

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI DAN ANTIBIOFILM  
*ASPERGILLUS ORYZAE* TERHADAP *ESCHERICHIA COLI*  
PADA PASIEN INFEKSI SALURAN KEMIH**

**SKRIPSI**

Oleh

**MERYTA ADE AROFANI**

**NIM: 18910047**



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

**2021**

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI DAN ANTIBIOFILM  
*ASPERGILLUS ORYZAE* TERHADAP *ESCHERICHIA COLI*  
PADA PASIEN INFEKSI SALURAN KEMIH**

**SKRIPSI**

**Diajukan Kepada:**

**Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan  
Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang  
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam Memperoleh  
Gelara Sarjana Kedokteran (S.Ked)**

Oleh

**MERYTA ADE AROFANI**  

---

**NIM: 18910047**

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER  
FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK  
IBRAHIM MALANG  
2021**

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI DAN ANTIBIOFILM  
*ASPERGILLUS ORYZAE* TERHADAP *ESCHERICHIA COLI*  
PADA PASIEN INFEKSI SALURAN KEMIH**

**SKRIPSI**

**Oleh:**

**MERYTA ADE AROFANI**

**NIM: 18910047**

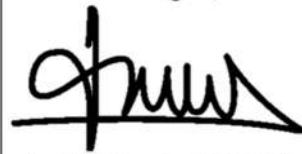
Telah Diperiksa dan Disetujui untuk  
Diuji Tanggal: 20 Desember 2021

Pembimbing I,



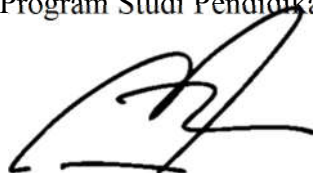
dr. Ana Rahmawati M.Biomed.  
NIP. 197412032009122001

Pembimbing II,



dr. Riskiyah, MMRS.  
NIP. 198505062020122001

Mengetahui,  
Ketua Program Studi Pendidikan Dokter



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

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI DAN ANTIBIOFILM  
*ASPERGILLUS ORYZAE* TERHADAP *ESCHERICHIA COLI*  
PADA PASIEN INFEKSI SALURAN KEMIH**

**SKRIPSI**

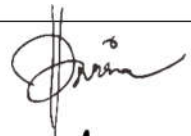

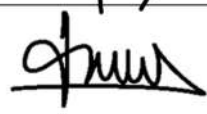
**Oleh:**

**MERYTA ADE AROFANI**

**NIM: 18910047**

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi dan Dinyatakan Diterima  
Sebagai Salah Satu Persyaratan untuk Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran  
(S.Ked):

Tanggal: 20 Desember 2021

Penguji Utama	<u>Dr. dr. Herry Darsim Gaffar, M.Kes.</u> NIP. 195707011987101002.	
Ketua Penguji	<u>dr. Ana Rahmawati M.Biomed.</u> NIP. 197412032009122001	
Sekretaris Penguji	<u>dr. Riskiyah, MMRS.</u> NIP. 198505062020122001	

Mengesahkan  
Ketua Program Studi Pendidikan Dokter



dr. Tias Pramesti Griana M.Biomed.

NIP. 198105182011012000

## PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Meryta Ade Arofani

NIM : 18910047

Program Studi : Pendidikan Dokter

Fakultas : Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan (FKIK)

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-banar merupakan hasil karya saya 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.

Batu, 25 Desember 2021

Yang membuat pernyataan,



Meryta Ade Arofani

NIM. 18910047

## KATA PENGANTAR

*Assalamua'alaikum Wr. Wb.*

Syukur Alhamdulillah penulis panjatkan kepada Allah Swt. yang telah melimpahkan rahmat, hidayah, dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan studi pada Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang sekaligus skripsi ini dengan baik

Penulis haturkan ucapan terima kasih atas semua doa, dukungan, dan bimbingannya kepada semua pihak yang membantu dalam penyelesaian skripsi ini. Ucapan terima kasih ini penulis sampaikan kepada:

