

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI KADAR HAMBAT
MINIMUM, KADAR BUNUH MINIMUM, ANTIBIOFILM
(PENGHAMBATAN PERTUMBUHAN BIOFILM) *Aspergillus
niger* TERHADAP *UroPathogenic Escherichia coli***

SKRIPSI

Oleh:

YULIA CANDRA DEWI

NIM. 18910031



**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG**

2021

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI KADAR HAMBAT
MINIMUM, KADAR BUNUH MINIMUM, ANTIBIOFILM
(PENGHAMBATAN PERTUMBUHAN BIOFILM) *Aspergillus
niger* TERHADAP *UroPathogenic Escherichia coli***

SKRIPSI

Diajukan Kepada:

Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan

Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang

Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam Memperoleh

Gelar Sarjana Kedokteran (S.Ked)

Oleh:

YULIA CANDRA DEWI

NIM. 18910031

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM
MALANG**

2021

HALAMAN PERSETUJUAN SKRIPSI

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI KADAR HAMBAT MINIMUM, KADAR
BUNUH MINIMUM, ANTIBIOFILM (PENGHAMBATAN
PERTUMBUHAN BIOFILM) *Aspergillus niger* TERHADAP
*UroPathogenic Escherichia coli***

SKRIPSI

Oleh:

YULIA CANDRA DEWI

NIM. 18910031

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji:

Tanggal: 27 Oktober 2021

Pembimbing I



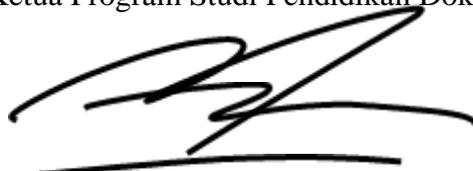
dr. Avin Ainur F. M.Biomed
NIP. 19800203 200912 2002

Pembimbing II



dr. Sakinah Baraja, Sp.B
NIP. 19640420 20170101 2 111

Mengetahui,
Ketua Program Studi Pendidikan Dokter



dr. Tias Pramesti Griana, M.Biomed
NIP. 198105182011012000

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI KADAR HAMBAT MINIMUM, KADAR
BUNUH MINIMUM, ANTIBIOFILM (PENGHAMBATAN
PERTUMBUHAN BIOFILM) *Aspergillus niger* TERHADAP
*UroPathogenic Escherichia coli***

SKRIPSI

Oleh:

YULIA CANDRA DEWI

NIM. 18910031

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi dan Dinyatakan Diterima

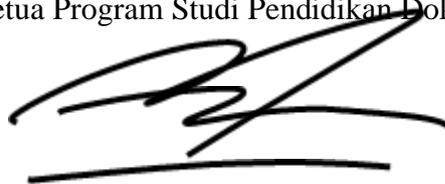
Sebagai Salah Satu Persyaratan untuk Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran

(S.Ked):

Tanggal: 27 Oktober 2021

Penguji Utama	<u>Dr. Zainabur Rahmah, S.Si, M.Si</u> NIDT. 19810207201701012122	
Ketua Penguji	<u>dr. Avin Ainur F, M.Biomed</u> NIP. 19800203 200912 2002	
Sekretaris Penguji	<u>dr. Sakinah Baraja, Sp.B</u> NIP. 19640420 20170101 2 111	

Mengetahui,
Ketua Program Studi Pendidikan Dokter



dr. Tias Pramesti Griana, M.Biomed
NIP. 198105182011012000

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertandatangan di bawah ini:

Nama : Yulia Candra Dewi

NIM : 18910031

Program Studi : Pendidikan Dokter

Fakultas : Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya, kecuali dengan mencantumkan sumber cuplikan pada daftar pustaka. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 27 Oktober 2021
Yang membuat pernyataan,

A handwritten signature in black ink is written over a yellow and red postage stamp. The stamp features the number '10000' and the text 'REPUBLIK INDONESIA' and 'MALANG'. The signature is written in a cursive style.

Yulia Candra Dewi
NIM 18910031

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Allah SWT berkat Rahmat, Hidayah, dan Karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan laporan skripsi dengan judul “UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI KADAR HAMBAT MINIMUM, KADAR BUNUH MINIMUM, ANTIBIOFILM (PENGHAMBATAN PERTUMBUHAN BIOFILM) *Aspergillus niger* TERHADAP *UroPathogenic Escherichia coli*”. Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mengerjakan skripsi pada program Strata-1 Jurusan Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

Penulis menyadari dalam penyusunan proposal skripsi ini tidak akan selesai tanpa bantuan dari berbagai pihak. Karena itu pada kesempatan ini kami ingin mengucapkan terimakasih kepada:

1. Prof. Dr. H. M. Zainuddin, MA, selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, yang telah banyak memberikan pengetahuan dan pengalaman yang berada.
2. Prof. Dr. dr. Yuyun Yueniwati Prabowowati Wadjib, M.Kes, Sp.Rad (K), selaku Dekan Progran Studi Pendidikan Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. dr. Tias Pramesti Griana, M.Biomed, selaku ketua Progran Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. dr. Avin Ainur Fitriyaningsih, M.Biomed, selaku dosen pembimbing skripsi I yang telah memberikan pengarahan dan dukungannya.

5. dr. Sakinah Baraja, Sp.B, selaku dosen pembimbing skripsi II yang telah memberikan pengarahan dan dukungannya.
6. dr. Lailia Nur Rahma, M.Biomed, selaku dosen pembimbing yang telah memberikan arahan selama proses penelitian.
7. Segenap sivitas akademika Progran Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang, terutama seluruh dosen atas ilmu dan bimbingannya.
8. Ayah, Ibu, Kakak, dan keluarga yang senantiasa memberikan doa, dan dukungannya kepada penulis selama menuntut ilmu di Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
9. Teman-teman seperjuangan di Progran Studi Pendidikan Dokter angkatan 2018 atas do'a dan dukungannya.
10. Semua pihak yang ikut membantu dalam penyusunan skripsi ini baik berupa materiil maupun moril.

Penulis menyadari laporan skripsi ini tidak luput dari berbagai kekurangan. Penulis mengharapkan saran dan kritik demi kesempurnaan dan perbaikannya sehingga akhirnya laporan skripsi ini dapat memberikan manfaat bagi bidang Pendidikan dan penerapan dilapangan serta bisa dikembangkan lagi lebih lanjut.

Malang, 15 Oktober 2021

Peneliti

DAFTAR ISI

HALAMAN PERSETUJUAN SKRIPSI.....	iii
HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI.....	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	v
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR.....	xiii
DAFTAR SINGKATAN.....	xv
ABSTRAK	xvii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.2.1 Rumusan Masalah Umum.....	5
1.2.2 Rumusan Masalah Khusus	5
1.3 Tujuan Penelitian.....	6
1.3.1 Tujuan Umum	6
1.3.2 Tujuan Khusus	6
1.4 Manfaat Penelitian.....	6
1.4.1 Bagi Masyarakat.....	6
1.4.2 Bagi Tenaga Kesehatan.....	6

1.4.3	Bagi Peneliti	7
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....		8
2.1	Infeksi Saluran Kemih (ISK).....	8
2.1.1	Definisi.....	8
2.1.2	Epidemiologi.....	8
2.1.3	Faktor Resiko	9
2.1.4	Etiologi.....	9
2.1.5	Patogenesis.....	10
2.1.6	Manifestasi Klinis	12
2.2	<i>Escherichia coli</i>	13
2.2.1	Taksonomi.....	13
2.2.2	Klasifikasi	14
2.2.3	Morfologi	16
2.2.4	Faktor virulensi	17
2.2.5	Biofilm	18
2.3	<i>Aspergillus niger</i>	25
2.3.1	Taksonomi.....	25
2.3.1	Morfologi	25
2.3.2	Kandungan <i>Aspergillus niger</i>	27
2.3.3	<i>Aspergillus niger</i> sebagai antibiotik dan antibiofilm	27
2.4	Penelitian Serupa tentang Antibiotik dan Antibiofilm dari Jamur	29

2.5	Kerangka Teori	31
BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN.....		32
3.1	Kerangka Konsep	32
3.2	Hipotesis Penelitian	32
BAB IV METODE PENELITIAN		34
4.1	Desain Penelitian	34
4.1.1	Jumlah Pengulangan.....	34
4.1.2	Variabel Penelitian	35
4.1.3	Kriteria Inklusi dan Eksklusi.....	35
4.2	Tempat dan Waktu Penelitian	36
4.3	Populasi Penelitian	36
4.4	Sampel Penelitian	37
4.5	Alat dan Bahan Penelitian	37
4.5.1	Alat Penelitian.....	37
4.5.2	Bahan Penelitian.....	37
4.6	Definisi Operasional.....	38
4.7	Prosedur Penelitian.....	40
4.7.2	Pembuatan Supernatan <i>Aspergillus niger</i>	40
4.7.3	Penyiapan Bakteri	41
4.7.4	Penyiapan Kelompok Kontrol.....	42
4.7.5	Uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM).....	43

4.7.6	Uji Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM)	44
4.7.7	Uji Deteksi Pembentukan Biofilm <i>Escherichia coli</i>	45
4.7.8	Uji Penghambatan Biofilm <i>Escherichia coli</i>	47
4.8	Denah Perlakuan Uji Aktivitas Antibakteri dan Antibiofilm.....	49
4.9	Alur Penelitian.....	50
4.10	Analisis Data	51
BAB V HASIL PENELITIAN		52
5.1	Hasil Identifikasi Jamur.....	52
5.2	Hasil pembuatan <i>Cell Free Supernatant</i> (CFS).....	53
5.3	Hasil Identifikasi bakteri	54
5.4	Hasil Uji Deteksi Pembentukan Biofilm	56
5.5	Hasil Uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM).....	56
5.6	Hasil Uji Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM).....	58
5.7	Hasil Uji Penghambatan Biofilm atau <i>MBIC (Minimum Biofilm Inhibitory Concentration)</i>	58
5.8	Hasil Uji Analisis Data.....	59
BAB VI PEMBAHASAN.....		68
6.1	Uji Identifikasi <i>Aspergillus niger</i>	68
6.2	Uji Identifikasi <i>Escherichia coli</i>	69
6.3	Uji Deteksi Pembentukan Biofilm <i>Escherichia coli</i>	70

6.4	Uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) <i>Aspergillus niger</i> terhadap <i>Escherichia coli</i>	71
6.5	Uji Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) <i>Aspergillus niger</i> terhadap <i>Escherichia coli</i>	73
6.6	Uji Penghambatan Biofilm <i>Escherichia coli</i> (MBIC).....	74
6.7	Hasil Penelitian Terdahulu	76
6.8	Kajian Integrasi Islam mengenai Aktivitas Antibakteri dan Antibiofilm <i>Aspergillus niger</i> terhadap <i>Escherichia coli</i>	77
BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN		79
7.1	Kesimpulan.....	79
7.2	Saran	79
DAFTAR PUSTAKA		80
LAMPIRAN.....		85

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 Agen-agen penyebab ISK.....	10
Gambar 2. 2 Patogenesis Infeksi Saluran Kemih.....	11
Gambar 2. 3 <i>Escherichia coli</i>	13
Gambar 2. 4 Faktor virulensi <i>Escherichia coli</i>	17
Gambar 2. 5 Patogenesis UPEC.....	13
Gambar 2. 6 Struktur pembentuk dari biofilm	19
Gambar 2. 7 Tahapan pembentukan biofilm oleh bakteri.....	20
Gambar 2. 8 Resistensi antibiotik pada biofilm	22
Gambar 2. 9 Koloni <i>Aspergillus niger</i>	25
Gambar 2. 10 <i>Aspergillus niger</i> & <i>Aspergillus tubingensis</i>	26
Gambar 2. 11 Kerangka Teori.....	31
Gambar 3. 1 Kerangka Konsep Penelitian	32
Gambar 4. 1 Denah Penelitian	49
Gambar 4. 2 Alur Penelitian.....	50
Gambar 5. 1 Spora <i>Aspergillus niger</i>	52
Gambar 5. 2 Hasil uji identifikasi secara mikroskopis	53
Gambar 5. 3 Hasil CFS	53
Gambar 5. 4 Koloni <i>Escherichia coli</i> pada media MCA	54
Gambar 5. 5 Hasil pewarnaan gram.....	55
Gambar 5. 6 Hasil Uji Biokimia bakteri <i>Escherichia coli</i>	55
Gambar 5. 7 Hasil uji KHM.....	57
Gambar 5. 8 Hasil uji KBM	58
Gambar 5. 9 Hasil uji antibiofilm	59

DAFTAR TABEL

Tabel 5. 1 Hasil uji Biokimia bakteri <i>Escherichia coli</i>	55
Tabel 5. 2 Hasil uji pembentukan biofilm bakteri <i>Escherichia coli</i>	56
Tabel 5. 3 Hasil uji KHM.....	57
Tabel 5. 4 Hasil uji MBIC bakteri <i>Escherichia coli</i>	58

DAFTAR SINGKATAN

ADEC	: <i>Difusi Adheren Escherichia coli</i>
ANOVA	: <i>Analysis of Variance</i>
CAUTIs	: <i>Catheter-associated urinary tract infections</i>
CDH	: <i>Cellobiose dehydrogenase</i>
CNF 1	: <i>Cytotoxic Necrotizing Factors 1</i>
EAEC	: <i>Enteroadgregatif Escherichia coli</i>
EHEC	: <i>Enterohemoragik Escherichia coli</i>
EIEC	: <i>Enteroinvasif Escherichia coli</i>
EPEC	: <i>Enteropatogenik Escherichia coli</i>
EPS	: Eksopolisakarida
ETEC	: <i>Enterotoksigenik Escherichia coli</i>
ExPEC	: <i>Extracellular Pathogenic Escherichia coli</i>
H ₂ S	: Hidrogen Sulfida
HlyA	: <i>α-haemolysin</i>
IBC	: <i>Intracellular Bacteri Community</i>
ISK	: Infeksi Saluran Kemih
ISPA	: Infeksi Saluran Pernapasan Atas
KBM	: Konsentrasi Bunuh Minimum
KHM	: Konsentrasi Hambat Minimum
LAF	: <i>Laminar Air Flow</i>
LPS	: Lipopolisakarida
MBIC	: <i>Minimum Biofilm Inhibitory Concentration</i>
MCA	: <i>Mac Conkey Agar</i>

MIC	: <i>Minimum Inhibitory Concentration</i>
NB	: <i>Natrium Broth</i>
NMEC	: <i>Neonatal Meningitis Escherichia coli</i>
OD	: <i>Optical Density</i>
OMP	: <i>Outer Membran Protein</i>
OMP	: <i>Outer Membran Protein</i>
ONPG	: <i>o-nitro-phenyl-β-D-galactopyranoside</i>
PBS	: <i>Phospate Buffer Saline</i>
PDA	: <i>Potato Dextrose Agar</i>
PDB	: <i>Potato Dextrose Broth</i>
TDA	: <i>Tryptopan Deaminase</i>
TSA	: <i>Trypticase Soy Agar</i>
TSB	: <i>Trypticase Soy Brooth</i>
UPEC	: <i>Urophatogenic Escherichia coli</i>
V-P	: <i>Voges-Proskarer</i>
WHO	: <i>Wolrd Health Organization</i>

ABSTRAK

UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI KADAR HAMBAT MINIMUM, KADAR BUNUH MINIMUM, ANTIBIOFILM (PENGHAMBATAN PERTUMBUHAN BIOFILM) *Aspergillus niger* TERHADAP *UroPathogenic Escherichia coli*

Infeksi Saluran Kemih (ISK) merupakan salah satu penyakit infeksi tersering di dunia yang disebabkan oleh bakteri *Escherichia coli*. Pengobatan penyakit ini dengan menggunakan antibiotik, namun bakteri *Escherichia coli* saat ini sudah mulai resisten dengan berbagai antibiotik, sehingga diperlukan adanya inovasi baru bahan yang dapat digunakan sebagai antibiotik terhadap *Escherichia coli*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan *Aspergillus niger* pada konsentrasi tertentu sebagai antibakteri dan antibiofilm terhadap *Escherichia coli* dengan melakukan uji Kadar Hambat Minimum (KHM), uji Kadar Bunuh Minimum (KBM), dan uji *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC) yang dilakukan pada *well-microplate*. Pada uji KHM dan uji MBIC dilakukan pembacaan nilai *optical density* menggunakan *microplate reader* dan didapatkan hasil nilai terendah pada konsentrasi 25% sebesar 0.388 dan 0.587. Sedangkan pada uji KBM diamati pada dasar *microplate* dan ditemukan adanya endapan pada dasar *microplate*. Sehingga dari hasil penelitian dapat disimpulkan nilai KHM dan MBIC berada pada konsentrasi 25% berturut-turut adalah 46% dan 56%, sedangkan pada uji KBM didapatkan hasil *Aspergillus niger* tidak mampu membunuh bakteri *Escherichia coli*.

Kata Kunci: *Escherichia coli*, *Aspergillus niger*, KHM, KBM, MBIC

ABSTRACT

ANTIBACTERIAL ACTIVITY TEST MINIMUM INSTRUCTION, MINIMUM KILLER LEVELS, ANTIBIOFILM (BIOFILM GROWTH INHIBITION) *Aspergillus niger* AGAINST *UroPathogenic Escherichia coli*

Urinary Tract Infection (UTI) is one of the most common infectious diseases in the world caused by Escherichia coli bacteria. The treatment of this disease is by using antibiotics, but the Escherichia coli bacteria are now starting to become resistant to various antibiotics, so that new material innovations are needed that can be used as antibiotics against Escherichia coli. This study aims to determine the ability of Aspergillus niger at certain concentrations as an antibacterial and antibiofilm against Escherichia coli by performing the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) test, Minimum Killing Concentration (MBC) test, and Minimum Biofilm Inhibitory Concentration (MBIC) test which was carried out on wells. microplate. In the MIC test and MBIC test, the optical density value was read using a microplate reader and the lowest values were obtained at a concentration of 25% of 0.388 and 0.587. Meanwhile, the KBM test was observed on the bottom of the microplate and found deposits on the bottom of the microplate. So from the results of the study it can be concluded that the MIC and MBIC values are at a concentration of 25%, 46% and 56%, respectively, while the MBC test shows that Aspergillus niger is unable to kill Escherichia coli bacteria.

Keywords: *Escherichia coli, Aspergillus niger, MIC, MBC, MBIC*

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Infeksi Saluran Kemih (ISK) adalah salah satu jenis penyakit yang paling sering dijumpai. WHO (*World Health Organization*) menyatakan bahwa ISK ini merupakan penyakit infeksi tersering di dunia setelah infeksi saluran pernapasan atas (ISPA) dengan angka insiden pertahun sebanyak 8,3 juta kasus pada wanita dan 4,2 juta pada laki-laki (Darsono *et al.*, 2016). Dari data yang dilaporkan dapat disimpulkan bahwa insiden ISK lebih banyak terjadi pada wanita dibandingkan laki-laki (Darsono *et al.*, 2016). Menurut *American Urology Association* pada tahun 2016, diperkirakan sebesar 150 juta penduduk dunia mengalami ISK per tahun. Di Amerika Serikat sendiri di setiap tahunnya mencapai 7 juta kasus. Hampir 15 % antibiotik yang diresepkan di Amerika dan masyarakat Eropa adalah untuk orang yang mengidap ISK (F Lina *et al.*, 2019).

Departemen Kesehatan Republik Indonesia (2014) menyatakan bahwa ada 90 sampai 100 per 100.000 masyarakat Indonesia menderita Infeksi Saluran Kemih (ISK) setiap tahunnya, dengan kasus baru pertahun sekitar 180.000 (Darsono *et al.*, 2016). Di Jawa Timur pada tahun 2017, angka kejadian ISK masih cukup tinggi yaitu sekitar 6.730 pasien wanita dan 4511 merupakan pasien laki-laki. Angka insiden penyakit ini di Kabupaten Malang mencapai 2.150 di tahun 2017. Menurut data pada Rumah Sakit Dr. Soepraoen Malang, kejadian ISK menjadi penyakit dengan

insiden paling tinggi dengan 55% kasusnya adalah wanita dan 45% kasusnya adalah laki-laki (Ana *et al.*, 2020).

Infeksi saluran kencing sendiri terjadi karena berkembangnya mikroorganisme pada organ-organ yang berperan dalam perkemihan. Organ yang terlibat diantaranya adalah ginjal sebagai organ penghasil urin, ureter dan uretra sebagai saluran pengeluaran urin, dan vesika urinaria sebagai tempat pengumpulnya. Penyebab penyakit ini umumnya adalah bakteri yang memang telah ada sebagai flora normal pada saluran cerna, genitalia maupun kulit perineum. Bukan hanya bakteri yang mampu menyebabkan ISK, tetapi juga jamur dan virus. Akan tetapi insiden tertinggi tetap karena infeksi bakteri. Bakteri yang paling sering menyebabkan ISK adalah jenis anaerob seperti *Escherichia coli* (Yashir & Apriani, 2019).

Dalam proses menginfeksi *Escherichia coli* memiliki faktor virulensi yang terletak pada komponen struktural permukaan, seperti lipopolisakarida (LPS), kapsul polisakarida, flagella, vesikel membran luar, pili, curli, *adhesins non-pilus*, *Outer Membran Protein* (OMP), serta toksin yang disekresikan sistem sekresi, *TonBreseptor*, *iron-uptake receptor*, juga *siderofor receptor*, dan juga mampu membentuk biofilm (Terlizzi *et al.*, 2017). Biofilm adalah suatu agregat pada suatu bakteri, jamur, alga, ataupun protozoa yang menutupi suatu mikroorganisme dan tersusun dari matriks ekstraseluler (Slobodníková *et al.*, 2016). Ada beberapa faktor yang mempengaruhi pembentukan biofilm, seperti kurang mendukungnya kondisi lingkungan dan *quorum sensing*. *Esherichia coli* dalam keadaan ekstrim mampu membentuk pertahanan diri berupa biofilm yang banyak.

Hal itu terjadi apabila bakteri ini kekurangan nutrisi, pH yang netral (7-7,5), dan temperatur antara 20°C-40°C (Marlina *et al.*, 2018). Terbentuknya biofilm diawali dengan adhesin dari substrat dengan permukaan bakteri. Selanjutnya akan terjadi perlekatan yang diperantarai antara protein bakteri maupun protein sel. Perlekatan yang terjadi selanjutnya akan bersifat irreversible dan kemudian akan terjadi pematangan dari biofilm yang melapisi bakteri (Rabin *et al.*, 2015). Bakteri-bakteri yang mampu membentuk biofilm ini cenderung lebih mampu menginfeksi, karena fungsi dari biofilm ini adalah untuk melindunginya dari berbagai macam keadaan dari eksternal (Abida, 2020).

