

**POTENSI ANTIBIOFILM *CELL-FREE SUPERNATANT Lactobacillus plantarum* TERHADAP *Staphylococcus aureus* DAN *Eschericia coli***

**SKRIPSI**

**Oleh:  
TAZKIYYATUN NUFUS  
NIM.18620086**



**PROGRAM STUDI BIOLOGI  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM  
MALANG  
2022**

**POTENSI ANTIBIOFILM *CELL-FREE SUPERNATANT Lactobacillus plantarum* TERHADAP *Staphylococcus aureus* DAN *Eschericia coli***

**SKRIPSI**

**Oleh:  
TAZKIYYATUN NUFUS  
NIM.18620086**

**Diajukan Kepada:  
Fakultas Sains dan Teknologi  
Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang  
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyarata dalam  
Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)**

**PROGRAM STUDI BIOLOGI  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM  
MALANG  
2022**

**POTENSI ANTIBIOFILM CELL-FREE SUPERNATANT *Lactobacillus plantarum* TERHADAP *Staphylococcus aureus* DAN *Eschericia coli***

**SKRIPSI**

Oleh:  
**TAZKIYYATUN NUFUS**  
NIM. 18620086

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk diuji  
Tanggal:  
06 Juni 2022

**Pembimbing I**



**Prilya Dewi Fitriasari, M.Sc**  
NIP. 19900428 2016080 1 2062

**Pembimbing II**



**Dr. H. Mochamad Imamudin, Lc., M.A**  
NIP. 19740602 200901 1 010

Mengetahui,  
**Ketua Program Studi**




**Dr. Evika Sandi Savitri, M.P.**  
NIP. 19741018 200312 2 002

**POTENSI ANTIBIOFILM CELL-FREE SUPERNATANT *Lactobacillus plantarum* TERHADAP *Staphylococcus aureus* DAN *Eschericia coli***

**SKRIPSI**

**Oleh:**  
**TAZKIYYATUN NUFUS**  
**NIM. 18620086**

**Telah dipertahankan**  
**Di depan Dewan Penguji Skripsi dan dinyatakan diterima sebagai salah satu**  
**persyaratan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (S.Si)**  
**Tanggal: 10 Juni 2022**

<b>Penguji Utama</b>	<b>: Prof. Dr. Ulfah Utami, M.Si</b> <b>NIP. 19650509 199903 2 002</b>	(.....  )
<b>Ketua Penguji</b>	<b>: Ir. Liliek Harianie AR, M.P</b> <b>NIP. 19620901 199803 2 001</b>	(.....  )
<b>Sekretaris Penguji</b>	<b>: Prilya Dewi Fitriasari, M.Sc</b> <b>NIPT. 19900428 2016080 1 2062</b>	(.....  )
<b>Anggota Penguji</b>	<b>: Dr. H. Mochamad Imamudin, Lc., M.A</b> <b>NIP. 19740602 200901 1 010</b>	(.....  )



**Mengesahkan,**  
**Ketua Program Studi**

**Dr. Erika Sandi Savitri, M.P.**  
**NIP. 19741018 200312 2 002**

## HALAMAN PERSEMBAHAN

Pertama-tama, puji syukur yang tak terhingga kepada Allah SWT atas terselesaikannya skripsi ini dengan baik dan lancar. Tugas akhir ini saya persembahkan secara spesial kepada pihak-pihak yang telah berkontribusi kepada saya dalam menyusun dan menyelesaikan tugas akhir ini, khususnya kepada:

1. Diri saya sendiri, yang sudah bertahan dan berusaha semaksimal mungkin hingga dapat menyelesaikan skripsi ini.
2. Kedua orang tua, ayah dan ibu tercinta yang senantiasa mendo'akan segala yang terbaik untuk saya, memberikan kasih sayang serta dukungan moral dan material hingga saya dewasa.
3. Kakak-kakak saya yang juga memberikan dukungan moral dan material serta memotivasi untuk tidak menyerah.
4. Keponakan tersayang yang selalu ceria dan menghibur saya dikala saya sedih. Semoga akan selalu memberikan kebahagiaan tersendiri dalam keluarga kami.
5. Keluarga besar saya yang mendoakan dan mendukung saya.
6. Teman-teman seperjuangan di laboratorium mikrobiologi atas bantuan dan kerjasamanya dalam melakukan penelitian (terutama Eni, Nadzif, Intan, Irsyadillah).
7. Sahabat saya, Bellavita dan Risma. Terimakasih atas semangat dan motivasi yang diberikan. Semoga skripsi dan perkuliahannya dilancarkan.
8. Teman-teman kos muslimah (Fida, Nisa, Khusnul), terimakasih atas bantuannya.
9. Treasure, yang telah menjadi penghibur dan penyemangat kapanpun saya merasa sedih dan kesepian. Semoga tetapawet, karirnya semakin sukses dan dapat memberikan kebahagiaan selalu kepada orang-orang disekitarnya.

## PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Tazkiyyatun Nufus

NIM : 18620086

Program Studi : Biologi

Fakultas : Sains dan Teknologi

Judul Penelitian : Potensi Antibiofilm *Cell-Free Supernatant Lactobacillus plantarum* Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri, 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, 06 Juni 2022

Yang membuat pernyataan,



Tazkiyyatun Nufus

NIM. 18620086

## **PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI**

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar Pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipan hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

# **Potensi Antibiofilm *Cell-Free Supernatant Lactobacillus plantarum* Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli***

Tazkiyyatun Nufus, Prilya Dewi Fitriasari, Mochamad Imamudin

Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri  
Maulana Malik Ibrahim Malang

## **ABSTRAK**

Bakteri yang sering mencemari makanan diantaranya *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli*, keduanya dapat membentuk biofilm yang resisten terhadap cekaman lingkungan, zat antimikroba serta sulit dibersihkan sehingga meningkatkan resiko infeksi. Biofilm dapat dikendalikan dengan memanfaatkan mikroorganismenya. *Lactobacillus plantarum* dapat memproduksi bahan metabolit yang berfungsi sebagai antibiofilm dan dapat diekstraksi dalam bentuk *cell-free supernatant* (CFS). Tujuan penelitian ini untuk mengetahui potensi CFS dari *Lactobacillus plantarum* dalam mengatasi biofilm *S. aureus* dan *E. coli*. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental. Uji deteksi biofilm menggunakan metode *Congo Red Agar* dan *Microtiter Plate Assay*. Uji aktivitas antibiofilm meliputi uji pencegahan penempelan biofilm, uji penghambatan pembentukan biofilm, dan uji penghancuran biofilm dilakukan dengan metode *Microtiter Plate Assay*. Konsentrasi CFS yang digunakan yaitu 12,5%, 25%, dan 50%. Analisis data menggunakan SPSS versi 25. Aktivitas pencegahan penempelan biofilm tertinggi yaitu sebesar 86% pada bakteri *S. aureus* dan 47% pada bakteri *E. coli* dari hasil perlakuan konsentrasi 50%. Aktivitas penghambatan pembentukan biofilm tertinggi pada *S. aureus* hasil perlakuan konsentrasi 12,5% dan pada *E. coli* hasil perlakuan konsentrasi 50% sebesar 76%. Aktivitas penghancuran tertinggi sebesar 73% pada *S. aureus* dan 67% pada *E. coli* hasil perlakuan konsentrasi 50%. Berdasarkan hasil tersebut, disimpulkan bahwa CFS *L. plantarum* memiliki aktivitas antibiofilm terhadap *S. aureus* dan *E. coli*.

**Kata kunci:** *Antibiofilm, cell-free supernatant, Eschericia coli, Lactobacillus plantarum, Staphylococcus aureus*



## **Antibiofilm Potential of *Lactobacillus plantarum* Cell-Free Supernatant Against *Staphylococcus aureus* and *Eschericia coli***

Tazkiyyatun Nufus, Prilya Dewi Fitriasari, Mochamad Imamudin

Biology Department, Faculty of Science and Technology, The State Islamic  
University of Maulana Malik Ibrahim Malang

### **ABSTRACT**

Bacteria that often contaminate food include *Staphylococcus aureus* and *Eschericia coli*, both can form biofilm that are resistant to environmental stresses, antimicrobial substances and are difficult to clean, thereby increasing the risk of infection. Biofilms can be controlled by using microorganisms. *Lactobacillus plantarum* can produce metabolites that can act as antibiofilmagent and can be extracted as cell-free supernatant (CFS). The purpose of this study was to determine the potential of CFS from *Lactobacillus plantarum* in overcoming *S. aureus* and *E. coli* biofilm. This research is an experimental research. The biofilm detection test used the Congo Red Agar method and the Microtiter Plate Assay. Tests for antibiofilm activity included biofilm attachmentprevention test, inhibition of biofilm formation test, and biofilm degradation test using the Microtiter Plate Assay method. The concentrations of CFS used were 12.5%, 25%, and 50%. Data analysis used SPSS version 25. The highest biofilm adhesion prevention activity was 86% on *S. aureus* bacteria and 47% on *E. coli* bacteria as a results of 50% concentration treatment. The highest inhibitory activity of biofilm formation in *S. aureus* as a result of 12.5% concentration treatment and *E. coli* at the concentration of 50% that was 76%. The highest degradation activity was 73% in *S. aureus* and 67% in *E. colias* a result from 50% concentration treatment. Based on these results, it was concluded that CFS of *L. plantarum* had antibiofilm activity against *S. aureus* and *E. coli*.

**Keywords:** *Antibiofilm, cell-free supernatant, Eschericia coli, Lactobacillus plantarum, Staphylococcus aureus*

## قدرة المضاد الحيوي للطاف الخالي من الخلايا *Lactobacillus plantarum* على *Staphylococcus aureus* و *Eschericia coli*

تزكية النفوس, فريليا ديوي فطرية ساري, محمد امام الدين

قسم علم الأحياء ، كلية العلوم والتكنولوجيا، بجامعة الإسلامية الحكومية  
مولانا مالك ابراهيم مالانج

### الملخص

تشمل البكتيريا الذي تلوث الطعام هو *Staphylococcus aureus* و *Eschericia coli* ، وكلاهما يمكن أن يشكل المضاد الحيوي المقاومة للضغوط البيئية والمواد المضادة للميكروبات ويصعب تنظيفها حتى يزيد من خطر الإصابة بالعدوى. يمكن استخدام الكائنات الحية الصغيرة كرادع المضاد الحيوي. يمكن أن تنتج *Lactobacillus plantarum* مستقلبات تعمل كمضاد حيوي ويمكن استخلاصها في شكل طاف خالي من الخلايا (CFS). الغرض من هذه الدراسة هو تحديد إمكانات CFS من *Lactobacillus plantarum* في التغلب على *Staphylococcus aureus* و *Eschericia coli*. هذا البحث هو بحث تجريبي اختبار الكشف عن المضاد الحيوي باستخدام طريقة *Congo Red Agar* و *Microtiter Plate Assay*. تشمل اختبارات نشاط المضاد الحيوي اختبارات لمنع ارتباط المضاد الحيوي ، واختبار تثبيط تكوين المضاد الحيوي ، واختبار تدمير المضاد الحيوي باستخدام طريقة *Microtiter Plate Assay*. كانت تركيزات CFS المستخدمة منها 12,5% و 25% و 50%. استخدم برنامج SPSS 25 في تحليل البيانات. وكان أعلى نشاط لمنع الارتباط مضاد حيوي هو 86% على بكتيريا *S. aureus* و 47% على بكتيريا *E. coli* من نتائج العلاج بتركيز 50%. كان أعلى نشاط تثبيط تكوين المضاد الحيوي في *S. aureus* من نتيجة العلاج بتركيز 12.5% و في *E. coli* بتركيز 50% هو 76%. كان أعلى نشاط تدمير 73% في *S. aureus* و 67% في *E. coli* من النتيجة بتركيز 50% للمعالجة. بناءً على هذه النتائج ، تمت الخلاصة أن الطاف الخالي من الخلايا *L. planta rum* له نشاط مضاد حيوي على *S. aureus* و *E. coli*.

الكلمات الأساسية: مطاف خالي من الخلايا، المضاد الحيوي، *Lactobacillus plantarum* ، *Eschericia coli* ، *Staphylococcus aureus*

## KATA PENGANTAR

*Assalamu'alaikum Wr. Wb.*

*Bismillahirrahmanirrahim*, segala puji bagi Allah SWT tuhan semesta alam yang telah melimpahkan rahmat, taufiq, dan hidayah-Nya. Shalawat serta salam senantiasa tercurahkan kepada junjungan umat Nabi besar Muhammad SAW yang telah mengarahkan manusia dari zaman kegelapan menuju zaman yang terang benderang, yakni agama Islam. Penulis sangat bersyukur dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Potensi Antibiofilm *Cell-Free Supernatant Lactobacillus plantarum* Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli*” dengan baik.

Selanjutnya penulis ucapkan terimakasih kepada seluruh pihak yang telah membimbing dan memberikan dorongan dalam proses penyusunan skripsi ini, terutama kepada:

1. Prof. Dr. H. M. Zainuddin, M.A selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Dr. Sri Hariani, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Dr. Evika Sandi Savitri, M.P selaku Ketua Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Priilya Dewi Fitriyari, M.Sc dan Dr. H. Mochamad Imamudin, Lc., M.A selaku dosen pembimbing I dan II, yang telah membimbing penulis dengan penuh kesabaran dan keikhlasan dalam meluangkan waktu dan tenaga untuk membimbing penulis sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.
5. Prof. Dr. Ulfah Utami, M.Si selaku dosen penguji utama skripsi yang banyak memberikan masukan selama penelitian dan penulisan naskah.
6. Ir. Liliek Harianie AR, M.P selaku ketua penguji skripsi sekaligus dosen wali, yang telah membimbing dan memberikan masukan sehingga penulis dapat menyelesaikan studi dengan baik.
7. Seluruh dosen, laboran, dan *civitas* akademik di Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang terutama dari Program Studi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi yang telah menemani dalam menjalankan studi.
8. Ayah dan Ibu serta seluruh keluarga tercinta yang telah memberikan Doa, restu, dukungan, dan motivasi kepada penulis.
9. Teman-teman seperjuangan di Program Studi Biologi serta teman-teman seperjuangan di Laboratorium Mikrobiologi.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini masih terdapat banyak kekurangan. Semoga hasil skripsi ini dapat bermanfaat.

*Wassalamu'alaikum Wr. Wb.*

Malang, 01Juni 2022



Tazkiyyatun Nufus

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERSETUJUAN.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
HALAMAN PERSEMBAHAN .....	iv
HALAMAN PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN .....	v
HALAMAN PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI.....	vi
ABSTRAK .....	vii
ABSTRACT.....	viii
ملخص البحث .....	ix
KATA PENGANTAR .....	x
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xiv
DAFTAR GAMBAR .....	xv
DAFTAR LAMPIRAN.....	xvi
DAFTAR SINGKATAN .....	xvii

### BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	6
1.3 Tujuan Penelitian .....	6
1.4 Manfaat Penelitian .....	6
1.4.1 Manfaat Akademis.....	6
1.4.2 Manfaat Aplikatif .....	6
1.5 Batasan Masalah .....	7

### BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	8
2.1.1 Klasifikasi <i>Staphylococcus aureus</i> .....	8
2.1.2 Karakteristik <i>Staphylococcus aureus</i> .....	8
2.1.3 Patogenitas <i>Staphylococcus aureus</i> .....	9
2.2 <i>Eschericia coli</i> .....	10
2.2.1 Klasifikasi <i>Eschericia coli</i> .....	10
2.2.2 Karakteristik <i>Eschericia coli</i> .....	11
2.2.3 Patogenitas <i>Eschericia coli</i> .....	12
2.3 Biofilm .....	14
2.3.1 Definisi Biofilm .....	14
2.3.2 Sruktur Biofilm.....	14
2.3.3 Mekanisme Pembentukan Biofilm.....	16
2.3.4 Pembentukan Biofilm pada <i>Staphlococcus aureus</i> .....	17
2.3.5 Pembentukan Biofilm pada <i>Eschericia coli</i> .....	18
2.3.6 <i>Quorum Sensing</i> .....	19
2.3.7 Fungsi dan Peranan Biofilm dalam Resistensi Bakteri .....	21
2.3.8 Uji Pembentukan Biofilm.....	22

2.3.8.1 Metode <i>Congo Red Agar</i> .....	22
2.3.8.2 Metode Tabung.....	22
2.3.8.3 Metode <i>Microtiter plate Assay</i> (MtP).....	23
2.3.8.4 Pemeriksaan Mikroskopis Biofilm .....	24
2.4 Uji Deteksi Efektivitas Agen Antibiofilm .....	25
2.4.1 Metode <i>Microtiter plate Assay</i> (MtP).....	25
2.4.2 Penentuan bMIC dan bMBC dengan <i>Plate Counting</i> .....	26
2.4.3 Pengukuran dengan <i>Quantitative Real Time PCR</i> (qPCR).....	26
2.5 <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	27
2.5.1 Klasifikasi <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	27
2.5.2 Karakteristik <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	27
2.5.3 CFS <i>Lactobacillus plantarum</i> sebagai Agen Antibiofilm.....	28

### **BAB III METODE PENELITIAN**

3.1 Rancangan Penelitian.....	30
3.2 Waktu dan Tempat.....	30
3.3 Variabel Penelitian.....	30
3.3.1 Variabel Bebas .....	30
3.3.2 Variabel Terikat.....	30
3.3.3 Variabel Kontrol.....	30
3.4 Alat dan Bahan.....	31
3.4.1 Alat.....	31
3.4.2 Bahan.....	31
3.5 Prosedur Penelitian .....	32
3.5.1 Sterilisasi Alat .....	32
3.5.2 Pembuatan Media .....	32
3.5.3 Peremajaan Isolat Bakteri.....	33
3.5.4 Pembuatan <i>Cell-Free Supernatant</i> (CFS).....	34
3.5.5 Pembatan Suspensi Bakteri Uji .....	34
3.5.6 Pembuatan Kelompok Kontrol.....	35
3.5.7 Uji Deteksi Pembentukan Biofilm.....	35
3.5.8 Uji Aktivitas Antibiofilm .....	37
3.5.8.1 Uji Pencegahan Penempelan Biofilm.....	37
3.5.8.2 Uji Penghambatan Pembentukan Biofilm.....	38
3.5.8.3 Uji Penghancuran/Degradasi Biofilm .....	39
3.5.9 Analisis Data .....	40

### **BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN**

4.1 Biofilm <i>Staphylococcus aureus</i> dan <i>Eschericia coli</i> .....	42
4.2 Aktivitas Antibiofilm <i>Cell-Free Supernatant Lactobacillus plantarum</i> .....	48
4.2.1 Uji Pencegahan Penempelan Biofilm <i>Staphylococcus aureus</i> dan <i>Eschericia coli</i> .....	50
4.2.2 Uji Penghambatan Pembentukan Biofilm <i>Staphylococcus aureus</i> dan <i>Eschericia coli</i> .....	57
4.2.3 Uji Penghancuran Biofilm <i>Staphylococcus aureus</i> dan <i>Eschericia coli</i> .	63

4.3 Kajian Integrasi Islam Mengenai Aktivitas Antibiofilm CFS <i>Lactobacillus plantarum</i> Terhadap <i>Staphylococcus aureus</i> dan <i>Eschericia coli</i> .....	65
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

**BAB V PENUTUP**

5.1 Kesimpulan .....	70
5.2 Saran.....	70

<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>72</b>
-----------------------------	-----------

<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>78</b>
----------------------	-----------

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1. Interpretasi nilai OD dan kekuatan pembentukan biofilm .....	23
3.1. Interpretasi nilai OD dan kekuatan pembentukan biofilm .....	36
4.1. Nilai OD dan Hasil Pengkategorian Biofilm .....	46

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1. <i>Staphylococcus aureus</i> pada mikroskop elektron .....	8
2.2. <i>Eschericia coli</i> pada mikroskop elektron.....	11
2.3. Struktur biofilm.....	15
2.4. Tahapan pembentukan biofilm.....	15
2.5. Sistem <i>Quorum Sensing</i> pada Bakteri Gram Positif dan Gram Negatif .....	20
2.6. Koloni bakteri pada <i>Congo Red Agar</i> .....	22
2.7. Tabung menunjukkan <i>strong biofilm producer</i> , <i>weak biofilm producer</i> , dan <i>non biofilm producer</i> .....	22
2.8. Metode <i>Microtiter plate</i> .....	24
2.9. <i>Lactobacillus plantarum</i> pada mikroskop elektron.....	27
4.1. Hasil uji deteksi pembentukan biofilm bakteri pada media CRA.....	42
4.2. Hasil uji deteksi pembentukan biofilm bakteri <i>E. coli</i> pada <i>microplate</i> .....	44
4.3. Hasil OD uji pencegahan penempelan biofilm <i>S. aureus</i> dan <i>E. coli</i> .....	48
4.4. Presentase aktivitas pencegahan penempelan biofilm <i>S. aureus</i> dan <i>E. coli</i> .	50
4.5. Hasil OD penghambatan pembentukan biofilm <i>S. aureus</i> dan <i>E. coli</i> .....	54
4.6. Presentase aktivitas penghambatan pembentukan biofilm <i>S. aureus</i> dan <i>E.</i> <i>coli</i> .....	56
4.7. Hasil OD penghancuran biofilm <i>S. aureus</i> dan <i>E. coli</i> .....	60
4.8. Presentase aktivitas penghancuran biofilm <i>S. aureus</i> dan <i>E. coli</i> .....	61



## DAFTAR LAMPIRAN

1. Alat-alat yang Digunakan pada Penelitian .....	78
2. Komposisi Media .....	79
3. Proses Pembuatan <i>Cell-Free Supernatant</i> (CFS) <i>L. plantarum</i> .....	81
4. Gambaran Uji Deteksi Pembentukan Biofilm pada <i>Microplate</i> .....	82
5. Gambaran Uji Aktivitas Antibiofilm pada <i>Microplate</i> .....	83
6. Hasil Uji Aktivitas Pencegahan Penempelan Biofilm pada <i>Microplate</i> .....	84
7. Hasil Uji Aktivitas Penghambatan Pembentukan Biofilm pada <i>Microplate</i> ....	85
8. Hasil Uji Aktivitas Penghancuran Biofilm pada <i>Microplate</i> .....	86
9. Data Hasil Uji Antibiofilm.....	87
10. Analisis Data Uji Pencegahan Penempelan Biofilm .....	88
11. Analisis Data Uji Penghambatan Pembentukan Biofilm .....	92
12. Analisis Data Uji Penghancuran/Degradasi Biofilm.....	96

## DAFTAR SINGKATAN

Simbol/Singkat	Keterangan
<i>L. plantarum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>E. coli</i>	<i>Eschericia coli</i>
BAL	bakteri asam laktat
CFS	<i>cell-free supernatant</i>
EPS	<i>extracellular polymeric substance</i>
PIA	<i>Polysaccharide Intercellular Adhesin</i>
Ica	<i>intracellular adhesion</i>
AI	<i>autoinducer</i>
AHL	<i>acyl homoserine lactones</i>
AIP	<i>autoinducible peptide</i>
DNA	<i>Deoxyribo Nucleid Acid</i>
NA	<i>Nutrient Agar</i>
MRSA	<i>de Mann Rogosa Sharpe Agar</i>
MRSB	<i>de Mann Rogosa Sharpe Broth</i>
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
CRA	<i>Congo Red Agar</i>
MtP	<i>Microtiter plate Assay</i>
MIC	<i>Minimum Inhibition Concentration</i>
QS	<i>Quorum Sensing</i>
°C	derajat Celcius
rpm	<i>rotation per minute</i>
OD	<i>optical density</i>
pH	<i>power of Hydrogen</i>
SPSS	<i>Statistical Product and Service Solutions</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
SHU	sindrom hemolitik uremik

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

Masalah kesehatan masyarakat yang penting dan banyak menyebabkan kasus kematian di dunia salah satunya yaitu pencemaran makanan oleh mikroba. Bahan pangan mengandung nutrisi yang dibutuhkan bagi banyak mikroba sehingga kontaminasi makanan oleh mikroba sulit dihindari. Mikroba yang dapat mencemari bahan pangan salah satunya yaitu bakteri. Bakteri merupakan kelompok mikroorganisme bersel tunggal dengan tipe sel prokariotik (tidak memiliki selubung inti) (Boleng, 2015). Beberapa bakteri patogen dapat menghasilkan racun dan beberapa dapat pula menyebabkan infeksi apabila makanan yang terkontaminasi bakteri tersebut tertelan dan masuk ke tubuh manusia.

Bakteri yang sering ditemukan pada makanan diantaranya *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli*. *S. Aureus* banyak ditemukan mencemari bahan pangan berprotein tinggi misalnya susu, daging, telur, dan ikan (Kang *et al.*, 2019). Sedangkan *E. coli* sering ditemukan mencemari daging, susu, sayuran, air minum, pangan siap saji yang diproses minimal, serta jajanan pinggir jalan (Rahayuet *al.*, 2018).

Bakteri dalam siklus hidupnya dapat beralih bentuk berupa sel planktonik dan biofilm. Sel planktonik merupakan sel-sel bakteri yang hidup bebas secara individual, sedangkan biofilm adalah komunitas sel bakteri yang terakumulasi dalam matriks polimer yang diproduksi oleh bakteri itu sendiri dengan cara

melekat pada permukaan biotik maupun abiotik. Biofilm inilah yang menjadi bentuk yang lebih dominan bagi kebanyakan bakteri contohnya *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli* (Hidayati & Liuwan, 2019; Purbowati *et al.*, 2017). Kedua bakteri ini mampu menempel, tumbuh, dan membentuk biofilm pada berbagai permukaan termasuk pada bahan makanan dan permukaan peralatan pengolahan makanan (Kang *et al.*, 2019; Ma *et al.*, 2019). Pada makanan, *S. aureus* dapat membentuk biofilm pada produk daging, unggas, susu, telur, roti dan menyebabkan muntah serta diare. *E. coli* dapat membentuk biofilm pada susu segar, daging mentah, buah-buahan dan sayuran yang selanjutnya dapat menyebabkan diare dan sindrom hemolitik uremik (SHU) (Carrascosa *et al.*, 2021).