1. Prof. Dr. H. M. Zainuddin, M.A, selaku Rektor Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Prof. Dr. dr. Yuyun Yueniwati, M. Kes, Sp.Rad (K), selaku Dekan FKIK UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. dr. Tias Pramesti Griana, M. Biomed. selaku ketua Program Studi Pendidikan Dokter FKIK UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Dr. dr. Herry Darsim Gaffar, M.Kes, selaku penguji utama yang selalu memberikan kritikan dan saran yang membangun.
5. dr. Ana Rahmawati, M. Biomed, selaku dosen pembimbing skripsi I yang telah memberikan arahan dan dukungan.
6. dr. Riskiyah, MMRS, selaku dosen pembimbing skripsi II yang telah memberikan arahan dan dukungan.
7. dr. Lailia Nur Rachma, M.Biomed, selaku dosen pembimbing penelitian yang telah memberikan arahan dan dukungan.

8. Segenap sivitas akademika PSPD FKIK UIN Malang khususnya para dosen yang telah memberi bimbingan selama masa studi saya.
9. Bapak Yoyok Adi Suseno, Ibu Fery Nurhayati, Mas Galang Ade Rambawana yang senantiasa memberikan doa dan restu kepada penulis dalam menuntut ilmu.
10. Nicken Elok, Nandani Bayu, Griselda Nabilah, Anisyah Milenia, Farah Sabrina, Satria Panji dan Fathin Moerdiwanto selaku teman-teman dekat saya yang senantiasa memberikan dukungan dan doa dalam proses menjalani pendidikan di PSPD FKIK UIN Malang.
11. Nur Fadila Mansyur, Risna Afiatur, Ardellya Elfidaa, Septafani Kurnia, Kak Alya Labibah, Kak Aslin Nur Ainiyah, Kak Luthfia Asyda, Kak Fadilah Istiapalja, Adhitya Wishnu dan Maulana Yusuf, serta teman-teman Clavicula 2018 yang senantiasa memberikan dukungan dan doa dalam proses menjalani pendidikan di PSPD FKIK UIN Malang.
12. Semua pihak yang ikut membantu dalam menyelesaikan skripsi ini baik berupa materiil maupun moril.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini masih terdapat kekurangan dan saran dari berbagai pihak. Penulis berharap semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat kepada pembaca, khususnya bagi penulis secara pribadi. *Aamiin yaa Rabbal 'Aalamiin.*

*Wassalamu'alaikum Wr. Wb.*

Batu, 25 Desember 2021

Penulis

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	ii
<b>HALAMAN PERSETUJUAN</b> .....	iii
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	iv
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	v
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	vi
<b>DAFTAR ISI</b> .....	viii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xiii
<b>DAFTAR SINGKATAN</b> .....	xiv
<b>ABSTRAK</b> .....	xv
<b>BAB I</b>	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah Penelitian .....	4
1.3 Tujuan Penelitian .....	5
1.3.1 Tujuan Umum .....	5
1.3.2 Tujuan Khusus .....	5
1.4 Manfaat Penelitian .....	5
1.4.1 Manfaat Akademis/Toretis .....	5
1.4.2 Manfaat Aplikatif .....	5
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 <i>Escherichia coli</i> .....	6
2.1.1 Taksonomi dan Karakteristik <i>Escherichia coli</i> .....	6
2.1.2 Klasifikasi <i>Escherichia coli</i> .....	6
2.1.3 Faktor Virulensi <i>Escherichia coli</i> .....	7
2.1.4 Identifikasi <i>Escherichia coli</i> .....	8
2.2 Biofilm .....	11
2.2.1 Definisi dan struktur penyusun Biofilm .....	11
2.2.2 Mekanisme pembentukan biofilm .....	12
2.2.3 Uji Pembentukan Biofilm .....	13
2.3 Infeksi Saluran Kemih (ISK) .....	14



