumoniae* yang diukur dengan metode *tube-test*.

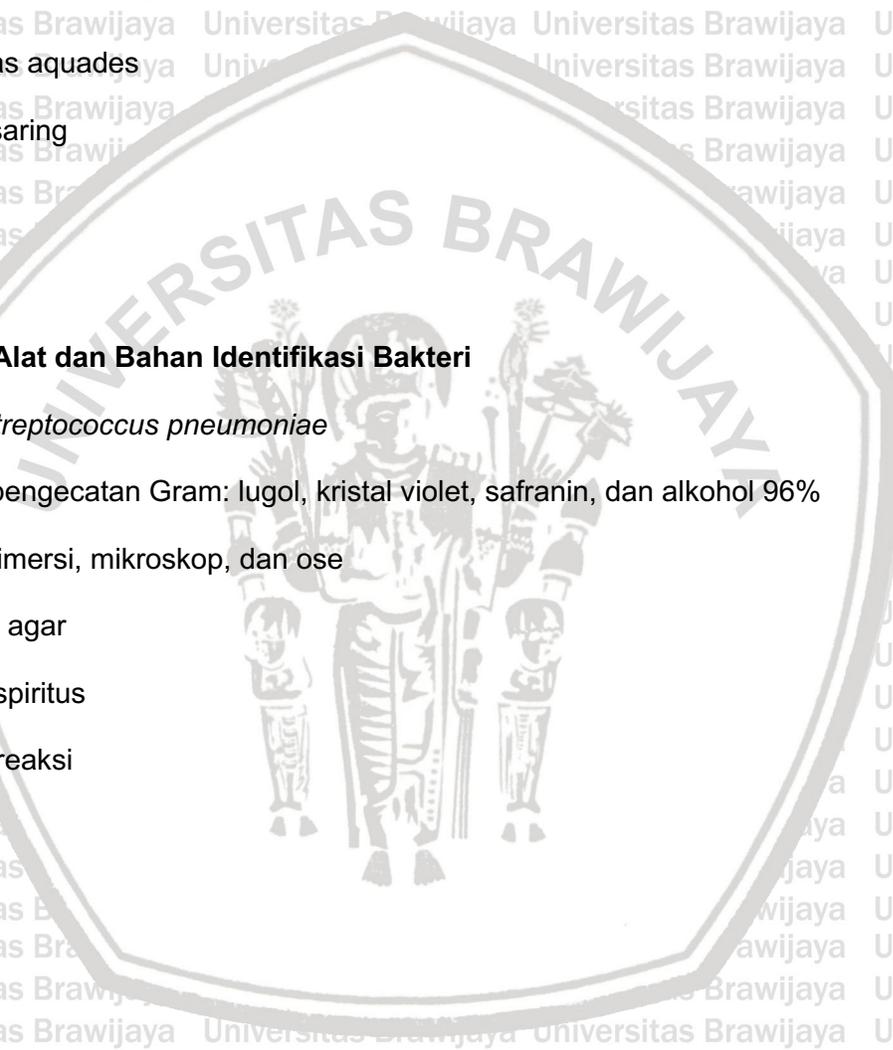
4.5 Alat dan Bahan Pembuatan Ekstrak Bawang Putih

1. Bawang putih (*Allium sativum*)
2. Etanol 96%
3. Timbangan analitik
4. Gelas kimia 250 ml
5. Sokhet

6. Cawan petri
7. Penjepit cawan petri
8. Desikator
9. Spatula
10. Pemanas aquades
11. Kertas saring
12. Thimble
13. Oven

4.5.1 Alat dan Bahan Identifikasi Bakteri

1. Isolat *Streptococcus pneumoniae*
2. Bahan pengecatan Gram: lugol, kristal violet, safranin, dan alkohol 96%
3. Minyak imersi, mikroskop, dan ose
4. Medium agar
5. Lampu spiritus
6. Tabungreaksi



4.5.2 Alat dan Bahan Deteksi Biofilm

1. TSB + *glycerol* 10%
2. Biakan *Streptococcus pneumoniae* pembentuk biofilm
3. Tabung reaksi
4. *Phosphate Buffer Saline* (PBS) pH 7,3
5. *Deionizedwater*
6. Kristal violet
7. Pipet
8. Ose
9. *Beaker glass*
10. Inkubator

4.6 Definisi Operasional

1. *Streptococcus pneumoniae* adalah bakteri gram positif penyebab utama terbentuknya penyakit *pneumonia*. Sampel ini diperoleh dari isolat *Streptococcus pneumoniae* pembentuk biofilm yang didapat dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
2. 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 Malang.
3. Metode tabung (*tub-test*) adalah metode deteksi biofilm dengan menggunakan tabung sebagai medium yang bersifat kualitatif.
4. *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC) atau Kadar 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.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Persiapan Bawang Putih (*Allium sativum*)

4.7.1.1 Ekstraksi

Ekstrak bawang putih dibuat dengan ekstraksi maserasi :

1. Bawang putih yang telah didapat kemudian dibersihkan dengan menggunakan air kemudian dicacah halus atau diblender (tanpa air).
2. Setelah diblender potongan bawang putih dikeringkan dengan cara dijemur. Setelah kering, timbang potong bawang putih seberat 200g
3. Kemudian potongan bawang putih direndam selama 24 jam di dalam ethanol 96% sebanyak 1000 ml untuk membuat larutan stok.
4. Setelah direndam selanjutnya bahan tersebut disaring sehingga diperoleh hasil akhirnya berupa ekstrak bawang putih dengan konsentrasi 100%.

4.7.2 Persiapan Biofilm *Streptococcus pneumoniae*

4.7.2.1 Pemeriksaan Mikroskopis

Pembentukan sediaan slide :

1. *Object glass* dibersihkan dahulu dengan kapas, dilanjutkan fiksasi dengan dilewatkan di atas api dan biarkan dingin sehingga *object glass* menjadi steril dari bahan pencemar lain. Kemudian pembuatan sediaan yang tidak terlalu tebal dan tidak terlalu tipis dengan cara:

2. Teteskan satu ose aquades steril pada gelas objek. Ambil sedikit biakan kuman menggunakan ose, kemudian suspensikan dengan aquades pada gelas objek dan ratakan. Khusus sediaan cair tidak perlu disuspensikan dengan aquades.
3. Biarkan sediaan kering di udara, kemudian lakukan fiksasi dengan cara melewatkan sediaan di atas api satu atau dua kali (Forbes *et al.*, 2007).