Bakteri yang mampu membentuk biofilm ini lebih resisten terhadap antibiotik, hingga mencapai 10.000 kali lipat dari bakteri yang tidak mampu membentuk biofilm. Hal ini terjadi karena biofilm yang melapisi bakteri mampu menahan antibiotik yang mencoba masuk (Rabin *et al.*, 2015). Selain itu, penggunaan obat-obatan antibiotik juga seringkali menyebabkan resistensi. Beberapa antibiotik yang resisten terhadap bakteri khususnya *Escherichia coli* adalah penisilin, amoksisilin, dan tetrasiklin (Normaliska *et al.*, 2019). Sehingga perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai alternatif lain yang dapat digunakan sebagai antibiotik, khususnya yang disebabkan oleh *Escherichia coli*.

Di Al Qur'an telah disebutkan bahwa segala sesuatu yang diciptakan di bumi ini bukanlah tanpa alasan.

Dalam surah Ar-Rad ayat 4 yang berbunyi;

وَفِي الْأَرْضِ قِطْعٌ مُتَجَاوِرَاتٌ وَجَنَّاتٌ مِنْ أَعْنَابٍ وَزُرْعٌ وَنَخِيلٌ صُنُونٌ وَغَيْرُ صُنُونٍ يُسْقَى بِمَاءٍ
وَاحِدٍ وَنُفُضِلُ بَعْضُهُ عَلَى بَعْضٍ فِي الْأُكُلِ ۗ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَاتٍ لِقَوْمٍ يَعْقِلُونَ

Yang artinya: *“Dan di bumi ini terdapat bagian-bagian yang berdampingan, dan kebun-kebun anggur, tanaman-tanaman dan pohon korma yang bercabang dan yang tidak bercabang, disirami dengan air yang sama. Kami melebihkan sebahagian tanam-tanaman itu atas sebahagian yang lain tentang rasanya. Sesungguhnya pada yang demikian itu terdapat tanda-tanda (kebesaran Allah) bagi kaum yang berfikir.”* (QS. Ar-Rad: 4)

Dalam surah Al-Isra ayat 82

وَنُنَزِّلُ مِنَ الْقُرْآنِ مَا هُوَ شِفَاءٌ وَرَحْمَةٌ لِّلْمُؤْمِنِينَ ۗ وَلَا يَزِيدُ الظَّالِمِينَ إِلَّا خَسَارًا

Yang artinya: *“Dan Kami turunkan dari Al-Qur'an (sesuatu) yang menjadi penawar dan rahmat bagi orang yang beriman, sedangkan bagi orang yang zhalim (Al-Qur'an itu) hanya akan menambah kerugian.”* (QS. Al-Isra ayat 82)

Di dalam Al Qur'an sering menyebutkan tumbuh-tumbuhan sebagai salah satu bukti kebesaran Allah Subhanahu wa ta'ala. Bukan hanya disebutkan, tetapi juga dijelaskan bahwa tumbuh-tumbuhan tersebut memiliki maanfaat bagi manusia, diantaranya sebagai penawar atau *sifa'* (obat). Pemanfaatan dari tumbuh-tumbuhan tersebut bergantung juga pada manusia. Mereka yang mau belajar dan memiliki pengetahuan dapat menjadikan kandungan-kandungan dalam berbagai tumbuhan menjadi obat bagi berbagai jenis penyakit (Apriadi, 2015).

Penggunaan jamur sebagai bahan obat utamanya antibakteri sudah tidak asing lagi didengar, bahkan kontribusinyapun cukup besar. Contohnya

adalah antibiotik yang pertama dihasilkan yaitu penisilin dibuat dari jamur *Penicilium*. Selain itu, jenis jamur *Aspergillus* pun telah menghasilkan antibiotik yaitu Fumigatin dan Aspergilin (A.Salmanu, 2017). Pada penelitian ini akan digunakan bahan alami yang diduga memiliki aktivitas sebagai antibakteri dan antibiofilm yaitu dari golongan *Aspergillus* karena diketahui bahwa *Escherichia coli* telah resisten terhadap penisilin. Jamur yang digunakan adalah *Aspergillus niger* yang merupakan golongan fungi dari filum *Ascomycetes* yang mampu menghasilkan enzim dan dapat merusak senyawa pada bakteri (Mozer, 2015). Beberapa enzim yang dihasilkan diantaranya adalah amilase dan protease, dimana masing-masing enzim ini mampu memecah protein dan karbohidrat yang juga terdapat pada permukaan bakteri. Selain itu, enzim protease juga dapat menghambat pembentukan biofilm yang didapatkan dengan menyaring supernatan pada *Aspergillus niger* (Patil A, 2014).

1.2 Rumusan Masalah

1.2.1 Rumusan Masalah Umum

Bagaimana aktivitas antibakteri dan antibiofilm *Aspergillus niger* terhadap pertumbuhan dan biofilm *Escherichia coli*?

1.2.2 Rumusan Masalah Khusus

- a. Berapa Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) *Aspergillus niger* terhadap *Escherichia coli*?
- b. Berapa Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) *Aspergillus niger* terhadap *Escherichia coli*?

- c. Berapakah konsentrasi minimum antibiofilm *Aspergillus niger* untuk penghambatan pertumbuhan atau *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC) biofilm *Escherichia coli*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk mengetahui aktivitas antibakteri dan antibiofilm *Aspergillus niger* terhadap pertumbuhan dan biofilm *Escherichia coli*

1.3.2 Tujuan Khusus

- a) Untuk mengetahui Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) *Aspergillus niger* terhadap *Escherichia coli*.
- b) Untuk mengetahui Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) *Aspergillus niger* terhadap *Escherichia coli*.
- c) Untuk mengetahui konsentrasi minimum antibiofilm *Aspergillus niger* untuk penghambatan pertumbuhan atau *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC) *Escherichia coli*.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Bagi Masyarakat

Adanya penelitian ini diharapkan agar masyarakat dapat meningkatkan pengetahuannya mengenai bahan alami sebagai alternatif obat dan terbukti efektifitasnya secara ilmiah.

1.4.2 Bagi Tenaga Kesehatan

Adanya penelitian ini diharapkan dapat meningkatkan pengetahuan akan variasi penggunaan obat alami sebagai obat alternatif antibiofilm dan

antibakteri, bukan hanya obat kimia, untuk mengatasi kasus-kasus terutama yang disebabkan infeksi bakteri.

1.4.3 Bagi Peneliti

Adanya penelitian ini diharapkan dapat menambah wawasan mengenai kandungan dan manfaat dari bahan alami yaitu *Aspergillus niger* terhadap aktifitas anti bakteri dan antibiofilm yang terbukti dengan data data yang valid secara ilmiah, sehingga dapat dipertanggungjawabkan penggunaannya di lingkungan masyarakat.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Infeksi Saluran Kemih (ISK)

2.1.1 Definisi

Infeksi Saluran Kemih (ISK) disebabkan oleh infeksi dari mikroba yaitu adanya bakteri pada saluran kemih. Beberapa bakteri memang menjadi flora normal pada saluran kemih, namun pada jumlah tertentu yaitu ditemukan $>10^5$ CFU/ml dalam spesimen urin baru dapat dikatakan terkena ISK dan akan menimbulkan gejala (Irawan & Mulyana, 2018). ISK sendiri mencakup sistitis (infeksi vesika urinaria), pielonefritis (infeksi ginjal), dan bakterimia (bakteri dalam darah) (Bien *et al.*, 2012).

2.1.2 Epidemiologi

Menurut data yang didapatkan dari *National Kidney and Urologic Diseases Information Clearinghouse* (NKUDIC) menyatakan bahwa ada sekitar 8,3 juta orang yang mengalami ISK tanpa memandang usia di setiap tahunnya (Sari, 2018). Pada tahun 2011 CDC menyatakan bahwa ISK adalah penyakit infeksi yang sering kali disebabkan oleh bakteri dengan kasus sebanyak 8,6 juta (Ana *et al.*, 2020).

Menurut Depkes RI pada tahun 2016, telah dilaporkan terjadi 90-100 kasus per 100.000 penduduk mengalami kejadian ISK. Dengan jumlah penderita sebanyak 180.000 per penduduk. Sedangkan kejadian tertinggi sering terjadi pada wanita. Didapatkan data sekitar 50% pada wanita dewasa pernah mengalami ISK (Abida, 2020).

2.1.3 Faktor Resiko

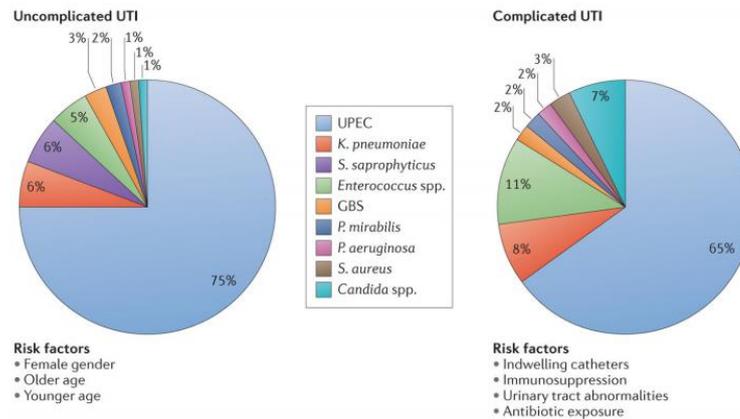
Dari identifikasi yang telah dilakukan oleh Letica pada tahun 2019, didapatkan kejadian ISK atau CAUTIs (*Catheter-associated urinary tract infections*) sering kali terjadi pada perempuan, anak-anak, dan orang dengan penyakit neurologi (Letica-Kriegel *et al.*, 2019). Infeksi Saluran Kemih juga dapat berhubungan dengan higienitas yang buruk, kebiasaan menahan kencing, dan kebiasaan kurang minum air (Sari, 2018).

Selain beberapa hal yang disebutkan diatas, gizi yang kurang baik, kegagalan pengosongan urin, refluks pada saluran urinaria, genitourinaria yang tidak normal dan laki-laki yang belum disirkumsisi juga menjadi faktor resiko terjadinya ISK (Triasta *et al.*, 2016). Selain itu, seseorang yang dirawat di rumah sakit dan mengalami imunodefisiensi juga memiliki resiko cukup tinggi mengalami ISK (Abida, 2020).

2.1.4 Etiologi

Menurut beberapa penelitian penyebab tersering ISK adalah bakteri gram negatif. Diantaranya *Escherichia coli*, *Staphylococcus*, *Proteus sp*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Klebsiella* (Gilang *et al.*, 2014). ISK merupakan infeksi nosokomial tersering menurut WHO, dengan prosentase terbesar disebabkan oleh penggunaan kateter, yaitu 80%. Dari beberapa penelitian yang dilakukan terhadap pasien dengan ISK ditemukan penyebab terbanyak adalah *Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa* dengan prosentase yang sama yaitu 26,7%. Namun pada penelitian lain, kecenderungan *Escherichia coli* memiliki prosentase yang lebih tinggi,

yaitu berkisar 26%, sedangkan *Pseudomonas sp* hanya 12% (Gilang *et al.*, 2014).

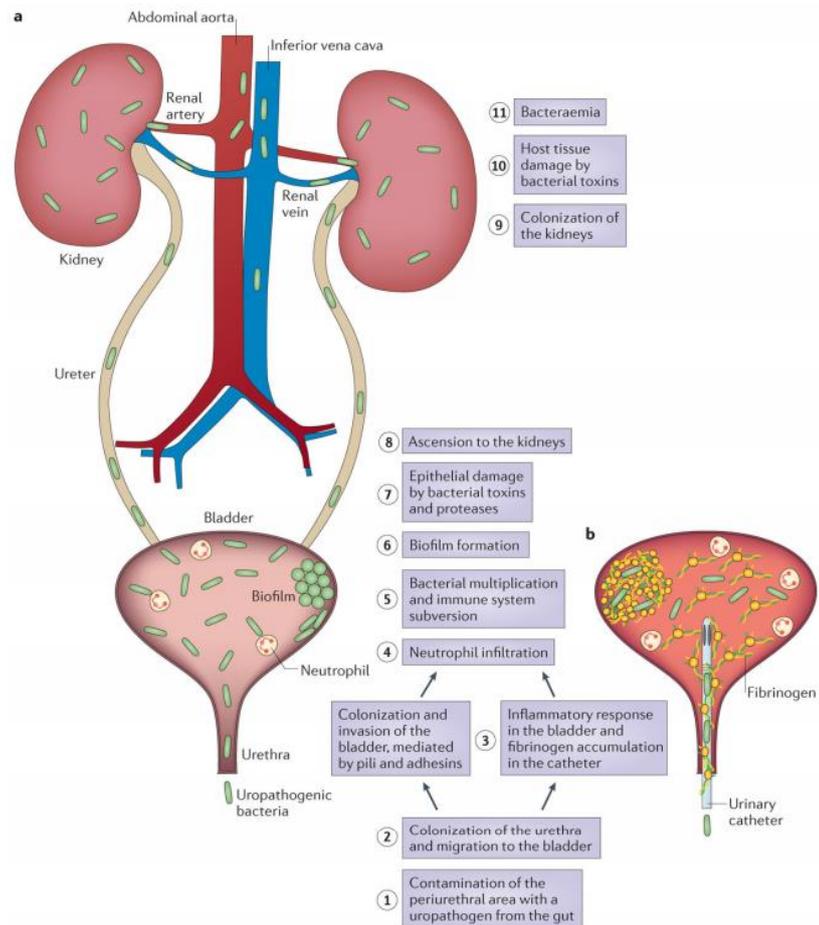


Gambar 2. 1 Agen-agen penyebab ISK (Ana L. Flores-Mireles *et al.*, 2000)

Agen penyebab paling umum untuk ISK adalah *UroPatogenic Escherichia coli* (UPEC) (Ana L. Flores-Mireles *et al.*, 2000). Bakteri *E.coli* dengan tipe antigen O sering kali menyebabkan timbulnya keluhan ISK seperti poliuria, hematuria, disuria, dan pyuria (Frahesti, 2013). Sehingga dapat disimpulkan bahwa penyebab terbesar dari ISK adalah bakteri gram negatif *Escherichia coli*.

2.1.5 Patogenesis

Patogenesis dari ISK terbanyak adalah karena infeksi asenden. Penyebab terseringnya adalah bakteri gram negatif yaitu *Escherichia coli*, namun juga bisa disebabkan karena infeksi nosokomial meskipun jarang terjadi (Triasta *et al.*, 2016).



Gambar 2. 2 Patogenesis Infeksi Saluran Kemih (Ana L. Flores-Mireles *et al.*, 2000)

Patogenesis ISK dimulai dengan masuknya bakteri ke peri uretra, dan mampu menyebar secara menyeluruh dalam uretra. Selanjutnya bakteri ini akan bermigrasi ke kandung kemih. Di dalam kandung kemih akan terbentuk kolonisasi akibat ekspresi dari pili dan adhesin yang terjadi. Tubuh akan mendeteksi adanya patogen sehingga terjadilah respon inflamasi, salah satunya infiltrasi neutrofil. Sebagian dari bakteri akan berhasil dihancurkan, namun beberapa bakteri mampu menghindari sistem kekebalan dari inang dengan melakukan perubahan morfologi dan pembentukan biofilm (Ana L. Flores-Mireles *et al.*, 2000).

Bakteri selanjutnya akan mulai mengeluarkan toksinnya untuk menghancurkan sel inang. Begitu berhasil menginvasi di kandung kemih, patogen ini akan menuju ke ginjal dan melakukan kolonisasi disana. Sama seperti sebelumnya, toksin akan dikeluarkan untuk menghancurkan sel-sel di ginjal. Apabila kondisi ini terus berlangsung tanpa pengobatan yang adekuat, bakteri akan mampu melewati epitel tubular dan akan menyebabkan bakterimia (Ana L. Flores-Mireles *et al.*, 2000). Pada kasus tertentu bahkan dapat menyebabkan hidronefrosis apabila terjadi obstruksi pada saluran urinaria. Obstruksi ini akan membuat aliran urin terhambat (stasis urin) yang menjadi resiko terkena ISK (Triasta *et al.*, 2016).

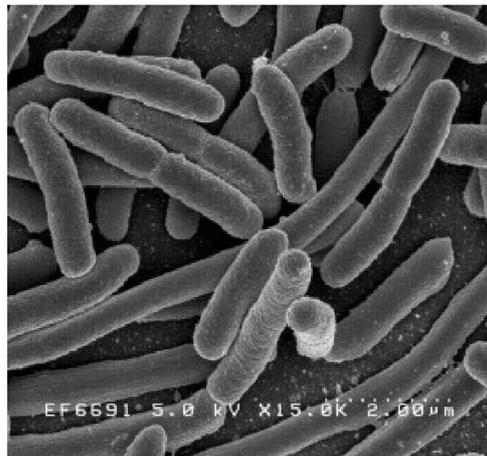
2.1.6 Manifestasi Klinis

Asosiasi Urologi Eropa membagi ISK menjadi tiga, sistitis, pielonefritis, dan urosepsis. Dari tingkat keparahannya, urosepsis merupakan yang paling parah, disusul pielonefritis dan selanjutnya sistitis (Smelov *et al.*, 2016). Gejala yang sering muncul pada ISK bawah (sistitis) adalah dysuria, frekuensi berkemih yang tinggi, urgensi, nyeri suprapubic dan hematuria. Karena ISK sering terjadi pada wanita, seringkali pasien juga mengeluhkan adanya keputihan dan rasa tidak nyaman. Pada ISK atas (pielonefritis) gejala yang muncul biasanya merupakan gejala sistemik, diantaranya adalah demam (suhu $>38^{\circ}\text{C}$) hingga menggigil, dan mengalami delirium. Nyeri pada sudut kostovertebra, dan terkadang disertai mual muntah (Geerlings, 2016). Sedangkan untuk urosepsis, bakteri sudah menyebar ke area lain selain saluran kemih. Gejala yang muncul merupakan gejala sistemik seperti penurunan denyut nadi, peningkatan pernafasan,

bahkan bisa mengalami disfungsi organ, hipoperfusi ataupun hipotensi. Dalam kondisi yang buruk, pasien juga bisa jatuh dalam kondisi syok (Smelov *et al.*, 2016).

2.2 *Escherichia coli*

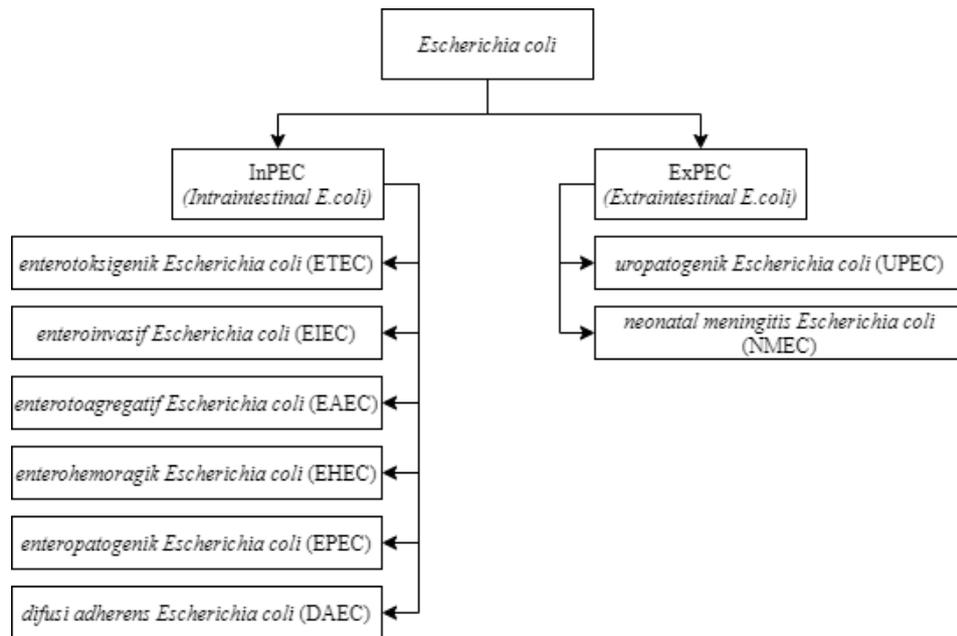
2.2.1 Taksonomi



Gambar 2.3 *Escherichia coli* (Sutiknowati, 2016)

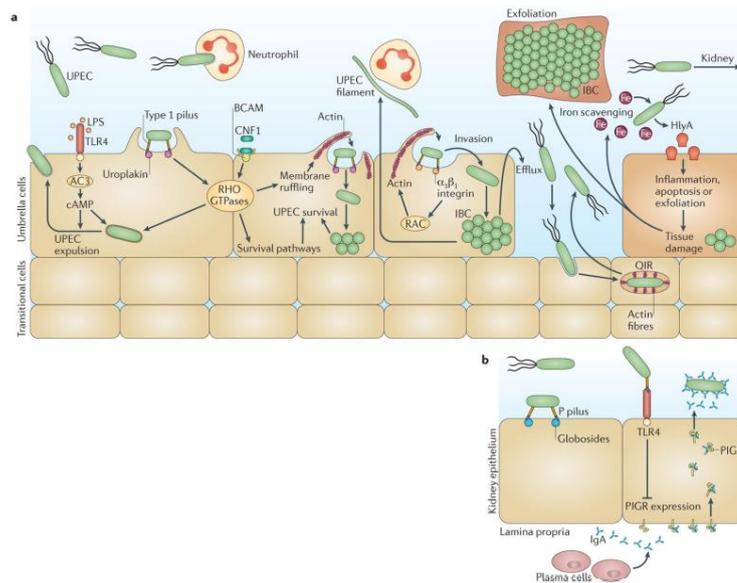
- Domain : *Bacteria*
- Kingdom : *Eubacteria*
- Phylum : *Proteobacteria*
- Class : *Gammaproteobacteria*
- Order : *Enterobacteriales*
- Family : *Enterobacteriaceae*
- Genus : *Escherichia*
- Species : *Escherichia coli*

2.2.2 Klasifikasi



Escherichia coli diklasifikasikan menjadi enam jenis berdasarkan sifat patogenesisnya dan efek yang ditimbulkan pada inang yaitu, *enterotoksigenik Escherichia coli* (ETEC), *enteroinvasif Escherichia coli* (EIEC), *enteroagregatif Escherichia coli* (EAEC), *enterohemoragik Escherichia coli* (EHEC), *enteropatogenik Escherichia coli* (EPEC), dan *difusi adherens Escherichia coli* (DAEC). (W. P. Rahayu *et al.*, 2018)

Selain enam jenis diatas, ada juga jenis *Escherichia coli* yang menginfeksi diluar dari saluran pencernaan yaitu *uropatogenic Escherichia coli* (UPEC) dan *neonatal meningitis Escherichia coli* (NMEC). UPEC dan NMEC ini termasuk jenis extracellular pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) (W. P. Rahayu *et al.*, 2018).