Bakteri dalam biofilm dapat menjadi lebih resisten dan toleran terhadap cekaman lingkungan karena terlindung oleh matriks penyusunnya serta sulit untuk dibersihkan karena biofilm dapat melekat kuat dan melawan gaya gesek yang berulang-ulang (Hidayati & Liuwan, 2019). Hal ini dapat mengakibatkan infeksi yang lebih parah terutama apabila bakteri membentuk biofilm pada makanan kemudian makanan tersebut dikonsumsi dan masuk ke dalam tubuh. Diduga pula bahwa pembentukan biofilm dapat berlanjut di dalam jaringan tubuh seperti yang dijelaskan oleh Yeganeh *et al.* (2017) bahwa banyak bakteri, termasuk *E. coli*, *S. aureus*, dan *P. aeruginosa* dapat membentuk biofilm dalam jaringan tubuh. Biofilm yang terbentuk mengarah ke munculnya beberapa penyakit infeksi yang mematikan seperti pneumonia dan endokarditis.

Pengendalian biofilm dapat dilakukan dengan tiga cara, yaitu secara fisika, kimia, dan biologi. Pengendalian biofilm dalam biologi dapat dilakukan dengan memanfaatkan mikroorganisme seperti bakteri yang mampu berperan sebagai agen antibiofilm (Yana *et al.*, 2019). Pemanfaatan bakteri potensial sebagai agen antibiofilm merupakan langkah yang baik karena bakteri dapat menghasilkan berbagai zat metabolit yang dapat dimanfaatkan untuk mengatasi biofilm bakteri patogen. Pemanfaatan bakteri ini terinspirasi dari QS: Al-Baqarah [2]: 26:

إِنَّ اللَّهَ لَا يَسْتَحْيِي أَنْ يَضْرِبَ مَثَلًا مَّا بَعُوضَةً فَمَا فَوْقَهَا... ﴿٢٦﴾

Artinya: “*Sesungguhnya Allah tiada segan membuat perumpamaan berupa nyamuk atau yang lebih rendah dari itu...*” (Kemenag RI).

Ayat di atas menjelaskan bahwasanya Allah memberikan perumpamaan kepada manusia dengan menggunakan sesuatu yang kecil seperti nyamuk. Disebutkan pula bahwa Allah mampu membuat perumpamaan yang bahkan lebih rendah atau kecil dari itu yang menyinggung pada penciptaan mikroorganisme seperti bakteri. Allah SWT. juga menjelaskan dalam QS: Ali-Imran [3]: 191:

الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَمًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ  
وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَطْلًا سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ ﴿١٩١﴾

Artinya: “(yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata): “Ya Tuhan kami, tiadalah Engkau menciptakan ini dengan sia-sia, Maha Suci Engkau, maka peliharalah kami dari siksa neraka” (Kemenag RI).

Ayat tersebut menjelaskan bahwa manusia diperintahkan untuk selalu mengingat Allah SWT. beserta penciptaan-Nya. Di mana segala hal yang diciptakan oleh Allah tidak ada yang sia-sia, tidak hanya semata-mata untuk melengkapi isi langit dan bumi tetapi semuanya memiliki kebermanfaatan bagi

seluruh makhluk-Nya. Hal ini termasuk pula mikroorganisme seperti bakteri yang meskipun berukuran sangat kecil dan tidak dapat dilihat langsung oleh mata, tetapi pastinya memiliki peranan penting dalam kehidupan manusia baik itu merugikan maupun menguntungkan. Di sinilah peran manusia sebagai makhluk yang dibekali dengan akal pikiran diperlukan untuk mempelajari ciptaan-ciptaan Allah dan mengambil hikmah serta pengetahuan darinya.

Bakteri Asam Laktat (BAL) merupakan contoh bakteri yang memiliki peranan menguntungkan dalam kehidupan manusia salah satunya sebagai probiotik. Bakteri probiotik sangat berpotensi untuk digunakan sebagai agen pengendali biofilm bakteri patogen. Salah satu spesies bakteri probiotik yang dapat mengatasi biofilm bakteri patogen yaitu *Lactobacillus plantarum* (Khiralla *et al.*, 2015).

*Lactobacillus plantarum* adalah bakteri gram positif berbentuk batang yang bersifat mikroaerofilik dan fakultatif heterofermentatif. Spesies ini merupakan salah satu yang paling banyak terdapat di alam, secara alami terdapat pada tumbuh-tumbuhan sehingga lebih mudah diisolasi (Todorov & Bermadette, 2010). Seperti probiotik lainnya, *L. plantarum* dapat memproduksi banyak jenis bahan metabolit yang bersifat antagonis terhadap patogen. Zat-zat hasil metabolit tersebut umumnya dilepaskan secara ekstraseluler ke dalam media pertumbuhan sehingga dapat diekstraksi dalam bentuk supernatan (Zamani *et al.*, 2017). Hasil ekstraksi ini selanjutnya disebut *Cell-free supernatant* (CFS) yang secara ilmiah terbukti sebagai bahan potensial untuk mengatasi biofilm bakteri patogen (Abdelhamid *et al.*, 2018). Kemampuan CFS untuk menghambat dan

menghilangkan biofilm bakteri terkait dengan eksopolisakarida, biosurfaktan, hidrogen peroksida, asam lemak jenuh, dan enzim pencernaan ekstraseluler yang terkandung di dalamnya yang mampu mencegah perlekatan sel bakteri patogen pada permukaan, mempengaruhi ekspresi gen terkait pembentukan biofilm, serta mendegradasi biofilm (El-Mokhtar *et al.*, 2020; Zamani *et al.*, 2017).

Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa bakteriosin dan asam organik yang terkandung dalam CFS *L. plantarum* memiliki aktivitas antibiofilm yang baik terhadap *P. Aeruginosa* dan *Klebsiella pneumonia*. Selain itu, disebutkan memiliki potensi yang baik juga terhadap beberapa patogen penting seperti *E. coli*, *B. subtilis*, dan lain-lain (Khiralla *et al.*, 2015). Eksopolisakarida dalam CFS *L. plantarum* spp. juga dapat mengurangi pembentukan biofilm oleh bakteri *P. aeruginosa*, *S. aureus* dan *E. coli* yang resisten antibiotik serta mengganggu integritas biofilm yang telah terbentuk sebelumnya (Zamani *et al.*, 2017).

Telah terbukti bahwa CFS bakteri *Lactobacillus plantarum* mengandung senyawa aktif seperti eksopolisakarida, biosurfaktan, hidrogen peroksida, asam lemak jenuh dan asam organik lain yang berperan dalam melawan dan mengendalikan biofilm berbagai bakteri patogen. Hal ini menunjukkan bahwa CFS bakteri *L. plantarum* sangat berpotensi untuk digunakan sebagai agen antibiofilm. Disamping itu, masih jarang ditemukan penelitian yang menggunakan CFS *Lactobacillus plantarum* untuk penerapannya sebagai agen antibiofilm pada patogen yang mengkontaminasi makanan seperti *S. aureus* dan *E. coli*, sehingga

dilakukan penelitian ini untuk mengkaji potensi dari CFS *Lactobacillus plantarum* sebagai agen antibiofilm terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli*.

## **1.2 Rumusan Masalah**

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah:

1. Bagaimana pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli*?
2. Bagaimana aktivitas antibiofilm *cell-free supernatant Lactobacillus plantarum* terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli*?

## **1.3 Tujuan**

Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah untuk:

1. Mengetahui pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli*.
2. Mengetahui aktivitas antibiofilm *cell-free supernatant Lactobacillus plantarum* terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli*.

## **1.4 Manfaat Penelitian**

### **1.4.1 Manfaat Akademis**

Manfaat akademis dari penelitian ini adalah dapat digunakan sebagai sumber pengetahuan tambahan dalam ilmu mikrobiologi mengenai potensi antibiofilm *cell free supernatant (CFS) Lactobacillus plantarum* dalam mengatasi biofilm *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli*.

### **1.4.2 Manfaat Aplikatif**

Manfaat aplikatif dari penelitian ini adalah dapat digunakan sebagai sumber informasi bagi industri mengenai pengembangan terapi antibiofilm dari



bahan metabolit bakteri probiotik untuk mengatasi biofilm bakteri patogen penyebab kontaminasi pada makanan seperti *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli*.

### **1.5 Batasan Masalah**

Batasan masalah pada penelitian ini adalah:

1. Isolat bakteri *Lactobacillus plantarum* yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari stok kultur Universitas Gadjah Mada Yogyakarta sedangkan isolat bakteri uji *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli* diperoleh dari stok kultur Universitas Brawijaya Malang. Semua isolat bakteri yang digunakan tidak diketahui jenis strainnya.
2. Parameter yang diteliti yaitu biofilm *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli*, serta nilai OD (*Optical Density*) dari uji pencegahan penempelan biofilm, uji penghambatan pembentukan biofilm, dan uji penghancuran/degradasi biofilm.
3. Uji dilakukan secara *in vitro*.

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

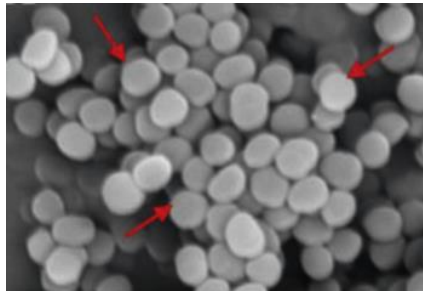
### 2.1 *Staphylococcus aureus*

#### 2.1.1 Klasifikasi *Staphylococcus aureus*

Klasifikasi *Staphylococcus aureus* adalah sebagai berikut (ITIS, 2012):

Kingdom	: Bacteria
Filum	: Firmicutes
Kelas	: Bacilli
Ordo	: Bacillales
Famili	: Staphylococcaceae
Genus	: <i>Staphylococcus</i>
Spesies	: <i>Staphylococcus aureus</i> Rosenbach

#### 2.1.2 Karakteristik *Staphylococcus aureus*



**Gambar 2.1.** *Staphylococcus aureus* pada mikroskop elektron (Kang *et al.*, 2019)

*Staphylococcus* berasal dari kata *staphyle*, yang berarti kelompok anggur. Sedangkan *coccus* mengacu pada bakteri dengan morfologi bulat seperti anggur dengan diameter 0,75-1,25  $\mu\text{m}$ , termasuk bakteri gram positif dengan dinding sel tebal dan membran sitoplasma yang khas, bersifat anaerob fakultatif, tidak membentuk spora dan tidak motil (Boleng, 2015). *S. aureus* tumbuh pada suhu

6,5-46 °C (tetapi optimumnya pada 30-37 °C) dan pH 4,2-9,3. Koloni dapat tumbuh dalam 24 jam mencapai diameter 4 mm. *Staphylococcus aureus* membentuk pigmen lipokromik, sehingga koloni terlihat berwarna kuning keemasan atau jingga. Bakteri ini bersifat katalase positif dan oksidase negatif (Dewi, 2013).

### **2.1.3 Patogenitas *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* memproduksi metabolit yang bersifat non toksin, eksotoksin, dan enterotoksin yang memiliki faktor virulensi berbeda sehingga bakteri ini dapat menimbulkan infeksi yang luas pada manusia (Gnanamaniet *al.*, 2017). *S. aureus* menyebabkan infeksi yang melibatkan pembentukan pus atau nanah. Infeksi oleh bakteri ini dapat melebar ke jaringan sekitarnya melalui darah dan limfa hingga ke sumsum tulang belakang dan sifatnya menahun (Boleng, 2015).

*Staphylococcus aureus* banyak ditemukan mencemari bahan pangan berprotein tinggi misalnya susu, daging, telur, dan ikan. Penyakit akibat bakteri ini disebut stafilokokal yaitu penyakit bawaan makanan yang sering menginfeksi manusia dan hewan di seluruh dunia (Kang *et al.*, 2019). Patogenitas *S. Aureus* terkait dengan *foodborne disease* (keracunan makanan) terdapat pada racun enterotoksin yang dihasilkan. Gejala pertama ketika keracunan enterotoksin yaitu mual, muntah dan diare dan biasanya terjadi mendadak (Vasanthakumari, 2007).

Planktonik *S. aureus* juga mampu menempel, tumbuh, dan membentuk biofilm pada makanan seperti produk daging, unggas, susu, telur, roti serta pada permukaan peralatan pengolahan makanan. Biofilm ini dapat menyebabkan

muntah serta diare (Kang *et al.*, 2019; Carrascosa *et al.*, 2021). *S. Aureus* merupakan salah satu patogen yang mampu membentuk biofilm di dalam jaringan tubuh. Biofilm yang terbentuk mengarah ke munculnya beberapa penyakit menular yang mematikan (Yaganeh *et al.*, 2017). *S. aureus* memproduksi beberapa jenis enzim seperti lipase, protease, nuklease, hyaluronatylase, metaloprotease, fosfolipase C, dan stafilokinase yang berperan dalam mekanisme invasi ke jaringan yang mengarah ke kerusakan jaringan. Kerusakan jaringan memudahkan bakteri untuk berpenetrasi ke dalam tubuh inang dan menginfeksi lebih banyak organ (Gnanamani *et al.*, 2017).

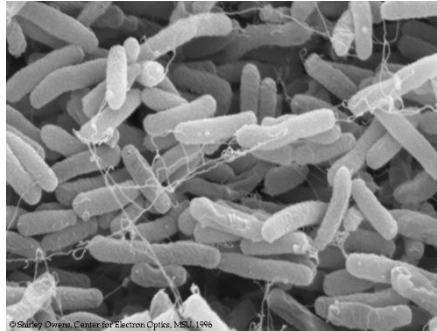
## **2.2 *Eschericia coli***

### **2.2.1 Klasifikasi *Eschericia coli***

Klasifikasi *Eschericia coli* adalah sebagai berikut (Brooks, 2013):

Kingdom	: Bacteria
Filum	: Proteobacteria
Kelas	: Gammaproteobacteria
Ordo	: Enterobacteriales
Famili	: Enterobacteriaceae
Genus	: <i>Eschericia</i>
Spesies	: <i>Eschericia coli</i>

### 2.2.2 Karakteristik *Escherichia coli*



**Gambar 2.2. *Escherichia coli* pada mikroskop elektron**(Triana, 2018)

*Escherichia coli* adalah bakteri berbentuk basil berukuran sekitar 1.0-1.5  $\mu\text{m}$  x 2.0-6.0  $\mu\text{m}$ , Gram negatif, motil dan tidak motil disertai flagel serta dapat tumbuh dengan atau tanpa oksigen, bersifat anaerob fakultatif dan mampu bertahan hidup dalam kondisi lingkungan yang sulit dan media yang kurang nutrisi. *E. coli* secara normal ditemukan hidup di dalam saluran pencernaan manusia dan hewan. *E. Coli* juga memiliki habitat di air tawar, air laut, atau di tanah (Rahayu *et al.*, 2018).

*Escherichia coli* mempunyai siklus atau waktu generasi antara 30-87 menit tergantung pada suhu. Waktu generasi adalah waktu yang diperlukan oleh bakteri *E. coli* untuk dapat berkembangbiak secara vegetatif menjadi dua kali lipat jumlahnya. Suhu optimal untuk pertumbuhan *E. coli* yaitu pada 37 °C dengan waktu generasi tersingkatnya sekitar 30 menit (Tabel 2.1) (Doyle dan Schoeni (1984) dalam Rahayu *et al.*, 2018).

*Escherichia coli* termasuk dalam kelompok *coliform* yaitu bakteri indikator kualitas air minum. Terdeteksinya bakteri *coliform* dalam air menandakan bahwa air tersebut telah terkontaminasi oleh feses, di mana besar

kemungkinannya sebagai pembawa mikroorganisme patogen lain. Bakteri *E. coli* di dalam air umumnya bersifat bukan patogen namun tidak jarang juga ditemukan strain yang bersifat patogen. *E. coli* yang sifatnya patogen dikategorikan dalam enam jenis yaitu Enteropatogenik *E. coli*, Enterotoksigenik *E. coli*, Enteroagregatif *E. coli*, Enterohemoragik *E. coli*, Difusif Adheren *E. coli*, dan Enteroinvasif *E. coli* (Abdelhamidet *al.*, 2018).

### **2.2.3 Patogenitas *Eschericia coli***

Patogenitas *E. coli* yaitu jika memasuki tubuh inangnya dan mampu beradaptasi serta bertahan di dalamnya, yang selanjutnya menyerang sistem imun dan akhirnya menyebabkan penyakit. Proses tersebut dilakukan dalam beberapa tahap seperti halnya bakteri patogen lain. Tahapan yang dimaksud yaitu meliputi: pembentukan koloni di titik tertentu pada permukaan sel (mukosa), pembelahan sel, perusakan sel, masuk ke aliran darah, dan perlekatan pada target organ dan pada akhirnya merusak organ (Rahayu *et al.*, 2018).

*E. coli* menjadi patogen pada inang apabila jumlahnya berlebih (misalnya menyebabkan diare dalam saluran pencernaan), jika sampai pada bagian tubuh yang terlindung atau ketika pertahanan tubuh inang menurun. *E. coli* strain tertentu dapat menyebabkan infeksi saluran urin akut yaitu yang berada pada ureter dan mencapai kandung kemih. *E. coli* pada vagina ibu hamil dapat menimbulkan meningitis pada bayi yang baru lahir. Pneumonia, infeksi luka terutama di abdomen, bakterimia dan septicemia adalah penyakit lain yang disebabkan oleh *E. coli* (Triana, 2018).

*E. coli* merupakan salah satu patogen penting pada makanan. *E. coli* utamanya *Enterohemorrhagic E. coli* O157: H7 merupakan patogen bawaan makanan yang dapat memproduksi racun Shiga. Jika makanan tercemar tersebut tertelan manusia, maka dapat menimbulkan *foodborne disease* (Ayu *et al.*, 2018). *E. coli* dapat membentuk biofilm pada susu segar, daging mentah, buah-buahan dan sayuran yang selanjutnya menyebabkan diare dan sindrom hemolitik uremik (SHU) (Carrascosa *et al.*, 2021). Selain itu, *E. coli* juga mampu membentuk biofilm dalam jaringan tubuh. Biofilm yang terbentuk mengarah ke munculnya beberapa penyakit menular yang mematikan (Yaganeh *et al.*, 2017).

Faktor virulensi *E. coli* salah satunya terdapat pada fli, flagela, dan protein membrannya yang digunakan untuk memulai perlekatan pada permukaan ketika akan membentuk biofilm. Setelah melekat, flagela akan lepas dan bakteri mulai memproduksi zat polimer ekstraseluler (EPS) yang membantu bakteri lebih tahan terhadap tekanan lingkungan dan zat antimikroba (Carrascosa *et al.*, 2021).

## **2.3 Biofilm**

### **2.3.1 Definisi Biofilm**

Istilah biofilm diperkenalkan pada tahun 1978 oleh Costerton. Bentuk morfologi biofilm bervariasi bergantung pada kumpulan bakteri dan keadaan di mana biofilm tersebut dibentuk (Hidayati & Liuwan, 2019). Biofilm merupakan istilah untuk sekumpulan sel mikroba yang melekat pada suatu permukaan dan terbungkus dalam matriks yang tersusun dari berbagai zat hasil produksi mikroba itu sendiri. Matriks biofilm tersusun dari gabungan polisakarida, protein, dan DNA. Matriks tersebut menyusun struktur padat dan keras yang melindungi

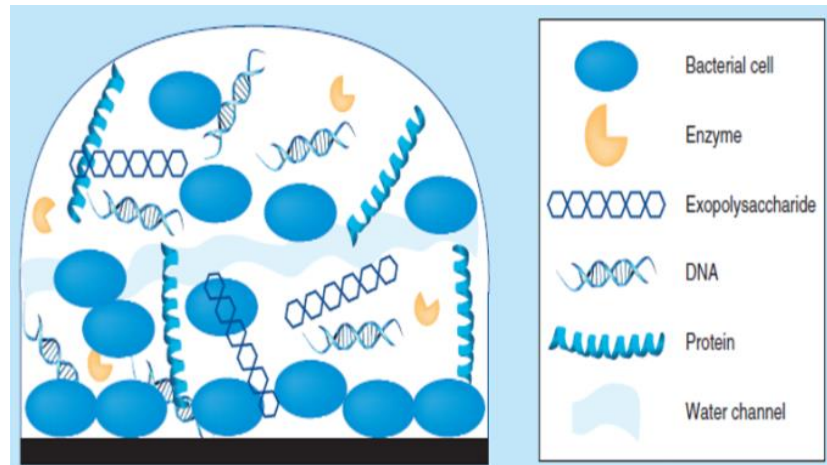
bakteri dari tekanan fisik, kimia, dan biologis. Biofilm bersifat menghalangi molekul antimikroba sehingga tidak menyebar melalui matriks. Selain itu, bahan pembentuk matriks biofilm juga dapat menonaktifkan molekul antibakteri (Di Somma *et al.*, 2020).

Bakteri mampu meningkatkan toleransinya dalam kondisi lingkungan yang merugikan serta dapat bertahan agar tidak terbawa aliran cairantubuh atau darah dengan melekat pada permukaan jaringan dan membentuk biofilm. Biofilm bersifat kuat dan mampu melawan gesekan yang berulang-ulang. Sel-sel di dalam biofilm mampu bertahan sekitar 1000 kali lebih kuat daripada saat berbentuk planktonik (Hidayati & Liuwan, 2019).

### **2.3.2 Struktur Biofilm**

Biofilm disusun oleh Substansi Polimerik Ekstraseluler (SPE) yang merupakan matriks polimer dengan berat molekul tinggi yang dilepaskan bakteri ke lingkungan. Substansi tersebut terdiri dari eksopolisakarida, protein, dan asam nukleat (DNA). Eksopolisakarida di sini memiliki fungsi sebagai penyangga karbohidrat, protein, lipid, dan DNA agar dapat melekat satu sama lain. Struktur, zat penyusun, dan sifat dari eksopolisakarida berbeda satu sama lain. Protein ekstraseluler dapat membantu pembentukan dan stabilisasi biofilm dengan cara melekat pada permukaan sel atau pada polisakarida. Proses degradasi biofilm melibatkan beberapa enzim (Hidayati & Liuwan, 2019).

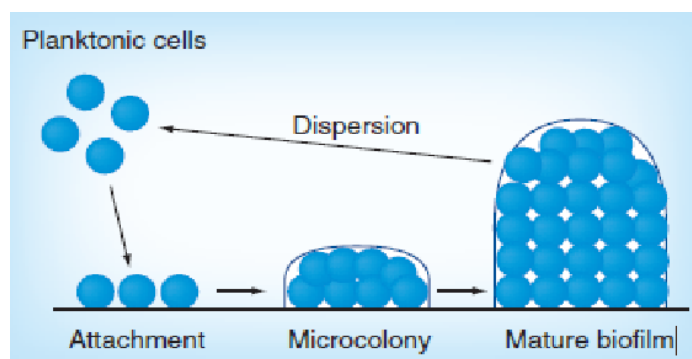




**Gambar 2.3. Struktur biofilm**(Hidayati & Liuwan, 2019)

Matriks SPE membentuk lapisan-lapisan. Lapisan terdalam berfungsi melindungi sel bakteri dari zat antimikroba dengan cara menghalangi difusi antimikroba tersebut. Biofilm berfungsi membatasi pergerakan sel bakteri, meningkatkan kerapatan sel, dan menyediakan lingkungan yang optimal untuk pertukaran *Deoxyribonucleatid acid* (DNA) secara konjugasi. Mekanisme ini diperlukan pada sistem yang mengkode resistensi antibiotik (Hidayati & Liuwan, 2019).

### 2.3.3 Mekanisme Pembentukan Biofilm



**Gambar 2.4. Tahapan pembentukan biofilm**(Hidayati & Liuwan, 2019)

Tahapan awal dalam pembentukan biofilm yaitu *attachment* (penempelan). Penempelan awal di mana mikroba saling berinteraksi dengan gaya *van der Waals*. Interaksi ini lemah sehingga mikroba dapat berpisah menjadi bentuk planktonik kembali (reversibel). Interaksi ini dapat terjadi pada spesies mikroba yang sama maupun berbeda. Setelahnya akan terjadi perlekatan ireversibel yaitu sel mikroba membentuk mikrokoloni. Pembentukan mikrokoloni tersebut melibatkan sebuah komunikasi untuk pengaturan pertumbuhan yang disebut dengan *quorum sensing* yaitu komunikasi yang melibatkan sinyal peptida dan molekul. Saat komunikasi mencapai *threshold*, akan terjadi aktivasi genetik untuk memproduksi eksopolisakarida (Purbowati, 2016; Hidayati & Liuwan, 2019).

Tahapan selanjutnya yaitu maturasi atau pematangan biofilm. Biofilm terdiri dari lapisan kaya nutrisi yang mendukung pertumbuhan mikroorganisme. Terbentuk pula saluran atau pori-pori untuk memfasilitasi pengangkutan nutrisi, difusi oksigen dan komponen lain yang diperlukan untuk pertumbuhan bakteri serta menghilangkan produk sisa dan sel-sel mati (Hidayati & Liuwan, 2019).

Tahapan akhir yaitu dispersi. Tahap ini adalah proses penyebaran biofilm di mana sel-sel yang tumbuh secara aktif dan bertahap dapat melepaskan diri menjadi bentuk planktonik kembali. Dispersi biofilm disebabkan oleh beberapa faktor seperti nutrisi yang berkurang, adanya persaingan antar sel bakteri, membludaknya populasi, dan lain-lain. Sehingga proses ini mungkin dilakukan untuk memungkinkan sel bakteri mendapatkan nutrisi yang cukup (Purbowati, 2016; Hidayati & Liuwan, 2019).