4.7.2.2 Pewarnaan Gram

1. Tuang sediaan pada gelas objek dengan kristal violet dengan durasi 1 menit. Buang sisa kristal violet dan bilas dengan air.
2. Tuang sediaan dengan lugol selama 1 menit. Buang sisa lugol dan bilas dengan air.
3. Tuang sediaan dengan alkohol 96% selama 5-10 detik atau sampai warna cat luntur. Buang sisa alkohol dan bilas lagi dengan air.
4. Tuang sediaan dengan safranin selama $\frac{1}{2}$ menit. Buang sisa safranin dan bilas lagi dengan air.
5. Keringkan sediaan dengan kertas penghisap.
6. Lihat di bawah mikroskop dengan lensa objektif perbesaran 100x (Cahyani, 2013).

4.7.2.3 Pembuatan Media BHIA (*Brain Heart Infusion Agar*)

Prosedur pembuatan media BHIA adalah 4,7 gram bubuk BHIA dan 100 ml aquades steril dicampur dalam tabung *erlenmeyer*, diaduk sampai homogen dan disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah itu dituangkan ke *petridish* dengan ketebalan 2 mm, didiamkan hingga agar BHIA dingin dan membeku. Uji sterilisasi dilakukan dengan meletakkan dalam inkubator dan diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C (Andrianto, 2012).

4.7.2.4 Pembuatan Media BHIB (*Brain Heart Infusion Broth*)

Prosedur pembuatan media BHIB adalah 3 gram bubuk BHIB dan 100 ml aquades steril dicampur dalam tabung *erlenmeyer*, diaduk sampai homogen dan disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam dengan suhu 37°C. Hal ini dilakukan untuk membuktikan bahwa media BHIB dalam keadaan steril sebelum inokulasi (Andrianto, 2012).

4.7.2.5 Regenerasi Bakteri *Streptococcus pneumoniae*

Untuk melakukan peremajaan bakteri *Streptococcus pneumoniae* caranya, yaitu dengan memindahkan bibit dari koloni yang lama ke medium yang baru. Bakteri diambil 1 ose kemudian digoreskan pada media BHIA 5 ml dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam (Rahmawati, 2014).

4.7.2.6 Pembuatan Inokulum *Streptococcus pneumoniae*

Biakan murni *Streptococcus pneumoniae* yang telah diremajakan diambil 2 ose lalu disuspensikan dalam 100 ml BHIB kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Rahmawati, 2014).

4.7.3 Uji Biokimia

Identifikasi bakteri *Streptococcus pneumoniae* menggunakan uji biokimia yang dilakukan menggunakan 3 media, yaitu; Mannitol Broth, Sorbitol Broth, dan Voges Proskauer. Koloni *Streptococcus pneumoniae* diambil dengan ose steril dimasukkan ke masing-masing media dihomogenkan kemudian diinkubasi pada inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam. Hasil pengamatan menunjukkan adanya kekeruhan dan perubahan warna (kuning) pada media Mannitol Broth dan Sorbitol Broth, sedangkan pada media Voges Proskauer terjadi kekeruhan yang ditambah dengan reagent

Kova'c berubah menjadi merah anggur. Perubahan-perubahan tersebut menunjukkan bahwa koloni tersebut benar *Streptococcus pneumoniae*.

4.7.4 Pembuatan Perbenihan Cair Bakteri

1. Inokulum *Streptococcus pneumoniae* diambil 2 ml, kemudian dimasukkan ke dalam 20 ml media BHIB dan diinkubasi pada suhu 37C selama 18-24 jam.
2. Kemudian diukur kekeruhannya pada panjang gelombang 650 nm dan jumlah sel yang digunakan disetarakan dengan /mL.
3. Untuk mendapatkan suspensi bakteri uji dengan konsentrasi bakteri sebesar /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 /mL)

Sehingga diperoleh volume (mL) bakteri yang akan ditambah pengencer untuk mendapatkan bakteri dengan konsentrasi /ml sebanyak 10 mL. Setelah diperoleh suspensi bakteri dengan konsentrasi /mL sebanyak 10 mL, dilakukan pengenceran sebanyak 100 kali dengan menggunakan NaCl dan *nutrient broth*, sehingga konsentrasi bakteri menjadi /mL. Kini bakteri telah siap digunakan untuk penelitian.

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

Streptococcus pneumoniae yang sudah teridentifikasi disimpan dalam media TSB + *glycerol* 10% dan diinkubasi pada suhu 37°C semalam. Mikroba kultur semalam selanjutnya dimasukkan ke tabung TSB glu (10 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.*, 2000).

4.7.6 Uji Hambat Pembentukan Biofilm pada *Streptococcus pneumoniae*

1. Menyiapkan perbenihan cair bakteri dengan konsentrasi bakteri 1x CFU/ml.
2. Membuat suspensi bakteri dalam medium TSB + *glycerol* 10% berdasarkan perhitungan OD dari spektrofotometri.
3. Mengisi tabung reaksi 1-6 dengan suspensi bakteri dalam medium TSB + *glycerol* 10% 2ml, dan satu tabung lain (kontrol) diisi 4ml.
4. Kemudian 2 ml dalam larutan ekstrak dalam tiap tabung kecil dicampurkan dalam tabung reaksi 1-6 sehingga didapatkan larutan sebanyak 4 ml dengan konsentrasi ekstrak bawang putih pada masing-masing tabung sebagai berikut:

- a. Tabung 1 (Kontrol) : 0 %
 - b. Tabung 2 : 3,125 %
 - c. Tabung 3 : 6,25 %
 - d. Tabung 4 : 12,5 %
 - e. Tabung 5 : 25 %
 - f. Tabung 6 : 50 %
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%) 0,5 ml lalu kelebihan warna dibuang dan tabung dicuci dengan *deionized water*.
 8. Tabung dikeringkan.
Segera amati dan catat biofilm yang terbentuk (Cahyani, 2013). Dapat terlihat sebuah film melapisi sisi dan dasar tabung. Hal ini diyakini sebagai indikasi pembentukan biofilm (Praharaj *et al.*, 2013).

4.8 Analisis Data

Penelitian ini menggunakan variabel numerik untuk mengetahui pengaruh antara berbagai konsentrasi ekstrak etanol bawang putih (*Allium sativum*) terhadap intensitas warna yang ditimbulkan oleh biofilm pada tabung dan untuk mengetahui hubungan antara masing-masing konsentrasi ekstrak bawang putih (*Allium sativum*) terhadap intensitas warna biofilm pada tabung. Analisis data dilakukan dengan menggunakan *IBM Statistic SPSS (Statistical Product of Service Solution)* untuk *windows* versi 16. Langkah-langkah pengujian sebagai berikut :

1. Uji normalitas data dengan menggunakan *Kolmogorov Smirnov test* untuk menguji apakah data tersebar normal (parametrik) atau tidak tersebar normal (nonparametrik) dan homogen atau tidak homogen. *Shapiro-Wilk test* dilakukan apabila data berjumlah kurang dari 50 data.