Gambar 2. 4 Patogenesis UPEC (Ana L. Flores-Mireles *et al.*, 2000)

Pada kandung kemih, UPEC melakukan adhesi pada epitel menggunakan pili tipe 1. Selain itu *FimH* akan mengikat uroplakin yang mampu menginduksi pengaturan ulang aktin melalui mekanisme aktivasi GTP-ase sehingga mempermudah invasi bakteri. Di dalam sel inang UPEC akan berusaha menolak mekanisme pertahanan tubuh serta menolak pengobatan antibiotik. Cara yang dilakukan adalah dengan membentuk *Intracellular Bacteri Community* (IBC). Pematangan IBC selanjutnya akan diikuti dengan penyebaran bakteri ke sel inang yang lain. Selain itu pertahanan bakteri ini juga dipengaruhi oleh pengeluaran toksin yang dilakukan, seperti pengeluaran *HlyA* yang menyebabkan lisis sel inang, serta memfasilitasi pelepasan zat besi. Zat besi ini juga merupakan sumber nutrisi dari bakteri. *HlyA* juga berperan dalam pengelupasan epitel sehingga mempermudah invasi dari UPEC ini. Sitotoksik lain yang dimiliki oleh UPEC ini adalah *Cytotoxic Necrotizing Factors* (CNF1). Pengeluaran CNF1 akan menghambat proses apoptosis sel inang (utamanya apoptosis sel

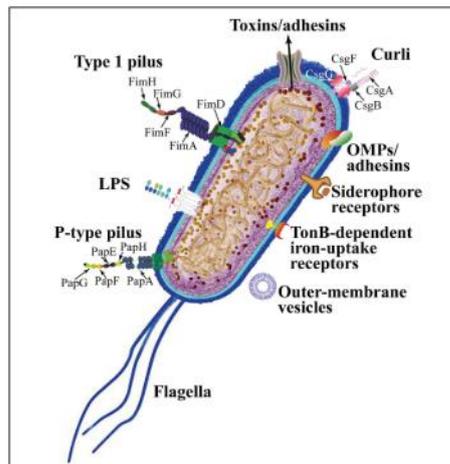
yang telah terinfeksi bakteri), sehingga memungkinkan penambahan jumlah bakteri. Selain pada kandung kemih mekanisme serupa juga bisa terjadi secara lebih luas salah satunya adalah di organ ginjal (Ana L. Flores-Mireles *et al.*, 2000).

2.2.3 Morfologi

Bakteri *Escherichia coli* adalah bakteri gram negatif yang tergolong bakteri koliform. Memiliki flagela peritrikus serta fimbria sehingga dia bersifat motil. Pada suhu 44°C *Escherichia coli* dapat memfermentasikan laktosa dan menghasilkan gas dan juga asam dengan media *Mac Conkey* menghasilkan warna koloni merah muda (Prasiddhanti & Wahyuni, 2015).

Antigen yang terdapat pada serotipe *Escherichia coli* diantaranya adalah somatik (O), flagelar (H), *proteinaceous fimbriae* (F) dan juga kapsular (K). Rantai karbohidrat menentukan spesifikasi dari antigen. Untuk antigen somatik (O) sendiri terletak pada dinding sel bagian permukaan dan terbentuk dari lipopolisakarida. Selain itu polisakarida juga merupakan bahan pembentuk dari antigen kapsular (K). Antigen flagelar sendiri juga merupakan suatu protein. *Escherichia coli* juga mampu melakukan suatu perlekatan, fungsi dari perlekatan (adhesin) dilakukan oleh antigen *proteinaceous fimbriae* (F) (Prasiddhanti & Wahyuni, 2015).

2.2.4 Faktor virulensi



Gambar 2. 2 Faktor virulensi *Escherichia coli* (Terlizzi et al., 2017)

UroPathogenic Escherichia coli (UPEC) merupakan bakteri utama penyebab ISK. UPEC mampu menginfeksi saluran kemih dengan beberapa faktor virulensi yang dimilikinya, diantaranya komponen struktural permukaan, seperti lipopolisakarida (LPS), kapsul polisakarida, flagella, vesikel membran luar, pili, curli, *adhesins non-pilus*, *Outer Membran Protein* (OMP), serta toksin yang disekresikan, sistem sekresi, dan *Ton Breceptor*, *iron-uptake receptor* dan juga *siderofor receptor* (Terlizzi et al., 2017). Toksin yang dikeluarkan oleh bakteri ini adalah CNF 1 (*cytotoxic necrotizing factor 1*), yang akan mempengaruhi pembentukan aktin dalam sel inang. UPEC juga mengeluarkan *HlyA* (α -*haemolysin*) dalam konsentrasi tinggi yang mampu memicu pengelupasan dan pengeksposan lapisan uroepitel yang lebih dalam, sehingga akan meningkatkan kolonisasi dan penyebaran bakteri (Ana L. Flores-Mireles et al., 2000).

Struktur Lipopolisakarida (LPS) yang dimiliki UPEC sangat berperan dalam siklus hidupnya. LPS akan menyebabkan resistensi dari antibiotik hidrofobik, mengkolonisasi bakteri secara cepat, dan membentuk

reservoir. Adanya *curli* pada permukaan bakteri mampu menghasilkan zat amyloid yang dapat memfasilitasi terbentuknya biofilm pada UPEC. *Curli* sendiri merupakan salah satu jenis dari fimbriae yang tersusun dari protein *crulin*. Sementara adanya pili mampu meningkatkan perlekatan bakteri ini pada mukosa saluran kemih (Terlizzi *et al.*, 2017).

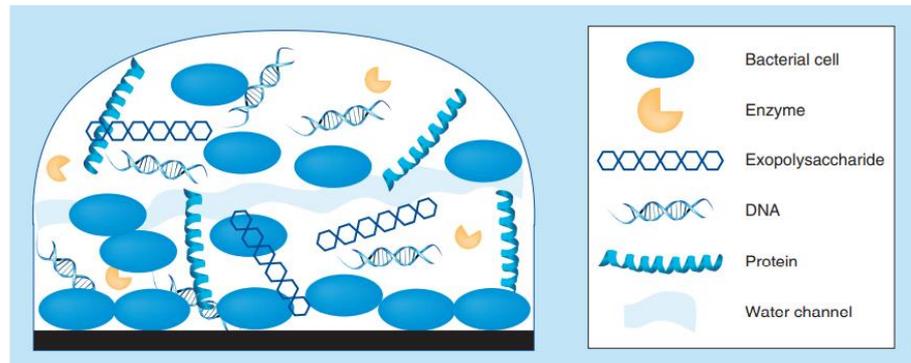
2.2.5 Biofilm

Biofilm merupakan kumpulan mikroorganisme (koloni) yang membentuk struktur tertentu pada matriks zat polimer ekstraseluler yang mereka hasilkan. Biofilm ini mengandung sel mikroba yang melekat satu sama lain pada permukaan statis pada makhluk hidup ataupun benda mati (Jamal *et al.*, 2018). Bakteri *Escherichia coli* mampu membentuk biofilm sebagai perlindungan diri dan meningkatkan virulensinya. Biofilm sendiri dapat terbentuk pada permukaan suatu mikroorganisme seperti jamur, bakteri, alga ataupun protozoa dan juga dapat terbentuk pada alat-alat medis seperti kateter. Bakteri yang mampu membentuk biofilm ini akan lebih resisten terhadap antibiotik. Oleh karena itu biofilm menjadi masalah yang cukup serius pada bidang kesehatan (Abida, 2020).

Bakteri patogen sering kali ditemukan dalam air. Saat air yang mengandung bakteri ini bersentuhan dengan permukaan benda mati ataupun hidup dia akan mampu berkolonisasi dan membentuk biofilm. Selanjutnya bakteri akan bermultiplikasi dan kembali dilepaskan dengan jumlah yang lebih besar (Ishaq & Ali, 2018). Ketebalan dari biofilm *Escherichia coli* mencapai ratusan mikron, hal ini menimbulkan sulitnya antibiotik untuk menembus eksopolimer dan mencapai bakteri. Mekanisme penghambatan

masuknya antibiotik ini akan menurunkan kecepatan antibiotik menuju target bahkan dapat memperlemah efek kerjanya sehingga menimbulkan resistensi dengan tingkatan berbeda-beda pada jenis antibiotik yang berbeda pula (Jamal M *et al.*, 2015).

2.2.5.1 Struktur Biofilm



Gambar 2. 3 Struktur pembentuk dari biofilm diantaranya adalah ektrapolisakarida, protein dan molekul DNA. (Rabin *et al.*, 2015)

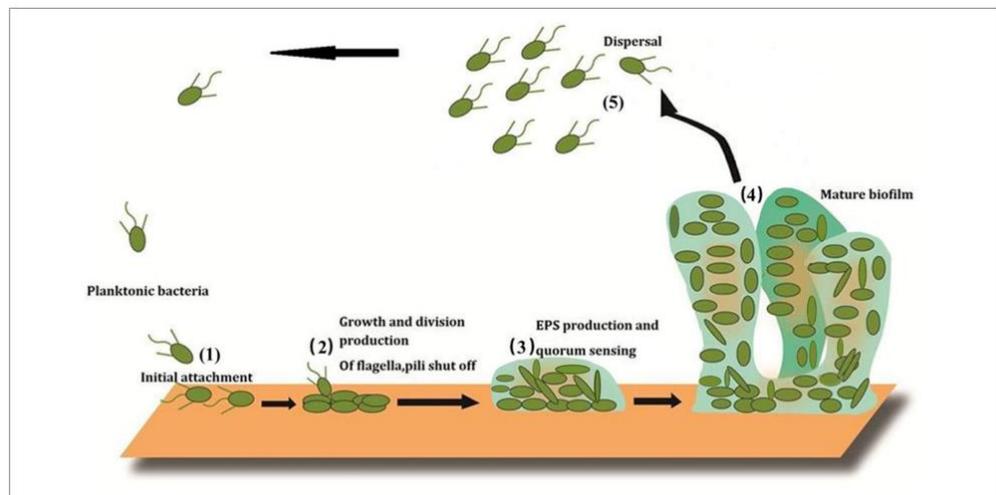
Sebanyak 5-35% dari volume biofilm tersusun dari mikroorganisme sedangkan sisanya merupakan matriks ekstraseluler yang terdiri dari protein. Komponen-komponen yang terkandung dalam substansi ekstraseluler adalah protein (>2%), polisakarida (1-2%), DNA (<1%), RNA (<1%), ion, dan air dalam jumlah yang paling besar (97%) (Jamal *et al.*, 2018).

2.2.5.2 Pembentukan Biofilm

Proses pembentukan biofilm sangatlah kompleks dan tahapan dalam pembentukan biofilm pun masih merupakan hipotesis (Sadekuzzaman *et al.*, 2015) Dibutuhkan suatu sinyal khusus antar sel yang disebut quorum sensing dan juga transkripsi dari gen-gen yang ada. Secara umum, proses pembentukan biofilm ini dibagi dalam beberapa langkah, diantaranya

kontak awal/keterikatan ke permukaan, pembentukan mikrokoloni, pematangan dan pembentukan arsitektur biofilm, dan pelepasan/dispersi dari biofilm. (Jamal *et al.*, 2018). Tahapan-tahapan pembentukan biofilm tersebut juga didukung dengan pernyataan serupa dalam jurnal Sadekuzzaman yang menyebutkan bahwa pembentukan biofilm dimulai dengan perlekatan awal, perlekatan yang dibantu flagella dan pili, produksi EPS (Eksopolisakarida), *quorum sensing*, pematangan biofilm, dan penyebaran bakteri (Sadekuzzaman *et al.*, 2015).

Secara singkat, pembentukan biofilm dapat diilustrasikan seperti gambar berikut:



Gambar 2. 4 Tahapan pembentukan biofilm oleh bakteri (Sadekuzzaman *et al.*, 2015)

a. Kontak awal/keterkaitan ke permukaan

Tahap awal dari pembentukan biofilm adalah dengan perlekatan atau adhesi. *Fimbriae*, *pili* dan *flagella* berperan penting dalam interaksi antara bakteri dan permukaan perlekatan. Selain itu hidrofobisitas permukaan akan memperkuat perlekatan mikroba,

karena mengurangi gaya tolak antara bakteri dan permukaan (Jamal *et al.*, 2018).

b. Pembentukan mikrokoloni

Setelah penempelan stabil, maka selanjutnya akan terjadi pensinyalan kimiawi di dalam EPS. Akibatnya akan terjadi proses multiplikasi dari sel mikroba yang menyebabkan jumlah selnya meningkat pesat hingga terbentuklah mikro koloni (Jamal *et al.*, 2018).

c. Pematangan dan arsitektur

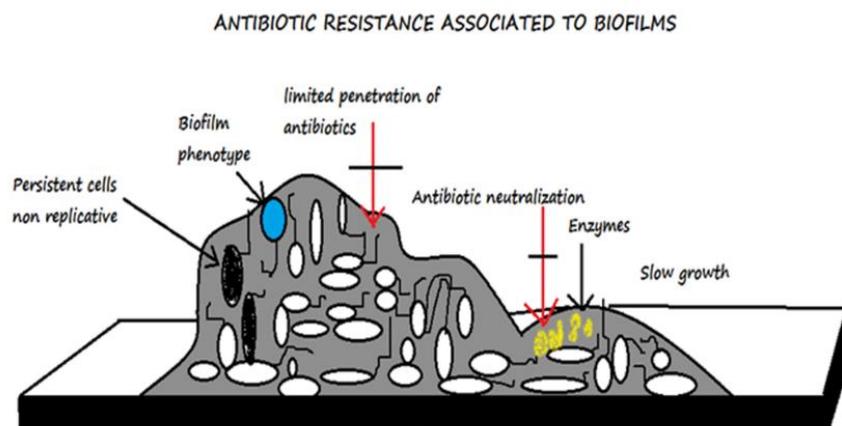
Komunikasi antar sel merupakan bagian yang sangat penting. Apabila telah terjadi penambahan mikroba dalam jumlah tertentu yang mencukupi, maka akan terjadi induksi sinyal secara otomatis (*quorum sensing*). Hal selanjutnya yang akan terjadi adalah pembentukan tiga dimensi biofilm, dimana disini EPS sebagai bagian utamanya. Akan terbentuk rongga intersisial dan matriks yang kemudian akan diisi dengan air. Air inilah yang akan berfungsi layaknya darah, yang akan mendistribusikan nutrisi dan membuang zat sisa dari komunitas mikro organisme di biofilm tersebut (Jamal *et al.*, 2018).

d) Dispersi

Tahap berikutnya adalah perubahan dari komunitas dalam biofilm ini menjadi motil. Lalu dihasilkannya enzim sakarolitik yang berfungsi untuk memisahkan perlekatan yang terbentuk sebelumnya agar komunitas ini mampu menyebar dan melakukan kolonisasi berikutnya (Jamal *et al.*, 2018).

2.2.5.3 Resistensi biofilm terhadap antibiotik

Bakteri yang mampu membentuk biofilm 10.000 kali lebih resisten terhadap antibiotik maupun molekul reaktif yang dihasilkan sistem kekebalan tubuh manusia dari pada bakteri yang tidak mampu membentuk biofilm (Rabin *et al.*, 2015). Resistensi antibiotik dan biosida biofilm diklasifikasikan menjadi empat kelas yang meliputi inaktivasi molekul antibiotik secara langsung, mengubah struktur maupun bentuk agar sistem kekebalan tubuh tidak mampu mengenali bakteri sebagai patogen, menurunkan konsentrasi antibiotik, dan adanya system pembuangan (Jamal M *et al.*, 2015).



Gambar 2. 5 Resistensi antibiotik pada biofilm (Sharma *et al.*, 2019)

Penyebab utama resistensi antibiotik karena sifat multiselular dari biofilm itu sendiri. Sifat multiselular ini yang menyebabkan antibiotik menjadi kurang efektif dan tidak mampu membunuh bakteri patogen karena beberapa mekanisme yang terjadi (Sharma *et al.*, 2019), yaitu :

a. Terbatasnya penetrasi antibiotik

Disini EPS memegang peran yang penting dengan cara menjebak beberapa antibiotik, yang mengakibatkan kegagalan penetrasi antibiotik menembus biofilm (Rabin *et al.*, 2015).

b. Transfer gen horizontal

Suatu bakteri mendapat resistensi terhadap antibiotik juga berasal dari mutasi acak dari gennya. Hasil mutasi gen ini akan menghasilkan gen-gen yang resisten terhadap antibiotik, yang kemudian akan ditransfer atau disebarkan. Di dalam biofilm, frekuensi transfer ini akan meningkat karena terjadi konjugasi/mobilisasi yang lebih tinggi dibanding bakteri tanpa biofilm (Rabin *et al.*, 2015).

c. Sel persister

Di dalam biofilm terdapat populasi sel persister, sel yang memiliki tingkat pertumbuhan sangat rendah atau lambat. Dengan fakta tersebut, maka banyak antibiotik yang bekerja dengan menargetkan pertumbuhan maupun pembelahan sel tidak akan efektif melawan sel persister ini. Adanya sel ini juga yang diduga dapat menjadi aktif di masa depan dan akan menjadi infeksius (Rabin *et al.*, 2015).

d. Pompa efluks

Dengan adanya pompa ini, dapat memungkinkan sel bakteri untuk memompa segala hal yg dianggapnya sebagai racun termasuk antibiotik yang ada di intrasel menuju keluar (Rabin *et al.*, 2015).

e. Netralisasi oleh enzim

Adanya enzim penetral yang mampu mendegradasi dan menginaktivasi antibiotik juga menjadi salah satu penyebab resistensi terjadi. Enzim ini merupakan protein yang terakumulasi di glikokaliks dari permukaan biofilm dan bekerja dengan mekanisme hidrolisis (Jamal M *et al.*, 2015).

f. Tingkat pertumbuhan bakteri yang lambat

Adanya biofilm ini menyebabkan adanya perbedaan gradien nutrisi yang membedakan antara bagian di permukaan biofilm dengan di dalam biofilm. Pada bagian permukaan akan menghasilkan sel yang aktif secara metabolik, sedangkan di dalam biofilm sel menjadi tidak aktif/mengalami pertumbuhan yang lambat. Hal ini menyebabkan sel bakteri dalam biofilm akan lambat pertumbuhannya. Sehingga beberapa antibiotik seperti penisilin dan ampicilin tidak akan bekerja pada bakteri ini sebab antibiotik tersebut bekerja pada saat bakteri sedang aktif tumbuh (Jamal M *et al.*, 2015).

Pada tahun 2019 telah dilakukan penelitian mengenai resistensi *Escherichia coli* terhadap beberapa antibiotik. Dari hasil yang didapatkan terdapat resistensi pada antibiotik dari yang prosentase tertinggi hingga terendah yaitu, tetrasiklin, sulfamonomethaxazol, trimethoprim, ampicilin, asam nalidiksat, ciprofloxacin, enrofloxacin, gentamisin, dan chloramphenicol, dengan prosentase tertinggi adalah tetrasiklin 97,3% dan chloramphenicol dengan prosentase terendah sebesar 10,8% (Peternakan *et al.*, 2019). Pada penelitian lain di tahun

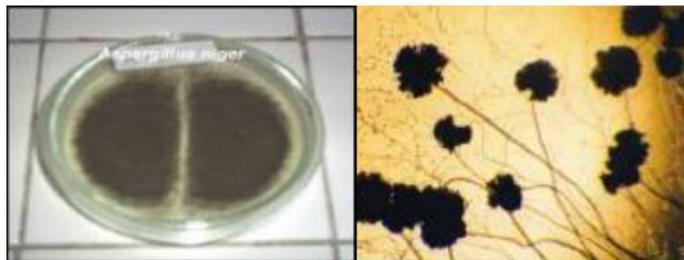
yang sama didapatkan resistensi antibiotik penisilin dan amoksisilin yang memiliki prosentase mencapai 100%, streptomisin sebesar 70%, trimetoprim-sulfametoksazol sebesar 60%, dan tetrasiklin sebesar 30%. Resistensi antibiotik yang terjadi diduga dapat mempengaruhi bakteri lain juga dengan cara menyebarkan gen resisten terhadap suatu antibiotik (Normaliska *et al.*, 2019).

2.3 *Aspergillus niger*

2.3.1 Taksonomi

Kingdom	: Fungi
Divisi	: <i>Eumycetes</i>
Kelas	: <i>Deuteromycetes</i>
Ordo	: <i>Moniliales</i>
Famili	: <i>Moniliaceae</i>
Genus	: <i>Aspergillus</i>
Spesies	: <i>Aspergillus niger</i> (Irma, 2015)

2.3.1 Morfologi

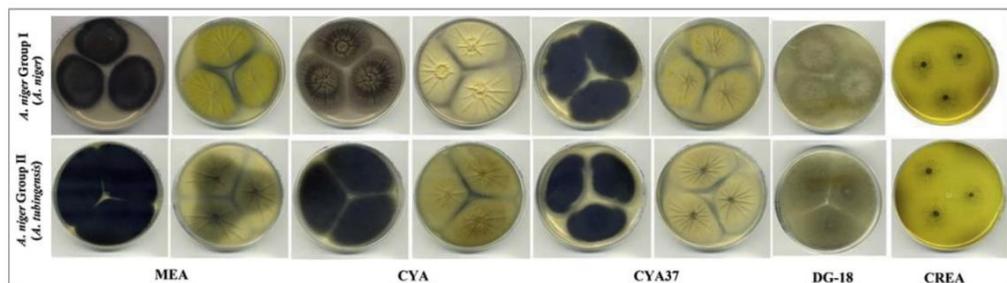


Gambar 2. 6 Koloni *Aspergillus niger*. (Irma, 2015)

Aspergillus niger merupakan jenis jamur yang hidup pada suhu 37°C atau lebih. Jamur ini biasanya tidak berwarna, memiliki hifa bersepta, terdapat hifa vegetatif pada bagian permukaannya, dan memiliki miselium yang bercabang. *Aspergillus niger* juga memiliki konidiofor yang bersepta

dan akan membentuk stigmata pada bagian ujungnya. Kebanyakan stigmata tidak berwarna, terdapat rantai kehijauan, coklat atau hitam yang merupakan konidianya (Irma, 2015). Dari penelitian yang bertujuan untuk mengidentifikasi *Aspergillus niger*, ciri khas dari spesies ini adalah memiliki konidia dengan warna yang khas yaitu, coklat tua hingga hitam, dengan konidiofornya *uniseriate* atau *biseriate*, hifa berpigmen hialin, dan juga memiliki vesikula yang cenderung bulat (Silva *et al.*, 2011).