#### 2.3.4 Pembentukan Biofilm pada *Staphylococcus aureus*

Pembentukan biofilm *S. aureus* dimulai ketika sel-sel planktonik menempel pada permukaan biotik maupun abiotik, atau pada matriks protein seperti fibronektin, fibrinogen, vitronektin, dan lain-lain dan mulai membentuk mikrokoloni (Hidayati & Liuwan, 2019). Proses ini diikuti oleh ekspresi *Polysaccharide Intercellular Adhesin* (PIA) yang dikontrol oleh operon *intracellular adhesion* (*ica*), *teichoic acid*, dan *Accumulation Associated Protein* (Aap) yang berperan dalam proses agregasi dari sel-sel bakteri (Utami *et al.*, 2020). Perlekatan *S. aureus* pada permukaan (*surface*) dipengaruhi oleh interaksi hidrofobik dan hidrofilik antara permukaan sel *S. aureus* dan permukaan biotik atau abiotik (Idrees *et al.*, 2021).

Pembentukan mikrokoloni tersebut diikuti oleh pembentukan zat polimer ekstraseluler (EPS) dan berkembang menjadi biofilm yang sepenuhnya matang. Setelahnya, sel-sel bakteri yang berada di dalam biofilm melepaskan bahan kimia tertentu, yaitu asam D-amino dan enzim pendegradasi EPS seperti alginat liase, untuk memecah biofilm. Sel-sel planktonik ini siap untuk membentuk koloni lagi pada tempat yang sama atau menempel pada tempat yang berbeda dan mengulangi prosesnya untuk membentuk biofilm baru (Idrees *et al.*, 2021).

Sel *Staphylococcus aureus* yang terbungkus dan dilindungi oleh biofilm lebih resisten terhadap antibiotik dan menunjukkan perbedaan dalam ukuran dan pertumbuhan sel, ekspresi gen dan produksi protein dibandingkan dengan bentuk planktoniknya yang hidup bebas. Sel *S. aureus* dalam biofilm memiliki empat keadaan metabolisme yang berbeda, yaitu dapat tumbuh secara aerobik, dapat

fermentatif, dapat dorman, atau bahkan dapat mati. Selain matriks polimer ekstraseluler yang melindungi sel terhadap antibiotik, sel yang tidak aktif dan pertumbuhan lambat secara metabolik juga dilaporkan menambah resistensi antimikroba (Idrees *et al.*,2021).

### **2.3.5 Pembentukan Biofilm pada *Eschericia coli***

Tahap perlekatan awal pada pembentukan biofilm *E. coli* terjadi dengan perlekatan antara sel-sel planktonik secara reversibel. Interaksi antara *E. coli* dengan permukaan (*surface*) dapat ditingkatkan karena flagel *E. coli* mampu mengimbangi gaya ion medium. Setelahnya, akan terjadi perlekatan ireversibel yang menyebabkan bentuk sel *E. coli* berubah dari bentuk planktonik menjadi sesil. Perubahan tersebut difasilitasi oleh mikromolekul seperti *cyclic-diguanylic-acid* (c-di-GMP). Selanjutnya terjadi pematangan biofilm yang difasilitasi oleh autotransporter untuk interaksi antar sel dengan EPS sehingga dapat membentuk matriks tiga dimensi. EPS utama pada biofilm *E. coli* yaitu  $\beta$ -1,6-N-acetyl-D-glucosamine polymer (PGA) yang berfungsi memediasi adhesi antar sel dan perlekatan pada permukaan, selulosa sebagai penyokong biofilm sehingga bentuknya kaku, dan asam kolanik membentuk kapsul untuk melindungi sel bakteri. Biofilm yang telah matur berbentuk tiga dimensi dengan saluran-saluran kecil untuk jalur transport nutrisi, air, dan zat sisa, serta bagian atas berlubang kecil sebagai perlindungan sel planktonik (Sharma *et al.*,2016).

### **2.3.6 Quorum Sensing**

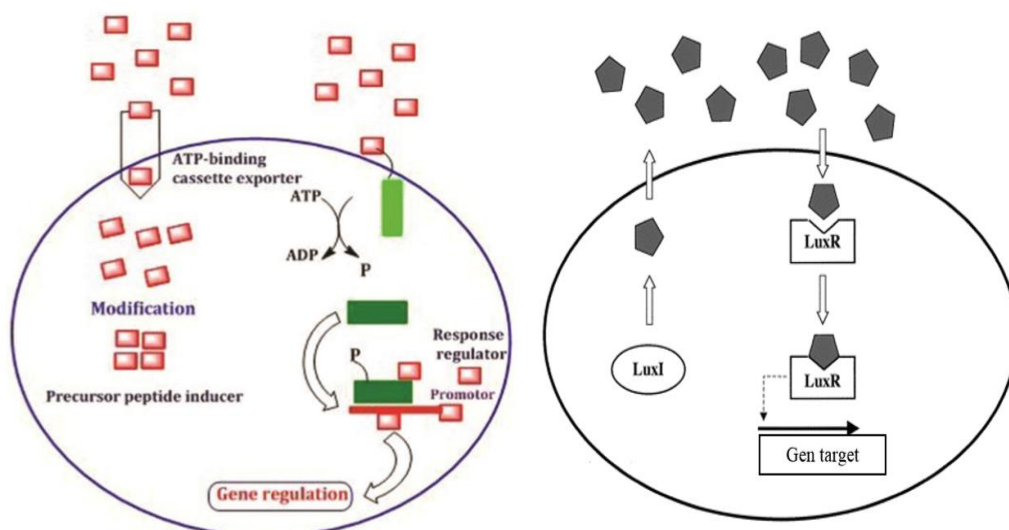
Proses pembentukan biofilm pada mikroorganismen memerlukan suatu komunikasi interseluler sebagai bentuk koordinasi yang disebut dengan *quorum*

*sensing* (QS). Dengan adanya sistem tersebut, bakteri dapat menyampaikan dan merespon sinyal kimia sehingga dapat terjadi pertukaran informasi mengenai kepadatan sel serta penyesuaian ekspresi gen dalam komunitasnya. Komunikasi ini diwujudkan dengan mensekresi, mendeteksi dan merespon sinyal berupa molekul-molekul spesifik yang disebut dengan *autoinducer* (AI), AI dapat masuk dan keluar sel secara difusi (Kurniawan & Asriani, 2020).

Bakteri Gram-positif dan Gram-negatif menggunakan *autoinducer* yang berbeda. *Autoinducer* dibagi menjadi tiga jenis menurut struktur dan fungsinya yang spesifik: (1) *acyl homoserine lactones* (AHLs—AI-1) adalah molekul kecil dengan satu *lactone ring* dan *acyl side chain* yang digunakan oleh bakteri Gram negatif; (2) *autoinducible peptides* (AIPs) adalah rantai peptida pendek yang diproduksi dalam sel, membutuhkan transporter membran untuk melewati membran sel. Berperan dalam regulasi QS pada bakteri Gram-positif; (3) *autoinducer-2* (AI-2) yaitu sinyal molekul yang berasal dari furanon yang memiliki karakteristik kombinasi AHLs dan AIPs. AI-2 berperan dalam mediasi QS dari bakteri Gram positif dan negatif (bertindak sebagai molekul sinyal umum untuk komunikasi antarspesies) (Kurniawan & Asriani, 2020).

Sistem *quorum sensing* pada bakteri dibedakan menjadi 2 macam yaitu: Gram positif: oligopeptida dan Gram negatif: lux IR. Pada bakteri Gram positif, *autoinducernya* adalah AIPs. Prekursor AIP disintesis, diproses, dan dimodifikasi menjadi AIP matang, selanjutnya dilepaskan melalui kompleks transpor ATP. Ketika jumlah sel meningkat, maka konsentrasi AIP ini juga meningkat. Saat mencapai *threshold*, sensor kinase mendeteksi AIP dan mengirimkan sinyal ke sel

melalui fosforilasi. Jika perubahan ekspresi gen target telah sesuai, maka persinyalan tersebut berhenti. Sedangkan pada bakteri Gram negatif, LuxI mengkatalisis pembentukan *autoinducer* AHL (*acyl homoserine lactone*), yang berdifusi masuk dan keluar sel. Ketika konsentrasi AHL mencapai *tershold*, LuxR akan mengikat *autoinducer* tersebut. kompleks antara LuxR dan AHL akan mengenali sekuens DNA tertentu, selanjutnya dapat mengaktifkan transkripsi dari sekuens gen tersebut (Asfour, 2018).



**Gambar 2.5.**Sistem *Quorum Sensing* pada Bakteri Gram Positif (kiri) dan Gram Negatif (kanan)(Asfour, 2018)

### 2.3.7 Fungsi dan Peranan Biofilm dalam Resistensi Bakteri

Bakteri dapat beralih dari bentuk planktonik ke biofilm dan sebaliknya. Bentuk planktonik memiliki tingkat pertumbuhan sel yang tinggi tetapi bentuk biofilm merupakan cara hidup alami yang lebih dominan bagi beberapa bakteri. Hal ini dikarenakan dengan membentuk biofilm, bakteri dapat meningkatkan ketahanannya. Bakteri dalam biofilm lebih toleran terhadap antibiotik daripada

bentuk planktoniknya, struktur biofilm yang keras menyebabkan antibiotik sulit untuk berpenetrasi menembus biofilm (Fitria *et al.*, 2018). Biofilm disusun oleh Substansi Polimerik Ekstraseluler (EPS) berupa matriks polimer dengan berat molekul tinggi sehingga dapat melindungi dan meningkatkan ketahanan sel bakteri terhadap lingkungan yang berbahaya (Hidayati & Liuwan, 2019).

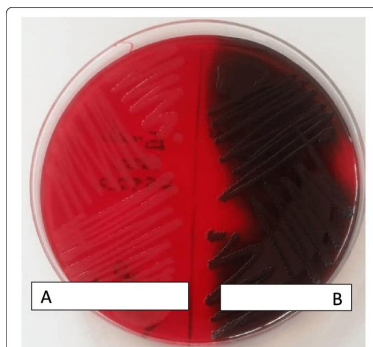
Biofilm juga merupakan bentuk peralihan bagi bakteri untuk mendapatkan nutrisi yang dibutuhkan. Dengan membentuk biofilm, bakteri dapat memperoleh nutrisi dengan melekatkan diri pada permukaan jaringan atau substrat yang kaya nutrisi. Biofilm mampu menyediakan lingkungan yang optimal serta dapat melekat kuat dan melawan gaya gesek. Sel-sel pada biofilm mampu melekat jauh lebih kuat dari bentuk planktoniknya. Selain itu, dengan membentuk biofilm, bakteri dapat membentuk koloni dan meningkatkan densitas sel sehingga sel-sel bakteri dapat melakukan komunikasi dan pertukaran informasi antarsel dengan molekul sinyal kimia (Hidayati & Liuwan, 2019).

### **2.3.8 Uji Pembentukan Biofilm**

#### **2.3.8.1 Metode *Congo Red Agar***

Deteksi pembentukan biofilm menggunakan *Congo Red Agar* (CRA) merupakan salah satu metode kualitatif. Metode ini sangat murah dan mudah diterapkan. Kriteria evaluasi didasarkan pada analisis visual warna koloni yang ditumbuhkan pada media agar. Interpretasi hasil berdasarkan kondisi berikut: bakteri yang menghasilkan koloni hitam pekat, hitam dan hitam kemerahan dengan permukaan yang kasar, kering dan kristal merupakan pembentuk biofilm,

sedangkan koloni berwarna merah muda, merah dan kemerahan dengan permukaan yang halus bukan pembentuk biofilm (Purbowati *et al*, 2017).



**Gambar 2.6.** Koloni bakteri pada *Congo Red Agar*. Koloni non-biofilm (A) dan koloni pembentuk biofilm (B) (Katongole *et al.*, 2020)

### 2.3.8.2 Metode Tabung

Metode ini termasuk metode kualitatif menggunakan tabung reaksi. Media yang digunakan yaitu TSB (*Tryptic Soy Broth*). Pada metode ini, uji dilakukan dengan pengamatan ada tidaknya garis atau bercak biofilm yang terbentuk pada dinding maupun dasar tabung. Jika terlihat adanya garis, maka hasil positif membentuk biofilm. Semakin pekat atau tebal garis yang terbentuk dibantu dengan pewarna *crystal violet* menandakan semakin banyak atau kuat pembentukan biofilm tersebut (Kirmusaoglu, 2019).



**Gambar 2.7.** Tabung menunjukkan *strong biofilm producer* (kiri), *weak biofilm producer* (tengah), dan *non biofilm producer* (kanan) (Ruchi *et al.*, 2015)



### 2.3.8.3 Metode *Microtiter Plate Assay* (MtP)

Metode ini merupakan metode kuantitatif untuk menentukan produksi biofilm. Suspensi bakteri diinokulasikan ke dalam *microplate polystyrene 96 well* steril untuk mendapatkan  $5 \times 10^5$  cfu/ml sebagai konsentrasi akhir (pengenceran sepuluh kali lipat). Pada metode ini, disiapkan kontrol negatif yaitu media ditambah dengan glukosa 1% sebagai *blank*. Nilai OD kemudian diukur pada *microplate reader*. Jika nilai OD bakteri uji lebih dari nilai OD kontrol negatif, maka bakteri tersebut positif membentuk biofilm. Perhitungan nilai *cut off* (ODcut) yaitu (Kirmusaoglu, 2019).:

$$\text{ODcut} = \text{ODc} + (3 \times \text{ODc})$$

Keterangan: ODcut = *Optical Density cut-off*  
ODc = *Optical Density control*

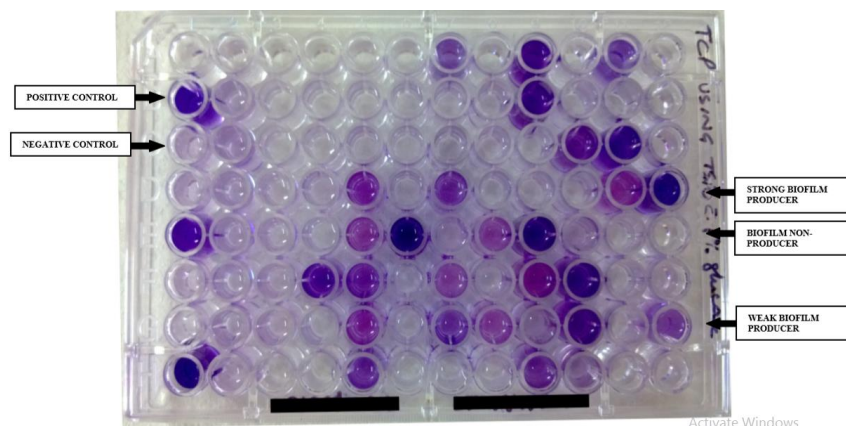
Interpretasi hasil sebagai berikut: Tidak ada produksi biofilm (0), lemah (+ atau 1), sedang (++ atau 2), dan produksi biofilm kuat (+++ atau 3) (Kirmusaoglu, 2019).

**Tabel 2. 1 Interpretasi nilai OD dan kekuatan pembentukan biofilm**

Rata-rata Nilai OD	Kekuatan Produksi Biofilm
$\text{OD}_{\text{isolat}} \leq \text{Odcut}$	<i>No biofilm production</i>
$\text{ODcut} < \text{OD}_{\text{isolat}} \leq 2 \times \text{ODcut}$	<i>Weak biofilm production</i>
$2 \times \text{ODcut} < \text{OD}_{\text{isolat}} \leq 4 \times \text{ODcut}$	<i>Moderate biofilm production</i>
$4 \times \text{ODcut} < \text{OD}_{\text{isolat}}$	<i>Strong biofilm production</i>

ODcut = *Optical Density cut off*,  $\text{OD}_{\text{isolat}}$  = *Optical Density isolat*

Sumber: Kirmusaoglu (2019)



**Gambar 2. 8**Metode *Microtiter plate* (Ruchi et al., 2015)

### 2.3.8.4 Pemeriksaan Mikroskopis Biofilm

Pemindaian menggunakan mikroskop elektron dapat dilakukan untuk mendeteksi biofilm dengan elektron pada perbesaran dan resolusi tinggi. Pemeriksaan mikroskop elektron menggunakan pewarnaan fluoresen yang rumit. Teknik yang dapat digunakan untuk mendeteksi biofilm yaitu *light microscopy*, *scanning electron microscopy*, *transmission electron microscopy*, *epifluorescent microscopy*, dan *confocal scanning laser microscopy*. Pembentukan biofilm terdiri dari tahapan penempelan sel, pembentukan mikrokoloni, dan maturasi biofilm. Selanjutnya, biofilm diberi pewarnaan dan perlakuan dengan bahan kimia tertentu sehingga densitas dan struktur biofilm dapat dideteksi melalui pemindaian elektron mikroskop (Kirmusaoglu, 2019).

## 2.4 Uji Deteksi Efektivitas Agen Antibiofilm

### 2.4.1 Metode *Microtiter Plate Assay* (MtP)

*Microtiter plate assay* (MtP) adalah uji kuantitatif untuk mendeteksi efisiensi agen antibiofilm terhadap produksi biofilm menggunakan *microplate reader*. Suspensi bakteri agen disiapkan dalam media yang sesuai dan dilengkapi dengan glukosa 1% (untuk meningkatkan produksi biofilm). Suspensi bakteri

agen dan bakteri patogen selanjutnya didispersikan ke masing-masing *well microplate* untuk diuji aktivitasnya. Setelah inkubasi pada 37°C selama 24 jam, uji dilanjutkan sesuai dengan prosedur MtP seperti yang sudah disebutkan sebelumnya untuk penentuan efek agen terhadap produksi biofilm bakteri patogen. Pada penentuan OD, jika tingkat kekeruhan media uji menurun maka nilai OD semakin kecil. Semakin kecil nilai OD menandakan efektivitas agen antibiofilm yang semakin baik (Kirmusaoglu, 2019).

#### **2.4.2 Penentuan bMIC dan bMBC dengan *Plate Counting***

Prinsip metode ini yaitu biofilm bakteri terlebih dulu dibiarkan berkembang pada *plate*. Selanjutnya ditambahkan dengan suspensi agen antibiofilm dan dilakukan kuantifikasi, biofilm bakteri yang tertanam pada *plate* dan juga biofilm yang tetap berada di permukaan *plate* dihitung dengan *plate counting*. Alat yang digunakan yaitu implan ortopedi kawat Kirschner. Kawat ini ditempatkan ke dalam tabung reaksi yang berisi  $5 \times 10^5$  cfu/mL isolat patogen dan diinkubasi untuk menumbuhkan biofilm. Setelahnya, kawat Kirschner yang menghasilkan biofilm dibilas dengan akuades steril dan dipindahkan ke tabung reaksi berisi suspensi agen antibiofilm. Dilanjutkan dengan proses sonikasi dan inokulasi pada agar Mueller-Hinton (MHA). Konsentrasi terendah agen antibiofilm di mana pertumbuhan bakteri kurang atau sama dengan kontrol ditentukan sebagai konsentrasi hambat minimum biofilm (bMIC). bMIC50 dan bMIC90 menunjukkan konsentrasi minimum zat yang menghambat 50% dan 90% bakteri yang tertanam dalam biofilm. Setelah inkubasi, konsentrasi terendah agen

di mana koloni bakteri biofilm tidak tumbuh ditentukan sebagai konsentrasi bakterisida minimum biofilm (bMBC) agen untuk biofilm (Kirmusaoglu, 2019).

### **2.4.3 Pengukuran Ekspresi Gen Terkait Biofilm dengan *Quantitative Real Time PCR* (qPCR)**

Pengukuran ekspresi gen terkait biofilm yang direpresi atau diinduksi oleh agen antibiofilm dilakukan dengan *quantitative real-time PCR* (qPCR). Sehingga aktivitas agen antibiofilm terhadap gen yang berasosiasi dengan biofilm dapat dideteksi dengan qPCR. Ekspresi gen pada patogen dipantau melalui qPCR dengan mendeteksi adanya DNA komplementer (cDNA) dari *template RNA* gen target menggunakan *probe fluorescence* seperti pewarna SYBR Green (Kirmusaoglu, 2019).

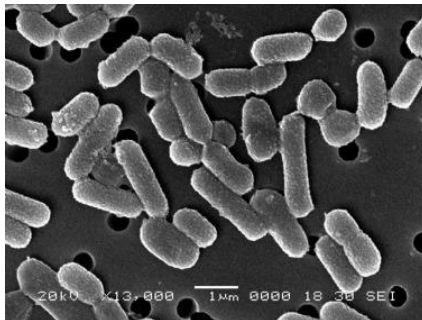
## **2.5 *Lactobacillus plantarum***

### **2.5.1 Klasifikasi *Lactobacillus plantarum***

Klasifikasi *Lactobacillus plantarum* adalah sebagai berikut (ITIS, 2012):

Kingdom	: Bacteria
Filum	: Firmicutes
Kelas	: Bacilli
Ordo	: Lactobacillales
Famili	: Lactobacillaceae
Genus	: Lactobacillus
Spesies	: <i>Lactobacillus plantarum</i>

### 2.5.2 Karakteristik *Lactobacillus plantarum*



**Gambar 2.9.** *Lactobacillus plantarum* pada mikroskop elektron (Arasu *et al.*, 2016)

Genus *Lactobacillus* adalah golongan Bakteri Asam Laktat (BAL) yang banyak dimanfaatkan di bidang yang berhubungan dengan makanan, pakan, farmasi dan bioteknologi. Misalnya sebagai starter susu, probiotik, pembawa vaksin dan inokulan silase (Huang *et al.*, 2018). *Lactobacillus plantarum* adalah bakteri gram positif berbentuk batang ( $0,5-1,2 \times 1,0-10 \mu\text{m}$ ), terdapat dalam sel tunggal atau koloni rantai pendek, bersifat mikroaerofilik dan fakultatif heterofermentatif, pertumbuhan optimumnya pada 18 jam inkubasi. Spesies ini telah menerima status GRAS (*Generally Recognized as Safe*). *L. plantarum* dapat diisolasi dari berbagai jenis tumbuhan, buah-buahan, sayuran, daging, ikan, susu, dan produk sereal (Todorov & Bermadette, 2010).

Koloni *Lactobacillus plantarum* berwarna putih kecoklatan, berbentuk titik titik kecil, cembung, permukaan halus dengan tepi *entire*. Spesies ini tidak membentuk spora, sedikit sensitif pada  $\text{SO}_2$  dan etanol. Pertumbuhan optimum umumnya terjadi setelah 18 jam inkubasi. Pada uji biokimia, *L. plantarum* negatif terhadap uji katalase, oksidase, urease, dan reduksi nitrat, tidak menghasilkan gas

dari fermentasi glukosa. Zat metabolit yang dihasilkan dominan asam laktat, tetapi juga dapat memproduksi asam asetat, asam suksinat, etanol, karbon dioksida, asam amino serta etil karbamat (Ahmad *et al.*, 2018).

### **2.5.3 Cell-Free Supernatant (CFS) *Lactobacillus plantarum* sebagai Agen Antibiofilm**

Beberapa mekanisme yang dilakukan bakteri probiotik dalam mengatasi biofilm termasuk interaksi mikrobiologis dan sekresi zat antagonis (misalnya surfaktan, bakteriosin, eksopolisakarida (EPS), asam organik, asam laktat, asam lemak, enzim (amilase, lipase) dan hidrogen peroksida (Barzegari *et al.*, 2020). Seperti probiotik lainnya, *L. plantarum* juga dapat memproduksi bahan metabolit tersebut. Zat-zat hasil metabolit tersebut umumnya dilepaskan secara ekstraseluler ke dalam media pertumbuhan sehingga dapat diekstraksi dalam bentuk supernatan. Supernatan hasil ekstraksi ini selanjutnya disebut dengan *Cell-free supernatant* (CFS) (Zamani *et al.*, 2017).

*Cell-free supernatant* (CFS) merupakan bahan potensial untuk mengatasi biofilm. Ekstrak sel ini mengandung eksopolisakarida dan biosurfaktan yang diproduksi selama pertumbuhan dan fermentasi bakteri *Lactobacillus* dalam kondisi pertumbuhan yang kompleks (Abdelhamidet *et al.*, 2018). Selain itu, CFS dari BAL juga mengandung hidrogen peroksida, metabolit oksigen, dan asam lemak jenuh yang dapat bertindak sebagai agen antibiofilm dengan mempengaruhi aktivitas sel atau matriks penyusun biofilm (Lee *et al.*, 2021).

Penghambatan biofilm oleh CFS kemungkinan dimediasi oleh eksopolisakarida yang terkandung di dalamnya melalui modifikasi permukaan sel

bakteri sehingga mencegah perlekatan awal atau bertindak sebagai molekul sinyal yang menekan ekspresi gen terkait pembentukan biofilm. Potensi penghambatan biofilm CFS bakteri probiotik dapat dikaitkan dengan represi gen yang terlibat dengan adhesi awal dan kemotaksis. Adhesi merupakan tahapan paling awal bakteri patogen untuk dapat membentuk biofilm. Penghambatan pada tahap ini berpengaruh besar pada pencegahan bakteri patogen untuk membentuk biofilm (Zamani *et al.*, 2017).

Supernatan dari kultur *Lactobacillus* sp. dapat mengurangi ekspresi gen pada patogen yang terkait dengan produksi eksopolisakarida. Matriks ini merupakan penyusun paling besar dalam biofilm (Wasfi *et al.*, 2018). CFS juga menghambat persinyalan pada sistem QS dalam biofilm bakteri patogen sehingga menghalangi asosiasi sel dan mengganggu pembentukan biofilm (Khiralla *et al.*, 2015).

Mekanisme antibiofilm lain oleh CFS yaitu mengurangi produksi biofilm dengan cara mereduksi tingkat kepadatan sel, agregasi, dan mendegradasi matriks polisakarida ekstraseluler (EPS) (Apiwatsiri *et al.*, 2021). Senyawa aktif fungsional yang terkandung dalam CFS dapat bertindak sebagai molekul yang menurunkan regulasi ekspresi gen pada sistem *quorum sensing* (QS) dan menurunkan modulasi biofilm. Penghancuran biofilm yang telah terbentuk berkaitan dengan enzim pencerna ekstraseluler di dalam CFS yang dihasilkan oleh sel probiotik. Enzim tersebut menyebabkan agregasi sel dan degradasi matriks penyusun biofilm (Zamani *et al.*, 2017).