2. Uji komparasi dilakukan dengan cara :

a. ANOVA, dengan syarat sebaran data harus normal dan varian data harus sama (homogen).

b. Namun, jika data tidak homogen atau tidak tersebar normal maka digunakan metode *Kruskal Wallis*.

3. Uji Post Hoc dilakukan dengan cara :

a. *Tuckey*, dengan syarat sebaran data harus normal dan varian data harus sama (homogen).

b. Namun, jika data tidak homogen atau tidak tersebar normal maka menggunakan metode *Mann Whitney*.

4. Uji Korelasi dilakukan dengan cara :

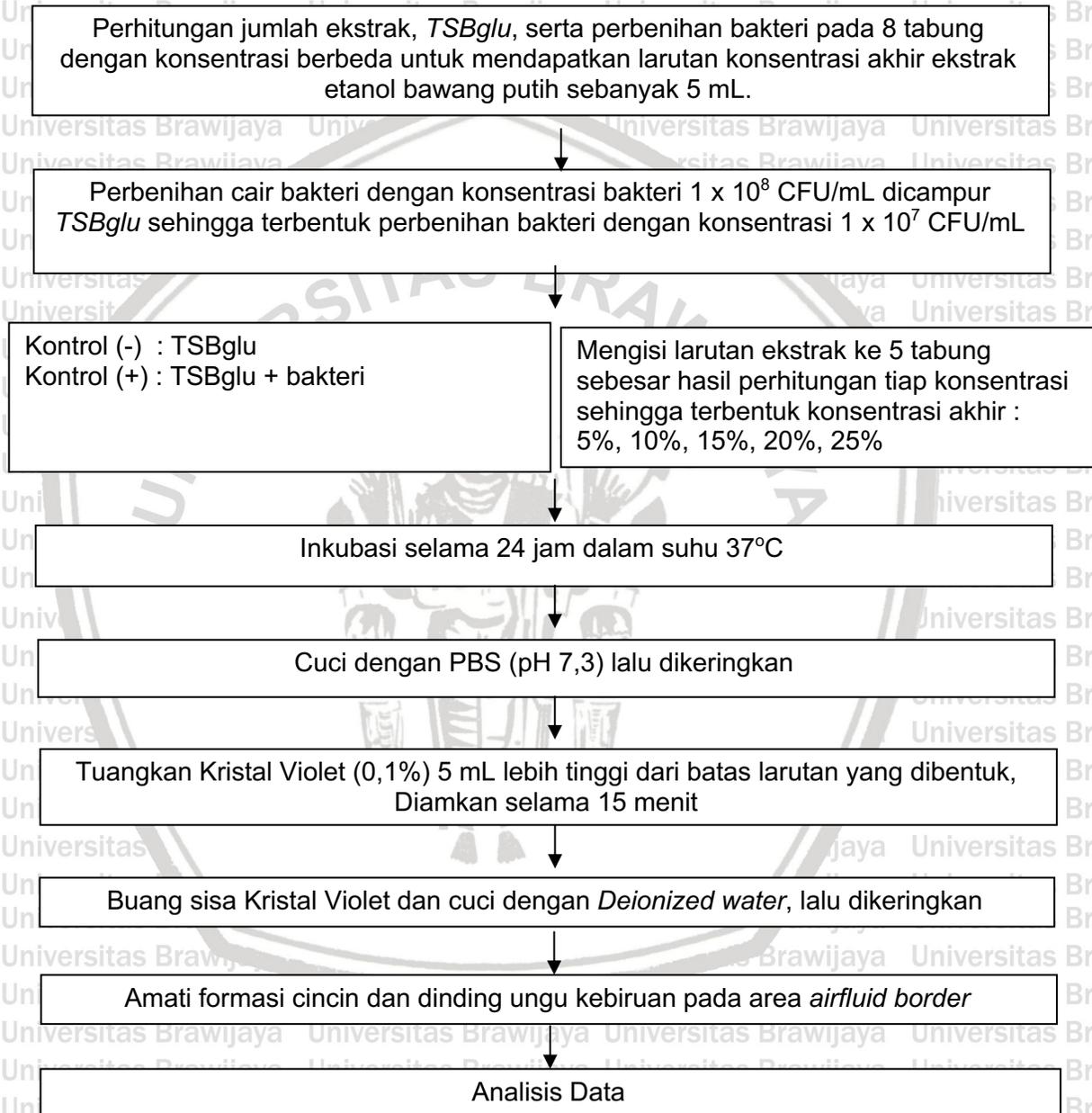
a. *Pearson*, dengan syarat sebaran data harus normal dan varian data harus sama (homogen).

b. Namun, bila data tidak homogen atau tidak tersebar normal maka menggunakan metode *Spearman*.

5. Uji Regresi dilakukan untuk mengetahui pengaruh variabel independen terhadap variabel dependen setelah diketahui ada hubungan bermakna antara kedua variabel penelitian.

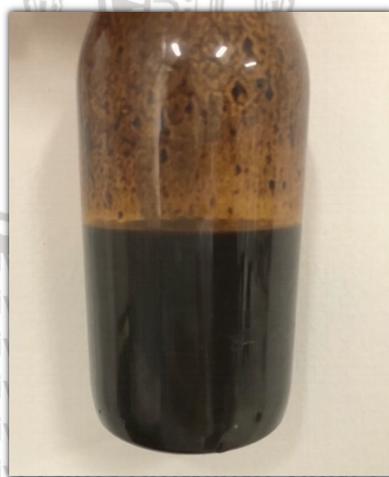
4.9 Rancangan Operasional Penelitian

Uji Hambat Pembentukan Biofilm



BAB 5**HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA****5.1 Hasil Penelitian****5.1.1 Hasil Ekstraksi Bawang Putih (*Allium Sativum*)**

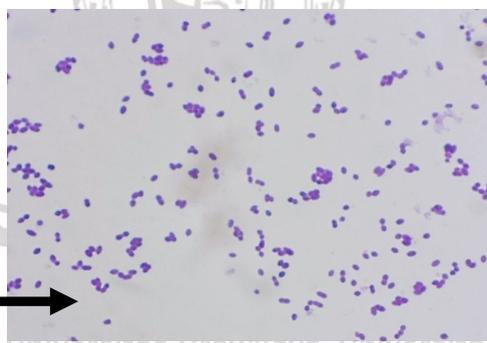
Bawang putih di kupas kulitnya dan dicuci bersih, selanjutnya dikeringkan dalam oven pada suhu 40°C, lalu dihaluskan hingga bawang putih yang telah di kupas menjadi serbuk kering atau simplisia. Simplisia direndam dalam 2 liter pelarut etanol 96% selama 2x24 jam dan diambil filtratnya dengan penyaringan. Pengadukan di metode maserasi dilakukan sebanyak 12 kali selama 15 menit. Setelah itu dilanjutkan dengan penyaringan untuk memisahkan filtrat dari ampas. Hasil saringan kemudian diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator* sampai kental sehingga didapatkan ekstrak bawang putih dengan konsentrasi 100%.