Aspergillus niger cenderung berwarna putih kekuningan saat berusia muda, dan semakin lama akan berubah warna menjadi coklat gelap atau bahkan hitam. Perubahan warna ini terjadi karena mulai terbentuknya konidiofor yang memiliki dinding halus, hialin, dan juga berwarna



Gambar 2. 7 *Aspergillus niger* & *Aspergillus tubingensis*
(Zulkifli & Zakaria, 2017)

kecoklatan. bentuk kepala konidiofornya bulat sampai semi bulat dan berwarna coklat atau hitam dengan ornamen (Irma, 2015). Morfologi dari *Aspergillus niger* ini berbeda dari spesies *Aspergillus* yang lain, seperti *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus oryzae*, dan *Aspergillus clavatus*. Namun memiliki kemiripan dengan *Aspergillus tubingensis*, dan dapat dibedakan melalui identifikasi secara molekuler (Zulkifli & Zakaria, 2017).

Penampakan dari kedua jamur ini sangat mirip bahkan hampir tidak dapat dibedakan antara *A.niger* dengan *A.tubingensis*. Namun pada *A.tubingensis* ditemukan adanya sklerotika (Zulkifli & Zakaria, 2017).

2.3.2 Kandungan *Aspergillus niger*

Dalam beberapa penelitian telah teridentifikasi enzim yang terkandung adalah *Aspergillus niger*. Enzim-enzim ini diantaranya adalah amilase yang dapat digunakan sebagai bahan pembuatan sirup, produksi glukosa bersama dengan enzim glukoamilase, membantu dalam pencernaan, fermentasi alkohol dan juga berguna dalam industri tekstil. Ada juga enzim protease yang berperan dalam industri makanan, enzim glukosa oksidase yang berperan dalam industri telur kering karena mampu melenyapkan oksigen dan kandungan glukosa dari makanan, serta enzim naringinase yang berperan dalam industri sari buah terutama jeruk karena mampu menghilangkan rasa getir dan pahit (Irma, 2015). Selain itu *Aspergillus niger* juga menghasilkan enzim selulase yang mampu mengkatalisis proses hidrolisis selulosa menjadi glukosa. Enzim CDH (*Cellobiose dehydrogenase*) juga berhasil ditemukan. Pada isolat *Aspergillus niger* terbukti mempunyai daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri (Rasouli *et al.*, 2020).

2.3.3 *Aspergillus niger* sebagai Antibiotik dan Antibiofilm

Beberapa kandungan yang terdapat dalam *Aspergillus niger* diduga mampu digunakan untuk melawan bakteri utamanya bakteri penyebab ISK, *Escherichia coli*.

a. *Cellobiose Dehydrogenase Enzyme* (CDH)

Cellobiose dehydrogenase (CDH) adalah enzim ekstraseluler yang diproduksi oleh berbagai jamur *Aspergillus niger* yang mampu mengoksidasi selodekstrin terlarut, manodekstrin dan laktosa secara efisien. Dari penelitian yang telah dilakukan didapatkan hasil bahwa kompleks CDH ini diketahui menunjukkan aktivitas antimikroba dengan menghancurkan matriks biofilm melalui glikosida yang terkait dengan pembelahan ExPs yang ada pada biofilm. CDH ini bekerja dengan cara mendestabilisasi biofilm maupun menghambat pembentukan biofilm. Sehingga biofilm tidak akan mampu menghalangi agen antimikroba untuk menembus masuk (Rasouli *et al.*, 2020).

b. Enzim glukosa oksidase

Enzim glukosa oksidase digunakan untuk menghasilkan H₂O₂ sebagai agen antimikroba yang dikenal dalam industri makanan. Sehingga adanya kandungan zat ini juga diduga mampu menghambat pertumbuhan berbagai bakteri penyebab ISK. Selain itu, H₂O₂ juga merupakan zat pengoksidasi yang melekat kuat yang digunakan dalam konsentrasi rendah sebagai antiseptik (Rasouli *et al.*, 2020).

c. Enzim selulase

Dari penelitian yang dilakukan, enzim selulase yang disintesis biasanya memiliki kandungan AgNO₃ 0,5 mM sehingga dapat menghasilkan nonpartikel perak dengan ukuran yang kecil yaitu 30 nm hingga 60 nm. Karena ukurannya yang kecil, memudahkan partikel ini

untuk menyebar merata ke dalam membrane selulosa bakteri sehingga akan terjadi hidrolisis selulosa bakteri. Hal ini dapat menyebabkan penghambatan bakteri sehingga dapat berperan sebagai antibakteri. Enzim selulase pada bakteri *E.coli* dan *S.aureus* memiliki aktivitas antibakteri dengan menghambat pertumbuhannya sebesar 26,69% dan 22.92% (Ecular *et al.*, 2010).

d. Enzim protease

Salah satu yang berperan sangat penting dalam metabolisme dan patogenisitas sel bakteri adalah protease. Struktur dari enzim protease sendiri sangat beragam. Karena fungsinya sebagai pemecah protein dan berpengaruh juga dalam peptidoglikan bakteri, menyebabkan enzim ini mulai banyak diteliti untuk digunakan sebagai antibakteri. Struktur aktif dalam protease diduga mampu menghambat enzim yang berada dalam bakteri sehingga dapat menurunkan toksisitasnya terhadap sel inang (Culp & Wright, 2017).

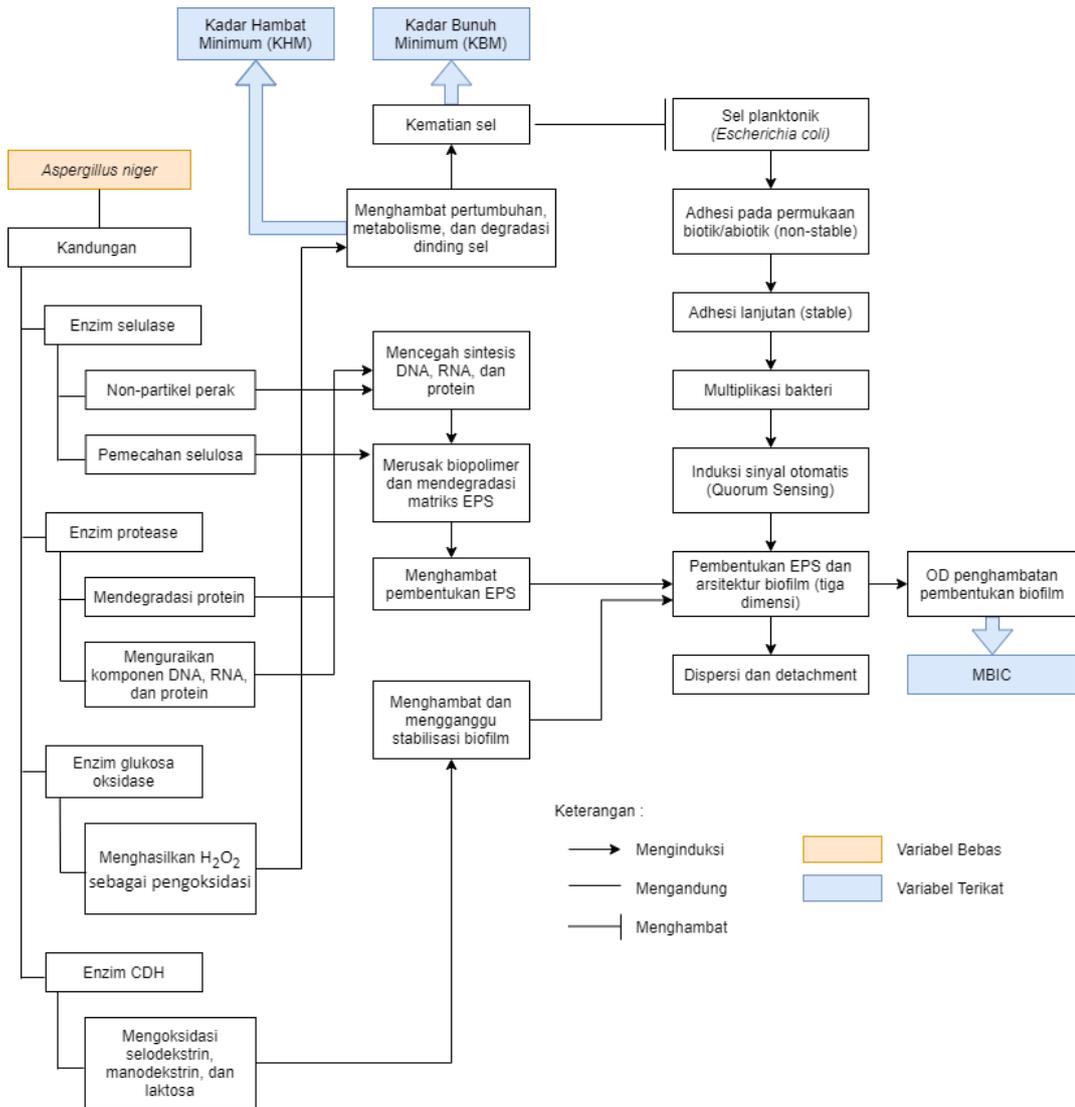
2.4 Penelitian Serupa tentang Antibiotik dan Antibiofilm dari Jamur

Estela dan Abraham pada tahun 2016 melakukan penelitian mengenai bahan alami yaitu jamur sebagai antibiotik dan antibiofilm bakteri patogen. Penelitian ini menggunakan ekstrak dari jamur *Aspergillus* lalu di ujikan pada *C.albicans* dan *S.aureus*. Dari hasil yang didapat, aspergillus menghasilkan senyawa *echinocandins* (*caspofungin*, *micafungin*, dan *anidulafungin*) yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri dan pembentukan biofilm (Estrela & Abraham, 2016). Hal tersebut juga membuktikan bahwa fitokimia mampu mengatasi masalah resistensi

antibiotik pada biofilm yang menjadi masalah serius terutama di bidang kesehatan (Mishra *et al.*, 2020).

Pada tahun 2020 dilakukan penelitian mengenai aktivitas *Aspergillus niger* sebagai antibakteri dan antibiofilm pada *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Penelitian ini menguji kandungan enzim *Cellobiose Dehydrogenase* (CDH) dalam *Aspergillus niger* dan aktivitasnya terhadap penghambatan pertumbuhan dan penghancuran bakteri. Dari penelitian yang dilakukan didapatkan hasil bahwa enzim CDH dalam *Aspergillus niger* terbukti dapat digunakan sebagai antibakteri dan antibiofilm pada isolat *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa* (Rasouli *et al.*, 2020). Selain enzim CDH, ditemukan juga adanya enzim koktail di dalam *Aspergillus niger*. Enzim ini mampu menghambat pembentukan biofilm dengan cara menghancurkan pembentukan arsitektur dari biofilm (Kaur *et al.*, 2020).

2.5 KerangkaTeori

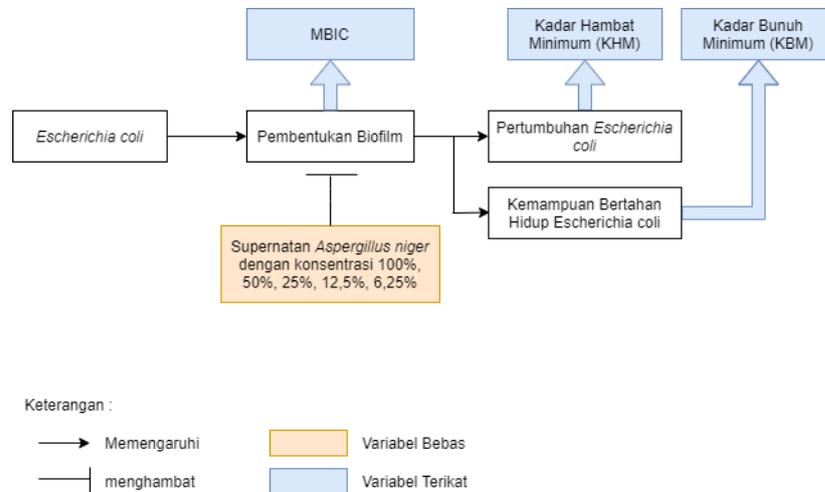


Gambar 2. 8 Kerangka Teori

BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3. 1 Kerangka Konsep Penelitian

Aspergillus niger memiliki berbagai kandungan diantaranya enzim selulase, enzim protease, enzim glukosa oksidase, dan enzim CDH (*Cellobiose dehydrogenase*). Beberapa enzim tersebut diduga berperan dalam proses penghambatan pertumbuhan dan juga penghambatan pembentukan biofilm bakteri gram negative *Escherichia coli*. Oleh karena itu, *Aspergillus niger* memiliki kemungkinan untuk digunakan sebagai antibakteri dan antibiofilm.

3.2 Hipotesis Penelitian

H₀:

- *Aspergillus niger* tidak memiliki aktivitas sebagai antibakteri terhadap *Escherichia coli*.
- *Aspergillus niger* tidak memiliki aktivitas sebagai antibiofilm terhadap *Escherichia coli*.

H₁:

- *Aspergillus niger* memiliki aktivitas sebagai antibakteri terhadap *Escherichia coli*.
- *Aspergillus niger* memiliki aktivitas sebagai antibiofilm terhadap *Escherichia coli*.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Pada penelitian ini menggunakan desain eksperimental murni (*true experimental design*) dan *posttest only control group design*. Dalam pengujian antibakteri digunakan metode dengan dilusi tabung, sedangkan pengujian antibiofilm menggunakan metode *microtiter plate biofilm assay*. Nilai *Optical Density* (OD) yang dihasilkan dari metode ini diukur dengan *microplate reader*.

4.1.1 Jumlah Pengulangan

Banyaknya pengulangan sampel pada penelitian ini dihitung menggunakan Rumus *Federer*:

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

Keterangan:

t = Kelompok perlakuan

n = Jumlah pengulangan pada setiap kelompok perlakuan

Penelitian ini menggunakan 9 kelompok perlakuan, yang terdiri dari 5 kelompok uji (konsentrasi supernatan *Aspergillus niger* 100%, 50%, 25%, 12,5%, dan 6,25%), dan 4 kelompok kontrol yaitu, kelompok kontrol positif, kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol media, dan kelompok kontrol supernatan *Aspergillus niger*. Sehingga perhitungan untuk banyaknya pengulangan adalah sebagai berikut:

$$\begin{array}{rcl}
(t-1) (n-1) & \geq & 15 \\
(9-1) (n-1) & \geq & 15 \\
8(n-1) & \geq & 15 \\
8n-8 & \geq & 15 \\
8n & \geq & 23 \\
n & \geq & 2,875
\end{array}$$

Dari hasil perhitungan, didapatkan jumlah pengulangan sebesar $n \geq 2,875$, sehingga pengulangan pada penelitian ini dilakukan sebanyak 3 kali untuk masing-masing kelompok.

4.1.2 Variabel Penelitian

4.1.2.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah besarnya konsentrasi inokulum *Aspergillus niger*, yaitu supernatan *Aspergillus niger* dengan konsentrasi sebesar 100%, 50%, 25%, 12,5%, dan 6,25%.

4.1.2.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah Konsentrasi Hambat Minimum (KHM), Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM), dan konsentrasi minimal *Aspergillus niger* sebagai antibiofilm *Escherichia coli* melalui mekanisme penghambatan biofilm atau *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC).

4.1.3 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

4.1.3.1 Kriteria Inklusi

- a. Supernatan *Aspergillus niger* yang dibuat dari inokulum *Aspergillus niger* dengan masa inkubasi 4 hari pada suhu 28°C di *inkubator shaker*.

b. *Escherichia coli*

1. Isolasi *Escherichia coli* yang berasal dari pasien ISK
2. *Escherichia coli* yang berusia 24 jam
3. Koloni *Escherichia coli* yang mampu membentuk biofilm dan dibuktikan dengan metode *microtiter plate biofilm assay* pada uji pertumbuhan biofilm.

4.1.3.2 Kriteria Eksklusi

a. Supernatan *Aspergillus niger* yang tidak dibuat dari inokulum *Aspergillus niger* dengan masa inkubasi 4 hari pada suhu 28°C di *inkubator shaker*.

b. *Escherichia coli*

1. Isolasi *Escherichia coli* yang tidak berasal dari pasien ISK
2. *Escherichia coli* yang tidak berusia 24 jam.
3. Koloni *Escherichia coli* yang tidak mampu membentuk biofilm dan dibuktikan dengan metode *microtiter plate biofilm assay* pada uji pertumbuhan biofilm.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

- Tempat : Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.

- Waktu : Juni sampai November 2021.

4.3 Populasi Penelitian

Penelitian ini menggunakan populasi biakan bakteri *Escherichia coli* pembentuk biofilm.

4.4 Sampel Penelitian

Sampel pada penelitian ini adalah bakteri *Escherichia coli* pembentuk biofilm, dari isolat murni pasien ISK pada Laboratorium Mikrobiologi Universitas Brawijaya Malang.

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu: *Microplate flat bottom 96 wells*, *autoklaf*, *Laminar Air Flow (LAF)*, timbangan analitik, *Microplate reader*, gelas ukur, oven, kuvet, ose, Bunsen, spektrofotometer, tabung reaksi, bunsen, cawan petri, gelas ukur, ose, pipet tetes, timer, *Erlenmeyer*, mikropipet, tabung falcon, kain lap, tabung Eppendorf, filter paper 0,22 µm, kertas whatmann no.42, blue disposal tip, aluminium foil, yellow disposal tip, baskom kecil, rak tabung, *ice pack*, *catton swab*.

4.5.2 Bahan Penelitian

a. Bahan Uji

Aspergillus niger yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Brawijaya Malang.

b. Bakteri Uji

Bakteri *Escherichia coli* pembentuk biofilm, dari isolat murni pasien ISK pada Laboratorium Mikrobiologi Universitas Brawijaya Malang.

c. Bahan Lainnya

Media *Potato Dextrose Broth (PDB)*, *Trypticase Soy Agar (TSA)*, *Trypticase Soy Brooth (TSB)*, glukosa, aquades, kristal violet 0,1%,

antibiotik ciprofloxacin, asam asetat 30%, alcohol 96%, dan *Phospate Buffer Saline (PBS)*.

4.6 Definisi Operasional

a. *Escherichia coli*

Escherichia coli merupakan bakteri gram negatif yang mampu membentuk biofilm, dan didapatkan dari hasil isolasi bakteri pada pasien ISK. Isolat yang digunakan diambil dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Brawijaya Malang.

b. Biofilm *Escherichia coli*

Biofilm *Escherichia coli* merupakan kumpulan mikroorganisme (koloni) *Escherichia coli* yang membentuk struktur tertentu pada matriks zat polimer ekstraseluler yang mereka hasilkan (Jamal *et al.*, 2018).

c. Inokulum *Aspergillus niger*

Inokulum *Aspergillus niger* adalah koloni jamur *Aspergillus niger* yang dibiakan pada media PDB (*potato dextrose broth*).

d. Metode dilusi

Metode dilusi sering disebut juga metode pengenceran yang sering digunakan untuk mengetahui KHM dan KBM suatu antibiotik. Dalam pengujiannya menggunakan berbagai konsentrasi dan pembacaan hasilnya berdasarkan kekeruhan yang terjadi pada masing-masing konsentrasi tersebut (Maulana & Ibrahim, 2020).

e. Metode *microtiter plate biofilm assay*

Metode ini digunakan untuk pengukuran jumlah biofilm dengan cara menginterpretasikannya dari kepekatan warna pada masing masing *microtiter plate* (Maghfirah *et al.*, 2017).

f. Kelompok Uji

Kelompok yang mendapatkan perlakuan dengan pemberian supernatan *Aspergillus niger* dengan berbagai konsentrasi yaitu, 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%.

g. Kelompok kontrol

Kelompok kontrol adalah kelompok yang tidak mendapatkan perlakuan berupa pemberian berbagai konsentrasi supernatan *Aspergillus niger*. Pada penelitian ini ada tiga kelompok kontrol yaitu kontrol positif yaitu antibiotik, kontrol negatif yaitu *Escherichia coli*, kontrol media yaitu LB, kontrol supernatan *Aspergillus niger* dengan konsentrasi 100%.

h. Uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)

Uji KHM dilakukan untuk mengetahui kadar minimal supernatan *Aspergillus niger* sebagai penghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.

i. Uji Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM)

Uji KBM dilakukan untuk mengetahui kadar minimal supernatan *Aspergillus niger* dalam membunuh bakteri *Escherichia coli*.

j. Uji pertumbuhan biofilm

Uji ini dilakukan untuk mengetahui tingkat kemampuan *Escherichia coli* sebagai pembentuk biofilm.

k. *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC)

MBIC merupakan konsentrasi terendah supernatant *Aspergillus niger* dalam menghambat pembentukan biofilm *Escherichia coli*.

l. *Optical Density* (OD)

OD merupakan ukuran kuantitatif yang menunjukkan kepadatan dari biofilm *Escherichia coli* setelah mendapat perlakuan berupa pemberian supernatant *Aspergillus niger*.