## **BAB III METODE PENELITIAN**

### **3.1 Rancangan Penelitian**

Jenis penelitian ini merupakan penelitian eksperimental untuk menguji potensi CFS (*Cell Free Supernatant*) *Lactobacillus plantarum* sebagai agen antibiofilm terhadap biofilm *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli*. Uji pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli* dilakukan dengan metode *Congo Red Agar* (CRA) dan *microtiter plate assay* (MtP). Uji aktivitas antibiofilm dilakukan dengan metode *microtiter plate assay*. Digunakannya metode ini untuk mendapatkan nilai OD (*Optical Density*) dari tiap pengujian yang diukur melalui *Microplate Reader*. Terdapat sembilan kelompok perlakuan yang terdiri dari enam kelompok uji dan tiga kelompok kontrol. Perlakuan diulang sebanyak tiga kali.

### **3.2 Waktu dan Tempat**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April sampai Mei 2022 di Laboratorium Mikrobiologi serta Laboratorium Genetika dan Biomolekuler, Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

### **3.3 Variabel Penelitian**

#### **3.3.1 Variabel Bebas**

Variabel bebas pada penelitian ini adalah besar presentase *Cell Free Supernatant* (CFS) bakteri *Lactobacillus plantarum* yang digunakan, yaitu 12,5%, 25%, dan 50% dari 1 mL CFS *L. plantarum*.



### 3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah nilai OD dari aktivitas antibiofilm *Cell Free Supernatant* (CFS) *L. plantarum*.

### 3.3.3 Variabel Kontrol

Variabel kontrol pada penelitian ini adalah suhu dan waktu inkubasi.

## 3.4 Alat dan Bahan

### 3.4.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan analitik, gelas beker, *hot plate* dan *magnetic stirrer*, tabung reaksi, tabung erlenmeyer, pipet tetes, mikropipet dan *microtube*, cawan petri, jarum ose, autoklaf, inkubator, sentrifus, *vortex*, tabung eppendorf, *Microplate flat-bottom 96 wells*, *Microplate Reader*, spektrofotometer, *Laminar Air Flow* (LAF), kamera, kertas label, buku tulis dan bolpoin.

### 3.4.2 Bahan

Bahan yang dibutuhkan antara lain isolat bakteri uji yaitu isolat bakteri *Lactobacillus plantarum* yang diperoleh dari stok kultur Universitas Gadjah Mada Yogyakarta serta isolat bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli* yang diperoleh dari stok kultur Universitas Brawijaya Malang. Medium NA (*Nutrient Agar*), medium MRSA (*DeMan Rogosa Sharpe Agar*) dan MRSB (*DeMan Rogosa Sharpe Broth*), medium BHIA (*Brain Heart Infusion Agar*), akuades, sukrosa, pewarna merah Congo, bubuk agar, medium TSB (*Trypticase Soy Broth*), glukosa 1%, pewarna *crystal violet* 1%, asam asetat 30%, *filter paper* 0,22  $\mu$ m, aluminium foil, kertas, plastik tahan panas, kapas dan plastik *wrap*.

### 3.5 Prosedur Penelitian

#### 3.5.1 Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat dilakukan dengan membungkus alat-alat yang akan digunakan dengan aluminium foil atau kertas dan plastik tahan panas, kemudian dimasukkan ke dalam autoklaf dan disterilisasi pada suhu 121 °C tekanan 1 atm selama 15 menit.

#### 3.5.2 Pembuatan Media

Media untuk peremajaan isolat bakteri *Lactobacillus plantarum* menggunakan MRSA. Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* diremajakan menggunakan media NA. Ditimbang 6,82 gram bubuk MRSA dan dilarutkan ke dalam 100 mL akuades, dipanaskan pada *hot plate* hingga larut pada suhu 80 °C selama 30 menit. Ditimbang pula 4 gram bubuk NA dan dilarutkan pada 200 mL akuades dengan cara yang sama.

Media untuk deteksi pembentukan biofilm bakteri patogen yaitu CRA (*Congo Red Agar*). Ditimbang sebanyak 5,2 gram media BHIA (*Brain Heart Infusion Agar*), 3,6 gram sukrosa, dan 0,08 gram pewarna merah Congo. Media BHIA dan sukrosa dilarutkan ke dalam 100mL akuades dan dididihkan dengan *hot plate* sampai terlarut sempurna. Pewarna merah Congo dipisah pada wadah lain dan diautoklaf secara terpisah dengan larutan media agar. Pewarna merah Congo akan ditambahkan ke dalam media agar setelah diautoklaf saat suhu larutan media agar  $\pm 80^{\circ}\text{C}$ . Campuran media CRA kemudian dituangkan ke dalam cawan petri steril sebanyak 15 mL.

Media pertumbuhan untuk pembuatan suspensi bakteri yang digunakan yaitu TSB (*Trypticase Soy Broth*). Ditimbang bubuk TSB sebanyak 3 gram dan dicampurkan dengan 100 mL akuades. Dipanaskan pada *hot plate* sampai mendidih selama 30 menit. Media dibagi menjadi dua dengan cara dituang ke dalam dua buah tabung erlenmeyer ukuran 100 mL. Setelah semua media siap, selanjutnya dilakukan sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C tekanan 1 atm selama 15 menit. Setelah steril, ditambahkan glukosa 1% sebanyak 0,5 gram ke dalam media TSB pada salah satu tabung erlenmeyer. Penambahan glukosa 1% untuk meningkatkan pembentukan biofilm bakteri.

Media untuk pembuatan *Cell-Free Supernatant* dari isolat bakteri *Lactobacillus plantarum* menggunakan MRSB. Ditimbang 2,8 gram bubuk MRSB dan dilarutkan ke dalam 50 mL akuades, dipanaskan pada *hot plate* hingga larut pada suhu 80 °C selama 30 menit.

### **3.5.3 Peremajaan Isolat Bakteri**

Peremajaan isolat bakteri *Lactobacillus plantarum* menggunakan media MRSA. Media MRSA yang telah steril dituangkan ke dalam cawan petri sebanyak 10 mL secara steril. Cawan petri ditutup dan media dibiarkan memadat. Selanjutnya, masing-masing isolat bakteri diinokulasikan secara zigzag pada masing-masing media MRSA dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam.

Peremajaan isolat bakteri *staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli* menggunakan media NA. Sebanyak 5 mL media NA yang telah steril dituangkan ke dalam dua buah tabung reaksi yang dimiringkan. Mulut tabung ditutup dengan kapas dan dibiarkan memadat. Selanjutnya, masing-masing isolat bakteri S.

*aureus* dan *E. coli* diinokulasikan secara zigzag pada masing-masing media NA miring secara steril dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam.

#### **3.5.4 Pembuatan Cell Free Supernatant (CFS)**

Pembuatan CFS dilakukan dengan mensuspensikan 5 ose inokulum bakteri *L. plantarum* pada 45 mL media MRSB kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam. Suspensi selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit pada suhu 20°C. Setelah sentrifugasi, supernatan yang terbentuk disaring menggunakan *filter paper* steril 0,22 µm (Khiralla *et al.*, 2015).

Penentuan konsentrasi didasarkan pada hasil penelitian Lee *et al.* (2021). Berdasarkan penelitian tersebut, konsentrasi Hambat Minimum atau *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) yang diperoleh sebesar 12,5%. Maka variasi konsentrasi yang digunakan pada penelitian ini meliputi MIC-3xMIC sehingga didapatkan konsentrasi 12,5%, 25%, dan 50%. Konsentrasi 12,5% dibuat dengan melarutkan 125 µL CFS yang terbentuk setelah sentrifugasi ke dalam media TSB hingga mencapai volume 1 mL. Konsentrasi 25% dibuat dengan melarutkan 250 µL CFS ke dalam media TSB hingga mencapai volume 1 mL. Konsentrasi 50% dibuat dengan melarutkan 500 µL CFS ke dalam media TSB hingga mencapai volume 1 mL. Semua suspensi kemudian dihomogenkan dengan vortex.

#### **3.5.5 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji**

Pembuatan suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli* menggunakan media TSB yang telah dicampur dengan glukosa 1%. Masing-masing satu ose biakan murni bakteri *S. aureus* dan *E. coli* dimasukkan ke dalam masing-masing tabung reaksi berisi 5 mL media TSB dengan penambahan

glukosa secara steril kemudian dihomogenkan dengan *vortex*. Selanjutnya tabung ditutup dengan kapas dan plastik wrap lalu diinkubasikan pada suhu 37 °C selama 24 jam. Kepadatan bakteri *S. aureus* dan *E. coli* diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm hingga didapatkan OD 0,2.

### **3.5.6 Pembuatan Kelompok Kontrol**

Kelompok kontrol terdiri dari kontrol negatif dan kontrol media. Kontrol negatif menggunakan masing-masing suspensi bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli*. Kontrol media dibuat dari campuran media TSB dan glukosa 1%.

### **3.5.7 Uji Deteksi Pembentukan Biofilm**

Untuk menguji pembentukan biofilm bakteri uji, digunakan metode CRA (*Congo Red Agar*). Pada metode CRA, isolat bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli* yang telah diremajakan diinokulasikan secara steril pada cawan petri berisi media CRA dengan metode *streak* dua area. Kontrol negatif menggunakan isolat bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli* negatif biofilm yang telah diuji sebelumnya. Cawan petri selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37° C dengan kondisi aerobik (Purbowati *et al.*, 2017). Interpretasi hasil berdasarkan perubahan warna koloni pada media CRA. Apabila bakteri menghasilkan koloni berwarna hitam pekat, hitam dan hitam kemerahan dengan permukaan yang kasar, kering dan kristal merupakan pembentuk biofilm, sedangkan koloni berwarna merah muda, merah dan kemerahan dengan permukaan yang halus bukan pembentuk biofilm (Purbowati *et al.*, 2017).

Uji deteksi biofilm dilanjutkan dengan metode *Microtiter Plate Assay* (MtP) untuk mengetahui tingkatan pembentukan biofilm bakteri uji.

Diinokulasikan 200  $\mu\text{L}$  masing-masing suspensi bakteri *S. aureus* dan *E. coli* ke dalam sumur uji pada *microplate 96 well* steril. Kontrol negatif menggunakan 200  $\mu\text{L}$  campuran media TSB dan glukosa 1% dimasukkan ke dalam sumur kontrol negatif. Diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Isi *microplate* dibuang dan dibilas dengan akuades steril sebanyak tiga kali dan dikeringkan pada suhu ruang selama 15 menit. Dilakukan pewarnaan biofilm dengan memasukkan 200  $\mu\text{L}$  kristal violet 1% ke dalam masing-masing sumuran dan dibiarkan selama 20 menit. Setelahnya, *microplate* dibilas kembali dengan akuades steril sebanyak tiga kali dan dikeringkan. Ditambahkan 200  $\mu\text{L}$  asam asetat 30% ke dalam masing-masing sumuran dan didiamkan selama 15 menit. Uji dilakukan sebanyak tiga kali ulangan. Nilai OD kemudian diukur pada *microplate reader* pada panjang gelombang 595 nm. Jika nilai OD bakteri uji lebih dari nilai OD kontrol negatif, maka bakteri tersebut positif membentuk biofilm. Perhitungan nilai *cut off*(ODcut) yaitu (Kirmusaoglu, 2019).:

$$\text{ODcut} = \text{ODc} + (3 \times \text{ODc})$$

Keterangan: ODcut = *Optical Density cut-off*

ODc = *Optical Density control*

Interpretasi hasil sebagai berikut:

**Tabel 3. 1 Interpretasi nilai OD dan kekuatan pembentukan biofilm**

<b>Rata-rata Nilai OD</b>	<b>Kekuatan Produksi Biofilm</b>
$\text{OD}_{\text{isolat}} \leq \text{ODcut}$	<i>No biofilm production</i>
$\text{ODcut} < \text{OD}_{\text{isolat}} \leq 2 \times \text{ODcut}$	<i>Weak biofilm production</i>
$2 \times \text{ODcut} < \text{OD}_{\text{isolat}} \leq 4 \times \text{ODcut}$	<i>Moderate biofilm production</i>
$4 \times \text{ODcut} < \text{OD}_{\text{isolat}}$	<i>Strong biofilm production</i>

ODcut = *Optical Density cut off*,  $\text{OD}_{\text{isolat}}$  = *Optical Density isolat*

Sumber: Kirmusaoglu (2019)

### 3.5.8 Uji Aktifitas Antibiofilm

#### 3.5.8.1 Uji Pencegahan Penempelan Biofilm (Kining *et al.*,2016 dengan modifikasi)

Uji pencegahan penempelan biofilm dilakukan dengan memasukkan 3 variasi presentase yaitu 12,5%, 25%, dan 50% CFS *L. plantarum* sebanyak 200  $\mu$ L ke dalam sumur uji. Kontrol media menggunakan 200  $\mu$ L campuran media TSB dan glukosa 1% dimasukkan ke dalam sumur kontrol media. *Microplate* kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 60 menit. Selanjutnya *microplate* dibilas dengan akuades steril sebanyak tiga kali untuk mengeluarkan sisa sampel dan dikeringkan pada suhu ruang. Setelah kering, dimasukkan masing-masing 200  $\mu$ L suspensi bakteri *S. aureus* dan *E. coli* pada tiap sumur uji dan sumur kontrol negatif. Dimasukkan pula 200  $\mu$ L campuran media TSB dan glukosa 1% ke dalam sumur kontrol media. Diinkubasi selama 72 jam pada suhu 37°C. Setelah inkubasi, *microplate* dibilas dengan akuades steril tiga kali untuk mengeluarkan sel planktonik lalu dikeringkan pada suhu ruang.

Dilakukan pewarnaan menggunakan kristal violet 1% sebanyak 200  $\mu$ L yang dimasukkan ke dalam *microplate* untuk mewarnai biofilm yang terbentuk lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 20 menit. *Microplate* dibilas dengan akuades steril untuk melepaskan sel-sel yang tidak menempel pada *microplate* dan dibiarkan mengering pada suhu ruang. Selanjutnya ditambahkan 200  $\mu$ L asam asetat 30% dan diinkubasi pada suhu ruang selama 20 menit. *Microplate* diamati menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 595 nm untuk mencari

nilai OD (*Optical Density*). Perhitungan pencegahan penempelan biofilm menggunakan rumus berikut:

$$\% \text{ Pencegahan penempelan biofilm} = \frac{\text{OD}_{\text{kn}} - \text{OD}_{\text{uji}}}{\text{OD}_{\text{kn}}} \times 100\%$$

Keterangan:  $\text{OD}_{\text{kn}}$  = *Optical Density* kontrol negatif

$\text{OD}_{\text{uji}}$  = *Optical Density* uji

### 3.5.8.2 Uji Penghambatan Pembentukan Biofilm (Kining *et al.*,2016 dengan modifikasi)

Uji penghambatan pembentukan biofilm dilakukan dengan memasukkan 3 variasi presentase yaitu 12,5%, 25%, dan 50% CFS *I. plantarum* sebanyak 100  $\mu\text{L}$  ke dalam sumur uji. Setelahnya ditambahkan masing-masing 100  $\mu\text{L}$  suspensi bakteri *S. aureus* dan *E. coli* ke dalam sumur uji. Kontrol media menggunakan 200  $\mu\text{L}$  campuran media TSB dan glukosa 1% dimasukkan ke dalam sumur kontrol media, sedangkan untuk kontrol negatif ditambahkan masing-masing 200  $\mu\text{L}$  suspensi bakteri *S. aureus* dan *E. coli*. *Microplate* diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C lalu dibilas menggunakan akuades steril sebanyak 3 kali dan dikeringkan pada suhu ruang.

Dilakukan pewarnaan dengan menambahkan kristal violet 1% sebanyak 200  $\mu\text{L}$  ke dalam *microplate* dan diinkubasi selama 20 menit pada suhu ruang kemudian dibilas dengan akuades steril dan dibiarkan mengering. Selanjutnyaditambahkan asam asetat 30% sebanyak 200  $\mu\text{L}$  pada tiap sumuran di *microplate* dan diinkubasi selama 20 menit pada suhu ruang. *Microplate* diamati dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 595 nm untuk mendapatkan nilai OD. Hasil uji penghambatan pembentukan biofilm ditentukan dengan menggunakan rumus:



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

Keterangan:  $OD_{kn}$  = *Optical Density* kontrol negatif

$OD_{uji}$  = *Optical Density* uji

### 3.5.8.3 Uji Penghancuran/Degradasi Biofilm (Mohsenipour *et al.*, 2015 dengan modifikasi)

Uji penghancuran/degradasi biofilm dilakukan dengan memasukkan masing-masing 200  $\mu$ L suspensi bakteri *S. aureus* dan *E. coli* ke dalam sumur kelompok uji dan sumur kontrol negatif, sedangkan sumur kontrol media diisi dengan 200  $\mu$ L campuran media TSB dan glukosa 1%. *Microplate* kemudian diinkubasi selama 72 jam pada suhu 37°C lalu dibilas dengan akuades steril steril sebanyak 3 kali dan dikeringkan pada suhu ruang. Selanjutnya ditambahkan 3 variasi presentase yaitu 12,5%, 25%, dan 50% CFS *I. plantarum* sebanyak 200  $\mu$ L pada sumur uji, masing-masing 200  $\mu$ L suspensi bakteri *S. aureus* dan *E. coli* pada sumur kontrol negatif, dan 200  $\mu$ L campuran media TSB dan glukosa 1% pada kontrol media. *Microplate* ditutup dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit. Setelah inkubasi, *microplate* dibilas menggunakan akuades steril tiga kali dan dikeringkan.

Dilakukan pewarnaan menggunakan kristal violet 1% sebanyak 200  $\mu$ L untuk mewarnai biofilm yang terbentuk lalu diinkubasi selama 20 menit pada suhu ruang. *Microplate* dibilas dengan dengan akuades steril dan dibiarkan mengering pada suhu ruang. Selanjutnya ditambahkan asam asetat 30% sebanyak 200  $\mu$ L ke dalam *microplate* dan diinkubasi selama 20 menit pada suhu ruang. *Microplate* kemudian diamati menggunakan *microplate reader* pada panjang

gelombang 595 nm untuk mendapatkan nilai OD. Hasil uji penghancuran biofilm ditentukan dengan menggunakan rumus:

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

Keterangan:  $OD_{kn}$  = *Optical Density* kontrol negatif

$OD_{uji}$  = *Optical Density* uji

### 3.5.9 Analisis Data

Analisis data pada penelitian ini menggunakan *software* SPSS versi 25. Data hasil penelitian diuji normalitas dan homogenitas terlebih dahulu. Uji normalitas dengan uji *Shapiro-Wilk*. Jika nilai *p-value* > 0,05 maka data terdistribusi normal. Uji homogenitas dengan *Lavene's Test*. Jika nilai *p-value* > 0,05 maka data homogen. Apabila data yang diperoleh terdistribusi normal dan homogen, dilanjutkan pada uji parametrik yaitu uji *One Way ANOVA*. Tetapi apabila data yang diperoleh tidak terdistribusi normal dan tidak homogen maka dilanjutkan pada uji non-parametrik *Kruskall Wallis*.

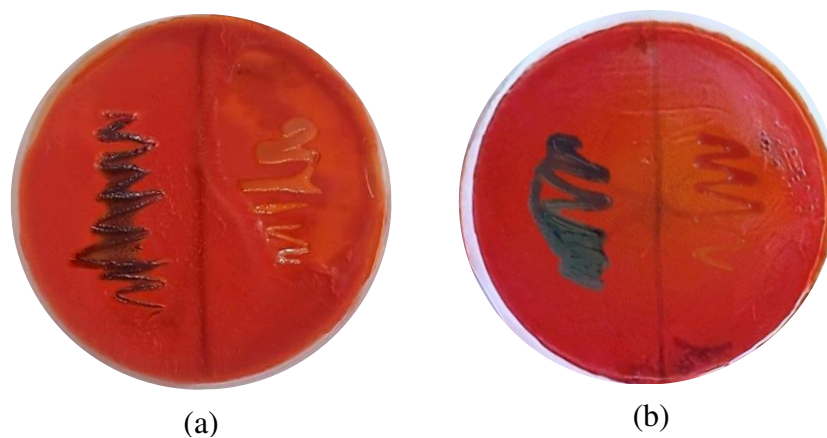
Hasil analisis data dari uji *One Way ANOVA* maupun uji *Kruskall Wallis* menunjukkan ada atau tidaknya perbedaan yang signifikan. Nilai *p-value* < 0,05 menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan, sedangkan nilai *p-value* > 0,05 menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan signifikan. Bila didapatkan perbedaan signifikan, uji *One Way ANOVA* dilanjutkan ke uji *Post-Hoc Tukey* sedangkan uji *Kruskall Wallis* dilanjutkan ke uji *Mann Whitney* untuk mengetahui perbedaan signifikansi masing-masing kelompok data. Kemudian dilanjutkan pada uji korelasi *Pearson* untuk mengetahui hubungan antara presentase CFS

*Lactobacillus plantarum* dengan besarnya nilai OD (*Optical Density*) masing-masing uji.

## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Pembentukan Biofilm *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli*

Hasil uji deteksi pembentukan biofilm bakteri *S. aureus* dan *E. coli* pada media CRA disajikan pada gambar 4.1.



**Gambar 4.1.** Hasil uji deteksi pembentukan biofilm bakteri (a) *S. Aureus* dan (b) *E. coli* pada media CRA (kiri hasil positif biofilm, kanan kontrol negatif)

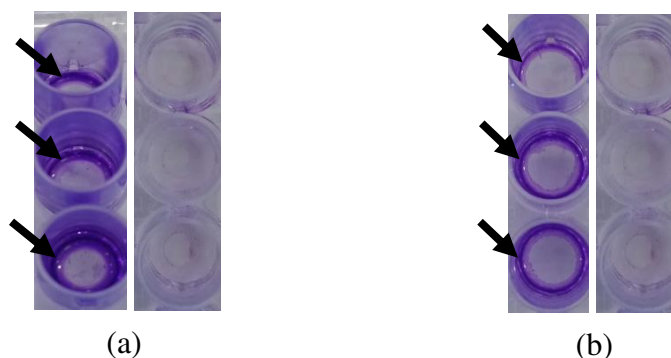
Uji deteksi pembentukan biofilm pada penelitian ini dilakukan untuk mengetahui apakah bakteri uji yang digunakan mampu membentuk biofilm. Hasil kultur kedua bakteri uji pada media CRA menunjukkan bahwa baik bakteri *S. aureus* maupun *E. coli* dapat membentuk biofilm dengan terlihatnya perubahan warna koloni menjadi hitam dan permukaan koloni yang kering. Di lain sisi, kontrol negatif yang digunakan sebagai pembanding menghasilkan koloni berwarna kemerahan dan merah. Hal ini sesuai dengan penjelasan Purbowati *et al.* (2017) mengenai interpretasi hasil uji CRA bahwa bakteri yang menghasilkan koloni hitam pekat, hitam dan hitam kemerahan dengan permukaan yang kasar,

kering dan kristal merupakan pembentuk biofilm, sedangkan koloni berwarna merah muda, merah dan kemerahan dengan permukaan yang halus bukan pembentuk biofilm.

Perubahan warna koloni bakteri disebabkan oleh perubahan pH pada media. Media CRA dibuat dari media BHIA yang ditambahkan dengan sukrosa dan pewarna *congo red*. Media BHIA memiliki kadar pH sebesar 7,4 yang berarti media tersebut bersifat netral. Media BHIA mengandung *dextrose* (glukosa) yang merupakan gula sederhana. Saat bakteri ditumbuhkan pada media, bakteri melakukan metabolisme dengan memecah molekul kompleks menjadi molekul yang lebih sederhana sehingga sukrosa yang ditambahkan pada media akan dipecah menjadi glukosa dan fruktosa (Cappucino & Sherman, 2005). Hal ini menyebabkan kadar glukosa dalam media tersebut semakin tinggi. Bakteri pembentuk biofilm melakukan metabolisme yang lebih cepat daripada bakteri non-biofilm sehingga akan lebih banyak menghasilkan glukosa dalam media. Glukosa bersifat asam dengan kadar pH sebesar 5,8 (Perez *et al.*, 2002). Peningkatan kadar glukosa menyebabkan pH media yang awalnya netral berubah menjadi asam. Furtuna *et al.* (2018) menjelaskan bahwa pewarna *congo red* pada media CRA berfungsi sebagai indikator pH. Semakin kuat tingkat keasaman media, maka koloni yang tumbuh akan berwarna hitam. Perubahan pH media menjadi asam kemudian terdeteksi oleh indikator *congo red* sehingga koloni bakteri pembentuk biofilm yang tumbuh pada media berwarna hitam.

Uji yang kedua menggunakan metode *Microtiter Plate Assay* (MtP). Suspensi bakteri *S. aureus* dan *E. coli* yang digunakan pada uji ini ditumbuhkan

dalam media TSB + 1% glukosa untuk meningkatkan pembentukan biofilm. Hal ini dijelaskan oleh Felicita (2019) yang membuktikan bahwa penambahan glukosa pada media cair memberikan pengaruh yang signifikan pada kemampuan bakteri untuk menempel satu sama lain sehingga lebih mudah untuk membentuk biofilm. Setelah proses kultur dan pencucian pada *microplate*, dilakukan pewarnaan dengan kristal violet 1%. Menurut Mohsenipour *et al.*(2015), kristal violet merupakan pewarna yang dapat berikatan dengan permukaan molekul dan polisakarida pada EPS yang menyusun struktur biofilm sehingga tidak akan hilang saat proses pencucian. Hasil deteksi uji pembentukan biofilm pada *microplate* dapat dilihat pada gambar 4.2.



**Gambar 4.2.** Hasil uji deteksi pembentukan biofilm bakteri (a) *S. aureus* dan (b) *E. coli* pada *microplate* (kiri kelompok uji, kanan kelompok kontrol negatif). Tanda panah menunjukkan plak biofilm.