**Gambar 5.1 Ekstrak Bawang Putih (*Allium Sativum*)**

5.1.2 Hasil Identifikasi Bakteri

Bakteri yang dipakai adalah *Streptococcus pneumoniae* yang di dapatkan dari Rumah Sakit Saiful Anwar. Identifikasi bakteri diawali dengan pewarnaan gram, uji katalase. Hasil pewarnaan gram bakteri tersebut bakteri gram positif, berbentuk coccus berantai seperti terlihat pada gambar 5.2. Identifikasi dilanjutkan dengan uji katalase dan didapatkan hasil negatif (tidak adanya gelembung) seperti pada gambar 5.3. Hasil ini menunjukkan bahwa bakteri tersebut merupakan *Streptococcus*.

Uji biokimia dengan menggunakan Vitek 2 compact dilakukan untuk mengkonfirmasi spesies *Streptococcus*. Hasil identifikasi menunjukkan prosentase kebenaran sebesar 96% (probability) seperti terlihat pada gambar 5.4. Hal ini memperkuat kesimpulan bahwa bakteri yang diteliti merupakan *Streptococcus pneumoniae*.



Gambar 5.2 Hasil Pewarnaan Gram

Bakteri *Streptococcus pneumoniae* dengan pengecatan gram dengan perbesaran mikroskop 1000x menggunakan minyak atsiri berbentuk *diplococcus* (panah hitam).



Gambar 5.3 Hasil Uji Katalase

Keterangan : Hasil negatif, tidak didapatkan adanya gelembung.

RS dr SYAIFUL ANWAR MALANG
Microbiology Chart Report

Printed Apr 11, 2019 06:55 ICT

bioMérieux Customer: Patient ID: 11434361
 Patient Name: STANLEY, OLTBERT Physician:
 Location: R7B Isolate Number: 1
 Lab ID: 10042019.5557

Organism Quantity: Selected Organism : *Streptococcus pneumoniae*

Source: SPT Collected:

Comments:			
-----------	--	--	--

Identification Information	Analysis Time:	4.90 hours	Status:	Final
Selected Organism	96% Probability	<i>Streptococcus pneumoniae</i>		
ID Analysis Messages	Bionumber:	06511132000000		

Gambar 5.4 Hasil Vitek 2 Compact

Hasil menunjukkan probability sebesar 96% (probability) bahwa bakteri yang diuji merupakan *Streptococcus pneumoniae*.

5.1.3 Hasil Uji Hambat Pembentukan Biofilm

Uji pendahuluan dilaksanakan sebelum penelitian inti yang bertujuan untuk menentukan konsentrasi yang akan dipakai. Konsentrasi yang digunakan, yaitu 0%, 3,125%, 6,25%, 12,5%, 25%, dan 50%. Hasil penelitian pendahuluan menunjukkan secara visual bahwa biofilm *Streptococcus pneumoniae* terhambat pada konsentrasi 25% dan 50% sudah tidak terlihat adanya cincin biofilm.

Penelitian inti kemudian dilakukan dengan melakukan perapatan konsentrasi menjadi lima konsentrasi, yaitu 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25%.

Perlakuan 0% merupakan kelompok kontrol bakteri yang menggunakan media TSB+ *glucose* tanpa pemberian ekstrak.

Pengamatan dari hasil penelitian inti dilakukan terhadap ketebalan bentukan cincin yang menandakan terbentuknya biofilm. Pengamatan tersebut dilakukan secara visual yang ditunjukkan pada gambar 5.6. Pengukuran ketebalan cincin dilakukan dengan cara kuantifikasi ketebalan biofilm di tabung tersebut. Hasil dari pengukuran ketebalan cincin diberi skor 0 sampai +3 seperti yang ditunjukkan pada tabel 5.5.

Tabel 5.1 Hasil Pengukuran Ketebalan cincin biofilm

Konsentrasi	Pengulangan				Rata – rata
	I	II	III	IV	
0%	+3	+3	+3	+3	+3
5%	+3	+3	+3	+3	+3
10%	+3	+3	+3	+3	+3
15%	+2	+2	+2	+1	+1.75
20%	+1	+1	0	0	+0,5
25%	0	0	0	0	0