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Pembuatan Inokulum *Aspergillus Niger*

Tujuan dari pembuatan inokulum *Aspergillus niger* adalah untuk memfermentasikan dan mengekstraksi senyawa metabolit yang ada pada jamur tersebut. Media yang digunakan adalah *Potato Dextrose Broth* (PDB) yang disterilkan di autoklaf. Bahan lain yang digunakan adalah glukosa 2% dan koloni jamur *Aspergillus niger*. Perbandingan dari *Aspergillus niger* yang telah di isolasi dengan media adalah 1 : 9.

Langkah pertama yang dilakukan adalah mencampurkan 100 ml PDB yang telah disterilisasi dengan glukosa 2% dalam tabung Erlenmeyer 250 ml. Selanjutnya mengambil koloni jamur *Aspergillus niger* menggunakan ose untuk dicampurkan pada media PDB yang telah ditambahkan glukosa. Tahap berikutnya adalah menginkubasi larutan tadi pada suhu ruang 28°C selama 4-7 hari (Prateeksha *et al.*, 2020).

4.7.2 Pembuatan Supernatant *Aspergillus niger*

Tujuan dari pembuatan supernatant *Aspergillus niger* ini adalah untuk memisahkan kandungan senyawa dan enzim yang terdapat

didalamnya. Pemisahan ini dapat terjadi dengan cara melakukan sentrifugasi (Suryono, 2016).

Langkah awal yang dilakukan adalah menyaring miselium *Aspergillus niger* yang telah diinokulasi dengan menggunakan kertas whatman no.42 steril, hasil saringan ditampung dalam gelas beaker steril yang telah diberi *ice pack* pada bagian luarnya untuk menjaga agar tetap dingin. Selanjutnya, pindahkan pada tabung *eppendorf* dan masukan dalam freezer selama 10-15 menit, namun jangan sampai membeku. Berikutnya lakukan sentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit. Setelah itu, saring dengan filter paper steril 0,22 μm dan ditampung pada gelas beaker yang telah diberi *ice pack* pada bagian luarnya. Supernatan siap untuk digunakan (Prateeksha *et al.*, 2020).

4.7.3 Penyiapan Bakteri

4.7.3.1 Pembuatan Media Pertumbuhan

Pada penelitian ini menggunakan media *Trypticase Soy Broth* (TSB) dengan penambahan glukosa 5% (Bq. Mutmainnah, Supnawadi, 2018). Penambahan glukosa bertujuan agar pembentukan biofilm bakteri dapat meningkat (Handa Gustiawan, 2019). Cara pembuatannya dengan mensterilkan 200 ml media TSB menggunakan autoklaf dengan suhu sebesar 121°C dalam waktu 15 menit. Setelah itu tambahkan 2 gr glukosa 5% (Harris, 2015).

4.7.3.2 Penyiapan Suspensi Bakteri

Suspensi bakteri *Escherichia coli* dibuat dengan satu ose kultur *Escherichia coli* yang diremajakan dan diinokulasi media 3 ml TSB +

glukosa 1%. Homogenkan lalu inkubasi anaerob dalam waktu 18 jam pada suhu 37°C. Kemudian tambahkan suspensi bakteri dengan media TSB 2 ml lalu dihomogenkan. Selanjutnya inkubasi secara anaerob selama 18 jam pada suhu 37°C. Hitung kepadatan bakteri (OD) dengan spektrofotometer yang memiliki panjang gelombang 595 nm hingga diperoleh OD 0,5 (Yuliana, 2015).

4.7.4 Penyiapan Kelompok Kontrol

Antibiotik yang digunakan sebagai kelompok kontrol positif adalah ciproflaksasin. Ciproflaksasin digunakan karena memiliki spektrum yang luas sebagai antibiotik utamanya pada kasus ISK (Brown, 2006). Berdasarkan penelitian yang dilakukan sebelumnya, *MIC (Minimum Inhibitory Concentration)* ciproflaksasin pada *Escherichia coli* memiliki rentang sebesar 0,015-128 µg/ml (Dong *et al.*, 2019). Sedangkan pada penelitian ini digunakan konsentrasi MIC 128 µg/ml sebagai kontrol positif. Untuk kontrol negatif digunakan bakteri *Escherichia coli* dan untuk kontrol media digunakan TSB + glukosa 5%. Penggunaan media ini didasarkan pada penelitian (Yuliana, 2015) yang merekomendasikan penggunaan campuran TSB dengan glukosa 5% . TSB memiliki kandungan pepton kedelai dan kasein yang sangat membantu pertumbuhan bakteri (Resources *et al.*, 2018). Sedangkan penambahan glukosa bukan hanya dapat memenuhi nutrisi bagi pertumbuhan bakteri, tetapi juga membantu pembentukan biofilm bakteri (Aviantina, 2019).

4.7.5 Uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)

Metode pengujian KHM adalah dengan dilusi tabung. Digunakan *microplate* 96 wells agar meminimalkan jumlah alat yang dipakai. Konsentrasi supernatan *Aspergillus niger* yang dibutuhkan adalah 100%, 50%, 25%, 12,5%, dan 6,25%. Pembuatan supernatan *Aspergillus niger* dengan berbagai konsentrasi ini dilakukan langsung pada *microplate* 96 wells dengan 3 kali pengulangan.

1. Konsentrasi 100%

Berisi 100 μ l supernatan *Aspergillus niger*

2. Konsentrasi 50%

Mencampurkan 100 μ l supernatan *Aspergillus niger* dengan 100 μ l PDB. Selanjutnya ambil 100 μ l dari hasil pencampuran ini untuk dimasukkan ke *microplate* berikutnya.

3. Konsentrasi 25%

Mencampurkan 100 μ l supernatan konsentrasi 50% dengan 100 μ l PDB. Selanjutnya ambil 100 μ l dari hasil pencampuran ini untuk dimasukkan ke *microplate* berikutnya.

4. Konsentrasi 12,5%

Mencampurkan 100 μ l supernatan konsentrasi 25% dengan 100 μ l PDB. Selanjutnya ambil 100 μ l dari hasil pencampuran ini untuk dimasukkan ke *microplate* berikutnya.

5. Konsentrasi 6,25%

Mencampurkan 100 μ l supernatan konsentrasi 12,5% dengan 100 μ l PDB. Selanjutnya buang 100 μ l campuran ini.

Selanjutnya menambahkan 100 µl suspensi bakteri *Escherichia coli* pada semua microplate yang telah terisi beragam konsentrasi supernatant *Aspergillus niger* (Rahayu, 2013 dengan modifikasi).

Pembuatan kelompok kontrol positif dilakukan dengan mencampurkan antibiotik ciprofloksasin 64 µg/ml sebesar 100 µl dengan 100 µl suspensi bakteri *Escherichia coli*. Kelompok kontrol negatif dibuat dengan mencampurkan suspensi *Escherichia coli* 100 µl dengan media TSB 100 µl. Sedangkan untuk kelompok kontrol media terdiri dari pencampuran media PDB 100 µl dengan TSB 100 µl. Terakhir membuat kontrol supernatant *Aspergillus niger* sendiri 100 µl. Tahapan berikutnya adalah menutup microplate lalu diinkubasi pada suhu 37°C dalam waktu 24 jam (Nuraina, 2015 dengan modifikasi).

Setelah diinkubasi selama 24 jam, amati microplate dengan *Microplate Reader* 595 nm (Rollando & Sitepu, 2018). Dari pengukuran ini akan dihasilkan OD yang beragam pada masing-masing *well*. Untuk mengetahui nilai KHM *Aspergillus niger* terhadap *Escherichia coli*, dapat dianalisis melalui nilai OD pada *well* yang menunjukkan angka konstan pada konsentrasi yang paling rendah.

4.7.6 Uji Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM)

Dalam perhitungan KBM pada penelitian ini menggunakan metode *streak*. Media yang akan ditanam adalah *well* yang memiliki nilai OD sebagai KHM dan *well* dengan konsentrasi satu tingkat di atasnya. Selanjutnya, ambil media dari *well* tersebut sebanyak 3 µl dengan *yellow micropipate*. Setelah itu, tuangkan pada cotton swab, lalu streak pada media

tanam *Trypticase Soy Agar (TSA)* pada 3 cawan petri yang berbeda. Inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Langkah terakhir adalah menghitung KBM dengan *colony counter* (Mulyani *et al.*, 2018).

4.7.7 Uji Deteksi Pembentukan Biofilm *Escherichia coli*

Metode yang digunakan pada uji pembentukan biofilm *Escherichia coli* ini adalah *microtiter plate biofilm assay* atau *tissue culture plate*. Uji ini dilakukan untuk mengetahui kekuatan bakteri *Escherichia coli* dalam membentuk biofilm. Disini suspensi bakteri *Escherichia coli* sebagai kelompok uji, dan campuran media TSB sebagai kelompok kontrol.

Selanjutnya melakukan dilusi dengan mengambil 1 ose *Escherichia coli* lalu memasukkannya pada 10 ml TSB. Agar tidak ada bagian yang mengendap, dilakukan vortex pada larutan ini. Langkah berikutnya, mengambil 1 ml larutan pertama dan dimasukkan pada 10 ml larutan kedua, setelah itu divortex dan diberi nama 10^{-2} . Ulangi langkah ini hingga 10^{-10} . Semua larutan tadi diinkubasi 24 jam pada suhu 37°C (Fadhila & Sari, 2019 dengan modifikasi).

Lakukan pembacaan nilai OD 24 jam pada microplate A₁₋₄ dan cuci tiga kali dengan PBS agar sel-sel planktonik yang melekat pada microplate hilang, lalu keringkan. Berikutnya warnai dengan kristal violet 0,1% sebanyak 200 µl pada setiap microplate. Tujuannya adalah untuk mewarnai biomassa biofilm lalu inkubasi selama 15 menit. Setelah proses inkubasi selesai, buang isi microplate lalu cuci dengan PBS steril sebanyak tiga kali agar sel yang tidak menempel pada microplate hilang. Lalu keringkan dalam suhu ruang. Setelah kering, masukkan etanol 95% sebanyak 200 ml pada

setiap sumur, lalu inkubasi selama 20 menit dalam suhu ruang. Setelah itu hitung nilai OD menggunakan *microplate reader 595 nm* (Fadhila & Sari, 2019 dengan modifikasi). Langkah diatas diulangi pada waktu 48 jam dan 72 jam (Thieme *et al.*, 2019).

Untuk mengetahui kekuatan bakteri menghasilkan biofilm adalah dengan membandingkan OD_{cut} dengan OD_{isolat} . OD_{cut} diperoleh dari OD_c (OD kontrol negatif yang merupakan media kultur) ditambah 3 kali standar deviasi OD_c tersebut. Sedangkan nilai OD didapatkan dari nilai OD_{isolat} (rata-rata) dikurangi nilai OD_{cut} (Aviantina, 2019). Rumus perhitungannya dapat ditulis sebagai berikut:

$$OD_{cut} = OD_c + (3 \times SD\ OD_c)$$

Keterangan:

OD_{cut} = *Optical Density cut-off*

OD_c = *Optical Density control*

Intepretasi kekuatan bakteri dalam membentuk biofilm adalah sebagai berikut:

Rata-rata nilai OD	Kekuatan penghasil biofilm
$OD_{isolat} \leq OD_{cut}$	<i>Non-biofilm producer</i>
$OD_{cut} < OD_{isolat} \leq 2x\ OD_{cut}$	<i>Weak-biofilm producer</i>
$2x\ OD_{cut} < OD_{isolat} \leq 4x\ OD_{cut}$	<i>Moderate- biofilm producer</i>
$4x\ OD_{cut} < OD_{isolat}$	<i>Strong- biofilm producer</i>

OD_{cut} = *Optical Density cut*, OD_{isolat} = *Optical Density isolat*

Sumber: (Abida, 2020)

4.7.8 Uji Penghambatan Biofilm *Escherichia coli*

Pada pengujian ini menggunakan supernatan *Aspergillus niger* dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25% dengan masing-masing 100 µl diletakan pada micropipet. Berikutnya memasukkan suspensi bakteri *Escherichia coli* pada kelima sumur dengan berbagai konsentrasi tadi.

Pembuatan kelompok kontrol positif dilakukan dengan mencampurkan antibiotik ciproflaxacin 64 µg/ml sebesar 100 µl dengan 100 µl suspense bakteri *Escherichia coli*. Kelompok kontrol negatif menggunakan dibuat dengan mencampurkan suspensi *Escherichia coli* 100 µl dengan media TSB 100 µl. Sedangkan untuk kelompok kontrol media terdiri dari pencampuran media PDB 100 µl dengan TSB 100 µl. Terakhir membuat kontrol supernatan *Aspergillus niger* sendiri 100 µl. Tahapan berikutnya adalah menutup microplate lalu diinkubasi dengan suhu 37°C selama 72 jam.

Setelah inkubasi selesai, angkat microplate lalu cuci tiga kali dengan PBS agar sel-sel planktonik yang melekat pada microplate hilang, lalu keringkan. Berikutnya warnai dengan kristal violet 0,1% sebanyak 200 µl pada setiap microplate. Tujuannya adalah untuk mewarnai biomassa biofilm lalu inkubasi selama 15 menit. Setelah proses inkubasi selesai, buang isi microplate lalu cuci dengan PBS steril sebanyak tiga kali. Lalu keringkan dalam suhu ruang. Setelah kering masukkan etanol 95% sebanyak 200 ml pada setiap sumur, lalu inkubasi selama 20 menit dalam suhu ruang. Setelah itu amati menggunakan *microplate reader* 595 nm.

Untuk menghitung penghambatan pertumbuhan biofilm digunakan

$$\% \text{ Penghambatan pertumbuhan biofilm} = \frac{OD_{kn} - OD_{uji}}{OD_{kn}} \times 100\%$$

rumus berikut:

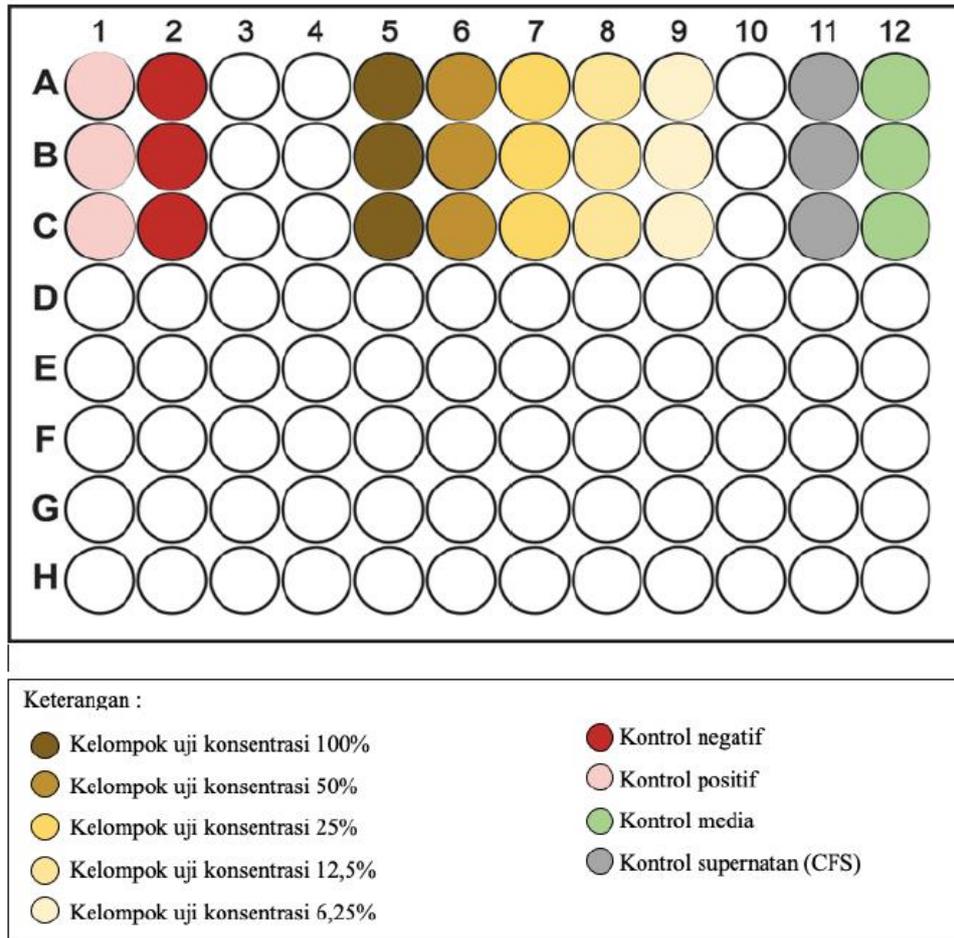
Keterangan:

OD_{kn} = *Optical Density kontrol negative*

OD_{uji} = *Optical Density uji*

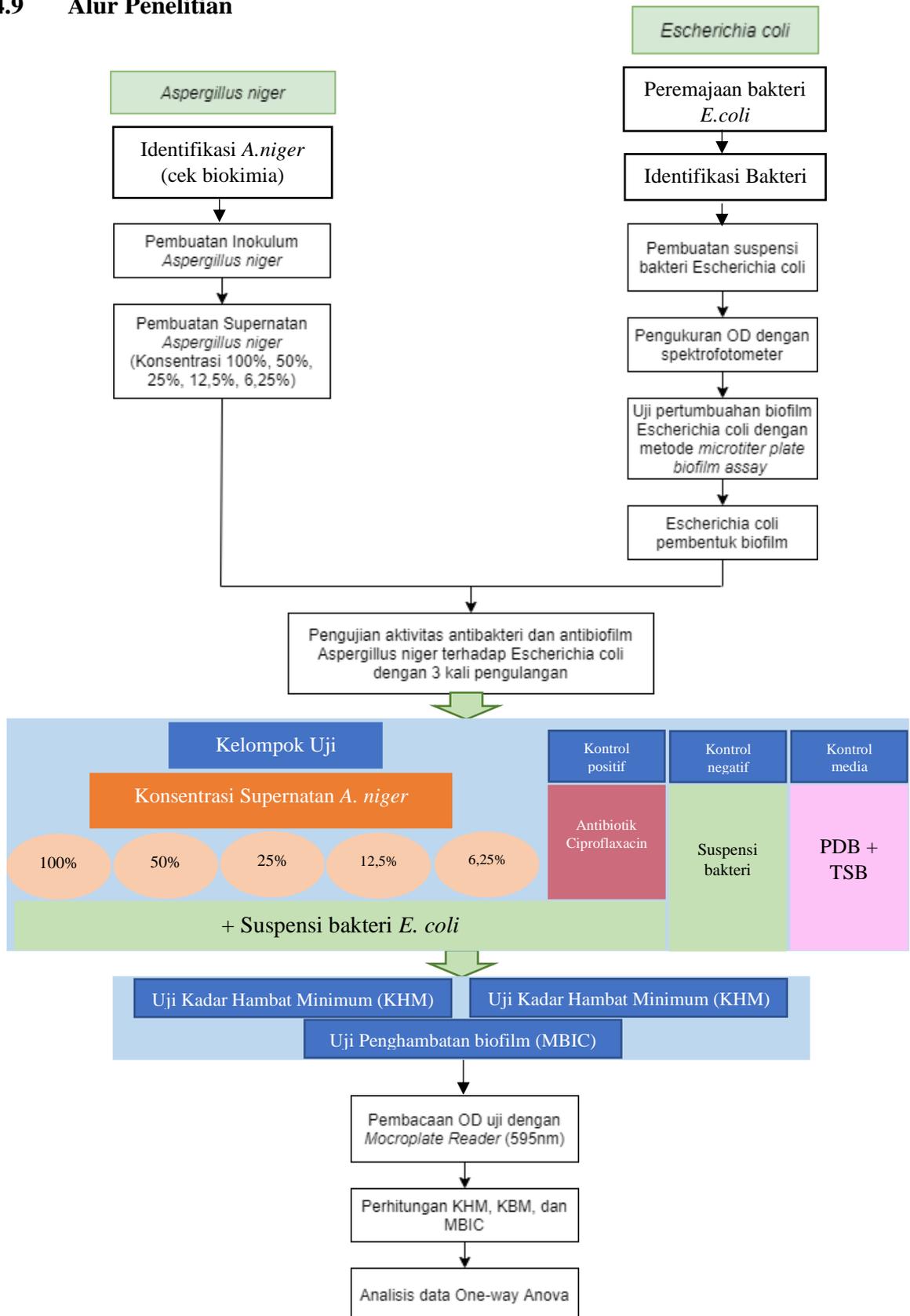
4.8 Denah Perlakuan Uji Aktivitas Antibakteri dan Antibiofilm

Denah Perlakuan Uji Aktivitas Antibakteri dan Antibiofilm menggunakan *microplate 96 wells* pada penelitian ini adalah sebagai berikut:



Gambar 4. 1 Denah Penelitian

4.9 Alur Penelitian



Gambar 4. 2 Alur Penelitian

4.10 Analisis Data

Data hasil penelitian dianalisis menggunakan Uji *One-way Analysis of Variance (ANOVA)* dengan aplikasi *SPSS for windows*. Anova ini merupakan uji parametrik menggunakan skala data numerik yang dapat membandingkan perbedaan rerata dari dua kelompok perlakuan atau lebih dengan taraf signifikansi data 0,05. Untuk uji normalitas distribusi data, dilakukan uji *Shapiro-wilk*. Apabila didapatkan nilai signifikansi $>0,05$ maka data tersebut normal. Sedangkan bila $<0,05$ maka data tidak terdistribusi dengan normal. Uji homogenitas dari sampel menggunakan uji *lavene*, dengan nilai signifikansi $>0,05$ untuk hasil yang menunjukkan data homogen (Abida, 2020).

Apabila data dari penelitian ini tidak memenuhi kriteria uji *one-way ANOVA*, maka data akan diuji dengan uji *kruskal wallis*. Apabila menggunakan *one-way ANOVA* dilanjutkan dengan uji *post hoc-tukey*. Namun bila analisa data menggunakan *kruskal wallis*, maka dilanjutkan dengan uji *man withney* (Aviantina, 2019).

BAB V

HASIL PENELITIAN

5.1 Hasil Identifikasi Jamur

Uji identifikasi pada jamur *Aspergillus niger* ini dilakukan secara makroskopis dan mikroskopis oleh peneliti dan ahli mikrobiologi.

a. Uji makroskopis

Media yang digunakan pada uji ini adalah dengan PDA (*Potato Dextrose Agar*). Dari hasil pertumbuhan menghasilkan warna putih kekuningan saat jamur berusia muda, dan semakin lama akan berubah warna menjadi coklat gelap atau bahkan hitam yang menunjukkan tumbuhnya jamur *Aspergillus niger*. Hasil identifikasi jamur secara makroskopis dapat dilihat pada gambar 5.1.