Gambar di atas menunjukkan bahwa baik *S. aureus* maupun *E. coli* dapat membentuk biofilm dengan terlihatnya plak berwarna ungu pada bagian dasar dan juga dinding *well microplate* dibandingkan dengan kontrol negatif. Hal ini sesuai dengan penjelasan Lewandowski & Beyenal (2014) bahwa indikasi pembentukan biofilm pada *microplate* dapat dilihat dengan ada atau tidaknya plak pada

permukaan *microplate* baik di bagian dasar dan dinding sumuran dibantu dengan pewarnaan kristal violet. Hasil positif ditunjukkan apabila plak terbentuk dan dapat mengikat pewarna kristal violet sehingga terlihat berwarna ungu. Berdasarkan gambar di atas, terdapat perbedaan dimana bakteri *S. aureus* menghasilkan biofilm yang lebih tebal daripada *E. coli* terlihat dari lebih pekatnya warna ungu pada plak kelompok uji *S. aureus*. Dijelaskan oleh Mohsenipour *et al.* (2015) bahwa semakin tebal biofilm yang terbentuk, semakin banyak pula kristal violet yang akan terikat.

Hasil pembentukan biofilm pada *microplate* tersebut dilanjutkan dengan pengukuran nilai *Optical Density* (OD). Pengukuran nilai OD pada penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kekuatan pembentukan biofilm bakteri. Brown (2022) menjelaskan bahwa *Optical Density* (OD) adalah metode untuk mengukur pertumbuhan mikroba berdasarkan kerapatan optiknya. Nilai OD menunjukkan ukuran jumlah mikroba dalam suspensi yang berbanding lurus dengan kekeruhan media. Semakin tinggi nilai OD menandakan semakin keruh media yang berarti semakin banyak jumlah sel mikroba yang tumbuh pada media tersebut. Jika digunakan untuk mengukur pembentukan biofilm, semakin tinggi nilai OD menunjukkan semakin banyaknya biofilm yang terbentuk pada permukaan. Data nilai OD hasil uji deteksi pembentukan biofilm disajikan pada tabel 4.1.

**Tabel 4.1. Nilai OD dan Hasil Pengkategorian Biofilm**

	Ulangan ke-			Rata-rata
	1	2	3	
<i>S. aureus</i>	0,626	0,632	0,644	0,634
<i>E. coli</i>	0,231	0,240	0,248	0,240
Kontrol negatif	0,067	0,071	0,075	0,071
<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>			
$4 \times \text{ODc} < \text{OD}_{\text{isolat}}$	$2 \times \text{ODc} < \text{OD}_{\text{isolat}} \leq 4 \times \text{ODc}$			
$0,284 < 0,634$	$0,142 < 0,240 \leq 0,284$			
<i>(strong biofilm producer)</i>	<i>(moderate biofilm producer)</i>			

Sumber: Kirmusaoglu (2019)

Uji ini dilakukan untuk mengetahui tingkatan pembentukan biofilm bakteri uji dengan mengukur nilai *Optical Density* (OD) isolat bakteri uji yang dibandingkan dengan nilai OD kontrol negatif. Hasil data yang diperoleh menunjukkan bahwa kedua bakteri uji dapat membentuk biofilm ditandai dengan nilai OD isolat yang lebih besar dari OD kontrol negatif. Hal ini sesuai dengan penjelasan Kirmusaoglu (2019) bahwa jika nilai OD bakteri uji lebih dari nilai OD kontrol negatif, maka bakteri tersebut positif membentuk biofilm

Berdasarkan tabel di atas, kedua bakteri uji memiliki kemampuan pembentukan biofilm yang berbeda. Bakteri *S. aureus* merupakan pembentuk biofilm kuat karena memenuhi rumus ( $4 \times \text{ODc} < \text{OD}_{\text{isolat}}$ ), sedangkan bakteri *E. coli* membentuk biofilm sedang sesuai dengan rumus ( $2 \times \text{ODc} < \text{OD}_{\text{isolat}} \leq 4 \times \text{ODc}$ ). Kekuatan kedua bakteri uji dalam membentuk biofilm tersebut sesuai dengan penelitian sebelumnya, yaitu Neopane *et al* (2018) yang menyatakan bahwa *S. aureus* memiliki kemampuan pembentukan biofilm yang kuat serta penelitian Ramadan *et al.* (2017) yang menyatakan bahwa *E. coli* memiliki kekuatan pembentukan biofilm sedang. Menurut Lewandowski & Beyenal (2014),



bakteri pembentuk biofilm kuat (*strong biofilm producer*) mampu membentuk matriks biofilm lebih cepat dan lebih tebal daripada bakteri pembentuk biofilm sedang dan lemah (*moderate and weak biofilm producer*) dalam kurun waktu yang sama. Hal inilah yang menyebabkan bakteri pembentuk biofilm kuat seringkali lebih resisten terhadap zat antibiotik.

Pembentukan biofilm pada bakteri secara umum terdiri dari tiga tahap seperti yang dijelaskan oleh Purbowati (2016) serta Hidayati & Liuwan (2019) yaitu: *attachment* (penempelan), maturasi, dan dispersi. Pada tahap *attachment*, bakteri melakukan perlekatan antar sel serta pada permukaan secara reversibel. Setelahnya akan terjadi perlekatan ireversibel yaitu sel-sel mikroba membentuk mikrokoloni. Proses ini melibatkan sebuah komunikasi untuk pengaturan pertumbuhan yang disebut dengan *quorum sensing*. Saat komunikasi mencapai *threshold*, akan terjadi aktivasi genetik untuk memproduksi eksopolisakarida. Pada tahap maturasi, terbentuk pori-pori untuk memfasilitasi pengangkutan nutrisi, difusi oksigen dan komponen lain yang diperlukan untuk pertumbuhan bakteri serta menghilangkan produk sisa dan sel-sel mati. Pada tahap dispersi, sel-sel yang tumbuh secara aktif dalam biofilm dapat melepaskan diri menjadi bentuk planktonik kembali.

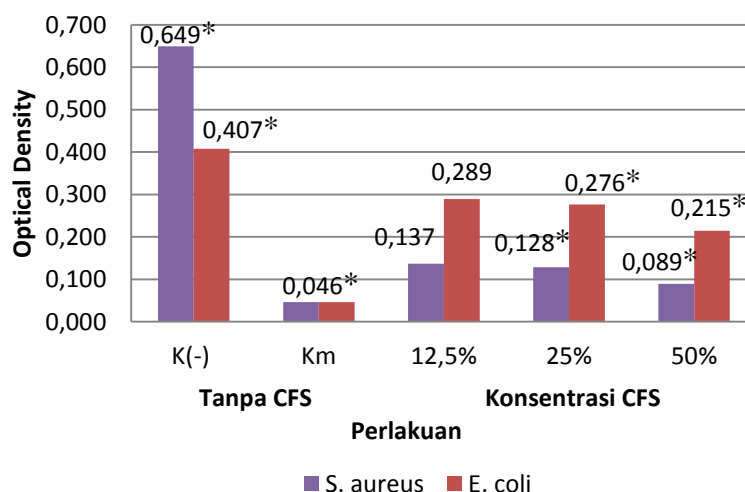
#### **4.2 Aktivitas Antibiofilm Cell-Free Supernatant *Lactobacillus plantarum* Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli***

Zat antibiofilm yang digunakan pada penelitian ini yaitu CFS hasil ekstraksi dari kultur bakteri *L. plantarum* dalam media MRSB yang diinkubasi selama 48 jam. Berdasarkan Hidayatulloh *et al.* (2019), pada jam ke 24 sampai

48, pertumbuhan *L. plantarum* berada pada fase stasioner di mana produk metabolit primer telah terakumulasi dan produk metabolit sekunder seperti eksopolisakarida dan bakteriosin sudah terbentuk. Uji aktivitas antibiofilm pada penelitian ini meliputi uji pencegahan penempelan biofilm, uji penghambatan pembentukan biofilm, dan uji penghancuran/degradasi biofilm.

#### 4.2.1 Uji Pencegahan Penempelan Biofilm *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*

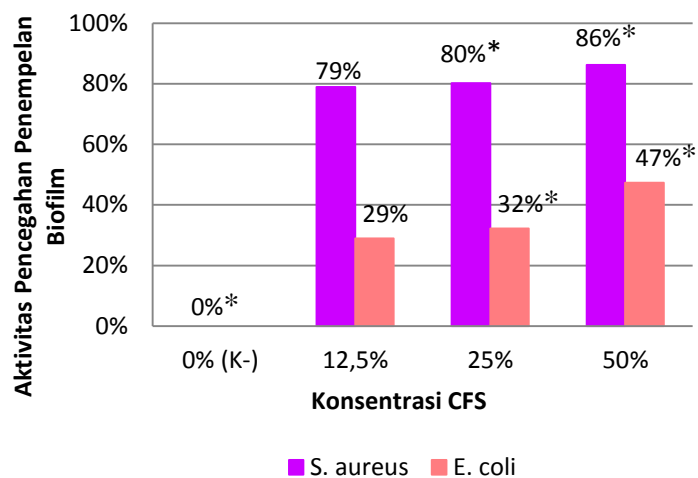
Uji pencegahan penempelan biofilm dilakukan untuk mengetahui kemampuan CFS *L. plantarum* dalam mencegah penempelan biofilm bakteri uji pada fase awal pembentukan biofilm. Hasil uji pencegahan penempelan biofilm dapat dilihat pada lampiran 6. Data hasil pengukuran OD dan presentase pencegahan penempelan biofilm disajikan pada gambar 4.2 dan 4.3.



**Gambar 4.3.** Hasil OD uji pencegahan penempelan biofilm *S. aureus* dan *E. coli*. Keterangan: Tanda (\*) menunjukkan adanya perbedaan signifikan ( $p\text{-value} < 0,05$ ).

Gambar di atas menunjukkan bahwa kontrol media menghasilkan nilai OD terendah sebesar 0,046. Sedangkan kontrol negatif yaitu suspensi bakteri uji tanpa penambahan CFS memiliki nilai OD tertinggi sebesar 0,649 untuk bakteri *S. aureus* dan 0,407 untuk bakteri *E. coli*. Nilai OD pada seluruh konsentrasi kelompok uji lebih rendah daripada kontrol negatif. Penurunan nilai OD dibandingkan dengan kontrol negatif tersebut menunjukkan bahwa ketebalan matriks biofilm yang terbentuk berkurang setelah diberi perlakuan dengan CFS dan menandakan bahwa CFS *L. plantarum* memiliki aktivitas pencegahan penempelan biofilm bakteri *S. aureus* dan *E. coli*.

Nilai OD tertinggi kelompok uji yaitu 0,137 untuk bakteri *S. aureus* dan 0,289 untuk bakteri *E. coli*, yang merupakan hasil uji pada konsentrasi 12,5% sedangkan OD terendah pada konsentrasi 50% yaitu sebesar 0,089 untuk bakteri *S. aureus* dan 0,215 untuk bakteri *E. coli*. Hal ini menunjukkan bahwa konsentrasi CFS 50% merupakan konsentrasi yang paling efektif untuk mencegah penempelan biofilm karena nilai OD yang dihasilkan paling rendah dan juga berbeda signifikan. Nilai OD menunjukkan grafik yang terus menurun dari konsentrasi 12,5% sampai konsentrasi 50%. Maka dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi konsentrasi CFS yang digunakan, semakin rendah nilai OD yang menandakan semakin baiknya tingkat pencegahan penempelan biofilm.



**Gambar 4.4. Presentase aktivitas pencegahan penempelan biofilm *S. aureus* dan *E. coli*.** Keterangan: Tanda (\*) menunjukkan adanya perbedaan signifikan ( $p\text{-value} < 0,05$ ).

Gambar di atas menunjukkan presentase pencegahan penempelan biofilm oleh CFS *L. plantarum*. Presentase pencegahan penempelan biofilm meningkat dari konsentrasi 12,5% hingga konsentrasi 50% yang menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi CFS yang digunakan, semakin tinggi pula presentase pencegahan penempelan biofilm yang dihasilkan. Hal ini dikarenakan semakin tinggi presentase CFS, semakin banyak kandungan zat antibiofilm di dalamnya sehingga dapat mencegah penempelan biofilm dengan lebih baik.

Presentase pencegahan tertinggi terdapat pada perlakuan konsentrasi CFS 50% yaitu sebesar 86% untuk bakteri *S. aureus* dan 47% untuk bakteri *E. coli*. Sedangkan presentase pencegahan terendah yaitu 79% untuk bakteri *S. aureus* dan 29% untuk bakteri *E. coli* yang dihasilkan dari perlakuan konsentrasi CFS 12,5%. Famuyide *et al.* (2019) menjelaskan bahwa suatu ekstrak dikatakan memiliki aktivitas antibiofilm yang baik dan efektif apabila dapat menghasilkan presentase

aktivitas antibiofilm sebesar  $\geq 50\%$ . Sedangkan presentase 0-49% dapat dikatakan memiliki aktivitas antibiofilm rendah. Maka dapat disimpulkan bahwa semua konsentrasi CFS yang digunakan memiliki kemampuan mencegah penempelan biofilm yang lebih baik pada *S. aureus* karena seluruhnya mampu menghasilkan konsentrasi pencegahan di atas 50% tetapi kurang efektif dalam mencegah penempelan biofilm *E. coli* karena seluruhnya menghasilkan konsentrasi kurang dari 50%.

Penempelan sel bakteri pada permukaan (*surface*) adalah proses awal dalam tahapan pembentukan biofilm. Perbedaan efek CFS terhadap hasil pencegahan penempelan biofilm bakteri uji tersebut dikarenakan kedua bakteri uji memiliki mekanisme yang berbeda dalam proses penempelannya ketika membentuk biofilm. Pembentukan biofilm *S.aureus* dimulai ketika sel-sel planktonik menempel pada permukaan dan mulai membentuk mikrokoloni (Hidayati & Liuwan, 2019). Proses ini diikuti oleh ekspresi *Polysaccharide Intercellular Adhesin* (PIA) yang dikontrol oleh operon *intracellular adhesion* (*ica*), teichoic acid, dan *Accumulation Associated Protein* (Aap) (Utami et al., 2020). Berdasarkan penelitian Lee et al. (2021), dijelaskan bahwa PIA merupakan kunci dalam pembentukan matriks biofilm dan perlekatan bakteri ke permukaan. CFS dari *L. plantarum* mampu menurunkan ekspresi operon *icaA* sehingga menurunkan kemampuan *S. aureus* untuk mensintesis PIA dan mencegah penempelannya untuk membentuk biofilm.

Berdasarkan Carrascosa et al.(2021) dan Sharma et al. (2016), pada *E coli*, virulensi berkaitan dengan perlekatan sel yang dibantu fili, flagela, fimbria

tipe 1 dan fibria curli serta protein membran. Flagela berperan dalam motilitas bakteri, flagela bersama fimbria tipe 1 membantu perlekatan awal bakteri pada permukaan. Fimbria curli meningkatkan interaksi antar sel untuk membentuk mikrokoloni. Setelah melekat, flagela akan lepas dan bakteri mulai memproduksi zat polimer ekstraseluler (EPS) yang membantu bakteri lebih tahan terhadap tekanan lingkungan dan zat antimikroba (Carrascosa *et al.*, 2021).

Efek CFS terhadap pencegahan penempelan biofilm *E. coli* yang kurang baik pada penelitian ini sesuai dengan hasil penelitian Lee *et al.* (2021) di mana CFS *L. plantarum* hanya menghasilkan presentase pencegahan biofilm *E. coli* sebesar 11,03%. Meski begitu, Lee menjelaskan bahwa CFS *L. plantarum* dapat menurunkan ekspresi gen *flagellar motor synthesis gene* (*fliA*) yang mengatur pergerakan flagel pada *E. coli* sehingga mobilitas *E. coli* terhambat dan mencegah perlekatannya untuk membentuk biofilm. Zamani *et al.* (2017) menambahkan, eksopolisakarida (EPS) di dalam CFS yang dihasilkan dari bakteri probiotik juga mencegah pembentukan biofilm *E. coli* dengan menurunkan gen produksi curli.

Hasil data uji pencegahan penempelan biofilm kemudian dianalisis secara statistik. Data diuji normalitas dan homogenitas terlebih dahulu menggunakan uji *Shapiro-Wilk* untuk menentukan normalitas data serta uji *Levene* untuk menentukan homogenitas data. Pada uji normalitas, diperoleh data dari *S. aureus* dan *E. coli* berdistribusi normal ( $p\text{-value}>0,05$ ) dan pada uji homogenitas diperoleh data *S. aureus* dan *E. coli* terdistribusi homogen ( $p\text{-value}>0,05$ ).

Pengujian selanjutnya menggunakan uji *one-way* ANOVA untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok data. Hasil

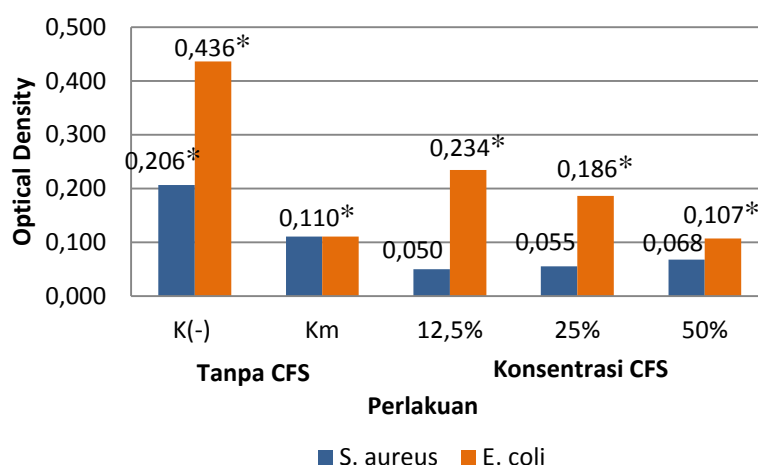
uji pada kedua jenis bakteri menunjukkan nilai  $p\text{-value} = 0,000$  yang berarti bahwa terdapat perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan uji pencegahan penempelan biofilm ( $p\text{-value} < 0,05$ ). Untuk mengetahui kelompok perlakuan mana yang memiliki perbedaan signifikan, dilakukan uji lanjut *Post Hoc Tukey* dengan kriteria bahwa jika kelompok perlakuan menghasilkan nilai signifikansi ( $p\text{-value}$ )  $< 0,05$ , maka terdapat perbedaan pengaruh secara signifikan antara pemberian masing-masing perlakuan tersebut. Hasil uji seperti yang tertera pada gambar 4.3 dan 4.4 menunjukkan bahwa pada kedua bakteri uji, didapatkan perbedaan signifikan pada kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol media, dan kelompok perlakuan konsentrasi CFS meliputi konsentrasi 25% dan 50%.

Pengujian yang terakhir yaitu uji korelasi *Pearson* untuk mengetahui hubungan tingkat pemberian CFS *L. plantarum* terhadap hasil OD pencegahan penempelan biofilm *S. aureus* dan *E. coli*. Hasil uji korelasi *Pearson* pada bakteri *S. aureus* menghasilkan nilai  $p\text{-value} = 0,004$  dan pada bakteri *E. coli* menghasilkan nilai  $p\text{-value} = 0,001$  ( $p\text{-value} < 0,05$ ) yang berarti terdapat korelasi antara besarnya konsentrasi ekstrak CFS yang digunakan dengan tingkat pencegahan penempelan biofilm kedua bakteri uji tersebut (dilihat dari nilai OD). Korelasi menunjukkan tingkat hubungan yang sangat kuat dengan nilai koefisien korelasi ( $r$ ) sebesar  $-0,847$  pada *S. aureus* dan  $-0,909$  pada *E. coli*. Kedua nilai ini menandakan arah korelasi negatif yang berarti semakin tinggi konsentrasi CFS yang digunakan menghasilkan nilai OD yang semakin rendah (tingkat pencegahan penempelan biofilm semakin tinggi). Maka dapat disimpulkan bahwa nilai OD uji pencegahan penempelan biofilm *S. aureus* dan *E. coli* dipengaruhi secara

signifikan oleh besarnya konsentrasi CFS *L. plantarum* dengan derajat korelasi sangat kuat.

#### 4.2.2 Uji Penghambatan Pembentukan Biofilm *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli*

Uji penghambatan pembentukan biofilm dilakukan untuk mengetahui kemampuan CFS *L. plantarum* dalam menghambat pembentukan biofilm bakteri uji pada fase pertumbuhan. Hasil uji pencegahan penempelan biofilm dapat dilihat pada lampiran 7. Data hasil pengukuran OD dan presentase penghambatan pembentukan biofilm disajikan pada gambar 4.4 dan 4.5.



**Gambar 4.5.** Hasil OD penghambatan pembentukan biofilm *S. aureus* dan *E. coli*. Keterangan: Tanda (\*) menunjukkan adanya perbedaan signifikan ( $p\text{-value} < 0,05$ ).

Gambar di atas menunjukkan bahwa nilai OD tertinggi dari seluruh kelompok perlakuan yaitu pada kontrol negatif sebesar 0,206 untuk bakteri *S. aureus* dan 0,436 untuk bakteri *E. coli*. Nilai OD pada seluruh konsentrasi kelompok uji lebih rendah dari kontrol negatif. Penurunan nilai OD dibandingkan

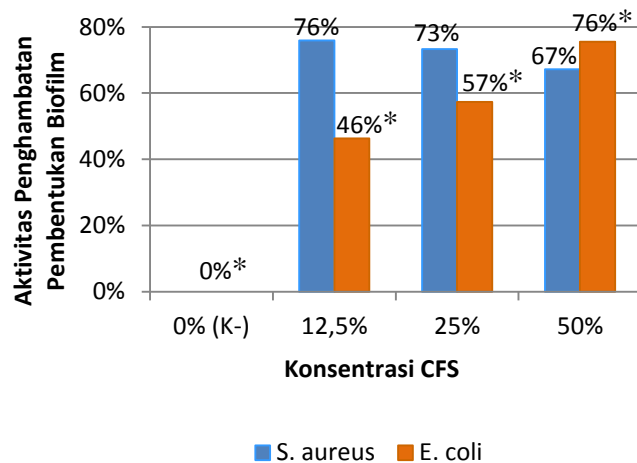


dengan kontrol negatif tersebut menandakan bahwa ketebalan matriks biofilm berkurang akibat diberi perlakuan dengan CFS *L. plantarum*. Maka dapat diketahui bahwa CFS *L. plantarum* memiliki aktiivitas penghambatan pembentukan biofilm bakteri *S. aureus* dan *E. coli*.

Terdapat perbedaan pada hasil uji penghambatan tersebut terhadap kedua jenis bakteri uji. Pada bakteri *S. aureus*, grafik nilai OD terus meningkat dari konsentrasi 12,5% hingga konsentrasi 50% sedangkan pada *E. coli*, grafik menunjukkan hasil yang sebaliknya. Peningkatan nilai OD seiring dengan peningkatan konsentrasi CFS pada *S. aureus* tersebut menunjukkan penurunan efektivitas dalam penghambatan biofilm. Hal ini kemungkinan disebabkan adanya reaksi kejenuhan reaksi antara senyawa aktif pada CFS dan targetnya. Katzung *et al.* (2012) menjelaskan apabila suatu zat atau senyawa mengalami kejenuhan reaksi terhadap reseptor targetnya, maka peningkatan dosis tidak dapat mempengaruhi peningkatan efek yang diinginkan. Wahyudi *et al.* (2018) menambahkan bahwa hubungan antara perlakuan dengan respon tidak terjamin positif, yang berarti peningkatan dosis tidak selalu menghasilkan efektivitas yang meningkat pula.

Keseluruhan nilai OD penghambatan pada *S. aureus* lebih rendah dari kontrol media. Nilai OD tertinggi pada *S. aureus* yaitu pada konsentrasi 50% sebesar 0,068 dan terendah pada konsentrasi 12,5% sebesar 0,050. Nilai OD tertinggi pada *E. coli* sebesar 0,234 pada konsentrasi 12,5%. Sedangkan pada konsentrasi 50% menghasilkan OD terendah sebesar 0,107, yang merupakan satu-satunya nilai OD yang lebih rendah dari kontrol media dibanding dua konsentrasi

lainnya. Dapat disimpulkan bahwa pada *S. aureus*, semakin tinggi konsentrasi CFS yang digunakan, semakin tinggi nilai OD yang dihasilkan menandakan semakin rendahnya tingkat penghambatan pembentukan biofilm. Konsentrasi CFS 12,5% merupakan konsentrasi yang paling efektif untuk menghambat pembentukan biofilm *S. aureus* karena nilai OD yang dihasilkan paling rendah serta tidak berbeda signifikan meskipun digunakan konsentrasi lebih tinggi. Sebaliknya, pada *E. coli*, semakin tinggi konsentrasi CFS yang digunakan, semakin rendah nilai OD yang dihasilkan dan menandakan bahwa tingkat penghambatan pembentukan biofilmnya semakin baik. Konsentrasi CFS 50% paling efektif untuk menghambat pembentukan biofilm *E. coli* karena nilai OD yang dihasilkan paling rendah dan berbeda signifikan.



**Gambar 4.6. Presentase aktivitas penghambatan pembentukan biofilm *S. aureus* dan *E. coli*.** Keterangan: Tanda (\*) menunjukkan adanya perbedaan signifikan ( $p$ -value < 0,05).

Hasil presentase penghambatan pembentukan biofilm di atas menunjukkan bahwa terjadi penurunan efektivitas penghambatan biofilm pada bakteri *S. aureus*

seiring dengan peningkatan konsentrasi CFS yang digunakan. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi CFS yang digunakan, semakin rendah presentase penghambatan pembentukan biofilm yang dihasilkan. Sebaliknya, pada bakteri *E. coli*, grafik terus meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi CFS yang menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi CFS yang digunakan, semakin tinggi pula presentase penghambatan pembentukan biofilm yang dihasilkan.