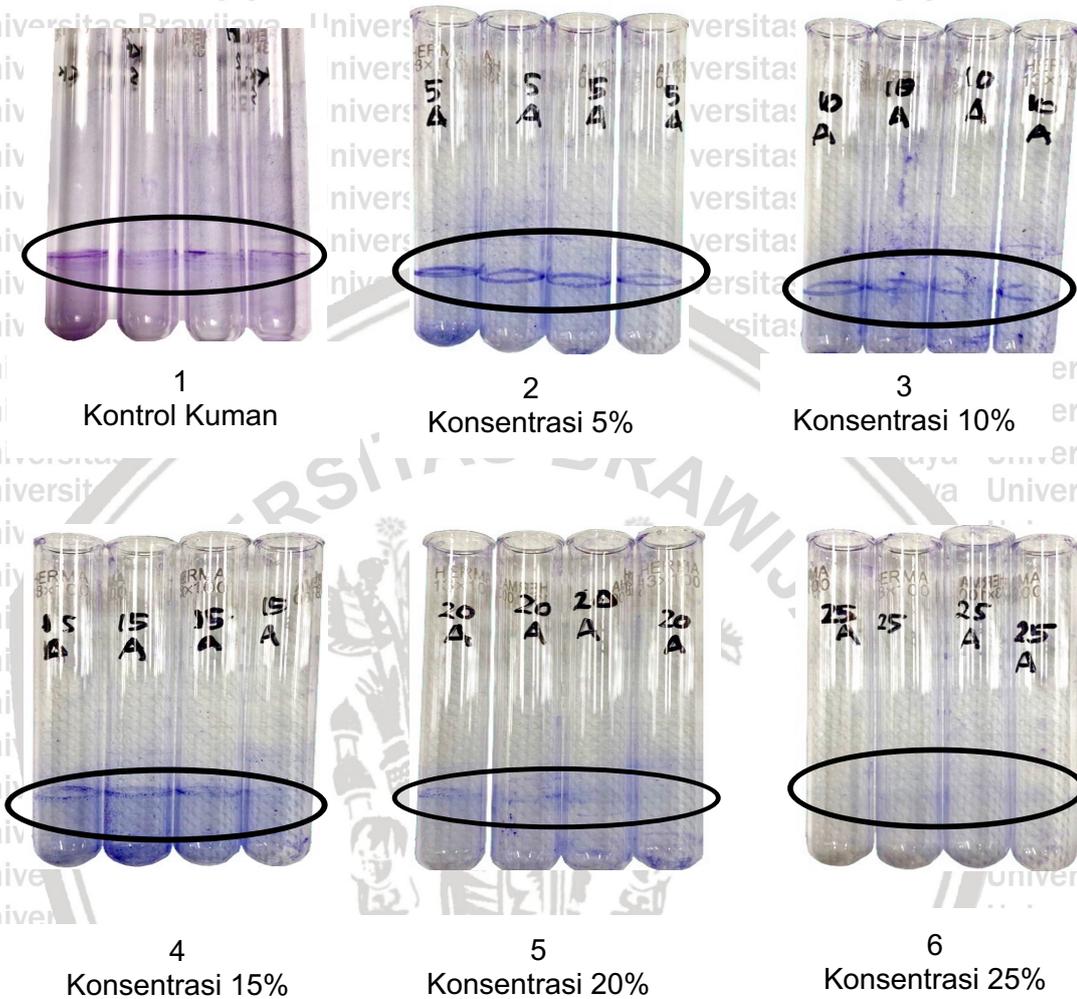
Keterangan : 0 = tidak terbentuk cincin biofilm

1= cincin sangat tipis

2 = cincin tipis

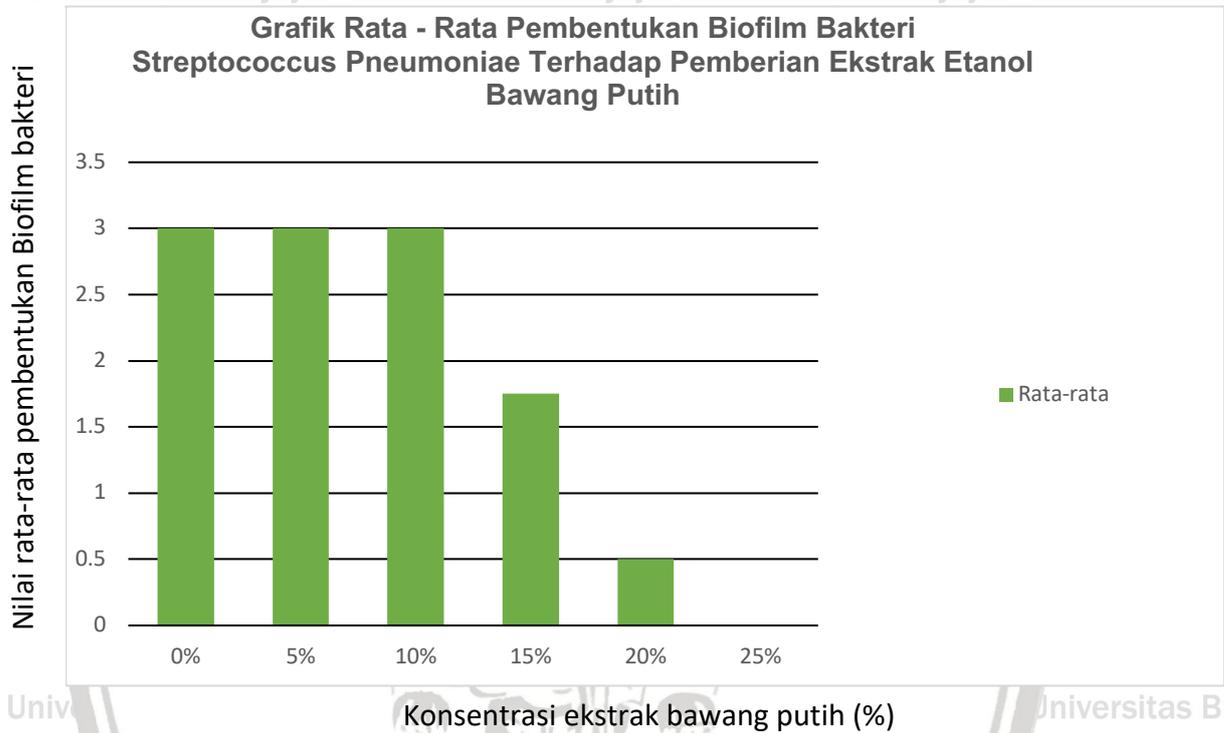
3 = cincin tebal

Gambar 5.6 Hasil Uji Hambat Pembentukan Biofilm Pengulangan I-VI



Berdasarkan tabel 5.5 dan gambar 5.6, hasil pertumbuhan biofilm bakteri *Streptococcus pneumoniae* di setiap pemberian ekstrak etanol bawang putih yang berbeda-beda menunjukkan hasil yang bervariasi. Pada konsentrasi 20% dapat ditemukan penurunan ketebalan biofilm yang artinya terdapat penurunan pertumbuhan bakteri pada konsentrasi tersebut. Pada konsentrasi 25% tidak ditemukan adanya pembentukan biofilm. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi 25% merupakan konsentrasi terendah dimana tidak ditemukannya pembentukan biofilm yang dapat didefinisikan sebagai Kadar Hambat Biofilm Minimal (KHBM).

Oleh karena itu, semakin tinggi konsentrasi ekstrak akan semakin menghambat pembentukan biofilm.



Gambar 5.6 Grafik pengaruh ekstrak etanol bawang putih terhadap pembentukan biofilm *Streptococcus pneumoniae*.

Berdasarkan grafik rata-rata pembentukan biofilm, ditemukan bahwa terdapat hasil yang bervariasi. Penurunan rata-rata pembentukan cincin biofilm dapat dilihat pada konsentrasi 15%, 20%, dan 25%. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak akan menunjukkan semakin rendah nilai rata-rata pembentukan biofilm bakteri.

5.2 Analisis Data

Analisis hasil penelitian menggunakan aplikasi analisis statistik *IBM SPSS Statistic* versi 16 untuk *Windows*. Dalam penelitian ini terdapat dua variabel yaitu

variabel dependen dan independen. Variabel independen dari penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol bawang putih yang merupakan variabel numerik.