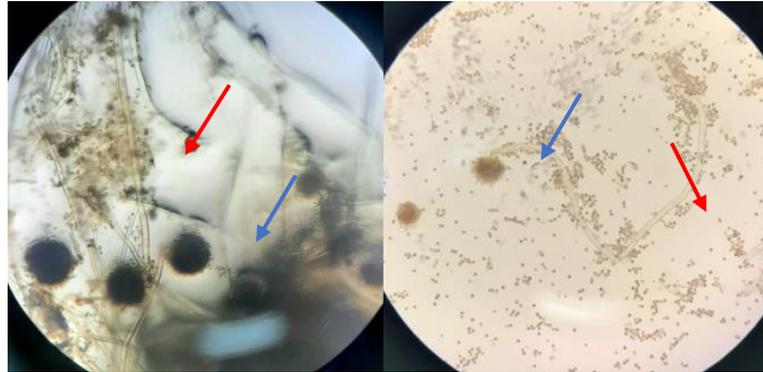


Gambar 5. 1 Spora *Aspergillus niger* berwarna coklat gelap sampai hitam pada media PDA

b. Uji Mikroskopis

Hasil uji identifikasi *Aspergillus niger* secara mikroskopik adalah ditemukannya hifa bersepta dan miselium yang bercabang. Selain itu jamur ini memiliki vesikula cenderung bulat dan warna yang cenderung

gelap (coklat tua atau bahkan hitam). Hasil identifikasi jamur secara mikroskopis dapat dilihat pada gambar 5.2.



Gambar 5. 2 Hasil uji identifikasi secara mikroskopis dengan perbesaran 400x dan 100x menunjukkan adanya hifa berseptata (panah merah) dan vesikula berbentuk bulat berwarna gelap (panah biru)

5.2 Hasil pembuatan *Cell Free Supernatant* (CFS)

Pembuatan CFS didapatkan dari pengambilan spora *Aspergillus niger* yang kemudian diinokulasi pada media PDB (Potato Dextrose Broth) 100 ml. Hasil dari inokulum tersebut diambil 5 ml lalu ditambahkan dengan 45 ml PDB dan glukosa 2%. Setelah itu, dilakukan inkubasi selama 7 hari dengan suhu 28°C. CFS kemudian di saring hingga berwarna kuning bening. Hasil pembuatan CFS dapat dilihat pada gambar 5.3.



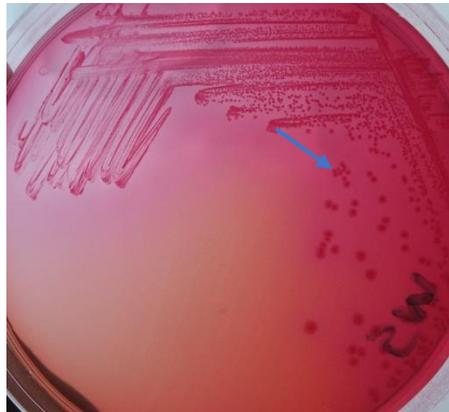
Gambar 5. 3 Hasil CFS setelah dilakukan penyaringan berwarna kuning bening

5.3 Hasil Identifikasi bakteri

Uji yang digunakan untuk mengidentifikasi bakteri *Escherichia coli* pada penelitian ini adalah dengan uji makroskopis, uji mikroskopis, dan uji biokimia yang dilakukan oleh peneliti dan ahli mikrobiologi.

a. Uji Makroskopis

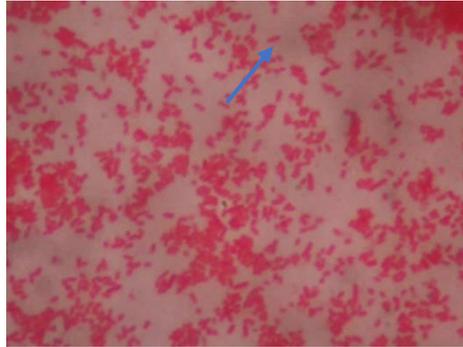
Media yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri pada uji ini adalah dengan MCA (*Mac Conkey Agar*). Ditemukan koloni berbentuk bulat dan berwarna merah bata. Hasil isolasi bakteri *Escherichia coli* dapat dilihat pada gambar 5.4.



Gambar 5. 4 Koloni *Escherichia coli* pada media MCA tampak berbentuk bulat dan berwarna merah.

b. Uji Mikroskopis

Uji ini dilakukan dengan memberikan pewarnaan gram pada bakteri *Escherichia coli*. Didapatkan bentuk batang pendek dan warna kemerahan pada pewarnaan gram yang menunjukkan bahwa bakteri *Escherichia coli* merupakan bakteri gram negatif. Hasil pewarnaan gram ini dapat dilihat pada gambar 5.5.



Gambar 5. 5 Hasil pewarnaan gram bakteri *Escherichia coli* dengan perbesaran 400x. Bakteri tampak berbentuk batang dan berwarna merah

c. Uji Biokimia

Uji biokimia yang digunakan pada bakteri *Escherichia coli* ini adalah untuk menguji adanya lysin, ornithine, H₂S (Hidrogen Sulfida), glukosa, mannitol, xylosa, ONPG (*o*-nitro-phenyl-β-D-galactopyranoside), indole, urease, V-P (*Voges-Proskauer*), sitrat, dan TDA (*Tryptopan Deaminase*). Hasil uji biokimia bakteri *Escherichia coli* dapat dilihat pada gambar 5.6 dan tabel 5.1.



Gambar 5. 6 Hasil Uji Biokimia bakteri *Escherichia coli*

Tabel 5. 1 Hasil Uji Biokimia bakteri *Escherichia coli*

Uji Biokimia <i>Escherichia coli</i>	Hasil
Lysine	+
Ornithine	+
H ₂ S	-
Glukosa	+
Mannitol	+
Xylosa	+
ONPG	+
Indole	+
Urease	-
V-P	-
Sitrate	-
TDA	-

5.4 Hasil Uji Deteksi Pembentukan Biofilm

Uji pembentukan biofilm bakteri *Escherichia coli* menggunakan metode *microtiter plate biofilm assay* yang diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C lalu dihitung menggunakan *microplate reader*. Suspensi bakteri yang digunakan adalah *Escherichia coli* yang memiliki OD 0,5. Hasil uji deteksi pembentukan biofilm dapat dilihat pada tabel 5.2.

Tabel 5. 2 Hasil uji pembentukan biofilm bakteri *Escherichia coli*

Kelompok perlakuan	Optical Density					
	Pengulangan			Rata-rata	SD	ODcut
	1	2	3			
Kelompok uji:						
Bakteri <i>Escherichia coli</i>	1.309	1.331	1.331	1.324	0.013	0.646
Kelompok kontrol:						
Media TSB dan glukosa 2%	0.434	0.402	0.525	0.454	0.064	

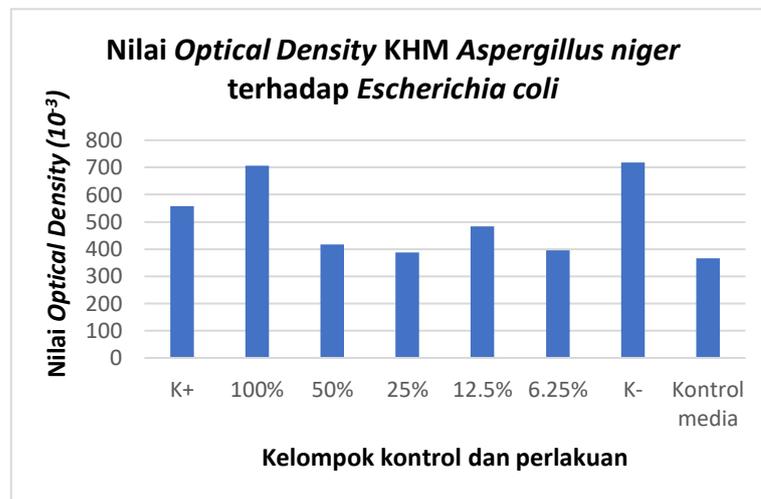
Dari hasil diatas, pertumbuhan biofilm *Escherichia coli* dapat dihitung dengan membandingkan nilai OD_{isolat} dengan OD_{cut}. Nilai OD_{cut} ini diperoleh dengan menggunakan rumus $OD_{control} + (3 \times SD \ OD_{control})$. Dari hasil tersebut memenuhi nilai pembentuk biofilm sedang $OD \ 2x \ OD_{cut} < OD_{isolat} \leq 4xOD_{cut}$ ($1.292 < 1.324 \leq 2.584$).

5.5 Hasil Uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)

Metode yang digunakan untuk uji KHM adalah dengan mikrodilusi menggunakan *well microplate* yang diinkubasi selama 24 jam dalam suhu 37°C lalu diukur ODnya menggunakan *microplate reader*. Konsentrasi yang dapat menghambat bakteri ditunjukkan dengan kadar kekeruhan yang paling rendah atau paling jernih. Hasil uji KHM dapat dilihat pada tabel 5.3, dan gambar 5.7.

Tabel 5. 3 Hasil uji KHM. Nilai rata-rata OD pada masing-masing perlakuan

Perlakuan	Nilai rata-rata OD KHM
K+	0.557
100%	0.707
50%	0.416
25%	0.388
12.5%	0.483
6.25%	0.396
K-	0.718
Kontrol media	0.366



Gambar 5. 7 Hasil uji KHM. Nilai rata-rata OD pada masing-masing perlakuan

Nilai KHM ditunjukkan dengan nilai OD yang paling rendah pada *microplate* yang diukur menggunakan *microplate reader*. Dari hasil diatas dapat dilihat bahwa nilai OD terendah ada pada konsentrasi CFS 25%, yang menandakan bahwa kadar hambat minimum *Aspergillus niger* terhadap *Escherichia coli* adalah pada konsentrasi 25%.

5.6 Hasil Uji Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM)

Setelah didapatkan nilai KHM berikutnya dilakukan uji KBM. Tingkat keberhasilan dari uji ini dilihat pada dasar *microplate*. Apabila tidak didapatkan adanya endapan pada dasar *microplate* maka dilakukan uji biakan pada media agar TSA untuk melihat ada tidaknya bakteri. Hasil uji KBM dapat dilihat pada gambar 5.8.



Gambar 5. 8 Hasil uji KBM pada *well microplate*

Dari hasil yang didapat dapat dilihat adanya endapan pada dasar *microplate*. Hal ini menunjukkan bahwa *Aspergillus niger* tidak mampu membunuh bakteri *Escherichia coli*. Sehingga dapat dikatakan hasil uji KBM negatif dan tidak perlu dilakukan uji lanjutan dengan menanam bakteri pada media agar.

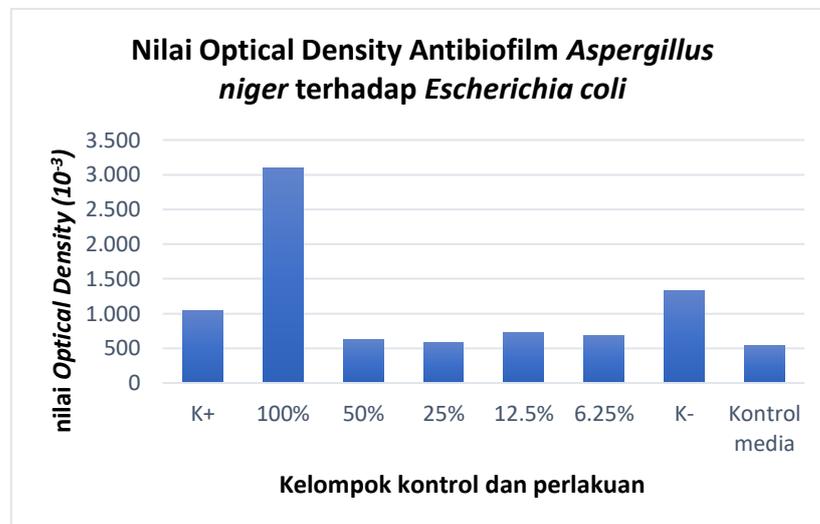
5.7 Hasil Uji Penghambatan Biofilm atau MBIC (*Minimum Biofilm Inhibitory Concentration*)

Hasil uji MBIC dapat dilihat pada perlakuan yang dilakukan pada *microplate* lalu diukur ODnya menggunakan *microplate reader*. Hasil Uji MBIC dapat dilihat pada tabel 5.4 dan gambar 5.9.

Tabel 5. 4 Hasil uji MBIC bakteri *Escherichia coli*. Nilai OD rata-rata pada masing-masing perlakuan.

Perlakuan	Nilai rata-rata OD Biofilm
K+	1.043
100%	3.094

50%	0.625
25%	0.587
12.5%	0.724
6.25%	0.687
K-	1.324
Kontrol media	0.533



Gambar 5. 9 Hasil uji antibiofilm. Nilai rata-rata OD pada masing-masing perlakuan

Nilai MBIC didapatkan dari nilai OD terendah yang dihitung menggunakan microplate reader. Dari hasil uji didapatkan nilai MBIC ada pada CFS dengan konsentrasi 25%.

5.8 Hasil Uji Analisis Data

1. Uji KHM

a. Uji Normalitas

Tujuan: Mengetahui normalitas distribusi data OD uji KHM.

Pengambilan keputusan:

- Jika nilai signifikansi ≥ 0.05 data terdistribusi normal
- Jika nilai signifikansi ≤ 0.05 data tidak terdistribusi normal

Tests of Normality

Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk			
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.	
OD	Kontrol +	.177	3	.	1.000	3	.961
KHM	Kontrol -	.176	3	.	1.000	3	.982
	CFS 100%	.329	3	.	.868	3	.289
	CFS 50%	.380	3	.	.762	3	.027
	CFS 25%	.282	3	.	.936	3	.512
	CFS 12.5%	.232	3	.	.980	3	.726
	CFS 6.25%	.289	3	.	.928	3	.480
	Kontrol media	.372	3	.	.781	3	.070

Keputusan:

Data OD uji KHM pada kelompok perlakuan memiliki $p\text{ value} > 0.05$ pada uji normalitas *shapiro-wilk* sehingga data terdistribusi normal. Meskipun ada satu data yang memiliki nilai $p < 0.05$, namun setelah dilihat jumlah data dari kelompok tersebut sama dengan kelompok yang lain, maka masih dapat dikatakan data tersebut terdistribusi secara normal.

b. Uji Homogenitas

Tujuan: Mengetahui homogenitas data OD uji KHM.

Pengambilan keputusan:

- Jika nilai signifikansi ≥ 0.05 data homogen
- Jika nilai signifikansi ≤ 0.05 data tidak homogen

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
OD	Based on Mean	1.951	7	16	.127
KHM	Based on Median	.505	7	16	.818
	Based on Median and with adjusted df	.505	7	6.677	.806
	Based on trimmed mean	1.807	7	16	.155

Keputusan:

Data OD uji KHM memiliki $p \text{ value} > 0.05$ sehingga data homogen dan dilakukan analisis parametrik menggunakan *one-way* ANOVA.

c. Uji *One-way* Anova

Tujuan: untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan signifikan antara kelompok perlakuan uji KHM.

Pengambilan keputusan:

- Jika nilai signifikansi ≤ 0.05 ada perbedaan (H_0 ditolak)
- Jika nilai signifikansi ≥ 0.05 tidak ada perbedaan (H_0 diterima)

ANOVA

OD_KHM

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.426	7	.061	30.221	.000
Within Groups	.032	16	.002		
Total	.458	23			

Keputusan:

Data OD KHM memiliki nilai $p \text{ value} < 0.05$ sehingga terdapat adanya perbedaan signifikan antara data OD KHM (H_0 ditolak H_1 diterima). Untuk menentukan perbedaan antara masing-masing kelompok perlakuan dilakukan uji *post-hoc tukey*.

d. Uji *Post-Hoc Tukey*

Tujuan: untuk mengetahui kelompok perlakuan mana yang memiliki perbedaan secara signifikan dan dimana letak nilai KHMnya.

Pengambilan keputusan:

- Nilai terendah antara kelompok perlakuan dari hasil uji *post-hoc tukey* merupakan konsentrasi nilai KHM.

OD_KHM

Tukey HSD^a

Kelompok	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
Kontrol media	3	.36633		
CFS 25%	3	.38767		
CFS 6.25%	3	.39600		
CFS 50%	3	.41567		
CFS 12.5%	3	.48300	.48300	
Kontrol +	3		.55667	
CFS 100%	3			.70667
Kontrol -	3			.71767

Sig.		.083	.504	1.000
------	--	------	------	-------

Keputusan:

Dari data hasil uji *post-hoc tukey* didapatkan beda signifikan pada semua kelompok, baik kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan. Sedangkan nilai terendah pada kelompok perlakuan ada pada CFS 25%, sehingga CFS 25% merupakan KHM dari *Aspergillus niger* terhadap *Escherichia coli*.

2. Uji MBIC

a. Uji Normalitas

Tujuan: Mengetahui normalitas distribusi data OD uji MBIC.

Pengambilan keputusan:

- Jika nilai signifikansi ≥ 0.05 data terdistribusi normal
- Jika nilai signifikansi ≤ 0.05 data tidak terdistribusi normal

Tests of Normality

	Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
OD_	Kontrol +	.379	3	.	.765	3	.034
Anti	Kontrol -	.385	3	.	.750	3	.000
Biofilm	CFS	.301	3	.	.911	3	.421
	100%						
	CFS 50%	.290	3	.	.926	3	.474
	CFS 25%	.333	3	.	.862	3	.274

CFS	.327	3	.	.873	3	.303
12.5%						
CFS	.321	3	.	.881	3	.329
6.25%						
Kontrol	.323	3	.	.879	3	.321
media						

Keputusan:

Data OD uji KHM pada kelompok perlakuan memiliki $p\text{ value} > 0.05$ pada uji normalitas *shapiro-wilk* sehingga data terdistribusi normal. Meskipun ada satu data yang memiliki nilai $p < 0.05$, namun setelah dilihat jumlah data dari kelompok tersebut sama dengan kelompok yang lain, maka masih dapat dikatakan data tersebut terdistribusi secara normal.

b. Uji Homogenitas

Tujuan: Mengetahui homogenitas data OD uji MBIC.

Pengambilan keputusan:

- Jika nilai signifikansi ≥ 0.05 data homogen
- Jika nilai signifikansi ≤ 0.05 data tidak homogen

Test of Homogeneity of Variances

		Levene			
		Statistic	df1	df2	Sig.
OD_Anti	Based on Mean	4.338	7	16	.007
Biofilm	Based on Median	.791	7	16	.605

Based on Median and with adjusted df	.791	7	7.164	.617
Based on trimmed mean	3.862	7	16	.012

Keputusan:

Data OD uji KHM memiliki $p\ value > 0.05$ sehingga data homogen dan dilakukan analisis parametrik menggunakan *one-way* ANOVA.

c. Uji *One-Way* ANOVA

Tujuan: untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan signifikan antara kelompok perlakuan uji MBIC.

Pengambilan keputusan:

- Jika nilai signifikansi ≤ 0.05 ada perbedaan (H0 ditolak)
- Jika nilai signifikansi ≥ 0.05 tidak ada perbedaan (H0 diterima)

ANOVA

OD_AntiBiofilm

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	15.440	7	2.206	139.121	.000
Within Groups	.254	16	.016		
Total	15.694	23			

Keputusan:

Data OD MBIC memiliki nilai $p\ value < 0.05$ sehingga terdapat adanya perbedaan signifikan antara data OD MBIC (H0 ditolak H1 diterima).

Untuk menentukan perbedaan antara masing-masing kelompok perlakuan dilakukan uji *post-hoc tukey*.

d. Uji *Post-Hoc Tukey*

Tujuan: untuk mengetahui kelompok perlakuan mana yang memiliki perbedaan secara signifikan dan dimana letak nilai KHMnya

Pengambilan keputusan:

- Nilai terendah antara kelompok perlakuan dari hasil uji *post-hoc tukey* merupakan konsentrasi nilai KHM

OD_AntiBiofilm

Tukey HSD^a

Kelompok	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
Kontrol media	3	.53300			
CFS 25%	3	.58700			
CFS 50%	3	.62533			
CFS 6.25%	3	.68767	.68767		
CFS 12.5%	3	.72367	.72367		
Kontrol +	3		1.04267	1.04267	
Kontrol -	3			1.32367	
CFS 100%	3				3.09400
Sig.		.596	.051	.182	1.000

Keputusan:

Dari data hasil uji *post-hoc tukey* didapatkan beda signifikan pada semua kelompok, baik kelompok kontrol maupun kelompok perlakuan. Sedangkan nilai terendah pada kelompok perlakuan ada pada CFS 25%, sehingga CFS 25% merupakan MBIC dari *Aspergillus niger* terhadap *Escherichia coli*.

BAB VI

PEMBAHASAN

6.1 Uji Identifikasi *Aspergillus niger*

Jamur *Aspergillus niger* merupakan salah satu jenis jamur yang sangat mudah tumbuh di wilayah tropis, contohnya Negara Indonesia (Praja & Yudhana, 2017). Jamur *Aspergillus niger* akan tumbuh optimal pada suhu 35-37°C (Irma, 2015). Uji identifikasi *Aspergillus niger* pada penelitian ini dilakukan dengan menumbuhkan *Aspergillus niger* pada cawan petri dengan metode streak. Media yang digunakan adalah PDA lalu diinkubasi selama 7 hari pada suhu 37°C. Pada awal pertumbuhannya, jamur ini berwarna putih dan berbentuk seperti filamen yang semakin lama akan berubah warna menjadi lebih gelap bahkan berwarna hitam. Pada uji mikroskopis, tampak hifa bersepta, konidia dan spora yang menyebar di sekelilingnya. Penemuan pada uji identifikasi ini menunjukkan hasil yang positif bahwa jamur yang diidentifikasi merupakan *Aspergillus niger*. Hal ini dikarenakan ditemukannya ciri-ciri jamur *Aspergillus niger* yaitu berwarna gelap, memiliki hifa bersepta, memiliki tangkai konidia dan kepala (vesikel) yang berbentuk bulat, serta memiliki spora (Praja & Yudhana, 2017).