Presentase penghambatan tertinggi pada *S. aureus* terdapat pada konsentrasi 12,5% yaitu sebesar 76% dan terendah pada konsentrasi 50% sebesar 67%. Pada *E. coli*, presentase penghambatan tertinggi pada konsentrasi 50% sebesar 76%. Sedangkan presentase terendah pada konsentrasi 12,5% sebesar 46%. Berdasarkan Famuyide *et al.* (2019), aktivitas antibiofilm dikatakan baik dan efektif apabila presentase yang dihasilkan  $\geq 50\%$ . Sedangkan apabila dihasilkan presentase 0-49%, aktivitas antibiofilm dapat dikatakan rendah. Maka dapat disimpulkan bahwa seluruh konsentrasi CFS *L. plantarum* pada penelitian ini menghasilkan aktivitas penghambatan pembentukan biofilm *S. aureus* yang baik karena seluruhnya menghasilkan presentase penghambatan di atas 50%. Begitu juga terhadap *E. coli*, kecuali pada konsentrasi 12,5% yang memiliki aktivitas penghambatan pembentukan biofilm rendah karena menghasilkan presentase yang kurang dari 50%.

Proses pembentukan biofilm bakteri terus mengalami pertumbuhan dan pematangan setelah bakteri berhasil melekat pada permukaan (*surface*). Pada tahap pertumbuhan, bakteri melakukan komunikasi antar sel yang disebut dengan

*Quorum Sensing* (QS) dan mulai membentuk matriks biofilm. Pada tahap ini, senyawa dalam CFS berperan sebagai penghambat pertumbuhan biofilm. Carvalho *et al.* (2021) menyatakan bahwa CFS bakteri probiotik menghambat proliferasi biofilm *E. coli* dan *S. aureus* dengan mengurangi kepadatan sel dan biomassa biofilm setelah 24 jam kontak. Selain itu, produksi metabolit yang bersifat antagonis seperti bakteriosin dapat mengacaukan organisasi biofilm sehingga proses pembentukan matriks biofilm terganggu. Carvalho *et al.* (2020) menambahkan, EPS yang terkandung dalam CFS dapat menurunkan hidrofobisitas permukaan sel dan produksi molekul sinyal yang terlibat dalam QS sehingga menghambat pembentukan biofilm *E. coli*.

Hasil data uji penghambatan pembentukan biofilm kemudian dianalisis secara statistik. Data diuji normalitas dan homogenitas terlebih dahulu menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dan uji *Levene*. Pada uji normalitas, diperoleh data dari *S. aureus* dan *E. coli* berdistribusi normal ( $p\text{-value} > 0,05$ ) dan pada uji homogenitas diperoleh data *S. aureus* dan *E. coli* terdistribusi homogen ( $p\text{-value} > 0,05$ ).

Pengujian selanjutnya menggunakan uji *one-way* ANOVA. Hasil uji pada kedua jenis bakteri menunjukkan nilai  $p\text{-value} = 0,000$  yang berarti bahwa terdapat perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan uji penghambatan pembentukan biofilm ( $p\text{-value} < 0,05$ ). Hasil uji *Post Hoc Tukey* seperti yang tertera pada gambar 4.5 dan 4.6 menunjukkan bahwa pada *S. aureus*, didapatkan perbedaan signifikan pada kelompok kontrol negatif dan kelompok kontrol media. Pada *E. coli*, perbedaan signifikan terdapat pada seluruh kelompok perlakuan

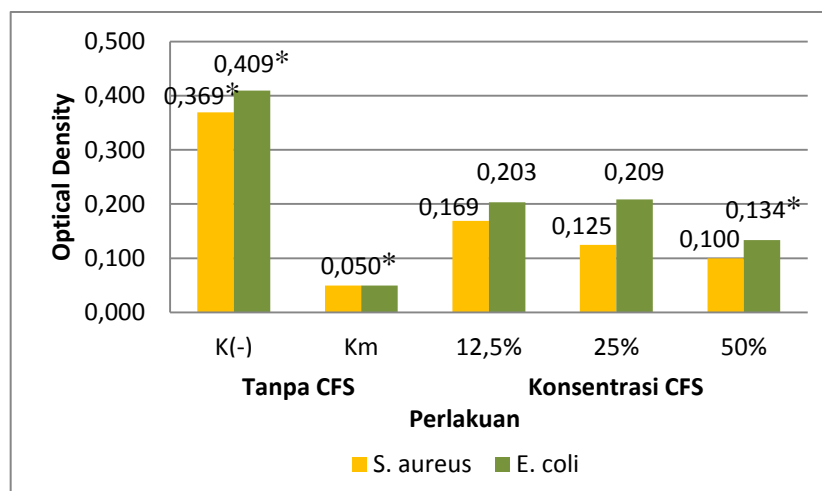
meliputi kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol media, dan kelompok perlakuan konsentrasi CFS 12,5%, 25% dan 50%. Pengujian yang terakhir yaitu uji korelasi *Pearson*. Hasil uji korelasi *Pearson* pada bakteri *S. aureus* menghasilkan nilai *p-value* = 0,003 dan pada bakteri *E. coli* menghasilkan nilai *p-value* = 0,000 (*p-value* < 0,05) yang berarti terdapat korelasi antara besarnya konsentrasi ekstrak CFS yang digunakan dengan tingkat penghambatan pembentukan biofilm kedua bakteri uji tersebut (dilihat dari nilai OD).

Korelasi menunjukkan tingkat hubungan yang sangat kuat pada kedua bakteri uji tetapi terdapat perbedaan pada arah korelasinya. Pada *S. aureus*, nilai koefisien korelasi (*r*) sebesar 0,857 menandakan arah korelasi positif yang berarti semakin tinggi konsentrasi CFS yang digunakan menghasilkan nilai OD yang semakin tinggi pula (tingkat penghambatan pembentukan biofilm semakin rendah). Sedangkan pada *E. coli*, nilai *r* = -0,947 menandakan arah korelasi negatif yang berarti semakin tinggi konsentrasi CFS yang digunakan, semakin rendah nilai OD yang dihasilkan (tingkat penghambatan pembentukan biofilm semakin tinggi). Maka dapat disimpulkan bahwa nilai OD uji penghambatan pembentukan biofilm *S. aureus* dan *E. coli* dipengaruhi secara signifikan oleh besarnya konsentrasi CFS *L. plantarum* dengan derajat korelasi sangat kuat.

#### **4.2.3 Uji Penghancuran/Degradasi Biofilm *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli***

Uji penghancuran biofilm dilakukan untuk mengetahui apakah CFS *L. plantarum* memiliki kemampuan untuk menghancurkan biofilm bakteri uji yang telah terbentuk. Hasil uji pencegahan penempelan biofilm dapat dilihat pada

lampiran 8. Data hasil pengukuran OD dan presentase penghancuran biofilm disajikan pada gambar 4.6 dan 4.7.

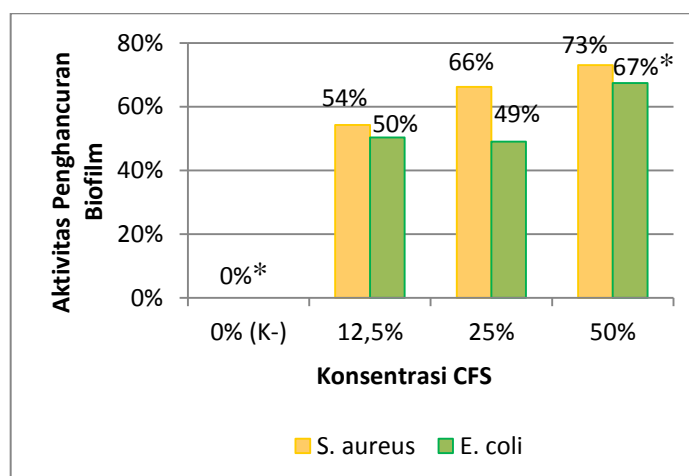


**Gambar 4.7. Hasil OD penghancuran biofilm *S. aureus* dan *E. coli*.**  
Keterangan: Tanda (\*) menunjukkan adanya perbedaan signifikan ( $p\text{-value} < 0,05$ ).

Hasil OD uji penghancuran menunjukkan bahwa kontrol media memiliki nilai OD terendah yaitu 0,050. Kontrol negatif yang merupakan suspensi bakteri uji tanpa penambahan CFS menghasilkan nilai OD tertinggi dari seluruh perlakuan yaitu sebesar 0,369 pada bakteri *S. aureus* dan 0,409 pada bakteri *E. coli*. Nilai OD pada seluruh konsentrasi kelompok uji lebih rendah dari kontrol negatif. Penurunan nilai OD dibandingkan dengan kontrol negatif tersebut menunjukkan bahwa ketebalan plak biofilm yang terbentuk berkurang setelah diberi perlakuan dengan CFS yang menandakan bahwa CFS *L. plantarum* mampu menghancurkan biofilm bakteri *S. aureus* dan *E. coli*.

Nilai OD pada kelompok uji yang tertinggi yaitu 0,169 pada *S. aureus* dengan konsentrasi CFS 12,5% serta pada *E. coli* yaitu 0,209 pada konsentrasi

CFS 25%. Sedangkan nilai OD terendah pada kelompok uji yaitu pada konsentrasi CFS 50% sebesar 0,100 untuk *S. aureus* dan 0,134 untuk *E. coli*. Konsentrasi CFS 12,5% merupakan konsentrasi yang cukup efektif untuk menghancurkan biofilm *S. aureus* karena tidak ada perbedaan signifikan pada tingkat penurunan nilai OD meskipun digunakan konsentrasi yang lebih tinggi. Konsentrasi 50% merupakan konsentrasi yang paling efektif untuk menghancurkan biofilm *E. coli* karena nilai OD yang dihasilkan paling rendah dan berbeda signifikan. Nilai OD penghancuran biofilm pada *S. aureus* semakin menurun dari konsentrasi 12,5% hingga konsentrasi 50%. Sedangkan pada *E. coli*, nilai OD sedikit meningkat dari konsentrasi 12,5% ke konsentrasi 25% tetapi tidak signifikan, kemudian menurun kembali pada konsentrasi 50%. Maka dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi konsentrasi CFS yang digunakan, semakin rendah nilai OD yang menandakan semakin baiknya tingkat penghancuran biofilm.



**Gambar 4.8. Presentase aktivitas penghancuran biofilm *S. aureus* dan *E. coli*.** Keterangan: Tanda (\*) menunjukkan adanya perbedaan signifikan ( $p$ -value < 0,05).

Hasil presentase uji penghancuran biofilm di atas menunjukkan terjadi peningkatan presentase penghancuran biofilm pada bakteri *S. aureus* seiring dengan peningkatan konsentrasi CFS yang digunakan. Hal ini berarti bahwa semakin tinggi konsentrasi CFS yang digunakan, semakin tinggi pula presentase penghancuran biofilm yang dihasilkan. Hal ini dikarenakan terdapat senyawa aktif di dalam CFS yang lebih banyak pada konsentrasi yang lebih tinggi sehingga dapat menghancurkan biofilm dengan lebih baik. Pada bakteri *E. coli*, grafik sedikit menurun dari konsentrasi 12,5% ke konsentrasi 25% tetapi tidak signifikan, lalu meningkat lagi pada konsentrasi 50%.

Presentase penghancuran tertinggi pada *S. aureus* terdapat pada konsentrasi 50% yaitu sebesar 73% dan terendah pada konsentrasi 12,5% sebesar 54%. Pada *E. coli*, presentase penghancuran tertinggi pada konsentrasi 50% sebesar 67%. Sedangkan presentase terendah pada konsentrasi 25% sebesar 49%. Berdasarkan Famuyide *et al.* (2019), aktivitas antibiofilm dikatakan baik dan efektif apabila presentase yang dihasilkan  $\geq 50\%$ . Sedangkan apabila dihasilkan presentase 0-49%, aktivitas antibiofilm dapat dikatakan rendah. Maka dapat disimpulkan bahwa seluruh konsentrasi CFS *L. plantarum* pada penelitian ini menghasilkan aktivitas penghancuran biofilm *S. aureus* yang baik karena seluruhnya menghasilkan presentase penghancuran di atas 50%. Begitu juga terhadap *E. coli*, kecuali pada konsentrasi 25% yang memiliki aktivitas penghancuran biofilm rendah karena menghasilkan presentase yang kurang dari 50%. Nilai ini menunjukkan satu-satunya hasil aktivitas penghancuran oleh CFS yang kurang baik karena presentasinya kurang dari 50%.



Biofilm bakteri terus mengalami pertumbuhan dan pematangan selama nutrisi masih tersedia. Dalam proses pematangan biofilm tersebut, struktur biofilm semakin keras, lapisan eksopolisakarida (EPS) juga semakin tebal. Kemampuan suatu bahan antibiofilm dalam menghancurkan biofilm yaitu dengan berpenetrasi menembus lapisan EPS dan mendegradasinya. Carvalho *et al.* (2021) menjelaskan bahwa CFS bakteri *Lactobacillus* secara signifikan dapat mengganggu integritas matriks biofilm *E. coli* dengan menurunkan aktivitas gen pengatur transkripsi (*luxS*, *lsrK*, dan *lsrR*) dalam sistem *Quorum Sensing* pada *E. coli* sehingga sel bakteri tidak dapat mengkatalisis pembentukan *autoinducer* AHL (*acyl homoserine lactone*) dan pada akhirnya terdispersi sehingga biofilm yang sudah terbentuk menjadi hancur. Selain itu, asam lipoteichoic yang terkandung dalam CFS jugamemiliki kemampuan untuk menghancurkan biofilm bakteri termasuk *S. aureus* dan *E. coli* yang telah terbentuk sebelumnya dengan mengganggu produksi EPS yang merupakan komponen utama pembentuk matriks biofilm.

Hasil data uji penghancuran biofilm kemudian dianalisis secara statistik. Data diuji normalitas dan homogenitas terlebih dahulu menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dan uji *Levene*. Pada uji normalitas, diperoleh data dari *S. aureus* dan *E. coli* berdistribusi normal ( $p\text{-value} > 0,05$ ) dan pada uji homogenitas diperoleh data *S. aureus* dan *E. coli* terdistribusi homogen ( $p\text{-value} > 0,05$ ).

Pengujian selanjutnya menggunakan uji *one-way* ANOVA. Hasil uji pada kedua jenis bakteri menunjukkan nilai  $p\text{-value} = 0,000$  yang berarti bahwa terdapat perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan uji penghancuran biofilm ( $p\text{-value} < 0,05$ ). Hasil uji *Post Hoc Tukey* seperti yang tertera pada gambar 4.7 dan

4.8 menunjukkan bahwa pada *S. aureus*, didapatkan perbedaan signifikan pada kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol media, dan kelompok perlakuan konsentrasi CFS 12,5%. Pada *E. coli*, perbedaan signifikan terdapat pada kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol media, dan kelompok perlakuan konsentrasi CFS 25% dan 50%.

Pengujian yang terakhir yaitu uji korelasi *Pearson* untuk mengetahui hubungan tingkat pemberian CFS *L. plantarum* terhadap hasil OD penghancuran biofilm *S. aureus* dan *E. coli*. Hasil uji korelasi *Pearson* pada bakteri *S. aureus* menghasilkan nilai *p-value* = 0,022 dan pada bakteri *E. coli* menghasilkan nilai *p-value* = 0,013 (*p-value* < 0,05) yang berarti terdapat korelasi antara besarnya konsentrasi ekstrak CFS yang digunakan dengan tingkat penghancuran biofilm kedua bakteri uji tersebut (dilihat dari nilai OD). Korelasi menunjukkan tingkat hubungan yang kuat dengan nilai koefisien korelasi (*r*) sebesar -0,742 pada *S. aureus* dan -0,779 pada *E. coli*. Kedua nilai ini menandakan arah korelasi negatif yang berarti semakin tinggi konsentrasi CFS yang digunakan menghasilkan nilai OD yang semakin rendah (tingkat penghancuran biofilm semakin tinggi). Maka dapat disimpulkan bahwa nilai OD uji penghancuran biofilm *S. aureus* dan *E. coli* dipengaruhi secara signifikan oleh besarnya konsentrasi CFS *L. plantarum* dengan derajat korelasi kuat.

Berdasarkan hasil penelitian, CFS *L. plantarum* terbukti memiliki aktivitas antibiofilm terhadap bakteri *S. aureus* dan *E. coli*. Pada *S. aureus*, aktivitas antibiofilm tertinggi secara berturut-turut terjadi pada uji pencegahan penempelan, uji penghancuran, dan uji penghambatan pembentukan biofilm. Pada *E. coli*,

aktivitas antibiofilm tertinggi berturut-turut terjadi pada uji penghambatan pembentukan, uji penghancuran, dan uji pencegahan penempelan biofilm. Dari hasil tersebut, penggunaan CFS *L. plantarum* secara keseluruhan disarankan untuk diterapkan dalam proses pencegahan penempelan biofilm. Di mana pada tahap ini, seperti yang dijelaskan oleh Hidayati & Liuwan (2019), penempelan sel bakteri pada permukaan (*surface*) adalah proses paling awal yang menentukan keberhasilan pembentukan biofilm. Dengan melakukan pencegahan pada tahap ini, maka sel-sel bakteri bahkan tidak akan mampu melekat untuk membentuk biofilm. Hal ini didukung oleh El-Mokhtar *et al.* (2020), yang juga merekomendasikan penerapan CFS dari *Lactobacilli* untuk mengendalikan infeksi yang disebabkan oleh patogen dengan cara mencegah kolonisasi patogen tersebut.

#### **4.3 Kajian Integrasi Islam Mengenai Aktivitas Antibiofilm CFS *Lactobacllus plantarum* Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli***

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli*. Berdasarkan hasil penelitian, kedua bakteri tersebut terbukti dapat membentuk biofilm pada makanan dan peralatan pengolahan pangan. Oleh karena itu, zat antibiofilm sangat dibutuhkan untuk mengatasi pembentukan biofilm bakteri patogen. Allah SWT. menjelaskan dalam QS: Ali-Imran [3]: 190-191:

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَأَخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لَآيَاتٍ لِأُولِي الْأَلْبَابِ ﴿١٩٠﴾ الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَمًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَطْلًا سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ ﴿١٩١﴾

Artinya: “*Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan silih bergantinya malam dan siang terdapat tanda-tanda bagi orang-orang yang berakal (190). (yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri atau duduk atau dalam keadan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata): "Ya Tuhan kami, tiadalah Engkau menciptakan ini dengan sia-sia, Maha Suci Engkau, maka peliharalah kami dari siksa neraka (191)"*” (Kemenag RI).

Tafsir Al-Mishbah dalam kitab Quraish Shihab (2002) menyebutkan bahwa ayat 190 di atas menegaskan tentang kepemilikan Allah SWT atas alam raya. Hukum-hukum alam yang melahirkan kebiasaan-kebiasaan, pada hakikatnya ditetapkan oleh Allah Yang Maha Hidup lagi *Qayyum* (Maha Menguasai dan Maha Mengelola segala sesuatu). Hakikat ini kembali ditegaskan pada ayat 191 bahwa salah satu bukti kebenaran hal tersebut adalah mengundang manusia untuk berpikir, karena *Sesungguhnya dalam penciptaan*, yakni kejadian benda-benda yang terdapat di *langit dan* perputaran *bumi* pada porosnya, yang melahirkan silih bergantinya *siang* dan *malam* terdapat tanda-tanda kekuasaan Allah, tidak ada zat yang dapat menandingi-Nya. Dijelaskan pula bahwa yang dinamai dengan *Ulul Albab* yaitu orang-orang yang terus menerus *mengingat Allah*, dengan ucapan atau hati dalam seluruh situasi dan kondisi. *Mereka memikirkan tentang penciptaan* yakni kejadian pada *langit dan bumi* sehingga mendapatkan kesimpulan bahwa *tiadalah Allah menciptakan* alam raya dan segala isinya ini *dengan sia-sia*. Apa yang terlihat atau terdengar terdapat kebaikan atau kekurangan.

Ayat-ayat di atas menerangkan mengenai konsep muamalah kepada Allah SWT. Hikmah yang dapat diambil dari ayat-ayat di atas yaitu bahwa segala yang terdapat di alam semesta ini merupakan bukti kekuasaan Allah, segala hal yang

diciptakan oleh Allah merupakan salah satu bukti kekuasaan-Nya dan tidak ada yang sia-sia. Dari sinilah, manusia sebagai *Ulul Albab* yang diciptakan dengan dibekali akal pikiran sudah sepatutnya menggunakannya untuk memikirkan keajaiban ciptaan Allah SWT dan mempelajari ilmu-ilmu yang terdapat di dalamnya, di mana penciptaan Allah semuanya memiliki kebermanfaatan, baik yang menguntungkan maupun merugikan, baik yang terlihat maupun tidak. Hal ini merujuk pada mikroorganisme seperti bakteri yang meskipun dirancang berukuran sangat kecil dan tidak dapat dilihat dengan mata secara langsung, tetapi pastinya memiliki fungsi tersendiri sebagaimana yang telah ditetapkan oleh Allah yang diterangkan dalam QS. Al-A'la [87]: 2-3:

الَّذِي خَلَقَ فَسَوَّى ۖ وَالَّذِي قَدَّرَ فَهَدَىٰ ﴿٣﴾

Artinya: “yang menciptakan, dan menyempurnakan (penciptaan-Nya) (2), dan yang menentukan kadar (masing-masing) dan memberi petunjuk (3)” (Kemenag RI).

Makna penggalan surat di atas menurut tafsir Al-Mishbah (Shihab, 2002) yaitu mengenai kemahatinggian Allah SWT. kemahatinggian Allah adalah Dia yang menciptakan semua makhluk dan menyempurnakannya juga menentukan kadar masing-masing serta memberi petunjuk. Atas kuasa-Nya segala makhluk dapat melaksanakan peanan yang dan fungsi yang dituntut darinya dalam rangka tujuan penciptannya. Sejalan dengan hal ini, tafsir An-Nuur (Ash Shiddieqy, 2000) menyebutkan bahwa Allah SWT telah menentukan jangka-jangka segala sesuatu sehingga tiap-tiap makhluk dapat memberikan manfaat kepada makhluk yang lain. Hal ini dapat diangkat menjadi salah satu penerapan dari konsep muamalah terhadap alam.

Keseimbangan dan ketetapan sebagaimana makna ayat di atas dari sisi biologi dapat diresapi melalui fenomena dalam mikrobiologi dimana masing-masing mikroorganisme memiliki peran yang melekat pada dirinya masing-masing sehingga dapat tercipta suatu keseimbangan di alam. Dalam penelitian ini, bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli* merupakan bakteri penyebab penyakit yang dapat membentuk biofilm. Biofilm merupakan suatu substansi yang menempel pada permukaan biotik dan abiotik yang dibentuk oleh bakteri dan sulit untuk dibersihkan karena strukturnya yang keras serta bersifat resisten. Hal ini tentunya akan menyebabkan kerusakan pada permukaan yang ditempeli serta meningkatkan resiko timbulnya penyakit. Untuk mengatasi hal tersebut, diperlukan suatu agen antibiofilm yang mampu mengendalikan biofilm sehingga dapat mencegah timbulnya penyakit maupun mengurangi kejadian infeksi akibat biofilm. Interaksi antara agen antibiofilm dan bakteri patogen pembentuk biofilm inilah yang meskipun tidak nampak secara terang-terangan, tetapi pastinya akan berkontribusi dalam terjaganya keseimbangan alam. Obat antibiofilm dapat ditemukan pula di alam dan perlu dilakukan pengujian untuk menemukan kesesuaian antara agen antibiofilm yang akan digunakan dengan target yang ditentukan. Rasulullah SAW bersabda:

إِنَّ اللَّهَ لَمْ يَنْزِلْ دَاءً إِلَّا وَأَنْزَلَ لَهُ شِفَاءً، عِلْمُهُ مَنْ عِلْمَهُ وَجَهْلُهُ مَنْ جَهْلُهُ

Artinya: “*Sesungguhnya Allah Ta’ala tidak menurunkan penyakit, kecuali Allah juga menurunkan obatnya. Ada orang yang mengetahui ada pula yang tidak mengetahuinya.*” (HR. Ahmad, Ibnu Majjah dan Al Hakim)

Hadis di atas menerangkan bahwa sesungguhnya Allah menciptakan segala sesuatu dengan pelengkap-Nya atas kekuasaan-Nya. Allah tidak akan

menurunkan setiap jenis penyakit kecuali dengan obatnya masing-masing, seperti halnya penyakit akibat biofilm bakterial. Tetapi tidak semua dapat mengetahui bagaimana bentuk dan dari mana obat tersebut berasal. Oleh karena hal itu, diperlukan sebuah penelitian sebagaimana penelitian sehingga dapat bermanfaat untuk menemukan obat antibiofilm. Hal ini merupakan salah satu penerapan dari konsep muamalah kepada sesama manusia. Salah satu agen antibiofilm yang terdapat di alam yaitu bakteri probiotik contohnya *Lactobacillus plantarum*. Bakteri tersebut berperan sebagai probiotik yang terbukti mampu meningkatkan kesehatan dan juga dilaporkan memiliki potensi sebagai agen antibiofilm. *L. plantarum* dapat menghasilkan bahan metabolit yang bersifat antagonis dan antibiofilm terhadap bakteri patogen sehingga dapat digunakan untuk mengurangi kejadian penyakit akibat biofilm.

## **BAB V PENUTUP**

### **5.1 Kesimpulan**

Kesimpulan pada penelitian ini yaitu:

1. *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri pembentuk biofilm kuat sedangkan *Eschericia coli* membentuk biofilm sedang.
2. *Cell-free supernatant Lactobacillus plantarum* memiliki aktivitas pencegahan penempelan biofilm, penghambatan pembentukan biofilm, dan penghancuran biofilm. Presentase pencegahan tertinggi pada konsentrasi 50% yaitu sebesar 86% untuk bakteri *S. aureus* dan 47% untuk bakteri *E. coli*. Presentase penghambatan tertinggi pada konsentrasi 12,5% untuk *S. aureus* dan pada konsentrasi 50% untuk *E. coli* yaitu sebesar 76%. Presentase penghancuran tertinggi pada konsentrasi 50% yaitu sebesar 73% untuk *S. aureus* dan sebesar 67% untuk *E. coli*.