Variabel dependen dari penelitian ini adalah ketebalan pembentukan cincin biofilm *Streptococcus pneumoniae* yang merupakan variabel ordinal (bertingkat).

Proses analisis data pada penelitian ini dilakukan dengan uji non-parametrik dikarenakan salah satu variabel yang digunakan merupakan variabel ordinal.

Uji statistik nonparametrik dapat dilakukan tanpa dilakukan uji asumsi terlebih dahulu. Uji statistik yang digunakan yaitu Uji Kruskal Wallis, Uji Mann Whitney dan Uji rank Spearman.

5.2.1 Uji Kruskal Wallis

Uji *Kruskal Wallis* digunakan untuk mengetahui adanya pengaruh dari variasi konsentrasi pemberian ekstrak etanol bawang putih terhadap pembentukan biofilm *Streptococcus pneumoniae*. Hipotesis ditentukan melalui H_0 dan H_1 . H_0 diterima apabila nilai signifikansi yang didapatkan lebih dari 0,05 ($p > 0,05$).

Sedangkan H_0 ditolak apabila nilai signifikansi yang didapatkan kurang dari 0,05 ($p < 0,05$). H_0 pada penelitian ini adalah tidak ada perbedaan bermakna antara konsentrasi ekstrak etanol bawang putih terhadap pembentukan biofilm *Streptococcus pneumoniae*. Sedangkan H_1 pada penelitian ini adalah ada perbedaan bermakna antara konsentrasi ekstrak etanol bawang putih terhadap pembentukan biofilm *Streptococcus pneumoniae*.

Hasil analisis *Kruskal Wallis* menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0,000 ($p < 0,05$). Sehingga H_0 ditolak dan H_1 diterima, hal ini menunjukkan bahwa ada

perbedaan yang signifikan dari konsentrasi ekstrak bawang putih yang diberikan terhadap pembentukan biofilm *Streptococcus pneumoniae*.

5.2.2 Uji Mann-Whitney

Uji Mann-Whitney digunakan untuk mengetahui kelompok perlakuan konsentrasi yang memiliki pengaruh signifikan terhadap pembentukan biofilm bakteri *Streptococcus pneumoniae*. Kelompok perlakuan dinyatakan signifikan apabila didapatkan hasil analisis kurang dari 0,05 ($p < 0,05$)

Ringkasan dari hasil Mann-Whitney pada setiap kelompok presentasi ekstrak etanol bawang putih :

Tabel 5.2 Hasil Analisis Data Uji Mann-Whitney

	0%	5%	10%	15%	20%	25%
0%		1,000	1,000	0,029*	0,029*	0,029*
5%	1,000		1,000	0,029*	0,029*	0,029*
10%	1,000	0,057		0,029*	0,029*	0,029*
15%	0,029*	0,057*	0,686		0,057	0,029*
20%	0,029*	0,029*	0,057	0,114		0,343
25%	0,029*	0,029*	0,029*	0,029*	0,343	

Keterangan : * = $p < 0,05$

Hasil Uji Mann-Whitney menunjukkan bahwa ekstrak etanol bawang putih pada konsentrasi 0% memiliki perbedaan yang signifikan terhadap konsentrasi 10%, 15%, 20%, dan 25%. Efek yang dihasilkan ekstrak etanol bawang putih pada konsentrasi 25% memiliki perbedaan yang signifikan terhadap konsentrasi 0%, 5%, 10% dan 15%.

5.2.3 Uji Korelasi Rank Spearmann

Uji Korelasi Rank Spearmann Dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui hubungan antara konsentrasi ekstrak etanol bawang putih terhadap pembentukan biofilm *Streptococcus pneumoniae*. Analisis hubungan ini menggunakan hipotesis berikut ini :

Ho : tidak ada hubungan yang signifikan antara konsentrasi ekstrak etanol bawang putih dengan pembentukan biofilm *Streptococcus pneumoniae*.

H1 : ada hubungan yang signifikan antara konsentrasi ekstrak etanol bawang putih dengan pembentukan biofilm *Streptococcus pneumoniae*.

Ho diterima apabila nilai signifikansi yang didapatkan lebih dari 0,05 ($p > 0,05$). Sedangkan Ho ditolak apabila nilai signifikansi yang didapatkan kurang dari 0,05 ($p < 0,05$).

Hasil dari Uji Korelasi Rank Spearmann didapatkan nilai signifikansi yaitu 0,000 ($p < 0,05$) yang berarti terdapat hubungan yang signifikan antara variasi pemberian konsentrasi ekstrak etanol bawang putih dengan pembentukan biofilm *Streptococcus pneumoniae*. Nilai koefisiensi korelasi sebesar -0,925 yang menunjukkan ada hubungan negatif (berlawanan) dan sangat kuat. Hal ini dapat diartikan bahwa semakin besar konsentrasi ekstrak etanol bawang putih, maka pembentukan biofilm *Streptococcus pneumoniae* semakin rendah, begitupula sebaliknya.

Bab 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini menggunakan bakteri *Streptococcus pneumoniae* yang didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Brawijaya yang telah diidentifikasi ulang sebelum penelitian dilakukan dan dinyatakan dalam surat keterangan bakteri *Streptococcus* yang ditanam pada tabung yang diberi perlakuan berupa pemberian ekstrak etanol bawang putih *Allium Sativum* ekstrak bawang putih yang digunakan didapatkan dari Materia Medika Batu berupa simplisia bawang putih sebanyak 500 gram yang kemudian di ekstraksi di Fakultas Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang dengan menggunakan metode maserasi. Proses pengerjaan dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam pelarut etanol 96%. Larutan etanol 96% akan menembus dinding sel bawang putih dan masuk dalam ke rongga sel, perbedaan konsentrasi akan mendesak zat aktif keluar. Kelebihan dari metode ini, yaitu peralatan dan prosedur yang dilakukan sederhana (Pratiwi,2010). Larutan etanol biasanya digunakan untuk mengekstraksi senyawa-senyawa aktif, beberapa penelitian melaporkan bahwa pelarut etanol lebih baik dari pada air, maupun pelarut lain dalam mengekstraksi senyawa antioksidan maupun antibakteri (Hirasawa, 1999).

Sebelum melakukan penelitian inti, dilakukan penelitian pendahuluan untuk menentukan konsentrasi pada penelitian inti. Hasil penelitian pendahuluan secara visual, konsentrasi 25% dan 50% sudah dapat menghambat pembentukan biofilm bakteri *Streptococcus pneumoniae*. Penelitian inti kemudian dilakukan dengan menggunakan 6 konsentrasi yaitu 0%, 5%, 10%, 15%, 20%, dan 25%.