Setelah membuktikan bahwa jamur yang digunakan pada penelitian ini memang benar *Aspergillus niger*, langkah berikutnya adalah membuat CFS yang bertujuan agar *Aspergillus niger* mengeluarkan enzim-enzim yang mampu digunakan sebagai antibiotik terhadap bakteri patogen. CFS dibuat dengan mengambil spora *Aspergillus niger* lalu dicampurkan pada

media PDB yang telah ditambahkan glukosa 2%, lalu diinkubasi pada inkubator shaker selama 7 hari. Setelah itu dilakukan penyaringan dua kali. Hasil dari penyaringan ini adalah CFS berwarna kuning bening. Setelah tersaring CFS *Aspergillus niger* akan ditambahkan dengan PDB sesuai dengan konsentrasi yang diinginkan yaitu 100%, 50%, 25%, 12,5%, dan 6,25%.

6.2 Uji Identifikasi *Escherichia coli*

Bakteri yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari kultur pasien ISK yaitu bakteri *UroPatogenic Escherichia coli* (UPEC). Uji identifikasi pada bakteri ini dilakukan untuk membuktikan bahwa bakteri tersebut merupakan bakteri *Escherichia coli*. Uji yang dilakukan adalah uji makroskopis, uji mikroskopis, dan uji biokimia.

Uji makroskopis dilakukan dengan menumbuhkan bakteri pada media MCA (*Mac Conkey Agar*) pada cawan petri. Isolasi bakteri menunjukkan warna merah dan berbentuk bulat. Menurut Prasiddhanti & Wahyuni koloni *Escherichia coli* yang ditumbuhkan pada media MCA akan berwarna merah atau merah muda, sehingga pada uji makroskopis ini menunjukkan hasil positif (Prasiddhanti & Wahyuni, 2015). Pada uji mikroskopis dilakukan pewarnaan gram pada bakteri lalu diamati menggunakan mikroskop. Hasilnya didapatkan bakteri berbentuk batang yang berukuran pendek dan berwarna merah. Warna merah menunjukkan bahwa bakteri yang diuji merupakan bakteri gram negatif sehingga hasil dari uji mikroskopis adalah positif (Artha D, 2016).

Uji biokimia pada bakteri ini bertujuan untuk mengetahui karakteristik suatu bakteri melalui reaksi kimia (Artha D, 2016). Uji biokimia yang akan dilakukan pada bakteri *Escherichia coli* ini adalah untuk menguji adanya *lysin*, *ornithine*, H₂S (Hidrogen Sulfida), glukosa, *mannitol*, *xylosa*, ONPG (*o*-nitro-phenyl-β-D-galactopyranoside), *indole*, *urease*, V-P (*Voges-Proskauer*), sitrat, dan TDA (*Tryptopan Deaminase*). Pada uji *lysin* didapatkan hasil positif karena terjadi perubahan warna pada sumur dari ungu menjadi kuning. Pada uji *ornithine* didapatkan hasil positif karena terjadi perubahan warna. Pada uji H₂S didapatkan hasil negatif karena warna pada sumur adalah kuning dan bukan hitam. Pada uji glukosa, *mannitol* dan *xylosa* didapatkan hasil positif karena sumur berubah warna menjadi kuning jingga. Pada uji ONPG dan *indole* didapatkan hasil positif karena sumur berubah warna menjadi kemerahan sedangkan uji *urease* didapatkan hasil negatif karena warnanya kuning. Pada uji V-P didapatkan hasil negatif karena tidak terjadi perubahan warna pada sumur. Pada uji sitrat didapatkan hasil negatif karena warna sumur tetap hijau dan tidak berubah menjadi biru. Pada uji TDA hasilnya negatif karena sumur tidak berubah warna menjadi coklat. Interpretasi hasil ini sesuai dengan uji biokimia bakteri oleh Awaludin Prihanto *et al.*, pada tahun 2018.

6.3 Uji Deteksi Pembentukan Biofilm *Escherichia coli*

Uji deteksi pembentukan biofilm menggunakan suspensi bakteri *Escherichia coli* yang memiliki OD 0,5. Bakteri diletakkan pada *microplate* lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Fadhila & Sari, 2019). Sedangkan kelompok kontrol menggunakan media TSB + glukosa 5%

(Abida, 2020). Setelah 24 jam dilakukan pencucian menggunakan PBS tiga kali lalu dikeringkan semalaman. Langkah berikutnya adalah memasukan cristal violet 0,1% pada *microplate* dan diinkubasi selama 15 menit dalam suhu ruang. Cuci dengan aquadest tiga kali dan ditambahkan asam asetat, lalu ditunggu hingga 15 menit (Fadhila & Sari, 2019). Selanjutnya dilakukan pengukuran OD *microplate* dengan menggunakan *microplate reader*.

Hasil dari pengukuran OD *Escherichia coli* pada pengulangan pertama adalah 1.309. Pada pengulangan kedua dan ketiga didapatkan nilai OD 1.331. Dari tiga kali pengulangan tersebut didapatkan rata-rata nilai OD 1.324. Sedangkan untuk hasil nilai OD kelompok kontrol pada pengulangan pertama, kedua, dan ketiga adalah 0.434, 0.402, 0.525 sehingga didapatkan rata-rata 0.454. Selain itu standar deviasi dari OD kontrol adalah 0.064.

Dari hasil yang didapat pertumbuhan biofilm *Escherichia coli* dapat dihitung dengan membandingkan nilai OD_{isolat} dengan OD_{cut} . Nilai OD_{cut} ini diperoleh dengan menggunakan rumus $OD_{control} + (3 \times SD \text{ } OD_{control})$ sehingga didapatkan hasil OD_{cut} 0.646. Dari hasil tersebut memenuhi nilai pembentuk biofilm sedang $2x \text{ } OD_{cut} < OD_{isolat} \leq 4x \text{ } OD_{cut}$ ($1.292 < 1.324 \leq 2.584$). Interpretasi ini memenuhi hasil pembentuk biofilm sedang atau *moderate biofilm producer* dalam penelitian Abida tahun 2020.

6.4 Uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) *Aspergillus niger* terhadap *Escherichia coli*

Uji KHM menggunakan suspensi bakteri *Escherichia coli* yang memiliki OD 0,5. Selanjutnya bakteri dimasukan pada *microplate* dan

ditambahkan perlakuan sesuai dengan yang akan diuji yaitu pemberian CFS *Aspergillus niger* 100%, 50%, 25%, 12,5% dan 6,25%. Kelompok kontrol yang digunakan adalah media TSB + glukosa 5% dan PDB + glukosa 2%. Kelompok kontrol positif menggunakan suspensi bakteri *Escherichia coli* dan kontrol positif menggunakan suspensi *Escherichia coli* + ciproflaksasin. Kemudian *microplate* diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah 24 jam dilakukan pengukuran OD menggunakan *microplate reader* (Abida, 2020). Pengulangan dilakukan tiga kali pada uji KHM ini.

Setelah didapatkan hasil nilai OD dari semua kelompok perlakuan dan kelompok kontrol, dilakukan uji normalitas data menggunakan *shapiro-wilk*. Dari uji analisa data didapatkan nilai $p > 0,05$ yang artinya data terdistribusi secara normal. Berikutnya dilakukan uji homogenitas menggunakan *levene test* dan didapatkan hasil $p > 0,05$ yang artinya data homogen. Dari uji normalitas dan homogenitas dipenuhi syarat untuk uji analisa data parametrik *one-way ANOVA*. Setelah dilakukan uji analisa data dengan *one-way ANOVA* didapatkan nilai signifikansi ($p < 0,05$) yang menunjukkan bahwa terdapat perbedaan signifikan antar data. Karena terdapat perbedaan signifikan, maka dilakukan uji *post hoc tukey HSD* dan didapatkan hasil bahwa nilai rata-rata terendah diantara kelompok perlakuan ada pada konsentrasi CFS 25% yaitu 0.483 dan nilai rata-rata tertinggi ada pada konsentrasi CFS 100% yaitu 0.707. Prosentase besar nilai KHM didapatkan dari hasil OD kontrol negatif dikurangi OD kelompok perlakuan terendah yaitu pada konsentrasi 25%, lalu dibagi OD kontrol negatif dan dikali 100%. Pada hasil uji KHM penelitian ini berada pada

konsentrasi CFS 25% dengan besar prosentase 46%. Sehingga ini membuktikan bahwa pemberian CFS *Aspergillus niger* dengan konsentrasi 25% mampu menghambat bakteri *Escherichia coli* sebesar 46%.

Menurut data pengukuran OD, nilai KHM *Aspergillus niger* terhadap *Escherichia coli* terdapat pada konsentrasi 25%. Pada konsentrasi 100% justru menunjukkan adanya pertumbuhan *Escherichia coli* yang tinggi. Hal ini dapat terjadi karena *Aspergillus niger* tidak melakukan metabolisme sekunder sehingga tidak terbentuk senyawa-senyawa dan enzim sebagai antibiotik terhadap makhluk hidup lain. Metabolit sekunder sendiri terjadi saat suatu makhluk hidup berada pada kondisi terancam, tujuannya adalah untuk mempertahankan diri dan sebagai pelindung terhadap makhluk hidup lain (Anggraito *et al.*, 2018). Konsep metabolisme sekunder juga digunakan pada awal mula ditemukannya antibiotik penisilin dari jamur *Penicillium sp.* yang mampu membentuk metabolisme sekunder pada fase penurunan pertumbuhannya (Hartono, 2014). Penyebab tingginya nilai OD pada kelompok perlakuan dengan konsentrasi 100% dapat terjadi karena *Aspergillus niger* tidak pada kondisi terancam oleh keberadaan bakteri *Escherichia coli*. Sehingga tidak terjadi metabolisme sekunder dan tidak terbentuk senyawa-senyawa antibiotik. Hal ini disebabkan karena jumlah *Escherichia coli* sama dengan jumlah CFS *Aspergillus niger* yaitu 100 μ l.

6.5 Uji Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) *Aspergillus niger* terhadap *Escherichia coli*

Nilai KBM diperoleh dari kelompok perlakuan yang ditetapkan sebagai KHM lalu dilakukan kultur pada media TSA (Mulyani *et al.*, 2018).

Pada Uji KBM apabila didapatkan adanya titik atau endapan pada dasar microplate menunjukkan bahwa adanya bakteri yang mengendap, sehingga hasil uji KBMnya adalah negatif. Hasil uji yang dilakukan pada penelitian ini tampak adanya endapan pada dasar *microplate* dengan konsentrasi terendah yaitu 25%. Sehingga untuk uji KBM pada penelitian ini adalah negatif atau *Aspergillus niger* tidak mampu membunuh bakteri *Escherichia coli*. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang menunjukkan bahwa setelah pemberian *Aspergillus niger* pada suspensi *Escherichia coli* tidak dapat memusnahkan atau membunuh bakteri secara menyeluruh karena masih ditemukan endapan pada dasar *microplate* yang merupakan koloni bakteri *Escherichia coli*.

6.6 Uji Penghambatan Biofilm *Escherichia coli* (MBIC)

Uji MBIC menggunakan suspensi bakteri *Escherichia coli* yang memiliki OD 0,5. Selanjutnya bakteri dimasukkan pada microplate dan ditambahkan perlakuan sesuai dengan yang akan diuji yaitu pemberian CFS *Aspergillus niger* 100%, 50%, 25%, 12,5% dan 6,25%. Kelompok kontrol yang digunakan adalah media TSB + glukosa 5% dan PDB + glukosa 2%. Kelompok kontrol negatif menggunakan suspensi bakteri *Escherichia coli* dan kontrol positif menggunakan suspensi *Escherichia coli* + ciproflaksasin. Microplate lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah 24 jam dilakukan pengukuran OD menggunakan *microplate reader* (Abida, 2020). Pengulangan dilakukan tiga kali pada uji KBM ini. Setelah 24 jam dilakukan pencucian menggunakan PBS tiga kali lalu dikeringkan semalam. Langkah berikutnya adalah memasukan cristal violet 0,1% pada *microplate*

dan diinkubasi selama 15 menit dalam suhu ruang. Cuci dengan aquades tiga kali dan ditambahkan asam asetat, lalu ditunggu hingga 15 menit (Fadhila & Sari, 2019). Langkah berikutnya yaitu mengukur OD microplate dengan menggunakan *microplate reader*.

Setelah didapatkan hasil nilai OD dari semua kelompok perlakuan dan kelompok kontrol, dilakukan uji normalitas data menggunakan menggunakan *shapiro-wilk*. Dari uji analisa data didapatkan nilai $p > 0,05$ yang berarti data terdistribusi secara normal. Berikutnya dilakukan uji homogenitas menggunakan *levne test* dan didapatkan hasil $p > 0,05$ yang berarti data homogen. Dari uji normalitas dan homogenitas, dipenuhi syarat untuk uji analisa data parametrik *one-way ANOVA*. Setelah dilakukan uji analisa data dengan *one-way ANOVA* didapatkan nilai signifikansi (p) $< 0,05$ yang berarti terdapat perbedaan signifikan antar data. Karena terdapat perbedaan signifikan, maka dilakukan uji *post hoc tukey HSD* dan didapatkan hasil bahwa nilai rata-rata terendah diantara kelompok perlakuan ada pada konsentrasi CFS 25% yaitu 0.587 dan nilai rata-rata tertinggi ada pada konsentrasi CFS 100% yaitu 3.094. Prosentase besar nilai MBIC didapatkan dari hasil OD kontrol negatif dikurangi OD kelompok perlakuan terendah yaitu pada konsentrasi 25%, lalu dibagi OD kontrol negatif dan dikali 100%. Pada hasil uji MBIC penelitian ini berada pada konsentrasi CFS 25% dengan besar prosentase 56%. Sehingga ini membuktikan bahwa pemberian CFS *Aspergillus niger* dengan konsentrasi 25% mampu menghambat bakteri *Escherichia coli* sebesar 56%.

Menurut data pengukuran OD, nilai MBIC *Aspergillus niger* terhadap *Escherichia coli* terdapat pada konsentrasi 25%, yang berarti jamur *Aspergillus niger* pada konsentrasi 25% efisien menghambat pertumbuhan biofilm dari *Escherichia coli*. Sedangkan tingginya nilai OD pada konsentrasi 100% menunjukkan bahwa *Aspergillus niger* tidak mampu menghambat pertumbuhan pada *Escherichia coli*. Hal ini dapat terjadi karena jamur *Aspergillus niger* tidak menghasilkan senyawa antibakteri. Senyawa antibakteri baru akan terbentuk apabila *Aspergillus niger* melakukan metabolisme sekunder dalam keadaan terancam ataupun untuk bersaing mempertahankan kehidupan dengan makhluk hidup lain seperti bakteri (Anggraito *et al.*, 2018). Pada kelompok perlakuan dengan konsentrasi 100% ini diduga tidak membuat lingkungan yang mengancam kehidupan dari jamur *Aspergillus niger* (Hartono, 2014), sehingga jamur ini tidak menghasilkan senyawa antibakteri yang mampu membunuh bakteri *Escherichia coli*.

6.7 Hasil Penelitian Terdahulu

Uji aktifitas antibiofilm pada bakteri *Escherichia coli* sudah pernah dilakukan sebelumnya dengan metode yang sama namun menggunakan bahan alami yang berbeda yaitu daun murbei hitam (*Morus nigra* L.) sebagai antibiotik. Dari hasil penelitian didapatkan bahwa daun murbei hitam memiliki aktivitas antibiofilm yang dibuktikan dengan uji MBIC. (Abida, 2020)

Sedangkan pada penelitian antibakteri dan antibiofilm menggunakan *Aspergillus sp.* sudah pernah dilakukan oleh Khoiriah pada

tahun 2021. Uji yang dilakukan adalah uji KHM, uji KBM, uji pencegahan perlekatan biofilm, uji penghambatan pertumbuhan biofilm, dan uji penghancuran biofilm jamur *Aspergillus sp.* terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. Perlakuan dilakukan pada microplate dan pembacaan OD menggunakan *microplate reader*. Pada hasil uji KHM, dan uji antibiofilm didapatkan hasil bahwa jamur ini mampu menghambat bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan memiliki aktivitas sebagai antibiofilm pada bakteri tersebut. Akan tetapi hasil uji KBM menunjukkan hasil negatif karena ditemukan adanya endapan pada dasar *microplate* dan ditemukan adanya koloni saat penanaman pada media agar. (Khoiriah, 2021)

6.8 Kajian Integrasi Islam mengenai Aktivitas Antibakteri dan Antibiofilm *Aspergillus niger* terhadap *Escherichia coli*

Bakteri *Escherichia coli* merupakan bakteri gram negatif yang seringkali menyebabkan gangguan kesehatan pada manusia. Penyakit yang seringkali disebabkan oleh bakteri ini adalah penyakit infeksi saluran kemih (ISK)(Aviantina, 2019). Oleh karena itu, manusia selalu berusaha mencari obat untuk mengatasi penyakit tersebut.

Sabda Rasulullah Shallallahu ‘Alaihi wa Sallam dalam Hadist Riwayat Bukhari, yang berbunyi:

مَا أَنْزَلَ اللَّهُ دَاءً إِلَّا أَنْزَلَ لَهُ شِفَاءً

“Tidaklah Allah menurunkan penyakit kecuali Dia juga menurunkan penawarnya.” (HR Bukhari).

Di dalam Al Qur’an telah disebutkan bahwa segala sesuatu yang diciptakan di bumi ini bukanlah tanpa alasan.

Dalam surat Ar-Rad ayat 4 yang berbunyi:

وَفِي الْأَرْضِ قِطْعٌ مُتَجَاوِرَاتٌ وَجَنَّاتٌ مِنْ أَعْنَابٍ وَزُرُوعٌ وَخَيْلٌ صُنُوفٌ وَغَيْرُ صُنُوفٍ يُسْقَى بِمَاءٍ
وَاحِدٍ وَنُفُضِلُ بَعْضُهُ عَلَى بَعْضٍ فِي الْأُكُلِ ۗ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَاتٍ لِقَوْمٍ يَعْقِلُونَ

Yang artinya: “Dan di bumi ini terdapat bagian-bagian yang berdampingan, dan kebun-kebun anggur, tanaman-tanaman dan pohon korma yang bercabang dan yang tidak bercabang, disirami dengan air yang sama. Kami melebihkan sebahagian tanam-tanaman itu atas sebahagian yang lain tentang rasanya. Sesungguhnya pada yang demikian itu terdapat tanda-tanda (kebesaran Allah) bagi kaum yang berfikir.” (QS. Ar-Rad: 4)

Dari hadist dan ayat Al-Qur’an diatas Allah selalu memberikan obat atas penyakit yang diturunkannya. Manusia hanya harus berusaha untuk menemukan dan mencoba dengan ilmu yang dimilikinya. Banyak obat-obatan yang diturunkan oleh Allah berasal dari tumbuhan yang tumbuh di muka bumi. Berdasarkan hadist dan firman Allah tersebut, peneliti memiliki gagasan untuk menggunakan jamur *Aspergillus niger* yang banyak tumbuh di daerah tropis sebagai antibakteri *Escherichia coli*. Dari hasil penelitian didapatkan bahwa memang benar jamur *Aspergillus niger* ini mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

1. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) *Aspergillus niger* terhadap *Escherichia coli* didapatkan pada konsentrasi 25% dengan besar prosentase 46%.
2. Hasil Uji Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) menunjukkan bahwa *Aspergillus niger* tidak dapat membunuh bakteri *Escherichia coli*.
3. *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC) *Aspergillus niger* terhadap *Escherichia coli* didapatkan pada konsentrasi 25% dengan besar prosentase 56%.

7.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai senyawa aktif spesifik pada *Aspergillus niger* yang dapat digunakan sebagai antibakteri dan antibiofilm.
2. Bagi peneliti selanjutnya bisa dilakukan uji antibakteri dan antibiofilm menggunakan metode yang berbeda.
3. Bagi peneliti selanjutnya bisa dilakukan uji antibakteri dan antibiofilm pada bakteri *Escherichia coli* tipe yang lain.