### **5.2 Saran**

Penelitian ini masih memiliki banyak kekurangan. Oleh karena itu, penulis memberikan saran pada penelitian ini yaitu:

1. Diperlukan uji lebih lanjut untuk mendapatkan dosis penggunaan konsentrasi CFS *Lactobacillus plantarum* yang efektif untuk mencegah penempelan biofilm *E. coli*.
2. Diperlukan penelitian lanjutan untuk menguji aktivitas antibiofilm CFS *Lactobacillus plantarum* pada konsentrasi yang lebih tinggi dari 50%.



3. Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai senyawa spesifik yang terkandung dalam CFS *Lactobacillus plantarum* dan mekanisme senyawa tersebut dalam mengatasi biofilm.
4. Disarankan bagi peneliti selanjutnya untuk meneliti aktivitas antibiofilm CFS *Lactobacillus plantarum* dengan metode yang berbeda atau terhadap bakteri uji yang berbeda.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abdelhamid, Ahmed G., Aliaa Esaam, & Mahmoud M. Hazaa. 2018. "Cell Free Preparations of Probiotics Exerted Antibacterial and Antibiofilm Activities against Multidrug Resistant *E. Coli*." *Saudi Pharmaceutical Journal* 26 (5): 603–7.
- Ahmad, Malik S., MY Zargar, SA Mir, NA Bhat, ZA Baba, Rehana Habib Kant, Zaffar M Dar, Imtiyaz Jahangir Khan & Saba Bandey. 2018. Morphological and Biochemical Studies for the Identification of *Lactobacillus plantarum* sp. nov., and *Lactobacillus fermentum* sp. nov., from Municipal Waste. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 7(5): 1421-1424.
- Al-Qur'anul Karim dan Terjemahannya versi Kemenag RI: <https://quran.kemenag.go.id/>
- Apiwatsiri P, Pupa P, Yindee J, Niyomtham W, Sirichokchatchawan W, Lugsomya K, Shah A.A.& Prapasarakul N. 2021. Anticonjugation and Antibiofilm Evaluation of Probiotic Strains *Lactobacillus plantarum* 22F, 25F, and *Pediococcus acidilactici* 72N Against *Escherichia coli* Harboring mcr-1 Gene. *Front. Vet. Sci.* 8:614439.
- Arasu, Maridas V., Naif Abdullah Al-Dhabi, Soundharrajan H., Ki Choon Choi & Srisesharam S. 2016. In Vitro Importance of Probiotic *Lactobacillus plantarum* Related to Medical Field. *Saudi Journal of Biological Science*. 23: S6-S10.
- Asfour, Hani Z. 2018. "Anti-Quorum Sensing Natural Compounds." *Journal of Microscopy and Ultrastructure* 6(1): 1.
- Ash-Shiddieqy, Teungku M. Hasbi. 2000. *Tafsir Al-Qur'anul Majid An-Nuur*. Pustaka Rizki Putra. Semarang.
- Ayu, D.F., Bambang S.N., & Akhyar A. 2018. Karakteristik dan Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Rimpang Jeringau (*Acorus calamus* L.) Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* pada Sabun Transparan. *Jurnal Teknologi Industri Pertanian*. 28(2): 210-218.
- Barzegari, Abolfazl, Keyvan Kheyrolahzadeh, Seyed Mahdi Hosseiniyan Khatibi, Simin Sharifi, Mohammad Yousef Memar, & Sepideh Zununi Vahed. 2020. "The Battle of Probiotics and Their Derivatives Against Biofilms." *Infection and Drug Resistance*. 13: 659–72.
- Boleng, Didimus Tanah. 2015. *Bakteriologi Konsep-konsep Dasar*. UMM Press. Malang:

- Brooks, GF., Carroll KC, Butel JS, Morse, & Mietzner, T.A. 2013. *Mikrobiologi Kedokteran Jawetz, Melnick, & Adelberg*. Ed. 25. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Brown, Helen Louise. 2022. Microbial Growth. *Encyclopedia of Infection and Immunity*. 1 : 324-335.
- Cappucino, J. G & Sherman. 2005. *Microbiology A Laboratory Manual*. 7 th Ed. Perason Education. San Fransisco.
- Carrascosa, C.,Dele R., Fernando R., Ariana S. & Antonio R. 2021. Microbial Biofilms in the Food Industry—A Comprehensive Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 18: 1-31.
- Dewi, A.K., 2013. Isolasi , Identifikasi dan Uji Sensitivitas *Staphylococcus aureus* Terhadap Amoxicillin dari Sampel Susu Kambing Peranakan Ettawa (PE) Penderita Mastitis di Wilayah Girimulyo, Kulonprogo, Yogyakarta. *Sain Veteriner*, 31(2): 138–150.
- Di Somma, Angela, Antonio Moretta, Carolina Canè, Arianna Cirillo, & Angela Duilio. 2020. “Inhibition of Bacterial Biofilm Formation.” In *Bacterial Biofilms*, edited by Sadik Dincer, Melis Sümengen Özdenefe, and Afet Arkut. *IntechOpen*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.90614>.
- El-Mokhtar, M.A., Khaled M.H., Ahmed S.A., Gamal F.M.G., Mohamed M.A. & Osama F.E.H. 2020. Antagonistic Activities of Cell-Free Supernatants of Lactobacilli Against Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase Producing *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Drug Resistance*, 13: 543-542.
- Famuyide, IM., Aro AO., Fasina FO., Eloff JN. & McGraw LJ. 2019. Antibacterial and Antibiofilm Activity of Acetone Leaf Extraxts of Nine Underinvestigated South African Eugenia and Syzygium (Myrtaceae) Species and Their Selectivity Indices. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 19(141): 1-13.
- Felicita, Eka Putri S. 2019. Aktivitas Penghambatan Pembentukan Biofilm Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) Terhadap *Staphylococcus aureus*. *Skripsi*. Jurusan Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma. Yogyakarta.
- Fitria, A., Arde T.N., Yurfida M., & Achdiani C. 2018. “The Bactericidal and Antibiofilm Activity of Stem Bark of *Jatropha multifida* L. Against *Staphylococcus aureus* and MRSA.” *Jurnal Eksakta* 18 (1): 42–55.
- Furtuna, D.K., Kartuti D. & Eddy B.W. 2018. Comparison Of Microbiological Examination By Test Tube And Congo Red Agar Methods To Detect

- Biofilm Production On Clinical Isolates. *Folia Medica Indonesiana*. 54(1): 22-28.
- Gnanamani, A., Hariharan P. & Paul-Satyaseela M. 2017. '*Staphylococcus aureus*: Overview of Bacteriology, Clinical Diseases, Epidemiology, Antibiotic Resistance and Therapeutic Approach' in Enany, S. & Crotty A.L.E. (eds), *Frontiers in Staphylococcus aureus*. InTech. doi: 10.5772/67338
- Hidayati, Afif Nurul, & Chesia Christiani Liuwan. 2019. "Peran Biofilm terhadap Infeksi Saluran Genital yang disebabkan oleh Vaginosis Bakterial" 31 (2): 9.
- Hidayatulloh, A., Jajang G. & Ellin H. 2019. Potensi Senyawa Metabolit yang Dihasilkan *Lactobacillus Plantarum* ATCC 8014 sebagai Bahan Biopreservasi dan Anti Bakteri pada Bahan Pangan Asal Hewan. *JTTP*. 7(2): 1-6.
- Huang, Chien-Hsun, Shiao-Wen Li, Lina Huang, & Koichi Watanabe. 2018. Identification and Classification for the *Lactobacillus plantarum* Group. *Front. Microbiol.* 9:1974.
- Idrees, M., Sheeba Sawani, Nazira Karudia, & Ayesha Rahman. 2021. "Staphylococcus aureus Biofilm: Morphology, Genetics, Pathogenesis and Treatment Strategies." *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 18(7602): 1-20.
- Kang, Jiamu, Wenyuan Jin, Jingfan Wang, Yuyang Sun, Xiaoxia Wu, & Liu Liu. 2019. Antibacterial and Anti-Biofilm Activities of Peppermint Essential Oil Against *Staphylococcus aureus*. *LWT-Food Science and Technology*. 101: 639-645.
- Katongole, Paul, Fatuma Nalubega, Najjuka C.F., Benon A., & Irene Andia. 2020. Biofilm Formation, Antimicrobial Susceptibility and Virulence Genes of Uropathogenic *Escherichia coli* Isolated from Clinical Isolates in Uganda. *BMC Infectious Diseases*. 20(1): 453.
- Katzung, Betram G. 2012. *Farmakologi Dasar dan Klinis Edisi 10*. EGC. Jakarta.
- Khiralla, Ghada M., Eman A.H. Mohamed, Azza G. Farag & Hesham Elhariry. 2015. Antibiofilm Effect of *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus plantarum* Cell-free Supernatants Against Some Bacterial Pathogens. *Journal of Biotech Research*. 6:86-95.
- Kining, Ekajayanti, Syamsul Falah, & Novik Nurhidayati. 2016. The *In Vitro* Antibiofilm Activity of Water Leaf Extract of Papaya (*Carica papaya* L.) Against *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Biochemistry*. 2(3): 150-163.

- Kirmusaoglu, Sahra. 2019. "The Methods for Detection of Biofilm and Screening Antibiofilm Activity of Agents." In *Bacterial Biofilms*, IntechOpen.<http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.84411>.
- Kurniawan, Andri&Euis Asriani. 2020. "Review: Quorum Sensing Bakteri dan Peranannya pada Perubahan Nilai pH di Kolong Pascatambang Timah dengan Umur Berbeda." *Jurnal Ilmu Lingkungan* 18 (3): 602–9.
- Lee, Ji-Eun, Na-Kyoung Lee & Hyun-Dong Paik. 2021. Antimicrobial and ANTI-Biofilm Effects of Probiotic *Lactobacillus plantarum* KU200656 Isolated from Kimchi. *Food Sci Biotechnol*. 30(1):97–106.
- Lewandowski, Zbigniew & Haluk Beyenal. 2014. *Fundamentals of Biofilm Research Second Edition*. CRC Press. New York.
- Ma, Zhi, Emmanuel W.B., Kim S., Xiaomei B., Yan D.N. & Tim A. McAllister. 2019. Biofilm Formation by Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* on Stainless Steel Coupons as Affected by Temperature and Incubation Time. *Microorganisms*. 7(95):1-11.
- Mekky, A.F., Wesam A.H., Fifi M.R. & Hanan M.E. 2022. Anti-biofilm Potential of *Lactobcillus plantarum* Y3 Culture and Its Cell-Free Supernatant Against Multidrug-Resistant Uropathogen *Eschericia coli* U12. *Saudi Journal of Biological Science*. 1 : 1-9.
- Mohsenipour, Zeinab & Mehdi Hassanshahian. 2015. The Effects of *Allium sativum* Extracts on Biofilm Formation and Activities of Six Pathogenic Bacteria. *Jundishapur Journal Microbiology*. 8(8): 1-7.
- Neopane, P., Nepal, H. P., Shrestha, R., Uehara, O., & Abiko, Y. 2018. In Vitro Biofilm Formation by *Staphylococcus aureus* Isolated from Wounds of Hospital-Admitted Patients and Their Association with Antimicrobial Resistance. *International Journal of General Medicine*, 11: 25–32.
- Perez, J., J. Munoz-Dorado, T. de la Rubia & J. Martinez. 2002. Biodegradation and Biological Treatments of Cellulose, Hemisellulose and Lignin: An Overview. *International Microbiology*. 5:53-63
- Purbowati, Rini. 2016. Hubungan Biofilm dengan Infeksi : Implikasi pada Kesehatan Masyarakat dan Strategi Mengontrolnya. *Jurnal Ilmiah Kedokteran*, 5(1): 1-14.
- Purbowati, R., Emillia D.D.R., & Fuad A. 2017. Kemampuan Pembentukan Slime pada *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, MRSA dan *Escherichia coli*. *Jurnal Florea Volume*. 4(2): 1-7.
- Rahayu, W. P., Siti N., & Ema K. 2018. *Escherichia coli: Patogenitas, Analisis, dan Kajian Risiko*. IPB Press. Bogor.

- Ramadan, E.M., Khadiga A. Abou-Taleb, Gehan F.G. & Nermin S. Abdel-Hamid. 2017. Antibacterial, Antibiofilm and Antitumor Activities of Grape and Mulberry Leaves Ethanolic Extracts Towards Bacterial Clinical Strains. *Annals of Agricultural Sciences*. 62 : 151-159.
- Retrieved [Oktober, 27, 2021], from the Integrated Taxonomic Information System (ITIS) 2012 on-line database, [www.itis.gov](http://www.itis.gov), [CC0](#)
- Ruchi, Tayal, Baveja Sujata, & De Anuradha. 2015. "Comparison of Phenotypic Methods for the Detection of Biofilm Production in Uro-Pathogens in a Tertiary Care Hospital in India," *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 4(9): 840-849.
- Sharma, G., S. Sharma, P. Sharma, D. Chandola, S. Dang, S. Gupta, & R. Gabrani. 2016. *Escherichia coli* Biofilm: Development and Therapeutic Strategies. *Journal of Applied Microbiology*, 121(2): 309-319.
- Shihab, M. Quraish. 2002. *Tafsir Al-Mishbah: Pesan, Kesan dan Keserasian Al-Qur'an*. Lentera Hati. Jakarta.
- Todorov, Svetoslav D. & Bernadette Dora G.D.M.F. 2010. *Lactobacillus Plantarum*: Characterization of the Species and Application in Food Production. *Food Reviews International*. 26(3): 205-229.
- Triana, Evi. 2018. Aktivitas Antibiofilm Bakteri *Escherichia coli* Oleh Bakteriofag Secara *In Vitro*. *Berita Biologi* 17(1): 77-84.
- Utami, P.S.M., Noorhamdani, & Masruroh R. 2020. Efek Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum sanctum*) dalam Menghambat Pembentukan Biofilm *Staphylococcus aureus* secara *In Vitro*. *Journal of Agromedicine and Medical Sciences*. 6(3): 168-173.
- Vasanthakumari, R. 2007. *Textbook of Microbiology*. BI Publication. New Delhi.
- Wahyudi, A., Bahar Y. & Septiawati P. 2018. Pengaruh Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum basilicum L Folium*) Terhadap Kadar SGOT dan SGPT Tikus Putih (*Rattus norvegicus* strain wistar) yang Diinduksi MSG. *Herb-Medicine Journal*. 1(1): 31-38.
- Wasfi, R., Abd El-Rahman, O. A., Zafer, M. M. & Ashour, H. M. 2018. Probiotic *Lactobacillus* sp. Inhibit Growth, Biofilm Formation and Gene Expression of Caries-inducing *Streptococcus mutans*. *J. Cell Mol. Med*. 22: 1972–1983.
- Yeganeh, M., Hedayat H., Sedigheh M., Elham S.T. & Seyed M.Z. 2017. Antibiofilm Effects of Lactobacilli against Ciprofloxacin-Resistant Uropathogenic *Escherichia coli* strains in Pasteurized Milk. *Applied Food Biotechnology*, 4(4):241-250.

- Yana, X., S. Gu, X. Cui, Y. Shi, S. Wen, H. Chen, & J. Ge. 2019. Antimicrobial, Anti-Adhesive and Anti-Biofilm Potential of Biosurfactants Isolated from *Pediococcus acidilactici* and *Lactobacillus plantarum* Against *Staphylococcus aureus* CMCC26003. *Microbial Pathogenesis*. 127:12- 20.
- Zamani, Hojjatolah, Saeid Rahbar, Seyed Reza G., Anahita Afsah S., & Hannaneh Jafari. 2017. Antibiofilm Potential of *Lactobacillus plantarum* spp. Cell Free Supernatant (CFS) Against Multidrug Resistant Bacterial Pathogens. *Pharm Biomed Res*. 3(2): 39-44.

## LAMPIRAN

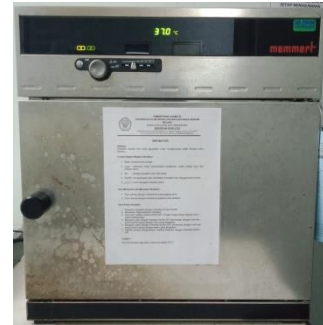
### Lampiran 1. Alat-alat yang Digunakan pada Penelitian



Autoklaf



Autoklaf  
dekstruksi



Inkubator



Neraca analitik



Vortex



Laminar Air Flow (LAF)



Hot plate



Spektrofotometer



Microplate reader



## Lampiran 2. Komposisi Media

### 1. NA (Nutrient Agar) (gr/L) :

Lab-Lemco Powder	: 1 gram
Yeast Extract	: 2 gram
Peptone	: 5 gram
Sodium Chloride (NaCl)	: 5 gram
Agar	: 15 gram
Water	: 1 Liter
pH akhir	: $7.4 \pm 0.2 @ 25^{\circ}\text{C}$

### 2. MRS (*de Man Rogosa Sharpe*) Agar (gr/L) :

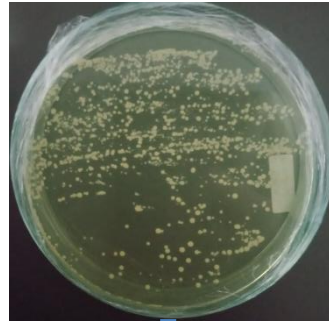
Dextrose	: 20 gram
Bacteriological peptone	: 10 gram
Beef extract	: 8 gram
Sodium acetate	: 5 gram
Yeast extract	: 4 gram
Dipotassium phosphate	: 2 gram
Ammonium citrate	: 2 gram
Tween 80	: 1 gram
Magnesium sulfate	: 0,2 gram
Manganese sulfate	: 0,05 gram
Bacteriological agar	: 10 gram
pH akhir	: 5 - 6,5

### 3. MRS (*de Man Rogosa Sharpe*) Broth (gr/L) :

Proteose peptone	: 10 gram
HM Peptone B#	: 10 gram
Dextrose	: 20 gram
Sodium acetate	: 5 gram
Yeast extract	: 5 gram
Dipotassium phosphate	: 2 gram
Ammonium citrate	: 2 gram
Tween 80	: 1 gram
Magnesium sulfate	: 0,1 gram
Manganese sulfate	: 0,05 gram
Final pH (at $25^{\circ}\text{C}$ )	: $6.5 \pm 0.2$

4. TSB (Typtone Soya Broth) (gr/L) :
- |                                |            |
|--------------------------------|------------|
| Pancreatic digest of casein    | : 17 gram  |
| Papaic digest of soyabean meal | : 3 gram   |
| Sodium chloride                | : 5 gram   |
| Dextrose                       | : 2,5 gram |
| Dibasic potassium phosphate    | : 2,5 gram |
| Final pH (at 25°C)             | : 7.3±0.2  |
5. BHIA (Brain Heart Infusion Agar) (gr/L) :
- |                           |           |
|---------------------------|-----------|
| Calf Brain Infusion Padat | : 200gram |
| Beef Heart Infusion Padat | : 250gram |
| Protease Pepton           | : 10gram  |
| Dextrose                  | : 2gram   |
| Sodium Chloride           | : 5gram   |
| Disodium Phosphate        | : 2,5gram |
| Agar                      | : 15 gram |
| Final pH (at 25°C)        | : 7.4±0.2 |

**Lampiran 3.** Proses Pembuatan *Cell-Free Supernatant* (CFS) *L. plantarum*



Kultur bakteri *L. plantarum* pada media MRSA



Kultur bakteri *L. plantarum* pada media MRSB setelah inkubasi selama 48 jam



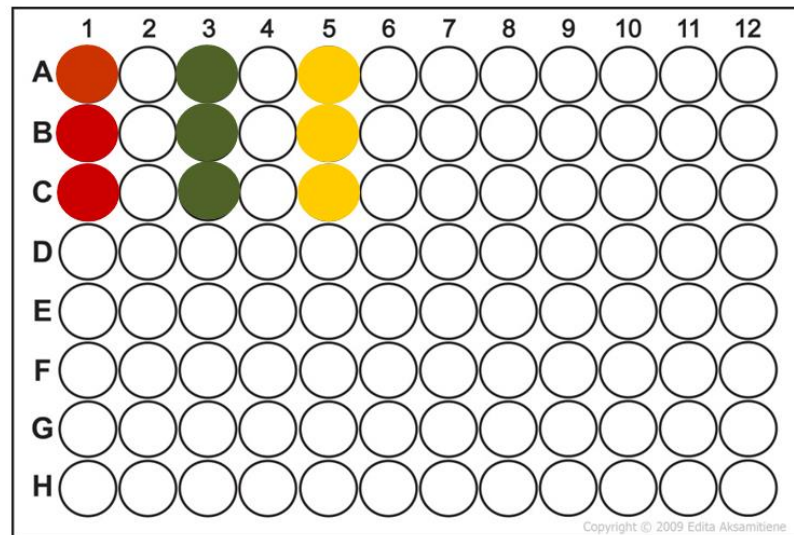
Hasil CFS setelah disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm, 20°C selama 15 menit






Hasil CFS setelah disaring menggunakan *filter paper* 0,22 µm



Pembuatan tiga macam konsentrasi CFS (12,5 %, 25%, dan 50% dengan penambahan media TSB)

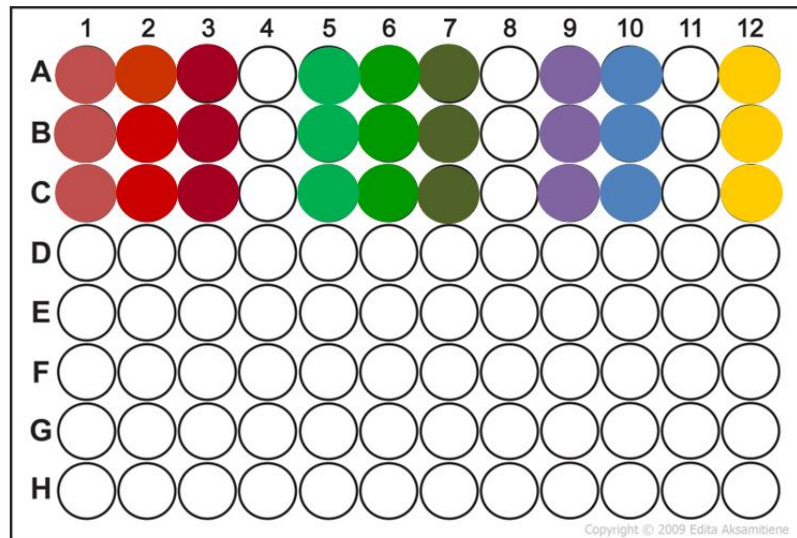
**Lampiran 4.** Gambaran Uji Deteksi Pembentukan Biofilm pada *Microplate***Gambaran Uji Deteksi Pembentukan Biofilm pada *Microplate***

Keterangan:

-  Kelompok uji suspensi *S. aureus*
-  Kelompok uji suspensi *E. coli*
-  Kelompok kontrol media

**Lampiran 5.** Gambaran Uji Aktivitas Antibiofilm pada *Microplate*

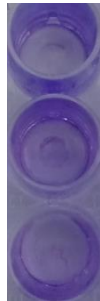
**Gambaran Uji Pencegahan Penempelan Biofilm, Penghambatan Pembentukan Biofilm, dan Penghancuran Biofilm pada *Microplate***



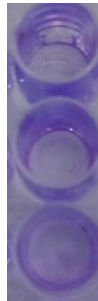
Keterangan:

- Kelompok uji CFS 12,5% pada *S. aureus*
- Kelompok uji CFS 25% pada *S. aureus*
- Kelompok uji CFS 50% pada *S. aureus*
- Kelompok uji CFS 12,5% pada *E. coli*
- Kelompok uji CFS 25% pada *E. coli*
- Kelompok uji CFS 50% pada *E. coli*
- Kelompok kontrol negatif *S. aureus*
- Kelompok kontrol negatif *E. coli*
- Kelompok kontrol media

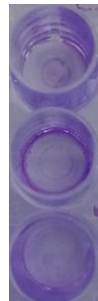
**Lampiran 6.** Hasil Uji Aktivitas Pencegahan Penempelan Biofilm pada *Microplate*



Konsentrasi  
CFS 12,5%  
pada *S. aureus*



Konsentrasi  
CFS 25% pada  
*S. aureus*



Konsentrasi  
CFS 50% pada  
*S. aureus*



Kontrol  
negatif(bakteri  
*S. aureus*)



Kontrol  
media



Konsentrasi  
CFS 12,5%  
pada *E. coli*



Konsentrasi  
CFS 25% pada  
*E. coli*



Konsentrasi  
CFS 50% pada  
*E. coli*

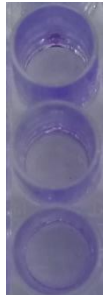


Kontrol  
negatif(bakteri  
*E. coli*)



Kontrol  
media

**Lampiran 7.** Hasil Uji Aktivitas Penghambatan Pembentukan Biofilm pada *Microplate*



Konsentrasi  
CFS 12,5%  
pada *S. aureus*



Konsentrasi  
CFS 25% pada  
*S. aureus*



Konsentrasi  
CFS 50% pada  
*S. aureus*



Kontrol  
negatif(bakteri  
*S. aureus*)



Kontrol  
media



Konsentrasi  
CFS 12,5%  
pada *E. coli*



Konsentrasi  
CFS 25% pada  
*E. coli*



Konsentrasi  
CFS 50% pada  
*E. coli*



Kontrol  
negatif(bakteri  
*E. coli*)



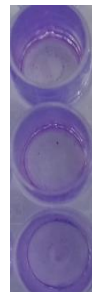
Kontrol  
media

**Lampiran 8.** Hasil Uji Aktivitas Penghancuran Biofilm pada *Microplate*

Konsentrasi  
CFS 12,5%  
pada *S. aureus*



Konsentrasi  
CFS 25% pada  
*S. aureus*



Konsentrasi  
CFS 50% pada  
*S. aureus*



Kontrol  
negatif(bakteri  
*S. aureus*)