Hasil penelitian inti menunjukkan bahwa konsentrasi ekstrak secara visual dapat

menghambat pembentukan biofilm *Streptococcus pneumoniae* adalah konsentrasi 25%. Hal tersebut dapat dilihat dari tidak terbentuknya cincin di area *airfluid border* pada tabung. Bersamaan dengan penelitian pendahuluan dilaksanakan uji identifikasi bakteri yaitu pengecatan gram dan uji katalase. Hasil pengecatan gram menunjukkan bakteri berwarna ungu, yaitu gram positif. Bakteri gram positif punya dinding sel yang terdiri dari peptidoglikan yang terletak di luar membran plasma. Ketika sediaan ditetesi kristal violet lalu iodin, warna ungu dari kristal violet ini akan ditahan oleh struktur peptidoglikan yang terletak di luar membran plasma. Ketika sediaan ditetesi kristal violet lalu kemudian iodin, warna ungu dari kristal violet ini akan ditahan oleh struktur peptidoglikan bakteri. Kemudian ketika sediaan ditetesi alcohol zat warna ungu tersebut akan sulit untuk terhapus sehingga bakteri berwarna ungu (Willey et al., 2008).

Uji Katalase menunjukkan hasil negatif yaitu tidak terlihat adanya gelembung. Bakteri aerob dan fakultatif anaerob memproduksi dua oksin sebagai hasil metabolisme normal, yaitu *hydrogen peroxide* (H_2O_2) dan *superoxide radical* (O_2^-). Bakteri memiliki dua enzim untuk detoksifikasi dua produk tersebut, salah satunya enzim katalase yang dapat mengubah *hydrogen peroxide* menjadi air dan oksigen (gelembung). Hasil uji yang negatif menunjukkan tidak adanya enzim katalase dan bakteri tersebut merupakan *Streptococcus sp.* (Tille, 2015).

Kemudian, tes Vitek 2 *compact* yang menunjukkan presentase kebenaran 96% (*probability*) memperkuat kesimpulan bahwa bakteri yang diteliti merupakan *Streptococcus pneumoniae*.

Uji hambat pembentukan biofilm pada penelitian ini dilakukan dengan cara metode dilusi tabung karena ekstrak yang digunakan kasar dan tidak dapat digunakan dengan metode mikrotiter. Dengan menggunakan metode dilusi tabung

pembentukan cincin biofilm dapat terlihat langsung *airfluid border* pada dinding tabung. Di penelitian pendahuluan dilakukan untuk menentukan konsentrasi yang nantinya akan digunakan pada penelitian inti. Pada *Streptococcus pneumoniae* di dapatkan hasil penelitiannya menunjukkan secara visual biofilm dari bakteri ini terhambat di konsentrasi 12,5% dan sudah tidak terlihat cincin biofilm di konsentrasi 25%.

Pada penelitian inti ini dilakukan penyempitan konsentrasi menjadi 5 konsentrasi yaitu 5%,10%,15%,20%, dan 25%. Di dapatkan hasil dari penelitian inti ini menunjukkan penghambat biofilm secara visual terlihat pada 20% dan sudah tidak ada cincin biofilm yang terbentuk pada konsentrasi 25% dengan ditandai tidak adanya *airfluid border* pada tabung dan dapat dibandingkan dengan tabung kontrol yang cincinnya sangat tebal. Didapatkan data dari penelitian ini berupa foto yang dianalisis secara visual dan ditemukan bahwa secara umum, warna cincin biofilm semakin tidak pekat seiring dengan tingginya konsentrasi dari ekstrak bawang putih.

Penelitian ini selaras dengan penelitian yang dilakukan oleh Wangi (2017), dalam penelitiannya mengenai efek ekstrak bawang putih *Allium Sativum* terhadap pembentukan biofilm *Pseudomonas aeruginosa*. Hasil penelitian menyebutkan bahwa semakin tinggi konsentrasi bawang putih yang diberikan, inhibisi yang dihasilkan akan semakin tinggi. Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas penghambatan biofilm juga semakin meningkat.

Penelitian lain oleh Biring (2015), menunjukkan bahwa konsentrasi ekstrak bawang putih sebesar 70% dapat mengurangi pertumbuhan *Enterococcus faecalis* sekaligus menghambat pembentukan biofilm bakteri. Konsentrasi optimal pada penghambatan biofilm berbeda. Hal ini disebabkan karena bakteri dan

metode penelitian yang digunakan berbeda. Pada penelitian ini dilakukan penghambatan pertumbuhan biofilm secara in vitro dengan hasil ekstraksi etanol berbentuk pasta yang didapatkan melalui proses penyaringan menggunakan kain kasa.

Kemudian menurut Mohsenipour (2015), studi mengenai efek ekstrak bawang putih terhadap pembentukan biofilm di enam bakteri patogen dan memberikan hasil efektif. Penelitian dilakukan pada tiga bakteri gram positif dan tiga bakteri gram negatif. Hasil menunjukkan efek penghambatan pertumbuhan biofilm yang secara langsung berkorelasi dengan peningkatan ekstrak bawang putih yang diberikan. Daya hambat pembentukan biofilm paling tinggi didapat pada bakteri *Bacillus cereus* dan *Streptococcus pneumoniae* yang keduanya merupakan bakteri gram positif.

Efek *Ajoene* 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. Jakobsen *et al.* (2012) menyebutkan bahwa tata laksana menggunakan *ajoene* terhadap biofilm secara in vitro terbukti sinergis dengan efek antimikrobal dari tobramycin.

Allicin adalah bahan aktif dalam bawang putih berperan penting dalam menghambat pembentukan biofilm. Penelitian menggunakan *Allicin* sebagai penghambat biofilm dari bakteri *Staphylococcus epidermidis* dengan metode *microtiter plate* memberikan hasil yang efektif. Kemampuan ini membuktikan bahwa *allicin* sendiri atau dikombinasikan dengan antibiotik dapat mencegah terjadinya infeksi (Cruz-Villalon & Perez-Giraldo, 2016).

Penelitian ini selaras dengan penelitian sebelumnya tentang efek kandungan dari bawang putih, yaitu *Allicin & ajoene*. Hasil dari penelitian ini adalah membuktikan kandungan dari bawang putih dapat menghambat pembentukan dari biofilm *Streptococcus pneumoniae* secara in vitro. Manfaat dari penelitian ini adalah penggunaan bawang putih sebagai alternatif pencegahan dan terapi terhadap infeksi *Streptococcus pneumoniae*.