2.3.1	Definisi Infeksi Saluran Kemih.....	14
2.3.2	Epidemiologi Infeksi Saluran Kemih.....	14
2.3.3	Etiologi Infeksi Saluran Kemih.....	15
2.3.4	Faktor Risiko Infeksi Saluran Kemih.....	15
2.3.5	Patogenesis Infeksi Saluran Kemih.....	16
2.4	<i>Aspergillus oryzae</i> .....	18
2.4.1	Taksonomi <i>Aspergillus oryzae</i> .....	18
2.4.2	Morfologi <i>Aspergillus oryzae</i> .....	18
2.4.3	Peranan <i>Aspergillus oryzae</i> .....	19
2.4.4	Kandungan <i>Aspergillus oryzae</i> .....	20
2.4.5	<i>Aspergillus oryzae</i> sebagai Antibakteri dan Antibiofilm .....	21
2.4.6	Supernatan <i>Aspergillus oryzae</i> .....	22
2.5	Kerangka Teori Penelitian.....	23
<b>BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS</b>		
3.1	Kerangka Konsep Penelitian .....	24
3.2	Hipotesis Penelitian.....	25
<b>BAB IV METODE PENELITIAN</b>		
4.1	Rancangan Penelitian dan Jumlah Pengulangan .....	27
4.2	Tempat dan Waktu Penelitian .....	28
4.3	Populasi dan Sampel Penelitian .....	28
4.4	Variabel Penelitian .....	29
4.4.1	Variabel Bebas .....	29
4.4.2	Variabel Tergantung.....	29
4.5	Kriteria Inklusi dan Eksklusi.....	29
4.5.1	Kriteria Inklusi .....	29
4.5.2	Kriteria Eksklusi.....	29
4.6	Alat dan Bahan Penelitian .....	29
4.6.1	Alat Penelitian .....	29
4.6.2	Bahan Penelitian.....	29
4.7	Definisi Operasional.....	29
4.8	Prosedur Penelitian.....	32
4.8.1	Sterilisasi Alat .....	32
4.8.2	Pembuatan Inokulum <i>Aspergillus oryzae</i> .....	32
4.8.3	Pembuatan Supernatan <i>Aspergillus oryzae</i> .....	33

4.8.4	Penyiapan Bakteri .....	33
4.8.5	Uji Kosentrasi Hambat Minimum (KHM) .....	34
4.8.6	Uji Kosentrasi Bunuh Minimum (KBM) .....	35
4.8.7	Uji Aktivitas Biofilm.....	36
4.8.8.2	Uji Penghambatan Pertumbuhan Biofilm <i>Escherichia coli</i> (MBIC) .	38
4.9	Denah Perlakuan Uji Aktivitas Antibakteri dan Antibiofilm.....	39
4.10	Perhitungan Konsentrasi Supernatan Minimal Antibakteri dan Antibiofilm .....	41
4.10.1	Kosentrasi Supernatan Kosentrasi Hambat Minimum (KHM).....	41
4.10.2	Kosentrasi Supernatan Kosentrasi Bunuh Minimum (KBM) .....	41
4.10.3	Konsentrasi Supernatan Minimal Penghambatan Biofilm (MBIC) ...	41
4.11	Alur Penelitian.....	42
4.12	Analisis Data .....	43

## **BAB V HASIL PENELITIAN**

5.1	Hasil Identifikasi Jamur.....	44
5.1.1	Uji Makroskopis.....	44
5.2.1	Uji Mikroskopis.....	44
5.2	Hasil Pembuatan <i>Cell Free Supernatant</i> (CFS) .....	45
5.3	Hasil Identifikasi Bakteri.....	46
5.3.1	Uji Mikroskopis.....	46
5.3.2	Uji Makroskopis.....	47
5.3.3	Uji Biokimia.....	47
5.4	Hasil Uji Kosentrasi Hambat Minimum (KHM).....	48
5.5	Hasil Uji Kosentrasi Bunuh Minimum (KBM).....	48
5.6	Hasil Uji Pembentukan Biofilm .....	49
5.7	Hasil Uji Penghambatan Pertumbuhan Biofilm <i>Escherichia coli</i> .....	49

## **BAB VI PEMBAHASAN**

6.1	Identifikasi Karakteristik jamur <i>Aspergillus oryzae</i> .....	52
6.2	Identifikasi Karakteristik bakteri <i>Escherichia coli</i> .....	52
6.3	Uji Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM) .....	53
6.4	Uji Pembentukan Biofilm <i>Escherichia coli</i> .....	54
6.5	Uji Penghambatan Pertumbuhan Biofilm <i>Escherichia coli</i> .....	55