Kontrol  
media



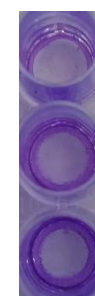
Konsentrasi  
CFS 12,5%  
pada *E. coli*



Konsentrasi  
CFS 25% pada  
*E. coli*



Konsentrasi  
CFS 50% pada  
*E. coli*



Kontrol  
negatif(bakteri  
*E. coli*)



Kontrol  
media



## Lampiran 9. Data Hasil Uji Antibiofilm

### A. Uji Pencegahan Penempelan Biofilm

Perlakuan	Konsentrasi CFS	Ulangan Ke-			Rata-rata $\pm$ SD	% Pencegahan
		1	2	3		
<i>S. aureus</i>	12,5%	0,124	0,148	0,139	0,137 $\pm$ 0,012	79%
	25%	0,124	0,128	0,133	0,128 $\pm$ 0,005	80%
	50%	0,105	0,072	0,091	0,089 $\pm$ 0,017	86%
<i>E. coli</i>	12,5%	0,287	0,288	0,293	0,289 $\pm$ 0,003	29%
	25%	0,292	0,276	0,261	0,276 $\pm$ 0,016	32%
	50%	0,217	0,208	0,219	0,215 $\pm$ 0,006	47%
K(-) SA	0%	0,643	0,661	0,644	0,649 $\pm$ 0,010	0%
K(-) EC	0%	0,432	0,391	0,399	0,407 $\pm$ 0,022	0%
Km	0%	0,058	0,042	0,038	0,046 $\pm$ 0,011	

### B. Uji Penghambatan Pembentukan Biofilm

Perlakuan	Konsentrasi CFS	Ulangan Ke-			Rata-rata $\pm$ SD	% Penghambatan
		1	2	3		
<i>S. aureus</i>	12,5%	0,045	0,051	0,053	0,050 $\pm$ 0,004	76%
	25%	0,051	0,058	0,056	0,055 $\pm$ 0,004	73%
	50%	0,062	0,075	0,066	0,068 $\pm$ 0,007	67%
<i>E. coli</i>	12,5%	0,238	0,224	0,240	0,234 $\pm$ 0,009	46%
	25%	0,214	0,193	0,151	0,186 $\pm$ 0,032	57%
	50%	0,105	0,101	0,114	0,107 $\pm$ 0,007	76%
K(-) SA	0%	0,218	0,202	0,198	0,206 $\pm$ 0,011	0%
K(-) EC	0%	0,443	0,445	0,420	0,436 $\pm$ 0,014	0%
Km	0%	0,101	0,108	0,122	0,110 $\pm$ 0,011	

### C. Uji Penghancuran/Degradasi Biofilm

Perlakuan	Konsentrasi CFS	Ulangan Ke-			Rata-rata $\pm$ SD	% Penghancuran
		1	2	3		
<i>S. aureus</i>	12,5%	0,228	0,146	0,133	0,169 $\pm$ 0,052	54%
	25%	0,135	0,125	0,114	0,125 $\pm$ 0,011	66%
	50%	0,098	0,110	0,091	0,100 $\pm$ 0,010	73%
<i>E. coli</i>	12,5%	0,181	0,211	0,218	0,203 $\pm$ 0,020	50%
	25%	0,190	0,226	0,210	0,209 $\pm$ 0,018	49%
	50%	0,128	0,139	0,134	0,134 $\pm$ 0,006	67%
K(-)	0%	0,320	0,406	0,381	0,369 $\pm$ 0,044	0%
K(-)	0%	0,410	0,422	0,396	0,409 $\pm$ 0,013	0%
Km	0%	0,062	0,046	0,041	0,050 $\pm$ 0,011	

## Lampiran 10. Analisis Data Uji Pencegahan Penempelan Biofilm

### A. Uji Pencegahan Penempelan Biofilm *S. aureus*

#### 1. Uji Normalitas *Shapiro-Wilk*

Perlakuan	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	Df	Sig.	Statistic	df	Sig.
CFS 12,5%	,232	3	.	,980	3	,726
CFS 25%	,196	3	.	,996	3	,878
CFS 50%	,207	3	.	,992	3	,833
Kontrol negatif	,368	3	.	,792	3	,094
Kontrol media	,314	3	.	,893	3	,363

a. Lilliefors Significance Correction

#### 2. Uji Homogenitas *Levene*

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Optical Density	Based on Mean	,975	4	10	,463
	Based on Median	,398	4	10	,806
	Based on Median and with adjusted df	,398	4	8,006	,805
	Based on trimmed mean	,927	4	10	,486

#### 3. Uji *One-way* ANOVA

ANOVA					
Optical Density					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,739	4	,185	1408,929	,000
Within Groups	,001	10	,000		
Total	,741	14			

#### 4. Uji Post Hoc Tukey

##### Multiple Comparisons

Dependent Variable: Optical Density

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean			95% Confidence Interval	
		Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	Lower Bound	Upper Bound
CFS 12,5%	CFS 25%	,008667	,009352	,880	-,02211	,03945
	CFS 50%	,047667*	,009352	,003	,01689	,07845
	Kontrol negatif	-,512333*	,009352	,000	-,54311	-,48155
	Kontrol media	,091000*	,009352	,000	,06022	,12178
CFS 25%	CFS 12,5%	-,008667	,009352	,880	-,03945	,02211
	CFS 50%	,039000*	,009352	,013	,00822	,06978
	Kontrol negatif	-,521000*	,009352	,000	-,55178	-,49022
	Kontrol media	,082333*	,009352	,000	,05155	,11311
CFS 50%	CFS 12,5%	-,047667*	,009352	,003	-,07845	-,01689
	CFS 25%	-,039000*	,009352	,013	-,06978	-,00822
	Kontrol negatif	-,560000*	,009352	,000	-,59078	-,52922
	Kontrol media	,043333*	,009352	,006	,01255	,07411
Kontrol negatif	CFS 12,5%	,512333*	,009352	,000	,48155	,54311
	CFS 25%	,521000*	,009352	,000	,49022	,55178
	CFS 50%	,560000*	,009352	,000	,52922	,59078
	Kontrol media	,603333*	,009352	,000	,57255	,63411
Kontrol media	CFS 12,5%	-,091000*	,009352	,000	-,12178	-,06022
	CFS 25%	-,082333*	,009352	,000	-,11311	-,05155
	CFS 50%	-,043333*	,009352	,006	-,07411	-,01255
	Kontrol negatif	-,603333*	,009352	,000	-,63411	-,57255

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

#### 5. Uji Korelasi Pearson

		Konsentrasi	
		CFS	Optical Density
Konsentrasi CFS	Pearson Correlation	1	-,847**
	Sig. (2-tailed)		,004
	N	9	9
Optical Density	Pearson Correlation	-,847**	1
	Sig. (2-tailed)	,004	
	N	9	9

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

## B. Uji Pencegahan Penempelan Biofilm *E. coli*

### 1. Uji Normalitas *Shapiro-Wilk*

Perlakuan	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
CFS 12,5%	,328	3	.	,871	3	,298
CFS 25%	,177	3	.	1,000	3	,964
CFS 50%	,321	3	.	,881	3	,328
Kontrol negatif	,316	3	.	,890	3	,354
Kontrol media	,314	3	.	,893	3	,363

a. Lilliefors Significance Correction

### 2. Uji Homogenitas *Levene*

#### Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Optical Density	Based on Mean	2,723	4	10	,091
	Based on Median	,721	4	10	,597
	Based on Median and with adjusted df	,721	4	4,536	,616
	Based on trimmed mean	2,518	4	10	,108

### 3. Uji *One-way ANOVA*

#### ANOVA

Optical Density					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,209	4	,052	301,116	,000
Within Groups	,002	10	,000		
Total	,211	14			

#### 4. Uji *Post Hoc* Tukey

##### Multiple Comparisons

Dependent Variable: Optical Density

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
CFS 12,5%	CFS 25%	,013000	,010766	,748	-,02243	,04843
	CFS 50%	,074667*	,010766	,000	,03923	,11010
	Kontrol negatif	-,118000*	,010766	,000	-,15343	-,08257
	Kontrol media	,243333*	,010766	,000	,20790	,27877
CFS 25%	CFS 12,5%	-,013000	,010766	,748	-,04843	,02243
	CFS 50%	,061667*	,010766	,001	,02623	,09710
	Kontrol negatif	-,131000*	,010766	,000	-,16643	-,09557
	Kontrol media	,230333*	,010766	,000	,19490	,26577
CFS 50%	CFS 12,5%	-,074667*	,010766	,000	-,11010	-,03923
	CFS 25%	-,061667*	,010766	,001	-,09710	-,02623
	Kontrol negatif	-,192667*	,010766	,000	-,22810	-,15723
	Kontrol media	,168667*	,010766	,000	,13323	,20410
Kontrol negatif	CFS 12,5%	,118000*	,010766	,000	,08257	,15343
	CFS 25%	,131000*	,010766	,000	,09557	,16643
	CFS 50%	,192667*	,010766	,000	,15723	,22810
	Kontrol media	,361333*	,010766	,000	,32590	,39677
Kontrol media	CFS 12,5%	-,243333*	,010766	,000	-,27877	-,20790
	CFS 25%	-,230333*	,010766	,000	-,26577	-,19490
	CFS 50%	-,168667*	,010766	,000	-,20410	-,13323
	Kontrol negatif	-,361333*	,010766	,000	-,39677	-,32590

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

#### 5. Uji Korelasi *Pearson*

		Konsentrasi	
		CFS	Optical Density
Konsentrasi CFS	Pearson Correlation	1	-,909**
	Sig. (2-tailed)		,001
	N	9	9
Optical Density	Pearson Correlation	-,909**	1
	Sig. (2-tailed)	,001	
	N	9	9

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

## Lampiran 11. Analisis Data Uji Penghambatan Pembentukan Biofilm

### A. Uji Penghambatan Pembentukan Biofilm *S. aureus*

#### 1. Uji Normalitas *Shapiro-Wilk*

Perlakuan	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
CFS 12,5%	,292	3	.	,923	3	,463
CFS 25%	,276	3	.	,942	3	,537
CFS 50%	,265	3	.	,953	3	,583
Kontrol negatif	,314	3	.	,893	3	,363
Kontrol media	,253	3	.	,964	3	,637

a. Lilliefors Significance Correction

#### 2. Uji Homogenitas *Levene*

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Optical Density	Based on Mean	1,784	4	10	,209
	Based on Median	,461	4	10	,763
	Based on Median and with adjusted df	,461	4	6,148	,763
	Based on trimmed mean	1,642	4	10	,239

#### 3. Uji *One-way* ANOVA

ANOVA					
Optical Density					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,051	4	,013	210,810	,000
Within Groups	,001	10	,000		
Total	,051	14			

#### 4. Uji *Post Hoc* Tukey

##### Multiple Comparisons

Dependent Variable: Optical Density

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean			95% Confidence Interval	
		Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	Lower Bound	Upper Bound
CFS 12,5%	CFS 25%	-,005333	,006335	,911	-,02618	,01552
	CFS 50%	-,018000	,006335	,100	-,03885	,00285
	Kontrol negatif	-,156333*	,006335	,000	-,17718	-,13548
	Kontrol media	-,060667*	,006335	,000	-,08152	-,03982
CFS 25%	CFS 12,5%	,005333	,006335	,911	-,01552	,02618
	CFS 50%	-,012667	,006335	,332	-,03352	,00818
	Kontrol negatif	-,151000*	,006335	,000	-,17185	-,13015
	Kontrol media	-,055333*	,006335	,000	-,07618	-,03448
CFS 50%	CFS 12,5%	,018000	,006335	,100	-,00285	,03885
	CFS 25%	,012667	,006335	,332	-,00818	,03352
	Kontrol negatif	-,138333*	,006335	,000	-,15918	-,11748
	Kontrol media	-,042667*	,006335	,000	-,06352	-,02182
Kontrol negatif	CFS 12,5%	,156333*	,006335	,000	,13548	,17718
	CFS 25%	,151000*	,006335	,000	,13015	,17185
	CFS 50%	,138333*	,006335	,000	,11748	,15918
	Kontrol media	,095667*	,006335	,000	,07482	,11652
Kontrol media	CFS 12,5%	,060667*	,006335	,000	,03982	,08152
	CFS 25%	,055333*	,006335	,000	,03448	,07618
	CFS 50%	,042667*	,006335	,000	,02182	,06352
	Kontrol negatif	-,095667*	,006335	,000	-,11652	-,07482

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

#### 5. Uji Korelasi *Pearson*

		Konsentrasi	
		CFS	Optical Density
Konsentrasi CFS	Pearson Correlation	1	,857**
	Sig. (2-tailed)		,003
	N	9	9
Optical Density	Pearson Correlation	,857**	1
	Sig. (2-tailed)	,003	
	N	9	9

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

## B. Uji Penghambatan Pembentukan Biofilm *E. coli*

### 1. Uji Normalitas *Shapiro-Wilk*

Perlakuan	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
CFS 12,5%	,343	3	.	,842	3	,220
CFS 25%	,253	3	.	,964	3	,637
CFS 50%	,265	3	.	,953	3	,583
Kontrol negatif	,359	3	.	,810	3	,138
Kontrol media	,253	3	.	,964	3	,637

a. Lilliefors Significance Correction

### 2. Uji Homogenitas *Levene*

#### Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Optical Density	Based on Mean	2,964	4	10	,074
	Based on Median	,942	4	10	,479
	Based on Median and with adjusted df	,942	4	4,697	,513
	Based on trimmed mean	2,768	4	10	,087

### 3. Uji *One-way ANOVA*

#### ANOVA

Optical Density					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,218	4	,055	187,243	,000
Within Groups	,003	10	,000		
Total	,221	14			



#### 4. Uji Post Hoc Tukey

##### Multiple Comparisons

Dependent Variable: Optical Density

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean		Sig.	95% Confidence Interval	
		Difference (I-J)	Std. Error		Lower Bound	Upper Bound
CFS 12,5%	CFS 25%	,048000*	,013936	,039	,00213	,09387
	CFS 50%	,127333*	,013936	,000	,08147	,17320
	Kontrol negatif	-,202000*	,013936	,000	-,24787	-,15613
	Kontrol media	,123667*	,013936	,000	,07780	,16953
CFS 25%	CFS 12,5%	-,048000*	,013936	,039	-,09387	-,00213
	CFS 50%	,079333*	,013936	,001	,03347	,12520
	Kontrol negatif	-,250000*	,013936	,000	-,29587	-,20413
	Kontrol media	,075667*	,013936	,002	,02980	,12153
CFS 50%	CFS 12,5%	-,127333*	,013936	,000	-,17320	-,08147
	CFS 25%	-,079333*	,013936	,001	-,12520	-,03347
	Kontrol negatif	-,329333*	,013936	,000	-,37520	-,28347
	Kontrol media	-,003667	,013936	,999	-,04953	,04220
Kontrol negatif	CFS 12,5%	,202000*	,013936	,000	,15613	,24787
	CFS 25%	,250000*	,013936	,000	,20413	,29587
	CFS 50%	,329333*	,013936	,000	,28347	,37520
	Kontrol media	,325667*	,013936	,000	,27980	,37153
Kontrol media	CFS 12,5%	-,123667*	,013936	,000	-,16953	-,07780
	CFS 25%	-,075667*	,013936	,002	-,12153	-,02980
	CFS 50%	,003667	,013936	,999	-,04220	,04953
	Kontrol negatif	-,325667*	,013936	,000	-,37153	-,27980

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

#### 5. Uji Korelasi Pearson

		Konsentrasi	
		CFS	Optical Density
Konsentrasi CFS	Pearson Correlation	1	-,947**
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	9	9
Optical Density	Pearson Correlation	-,947**	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	9	9

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

## Lampiran 12. Analisis Data Uji Penghancuran/Degradasi Biofilm

### A. Uji Penghancuran/Degradasi Biofilm *S. aureus*

#### 1. Uji Normalitas *Shapiro-Wilk*

Perlakuan	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
CFS 12,5%	,339	3	.	,850	3	,242
CFS 25%	,179	3	.	,999	3	,948
CFS 50%	,236	3	.	,977	3	,712
Kontrol negatif	,274	3	.	,945	3	,547
Kontrol media	,298	3	.	,916	3	,439

a. Lilliefors Significance Correction

#### 2. Uji Homogenitas *Levene*

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Optical Density	Based on Mean	4,934	4	10	,059
	Based on Median	,820	4	10	,541
	Based on Median and with adjusted df	,820	4	3,919	,575
	Based on trimmed mean	4,386	4	10	,026

#### 3. Uji ANOVA

ANOVA					
Optical Density	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,182	4	,046	46,216	,000
Within Groups	,010	10	,001		
Total	,192	14			

#### 4. Uji *Post Hoc* Tukey

##### Multiple Comparisons

Dependent Variable: Optical Density

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean		Sig.	95% Confidence Interval	
		Difference (I-J)	Std. Error		Lower Bound	Upper Bound
CFS 12,5%	CFS 25%	,044333	,025646	,460	-,04007	,12874
	CFS 50%	,069333	,025646	,123	-,01507	,15374
	Kontrol negatif	-,200000*	,025646	,000	-,28440	-,11560
	Kontrol media	,119333*	,025646	,006	,03493	,20374
CFS 25%	CFS 12,5%	-,044333	,025646	,460	-,12874	,04007
	CFS 50%	,025000	,025646	,861	-,05940	,10940
	Kontrol negatif	-,244333*	,025646	,000	-,32874	-,15993
	Kontrol media	,075000	,025646	,088	-,00940	,15940
CFS 50%	CFS 12,5%	-,069333	,025646	,123	-,15374	,01507
	CFS 25%	-,025000	,025646	,861	-,10940	,05940
	Kontrol negatif	-,269333*	,025646	,000	-,35374	-,18493
	Kontrol media	,050000	,025646	,353	-,03440	,13440
Kontrol negatif	CFS 12,5%	,200000*	,025646	,000	,11560	,28440
	CFS 25%	,244333*	,025646	,000	,15993	,32874
	CFS 50%	,269333*	,025646	,000	,18493	,35374
	Kontrol media	,319333*	,025646	,000	,23493	,40374
Kontrol media	CFS 12,5%	-,119333*	,025646	,006	-,20374	-,03493
	CFS 25%	-,075000	,025646	,088	-,15940	,00940
	CFS 50%	-,050000	,025646	,353	-,13440	,03440
	Kontrol negatif	-,319333*	,025646	,000	-,40374	-,23493

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

#### 5. Uji Korelasi *Pearson*

		Konsentrasi	
		CFS	Optical Density
Konsentrasi CFS	Pearson Correlation	1	-,742*
	Sig. (2-tailed)		,022
	N	9	9
Optical Density	Pearson Correlation	-,742*	1
	Sig. (2-tailed)	,022	
	N	9	9

\*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

## B. Uji Penghancuran/Degradasi Biofilm *E. coli*

### 1. Uji Normalitas *Shapiro-Wilk*

Perlakuan	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
CFS 12,5%	,318	3	.	,886	3	,342
CFS 25%	,196	3	.	,996	3	,878
CFS 50%	,191	3	.	,997	3	,900
Kontrol negatif	,187	3	.	,998	3	,915
Kontrol media	,298	3	.	,916	3	,439

a. Lilliefors Significance Correction

### 2. Uji Homogenitas *Levene*

#### Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Optical Density	Based on Mean	1,203	4	10	,368
	Based on Median	,398	4	10	,806
	Based on Median and with adjusted df	,398	4	5,993	,804
	Based on trimmed mean	1,133	4	10	,395

### 3. Uji *One-way* ANOVA

#### ANOVA

Optical Density					
	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,213	4	,053	257,723	,000
Within Groups	,002	10	,000		
Total	,215	14			

#### 4. Uji *Post Hoc* Tukey

##### Multiple Comparisons

Dependent Variable: Optical Density

Tukey HSD

(I) Perlakuan	(J) Perlakuan	Mean		Sig.	95% Confidence Interval	
		Difference (I-J)	Std. Error		Lower Bound	Upper Bound
CFS 12,5%	CFS 25%	-,005333	,011728	,990	-,04393	,03327
	CFS 50%	,069667*	,011728	,001	,03107	,10827
	Kontrol negatif	-,206000*	,011728	,000	-,24460	-,16740
	Kontrol media	,153667*	,011728	,000	,11507	,19227
CFS 25%	CFS 12,5%	,005333	,011728	,990	-,03327	,04393
	CFS 50%	,075000*	,011728	,001	,03640	,11360
	Kontrol negatif	-,200667*	,011728	,000	-,23927	-,16207
	Kontrol media	,159000*	,011728	,000	,12040	,19760
CFS 50%	CFS 12,5%	-,069667*	,011728	,001	-,10827	-,03107
	CFS 25%	-,075000*	,011728	,001	-,11360	-,03640
	Kontrol negatif	-,275667*	,011728	,000	-,31427	-,23707
	Kontrol media	,084000*	,011728	,000	,04540	,12260
Kontrol negatif	CFS 12,5%	,206000*	,011728	,000	,16740	,24460
	CFS 25%	,200667*	,011728	,000	,16207	,23927
	CFS 50%	,275667*	,011728	,000	,23707	,31427
	Kontrol media	,359667*	,011728	,000	,32107	,39827
Kontrol media	CFS 12,5%	-,153667*	,011728	,000	-,19227	-,11507
	CFS 25%	-,159000*	,011728	,000	-,19760	-,12040
	CFS 50%	-,084000*	,011728	,000	-,12260	-,04540
	Kontrol negatif	-,359667*	,011728	,000	-,39827	-,32107

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

#### 5. Uji Korelasi *Pearson*

		Konsentrasi	
		CFS	Optical Density
Konsentrasi CFS	Pearson Correlation	1	-,779*
	Sig. (2-tailed)		,013
	N	9	9
Optical Density	Pearson Correlation	-,779*	1
	Sig. (2-tailed)	,013	
	N	9	9

\*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).



KEMENTERIAN AGAMA  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
PROGRAM STUDI BIOLOGI  
Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp (0341) 558933, Fax. (0341) 558933

### KARTU KONSULTASI SKRIPSI

Nama : Tazkiyyatun Nufus  
NIM : 18620086  
Fakultas : Sains dan Teknologi  
Program Studi : Biologi  
Dosen Pembimbing 1 : Prilya Dewi Fitriasari, M.Sc  
Judul Skripsi : *Potensi Antibiofilm Cell-Free Supernatant Lactobacillus plantarum Terhadap Staphylococcus aureus dan Escherichia coli*

No.	Tanggal Bimbingan	Deskripsi Bimbingan	Status
1.	10/01/2022	Konsultasi perubahan judul	Sudah Dikoreksi
2.	26/01/2022	Konsultasi BAB I, BAB II, dan BAB III	Sudah Dikoreksi
3.	04/02/2022	Revisi rumusan masalah, tujuan, dan metode penelitian	Sudah Dikoreksi
4.	09/02/2022	Revisi latar belakang dan BAB II	Sudah Dikoreksi
5.	21/03/2022	Finalisasi metode penelitian	Sudah Dikoreksi
6.	12/04/2022	Konsultasi hasil kultur bakteri dan penambahan metode penelitian	Sudah Dikoreksi
7.	24/05/2022	Konsultasi hasil analisis data	Sudah Dikoreksi
8.	06/06/2022	Konsultasi BAB IV dan BAB V	Sudah Dikoreksi

Pembimbing Skripsi I

Prilya Dewi Fitriasari, M.Sc  
NIP. 19900428 2016080 1 2062

Malang, 06 Juni 2022  
Ketua Program Studi,



De. Evika Sandi Savitri, M.P.  
NIP. 19741018 200312 2 002



KEMENTERIAN AGAMA  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
PROGRAM STUDI BIOLOGI  
Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp (0341) 558933, Fax. (0341) 558933

### KARTU KONSULTASI SKRIPSI

Nama : Tazkiyyatun Nufus  
NIM : 18620086  
Fakultas : Sains dan Teknologi  
Program Studi : Biologi  
Dosen Pembimbing II: Dr. H. Mochamad Imamudin, Lc., M.A  
Judul Skripsi : *Potensi Antibiofilm Cell-Free Supernatant Lactobacillus plantarum Terhadap Staphylococcus aureus dan Eschericia coli*

No.	Tanggal Bimbingan	Deskripsi Bimbingan	Status
1.	26/01/2022	Konsultasi integrasi BAB 1	Sudah Dikoreksi
2.	02/06/2022	Konsultasi integrasi BAB IV	Sudah Dikoreksi
3.	04/06/2022	Revisi integrasi naskah skripsi	Sudah Dikoreksi

Pembimbing Skripsi II

Dr. H. Mochamad Imamudin, Lc., M.A  
NIP. 19740602 200901 1 010

Malang, 06 Juni 2022  
Ketua Program Studi,  
  
Dr. Evika Sandi Savitri, M.P.  
NIP. 19741018 200312 2 002



KEMENTERIAN AGAMA  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
JURUSAN BIOLOGI

Jl. Gajayana No. 50 Malang 65144 Telp./ Faks. (0341) 558933  
Website: <http://biologi.uin-malang.ac.id> Email: [biologi@uin-malang.ac.id](mailto:biologi@uin-malang.ac.id)

Form Checklist Plagiasi

**Nama** : Tazkiyyatun Nufus  
**NIM** : 18620086  
**Judul** : Potensi Antibiofilm *Cell-Free Supernatant Lactobacillus plantarum* Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli*

No	Tim Check plagiasi	Skor Plagiasi	TTD
1	Azizatur Rohmah, M.Sc		
2	Berry Fakhry Hanifa, M.Sc		
3	Bayu Agung Prahardika, M.Si	23%	
4	Dr. Maharani Retna Duhita, M.Sc.,  PhD. Med. Sc		



Mengetahui,  
Ketua Program Studi Biologi

Dr. Evik Sandi Savitri, M. P

NIP. 19741018 200312 2 002