Keterbatasan pada penelitian ini adalah pengamatan yang hanya dilakukan setelah masa inkubasi selesai (24 jam), tidak dilakukan sepanjang waktu dan secara *real time*. Oleh karena itu, belum dapat dilihat dengan detail proses pembentukan biofilm secara langsung. Selain itu, terdapat juga beberapa perancu, yaitu hasil dari ekstrak bawang putih ini berbentuk pasta dan memiliki tesktur yang besar, sehingga menempel di dinding tabung dan sulit untuk dibersihkan, akibatnya menyulitkan pengamatan cincin biofilm secara visual. Oleh karena itu, perlu dilakukannya eksplorasi ulang mengenai metode ekstraksi bawang putih yang digunakan untuk uji biofilm ke depannya.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa :

1. Ekstrak etanol bawang putih (*Allium Sativum*) memiliki potensi sebagai penghambat pembentukan biofilm *S.Pneumoniae* secara *in vitro*
2. Kadar Hambat Biofilm Minimum (KHBM) dari ekstrak etanol bawang putih (*Allium Sativum*) dalam menghambat pembentukan biofilm pada bakteri *S.Pneumoniae* secara *in vitro* adalah pada konsentrasi 25%.
3. Terdapat pengaruh yang signifikan antara peningkatan konsentrasi ekstrak etanol bawang putih (*Allium Sativum*) terhadap penghambatan biofilm *S.Pneumoniae*.

7.2 Saran

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

1. Perlu dilaksanakan penelitian untuk uji klinis selanjutnya secara *in vivo* untuk mengetahui farmakokinetik dan farmakodinamik ekstrak bawang putih.
2. Perlu dicari metode ekstraksi bawang putih dengan konsentrasi 100% namun dengan hasil yang lebih halus tanpa partikel yang dapat menempel di dinding tabung.

3. Perlu dikembangkan penelitian lanjutan yang menggunakan ekstrak bawang putih dalam menghambat biofilm bakteri lainnya.
4. Perlu dikembangkan konsentrasi lebih sempit agar mendapat angka konsentrasi yang lebih presisi.



DAFTAR PUSTAKA

Barnhart, M.M. and Chapman, M.R., 2006. Curli biogenesis and function. *Annu. Rev. Microbiol.*, 60, pp.131-147.

Brackman, G. and Coenye, T., 2015. Quorum sensing inhibitors as anti-biofilm agents. *Current pharmaceutical design*, 21(1), pp.5-11.

Brooks GF, Jawetz. Et.al.(2016) *Medical Microbiology*, 27th Ed., McGrawHill Education, Newyork,2016.p.247-252.

Departemen Kesehatan Republik Indonesia.2014. Survei Demografi dan kesehatan Indonesia. Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

Donlan RM. 2002. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Disease* 8(9), pp.881-890.

Finlay, B.B., 1997. Interactions of enteric pathogens with human epithelial cells. In *Mechanisms in the Pathogenesis of Enteric Diseases* (pp. 289-293). Springer, Boston, MA.

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

Hirasawa M, Shouji N, Neta T, Fukushima K, Takada K. Three kinds of antibacterial substances from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing.(Shiitake, an edible mushroom).

International Journal of Antimicrobial Agents. 1999 Feb 1;11(2):151-7. ---- etanol

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.

Lee, D.Y., Li, H., Lim, H.J., Lee, H.J., Jeon, R. and Ryu, J.H., 2012. Anti-inflammatory activity of sulfur-containing compounds from garlic. *Journal of medicinal food*, 15(11), pp.992-999.

Londhe, V. P. 2014. Role Of Garlic (*Allium Sativum*) In Various Diseases-An Overview. *Journal Of Pharmaceutical Research & Opinion*, 1(4)

Mathur, T., Singhal, S., Khan, S., Upadhyay, D.J., Fatma, T. and 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), p.25.

Mohsenipour, Z. and Hassanshahian, M., 2015. The effects of *Allium sativum* extracts on biofilm formation and activities of six pathogenic bacteria. *Jundishapur journal of microbiology*, 8(8)

Moore, G.E., 2009. Biofilm Production by *Streptococcus uberis* Associated with Intramammary Infections.

Noorhamdani., Santoso S., Sumarno., Dzen SM., Roekistingisih., Winarsih S., Santosaningsih D., Hidayati Dwi YN., Mulyastuti Yuanita., Erikawati Dewi., Rahayu S., Fitri Bethania. 2015. *Bakteriologi Medik, Edisi kedua. Malang: Laboratorium Mikrobiologi FKUB.*

Nuryastuti, T., van der Mei, H.C., Busscher, H.J., Irvati, S., Aman, A.T. and Krom, B.P., 2009. Effect of cinnamon oil on *icaA* expression and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(21), pp.6850-6855

Purwani Eni, Hapsari Nur, Rauf Rusdin. 2009. Respon Hambatan Bakteri Gram Positif Dan Gram Negatif pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) yang Diawetkan dengan Ekstrak Jahe (*Zingiber officinale*). *Jurnal Kesehatan* ISSN 1979-7621, Vol. 2, No. 1.

Santoso, H.B. 2008. Ragam & khasiat tanaman obat. Agromedia

Sewify M, Nair S, Warsame S, Murad M, Alhubail A, Behbehani K, Al-Refaei F, Tiss A. Prevalence of urinary tract infection and antimicrobial susceptibility among diabetic patients with controlled and uncontrolled glycemia in Kuwait. *Journal of diabetes research*. 2016;2016.

Sudoyo, A.W., Setiyohadi, B., Alwi, I., Simadibrata, M. and Setiati, S., 2009. Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam Jilid II edisi V. *Jakarta: Interna Publishing*, 310, pp.1973-1982.

Syamsiah, I. S., & Tajudi, S. 2005. *Khasiat dan Manfaat Bawang Putih Raja Antibiotik Alami*. Cetakan IV. Agromedia Pustaka, Jakarta.

Tan, C.W. and Chlebicki, M.P., 2016. Urinary tract infections in adults. *Singapore medical journal*, 57(9), p.485. ---- (Chee dan Maciej, 2016)

Trivedi, L. and Gomathi, S., 2016. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Enterococci: An evaluation of three different screening methods. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(3), pp.643-650.

Vasudevan, R., 2014. Biofilms: microbial cities of scientific significance. *J Microbiol Exp*, 1(3), p.00014.

Wu, X., Santos, R.R. and Fink-Gremmels, J., 2015. Analyzing the antibacterial effects of food ingredients: model experiments with allicin and garlic extracts on biofilm formation and viability of *Staphylococcus epidermidis*. *Food science & nutrition*, 3(2), pp.158-168