6.6	Kajian Integrasi Islam mengenai Aktivitas Antibiofilm <i>Aspergillus oryzae</i> terhadap biofilm <i>Escherichia coli</i> .....	57
6.7	Kelemahan Penelitian.....	58
<b>BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN</b>		
7.1	Kesimpulan.....	60
7.2	Saran.....	60
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....		64
<b>LAMPIRAN</b> .....		67

## DAFTAR TABEL

Tabel 4.1 .....	28
Tabel 4.2 .....	37
Tabel 5.1.....	47
Tabel 5.2.....	49
Tabel 5.3.....	51

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 .....	7
Gambar 2.2 .....	9
Gambar 2.3 .....	10
Gambar 2.4 .....	11
Gambar 2.5 .....	11
Gambar 2.6 .....	12
Gambar 2.7 .....	13
Gambar 2.8 .....	16
Gambar 2.9 .....	18
Gambar 2.10 .....	19
Gambar 2.11 .....	24
Gambar 3.1 .....	25
Gambar 4.1 .....	40
Gambar 4.2 .....	42
Gambar 5.1 .....	44
Gambar 5.2 .....	45
Gambar 5.3 .....	46
Gambar 5.4 .....	46
Gambar 5.5 .....	47
Gambar 5.6 .....	48
Gambar 5.7 .....	50
Gambar 5.8 .....	50

## DAFTAR SINGKATAN

CFS	: <i>Cell Free Supernatant</i>
EPS	: <i>Extracellular Polymeric Substance</i>
IMViC	: <i>Indole, Methyl red, Voges-Proskauer, Citrate</i>
ISK	: Infeksi Saluran Kemih
KHM	: Kosentrasi Hambat Minimum
KBM	: Kosentrasi Bunuh Minimum
MBIC	: <i>Minimum Biofilm Inhibitory Concentration</i>
MtP	: <i>Microtiter Plate</i>
OD	: <i>Optical Density</i>
PBS	: <i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PDA	: <i>Potato Dextrose Agar</i>
PDB	: <i>Potato Dextrose Broth</i>
SD	: Standar Deviasi

## ABSTRAK

Arofani, Meryta Ade. 2021. *Uji Aktivitas Antibakteri dan Antibiofilm Aspergillus oryzae Terhadap Escherichia coli pada Pasien Infeksi Saluran Kemih*. Skripsi, Jurusan Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Dibimbing oleh dr. Ana Rahmawati M.Biomed, dr. Riskiyah, MMRS, Dr. dr. Herry Darsim Gaffar, M.Kes.

---

*Escherichia coli* (*E. coli*) merupakan bakteri gram negatif yang menyebabkan infeksi saluran kemih (ISK) dan memiliki kemampuan dalam membentuk biofilm. Terbentuknya biofilm menyebabkan terapi ISK menjadi kurang efektif. *Aspergillus oryzae* mengandung enzim amilase dan enzim protease yang dapat digunakan sebagai antibakteri dan antibiofilm. Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas antibakteri dan antibiofilm *Aspergillus Oryzae* terhadap *Escherichia coli*. Uji aktivitas antibiofilm menggunakan uji penghambatan pertumbuhan biofilm/*Minimum Biofilm Inhibitory Concentration (MBIC)*. Uji Kosentrasi Hambat Minimum. (KHM) dan Kosentrasi Bunuh Minimum (KBM) bertujuan untuk mengetahui kemampuan *Aspergillus oryzae* dalam menghambat dan membunuh pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. Metode penelitian menggunakan metode *Microtiter Plate Biofilm Assay*. Hasil uji aktivitas antibiofilm menunjukkan bahwa *Aspergillus oryzae* memiliki aktivitas penghambatan pertumbuhan biofilm dengan persentase aktivitas terbesar secara berturut-turut pada 100%, 50%, 25%, 12,5% dan 6,25%. Hasil uji KHM dan KBM menunjukkan *Aspergillus oryzae* tidak mampu menghambat dan membunuh bakteri *Escherichia coli*.