DAFTAR PUSTAKA

- A.Salmanu, S. (2017). Jurnal Biology Science & Education 2017. *Identifikasi Jenis Tiram Dan Keanekaragamannya Di Daerah Intertidal Desa Harja Kecamatan Saparua Kabupaten Maluku Tengah*, 6(2), 171–175.
- Abida, H. Y. (2020). *UJI AKTIVITAS ANTIBIOFILM EKSTRAK DAUN MURBEI HITAM (Morus nigra L.) TERHADAP BIOFILM Escherichia coli SKRIPSI*.
- Ana, K. D., Riwayati, N. Y., & Jayanti, S. F. (2020). *Hubungan Lama Pemasangan Kateter Dengan Kejadian Infeksi Saluran Kemih Pada Pasien Di Ruang Penyakit Dalam Rumkit Tk Ii Dr. Soepraoen Malang. Care : Jurnal Ilmiah Ilmu Kesehatan*, 8(2), 138.
- Ana L. Flores-Mireles, Walker, J. N., Caparon, M., & Hultgren, S. J. (2000). *Diagnosis, Differential and Treatment Options. Nature Reviews Microbiology*, 13(March), 269–284.
- Anggraito, Y. U., Susanti, R., Iswari, R. S., Yuniastuti, A., Lisdiana, WH, N., Habibah, N. A., & Bintari, S. H. (2018). *Metabolit Sekunder Dari Tanaman. In Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Semarang*.
- Artha DY. *Identifikasi Cemaran Bakteri Escherichia coli pada Jamu Gendong yang Diperjualbelikan disekitar jalan Abdul Kadir Kota Makasar*. 2016
- Aviantina, M. E. (2019). *Uji Aktivitas Penghambatan Biofilm Ekstrak Etanol Daun Kirinyu (Chromolaena odorata (L.) R. M. King & H. Rob.) terhadap Bakteri Staphylococcus aureus*. 11–12.
- Awaludin Prihanto, A., Dwi Laksono Timur, H., Abdul Jaziri, A., Nurdiani, R., & Pradarameswari, K. A. (2018). *ISOLASI DAN IDENTIFIKASI BAKTERI ENDOFIT MANGROVE Sonneratia alba PENGHASIL ENZIM GELATINASE DARI PANTAI SENDANG BIRU, MALANG, JAWA TIMUR. Indonesia Journal of Halal*, 1(1), 31.
- Bien, J., Sokolova, O., & Bozko, P. (2012). *Role of uropathogenic escherichia coli virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. International Journal of Nephrology*, 2012.
- Bq. Mutmainnah, Supnawadi, N. (2018). *EFEKTIVITAS EKSTRAK ETANOL Mimosa pudica L. TERHADAP PEMBENTUKAN BIOFILM Staphylococcus aureus. Prosiding Seminar Nasional Pendidikan Biologi*, 711–716.
- Brown, P. D. (2006). *Ciprofloxacin for the management of urinary tract infection. Women's Health*, 2(4), 509–516.
- Culp, E., & Wright, G. D. (2017). *Bacterial proteases, untapped antimicrobial drug targets. Journal of Antibiotics*, 70(4), 366–377.
- Darsono, P. V., Mahdiyah, D., & Sari, M. (2016). *Gambaran Karakteristik Ibu Hamil Yang Mengalami Infeksi Saluran Kemih (Isk) Di Wilayah Kerja Puskesmas Pekauman Banjarmasin. Dinamika Kesehatan Jurnal Kebidanan Dan Keperawatan*, 7(1), 150–159.
- Dong, G., Li, J., Chen, L., Bi, W., Zhang, X., Liu, H., Zhi, X., Zhou, T., & Cao, J. (2019). *Effects of sub-minimum inhibitory concentrations of ciprofloxacin on biofilm formation and virulence factors of Escherichia coli. Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 23(1), 15–21.
- Ecular, M., Cahyaningsih, D., Dahliaty, A, (2010). *SINTESIS DAN*

- KARAKTERISASI MEMBRAN BIONANOKOMPOSIT SELULOSA BAKTERI-Ag SEBAGAI MEMBRAN ANTIBAKTERI. *8719(2006)*, 222–231.
- Estrela, A. B., & Abraham, W. R. (2016). *Fungal metabolites for the control of biofilm infections. Agriculture (Switzerland)*, 6(3).
- F Lina, L., Fredrika, L., Oktavidiati, E., & P Lestari, D. (2019). *Analisis Pengetahuan Dengan Kejadian Infeksi Saluran Kemih Pada Pasien Di Poliklinik Urologi Rsud Dr M Yunus Bengkulu*. 140–143.
- Fadhila, F., & Sari, S. R. (2019). *Gambaran Pembentukan Biofilm Escherichia coli yang Diisolasi dari Air Bersih Perpipa-an. The 1st Proceeding Publication of Creativity and Research Medical Laboratory Technology DIV*, 1(1), 73–77.
- Frahesti, N. (2013). *Morfologi dan patogenesis Escherichia coli. Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), 1689–1699.
- Gbinigie, O. A., Ordóñez-Mena, J. M., Fanshawe, T. R., Plüddemann, A., & Heneghan, C. (2018). *Diagnostic value of symptoms and signs for identifying urinary tract infection in older adult outpatients: Systematic review and meta-analysis. Journal of Infection*, 77(5), 379–390.
- Geerlings, S. E. (2016). *Clinical presentations and epidemiology of urinary tract infections. Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management*, 27–40. <https://doi.org/10.1128/9781555817404.ch2>
- Gilang, Syuhada, & Triswanti, N. (2014). *Prevalensi Dan Identifikasi Bakteri Penyebab Infeksi Saluran Kemih Pada Pasien Pengguna Kateter Hari Keempat Di Kelas Ii Dan Iii Rsud Abdul Moelok Bandar Lampung. Jurnal Medika Malahayati*, 1(2), 82–88.
- Handa Gustiawan. (2019). *AKTIFITAS PENGHAMBATAN PEMBENTUKAN BIOFILM EKSTRAK ETANOL PEGAGAN (Centella asiatica (L) Urban) TERHADAP Staphylococcus aureus*. 8(5), 55.
- Harris, A. M. (2015). *Studi Komparasi Variasi Media Kultur Terhadap Pertumbuhan Populasi Bakteri Bacillus subtilis Dan Bacillus licheniformis untuk Probiotik Unggas*. Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga.
- Hartono, L. K. (2014). *Metabolit Sekunder Mikroba : Antibiotik*. Departemen Biokimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Institut Pertanian Bogor
- Irawan, E., & Mulyana, H. (2018). *Faktor-Faktor Penyebab Infeksi Saluran Kemih (ISK). Prosiding Seminar Nasional Dan Diseminasi Penelitian Kesehatan, April*, 1–12.
- Irma. (2015). *Optimasi Media Pertumbuhan Aspergillus niger Dengan Menggunakan Tepung Singkong. Skripsi. Fakultas Sains Dan Teknologi UIN Alauddin Makassar*, 134(4), 7–11.
- Ishaq, T., & Ali, B. (2018). *Risk assessment and biofilm formation of bacterial communities associated with drinking water distribution system. Journal of Environmental Biology*, 39(5), 693–701.
- Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., Hussain, T., Ali, M., Rafiq, M., & Kamil, M. A. (2018). *Bacterial biofilm and associated infections. Journal of the Chinese Medical Association*, 81(1), 7–11.
- Jamal M et al. (2015). *Bacterial Biofilm: Its Composition, Formation and Role in Human Infections*. *Research & Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology*, 4(3), 1–14. Retrieved from <http://www.rr. Research &>

- Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology*, 4(3), 1–14.
- Kaur, A., Rishi, V., Soni, S. K., & Rishi, P. (2020). A novel multi-enzyme preparation produced from *Aspergillus niger* using biodegradable waste: a possible option to combat heterogeneous biofilms. *AMB Express*, 10(1).
- Khairiah, A. N. 2021. *UJI AKTIVITAS ANTIBIOFILM Aspergillus aculeatus TERHADAP BIOFILM Pseudomonas aeruginosa*. SKRIPSI. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Letica-Kriegel, A. S., Salmasian, H., Vawdrey, D. K., Youngerman, B. E., Green, R. A., Furuya, E. Y., Calfee, D. P., & Perotte, R. (2019). Identifying the risk factors for catheter-associated urinary tract infections: A large cross-sectional study of six hospitals. *BMJ Open*, 9(2), 1–7.
- Maghfirah, F., Saputri, D., & Basri. (2017). Aktivitas Pembentukan Biofilm *Streptococcus mutans* dan *Candida Albicans* Setelah Dipapar Dengan Cigarette Smoke Condensate dan Minuman Probiotik. *Journal Caninus Dentistry*, 2(Februari), 12–19.
- Marlina, D., Kurniati, M., Hamid, F., Larasathi, F., & Irnawita, F. (2018). Visualisasi Matriks Biofilm *Escherichia coli* dengan Media Bacteriological Peptone, Sucrose dan Ethanol. *Jurnal Kesehatan*, 9(1), 26.
- Mishra, R., Panda, A. K., De Mandal, S., Shakeel, M., Bisht, S. S., & Khan, J. (2020). Natural Anti-biofilm Agents: Strategies to Control Biofilm-Forming Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 11(October).
- Mozer, H. (2015). Uji Aktivitas Antifungi Ekstrak Etanol 96% Kulit Batang Kayu Jawa (*Lannea coromandelica*) Terhadap *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, dan *Trichophyton rubrum*. *Fakultas Kedokteran Dan Ilmu Kesehatan UIN Syarif Hidayatullah*, 69(2), 283–291.
- Mulyani, D., Iftitah, D. E., & Srihardyastutie, A. (2018). Pengaruh Waktu Inkubasi terhadap Biotransformasi Minyak Jarak (*Ricinus communis L.*) oleh *Aspergillus oryzae*. *Indonesian Journal Of Essential Oil*, 3(2), 76–88.
- Normaliska, R., Sudarwanto, M. B., & Latif, H. (2019). Pola Resistensi Antibiotik pada *Escherichia coli* Penghasil ESBL dari Sampel Lingkungan di RPH-R Kota Bogor. *Acta VETERINARIA Indonesiana*, 7(2), 42–48.
- Nuraina. (2015). *Uji Aktivitas Antimikroba Ekstrak Daun Garcinia Benthami Pierre Dengan Metode Dilusi*. Jakarta: UIN Syarif Hidayatullah. Skripsi, 22.
- Patil A, M. R. (2014). *Role of Extracellular Proteases in Biofilm Disruption of Gram Positive Bacteria with Special Emphasis on Staphylococcus aureus Biofilms*. *Enzyme Engineering*, 04(01).
- Peternakan, D., Broiler, A., & Kabupaten, D. I. (2019). *Prosiding Prosiding Prosiding Prosiding Prosiding*. 176–183.
- Praja, R. N., & Yudhana, A. (2017). *Isolasi dan Identifikasi Aspergillus Spp Pada Paru-paru Ayam Isolation and Identification of Aspergillus Spp from The Lungs of Native Chicken which Sell in Banyuwangi Market Abstrak*. *Jurnal Medik Veteriner*, 1(1), 6–11.
- Prasiddhanti, L., & Wahyuni. (2015). Karakter Permukaan *Escherichia coli* yang Diisolasi dari Susu Kambing Peranakan Ettawah yang Berperan terhadap Kemampuan Adesi pada Sel Epitelium Ambing. *Jurnal Sain Veteriner*, 33(1), 29–41.
- Prateeksha, Bajpai, R., Yusuf, M. A., Upreti, D. K., Gupta, V. K., & Singh, B. N. (2020). *Endolichenic fungus, Aspergillus quadrininctus of Usnea longissima*

- inhibits quorum sensing and biofilm formation of Pseudomonas aeruginosa PAO1. Microbial Pathogenesis, 140, 103933.*
- Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E., & Sintim, H. O. (2015). *Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. Future Medicinal Chemistry, 7(4), 493–512.*
- Rahayu, W. (2013). *Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Ekstrak Buah Melur (Brucea javanica [L.] Merr) Terhadap Bakteri Escherichia coli Dan Staphylococcus aureus. Repository Universitas Negeri Padang, 16–20.*
- Rahayu, W. P., Nurjanah, S., & Komalasari, E. (2018). *Escherichia coli: Patogenitas, Analisis, dan Kajian Risiko. Journal of Chemical Information and Modeling, 53(9), 1–151.*
- Rasouli, R., Navidinia, M., Ghahfarokhi, M. S., Roudsari, R. V., Adabian, S., & Baghestani, A. R. (2020). *Antibiofilm activity of cellobiose dehydrogenase enzyme (Cdh) isolated from aspergillus niger on biofilm of clinical staphylococcus epidermidis and pseudomonas aeruginosa isolates. Archives of Clinical Infectious Diseases, 15(1), 1–7.*
- Resources, Fadillah, N., (2018). *UJI MIKROBIOLOGI AIR ZAM-ZAM DALAM KEMASAN. Skripsi. Universitas Islam Negeri Allaudin Makassar.*
- Rollando, R., & Sitepu, R. (2018). *Efek Antibakteri dari Kombinasi Minyak Atsiri Masoyi dan Kayu Manis. Jurnal Kefarmasian Indonesia, 8(1), 26–33. <https://doi.org/10.22435/jki.v8i1.7639.26-33>*
- Sadekuzzaman, M., Yang, S., Mizan, M. F. R., & Ha, S. D. (2015). *Current and Recent Advanced Strategies for Combating Biofilms. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 14(4), 491–509.*
- Sari, R. P. (2018). *Angka Kejadian Infeksi Saluran Kemih (ISK) Dan Faktor Resiko Yang Mempengaruhi Pada Karyawan Wanita Di Universitas Lampung Event Numbers Urinary Tract Infection (Uti) and Risk Factor that Affecting on Female Employees In University of Lampung. Majority, 7(3), 115–120.*
- Sharma, D., Misba, L., & Khan, A. U. (2019). *Antibiotics versus biofilm: An emerging battleground in microbial communities. Antimicrobial Resistance and Infection Control, 8(1), 1–10.*
- Silva, D. M., Batista, L. R., Rezende, E. F., Fungaro, M. H. P., Sartori, D., & Alves, E. (2011). *Identification of fungi of the genus aspergillus section nigri using polyphasic taxonomy. Brazilian Journal of Microbiology, 42(2), 761–773.*
- Slobodníková, L., Fialová, S., Rendeková, K., Kováč, J., & Mučaji, P. (2016). *Antibiofilm activity of plant polyphenols. Molecules, 21(12), 1–15.*
- Smelov, V., Naber, K., & Bjerklund Johansen, T. E. (2016). *Improved Classification of Urinary Tract Infection: Future Considerations. European Urology, Supplements, 15(4), 71–80.*
- Suryono, A. (2016). *Jurnal Veteriner Kerjasama Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Udayana & Perhimpunan Dokter Hewan Indonesia , Jakarta. 17(3).*
- Sutiknowati, L. I. (2016). *“Bioindikator Pencemar, Bakteri Escherichia coli.” Jurnal Oseana, 41(4), 63–71. oseanografi.lipi.go.id*
- Terlizzi, M. E., Gribaudo, G., & Maffei, M. E. (2017). *UroPathogenic Escherichia coli (UPEC) infections: Virulence factors, bladder responses, antibiotic, and non-antibiotic antimicrobial strategies. Frontiers in Microbiology, 8(AUG).*
- Thieme, L., Hartung, A., Tramm, K., Klinger-strobel, M., Jandt, K. D.,

- Makarewicz, O., & Pletz, M. W. (2019). *MBEC Versus MBIC : the Lack of Differentiation between Biofilm Reducing and Inhibitory Effects as a Current Problem in Biofilm Methodology*. 0, 1–5.
- Triasta, T., Setiabudi, D., & Rachmadi, D. (2016). *Faktor Risiko Kecurigaan Infeksi Saluran Kemih pada Anak Laki-Laki Usia Sekolah Dasar*. *Sari Pediatri*, 18(2), 137.
- Yashir, M., & Apriani, A. (2019). *Variasi Bakteri Pada Penderita Infeksi Saluran Kemih (Isk)*. *Jurnal Media Kesehatan*, 12(2), 102–109.
- Yuliana, A. (2015). *UJI POTENSI BERBAGAI JENIS SUSU CAIR TERHADAP BAKTERI Escherichia coli*. *Prosiding Seminar Nasional Dan Penelitian Kesehatan 2018*, 1(1).
- Zulkifli, N. A., & Zakaria, L. (2017). *Morphological and Molecular Diversity of Aspergillus From Corn Grain Used as Livestock Feed*. *HAYATI Journal of Biosciences*, 24(1), 26–34.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Etik Penelitian

	<p>FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN Kampus 3 FKIK Gedung Ibnu Thufail Lantai 2 Jalan Locari, Tlekung Kota Batu E-mail: kepk.fkik@uin-malang.ac.id - Website : http://www.kepk.fkik.uin-malang.ac.id</p>
	<p>KETERANGAN KELAIKAN ETIK <i>(ETHICAL CLEARANCE)</i> No. 041/EC/KEPK-FKIK/2021</p>

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN(KEPK) FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN UIN MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG TELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN :

Judul Uji Aktivitas Antibakteri dan Antibiofilm *Aspergillus niger* Terhadap *UroPhatogenic Escherichia coli*

Sub Judul Uji Aktivitas Antibakteri dan Antibiofilm *Aspergillus niger* Terhadap *UroPhatogenic Escherichia coli*

Peneliti

- Yulia Candra Dewi
- Meryta Ade Arofani
- Ibrahim Fadhil Senjaya
- Dwi Wahyu Utami
- Rizqi Ayuning Tyas
- Fikri Holly Jihadi Al Hasan
- Risna Afiatur Rosyida

Unit / Lembaga Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang

Tempat Penelitian Laboratorium FKIK UIN Maulana Malik Ibrahim Malang

DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN TERSEBUT TELAH MEMENUHI SYARAT ATAU LAIK ETIK.

Malang, 31 Agustus 2021

Ketua



Dr. Doby Indrawan, MMRS
NIP. 19781001201701011113

Keterangan :

- Keterangan Laik Etik Ini berlaku 1 (satu) tahun sejak tanggal dikeluarkan
- Pada akhir penelitian, laporan Pelaksanaan Penelitian harus diserahkan kepada KEPK-FKIK dalam bentuk *soft copy*.
- Apabila ada perubahan protokol dan/atau Perpanjangan penelitian, harus mengajukan kembali permohonan Kajian Etik Penelitian (Amandemen Protokol).

Lampiran 2. Hasil Uji Identifikasi Jamur



LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA
(INDONESIAN INSTITUTE OF SCIENCES)
PUSAT PENELITIAN BIOLOGI
(RESEARCH CENTER FOR BIOLOGY)

Cibinong Science Center, Jl. Raya Jakarta - Bogor KM. 46 Cibinong 16911
Telp. (+62 21) 87907636 - 87907604, Fax. 87907612
Website : www.biologi.lipi.go.id



Cibinong, 14 Juni 2021

SURAT KETERANGAN

No : B-406 /IPH.1/IF.07/VI/2021

Dengan ini kami menyampaikan bahwa 5 (lima) isolat, sebagai berikut:

1. *Aspergillus terreus* Thom (InaCF37)
2. *Aspergillus niger* van Tieghem (InaCCF31)
3. *Aspergillus oryzae* (Ahlb.) Cohn (InaCCF102)
4. *Aspergillus aculeatus* Iizuka (InaCCF41)
5. *Agrobacterium tumefaciens* (InaCCB1187)

Merupakan koleksi Indonesian Culture Collection (InaCC), Bidang Mikrobiologi,
Pusat Penelitian Biologi LIPI.

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

A.n. Kepala Pusat Penelitian Biologi LIPI
Kepala Bidang Mikrobiologi

Dr. Iwan Sasakiawan

Lampiran 3. Pelaksanaan penelitian



Inokulasi Jamur
Aspergillus niger



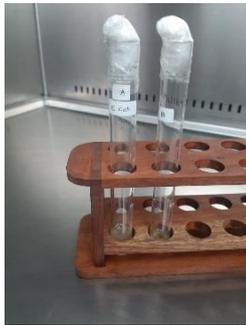
Pembuatan CFS
Aspergillus niger pada
inkubator shaker



Pembuatan media
TSB



Inokulasi bakteri
Escherichia coli



Suspensi bakteri
Escherichia coli



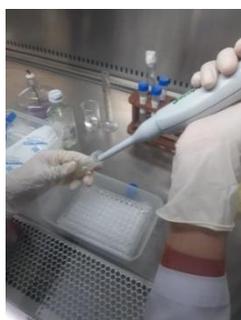
Inkubasi bakteri
Escherichia coli



Pembuatan OD bakteri
0,5



Pembuatan berbagai
konsentrasi CFS



Pengisian
kelompok kontrol
dan perlakuan
pada microplate



Inkubasi selama
24 jam



Pengukuran OD
dengan *microplate
reader*

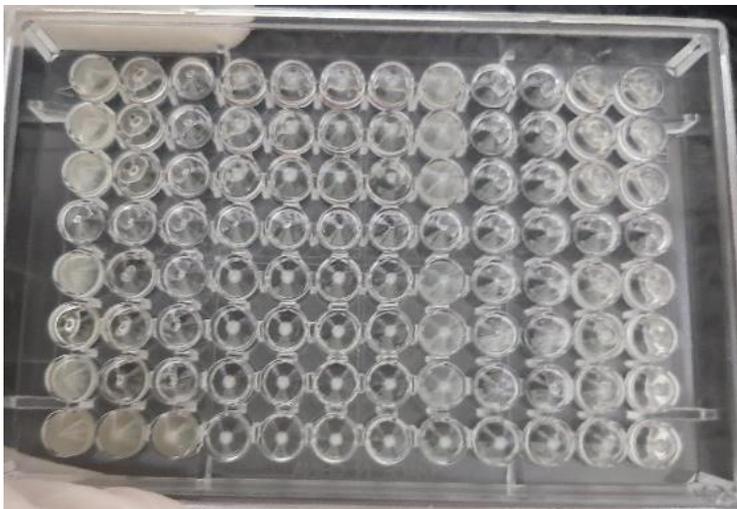


Pewarnaan
biofilm

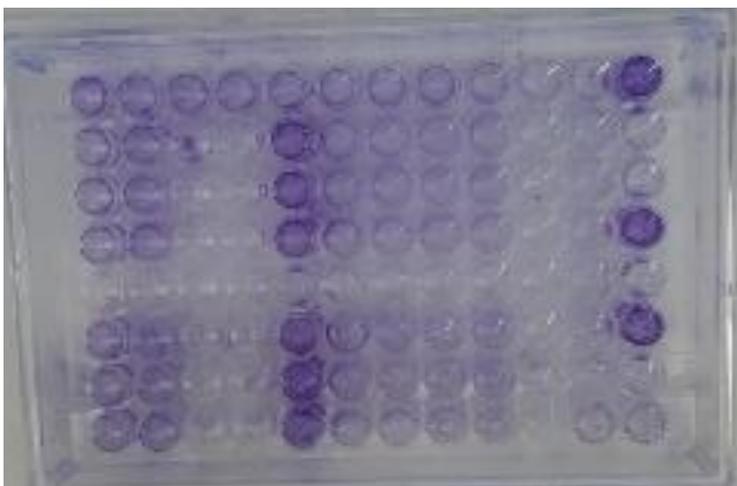
Lampiran 4. Prosedur uji aktivitas antibakteri



Hasil uji KHM



Hasil uji KBM



Hasil uji MBIC

Lampiran 5. Data hasil uji antibakteri dan antibiofilm *Aspergillus niger* terhadap *Escherichia coli*

1. Data hasil uji KHM

Pengulangan	K+	K-	100%	50%	25%	12.5%	6.25%	Kontrol Media	CFS	Media TSB+glukosa 2%
1	0.629	0.686	0.733	0.455	0.428	0.494	0.406	0.359	0.208	0.347
2	0.486	0.718	0.665	0.457	0.333	0.470	0.422	0.358	0.196	0.276
3	0.555	0.749	0.722	0.335	0.402	0.485	0.360	0.382	0.185	0.402

2. Data hasil uji biofilm dan antibiofilm (MBIC)

Pengulangan	K+	K-	100%	50%	25%	12.5%	6.25%	Kontrol Media	CFS	Media TSB+glukosa 2%
1	1.093	1.309	3.287	0.681	0.626	0.768	0.625	0.527	0.433	0.434
2	1.090	1.331	3.179	0.768	0.483	0.601	0.654	0.550	0.422	0.402
3	0.945	1.331	2.816	0.427	0.652	0.802	0.784	0.522	0.356	0.525