**Kata kunci:** Aktivitas Antibakteri dan Antibiofilm, *Aspergillus oryzae*, *Escherichia coli*.

## ABSTRACT

Arofani, Meryta Ade. 2021. *Antibacterial and Antibiofilm Activity Test of Aspergillus Oryzae Against Escherichia Coli in Urinary Tract Infection Patients*. Thesis, Medical Departement, Medical and Health Sciences Faculty, The Islamic State Universitas Mulana Malik Ibrahim Malang. Supervised by dr. Ana Rahmawati M.Biomed, dr. Riskiyah, MMRS, Dr. dr. Herry Darsim Gaffar, M.Kes.

---

*Escherichia coli (E. coli) is a gram-negative bacterium that causes urinary tract infections (UTIs) and has the ability to form biofilms. The formation of biofilms makes UTI's therapy less effective. Aspergillus oryzae contains amylase enzymes and protease enzymes that can be used as antibacterials and antibiofilms. The study aimed to test the antibacterial and antibiofilm activity of Aspergillus Oryzae against Escherichia coli. Antibiofilm activity tests use Minimum Biofilm Inhibitory Concentration (MBIC). Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) tests aim to determine the ability of Aspergillus aculeatus to inhibit and kill the growth of Escherichia coli bacteria. The research method uses the Microtiter Plate Biofilm Assay method. The results of antibiofilm activity tests showed that Aspergillus oryzae had the inhibition activity of biofilm growth with the largest percentage of activity in a row at 100%, 50%, 25%, 12.5% and 6.25%. MIC and MBC test results showed Aspergillus oryzae was unable to inhibit and kill Escherichia coli bacteria.*

**Keyword:** *Antibacterial and Antibiofilm Activity, Aspergillus oryzae, Escherichia coli.*



# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

*Escherichia coli* (*E.coli*) merupakan bakteri gram negatif, bersifat fakultatif anareob, berbentuk basil, dan tidak berspora (Fhitryani *et al.*, 2017). Bakteri ini termasuk flora normal yang terdapat pada saluran pencernaan yang memiliki peran penting dalam sintesis vitamin K dan penyerapan zat-zat makanan (Kudinha, 2017). *Escherichia coli* juga dapat menyebabkan infeksi apabila jumlah bakteri ini meningkat dan berada di luar usus (Zeniusa & Ramadhian, 2017). Salah satu infeksi yang paling banyak disebabkan oleh bakteri *Escherichia coli* adalah infeksi saluran kemih (Kudinha, 2017).

Infeksi saluran kemih adalah infeksi yang sering terjadi di dunia dan menduduki posisi kedua setelah infeksi saluran pernafasan (Nugraha *et al.*, 2019). Pada tahun 2016, *American Urology Association* menyebutkan terdapat 150 juta kasus infeksi saluran kemih (ISK) di dunia setiap tahunnya (Lina *et al.*, 2019). Prevalensi ISK di Indonesia pada tahun 2016 menurut Departemen Kesehatan RI mencapai 90 sampai 100 kasus per 100.000 penduduk atau sekitar 180.000 kasus baru setiap tahun. Infeksi saluran kemih di Provinsi Jawa Timur mencapai 3 sampai 4 kasus per 100.000 penduduk setiap tahun (Kemenkes, 2016).

Infeksi saluran kemih (ISK) merupakan infeksi yang dapat mengenai semua kelompok usia baik pria maupun wanita, namun infeksi ini lebih sering mengenai wanita (Sari & Satyabakti, 2015). Infeksi saluran kemih ini terjadi di saluran kemih manusia yaitu ginjal, ureter, kandung kemih, dan uretra (Sari &

Muhartono, 2018). Sekitar 80-90% kasus infeksi saluran kemih, secara umum diakibatkan oleh bakteri *Escherichia coli* dari strain UPEC (*Uropathogenic Escherichia coli*) (Kudinha, 2017).

Untuk menimbulkan suatu penyakit infeksi, bakteri *Escherichia coli* mempunyai faktor virulensi yaitu kapsul polisakarida, membran luar, *adhesin* atau *fimbriae* dan *α-hemolysin* (Zeniusa & Ramadhian, 2017; Gunardi, 2017). Faktor virulensi lain yang dimiliki oleh *Escherichia coli* adalah kemampuan membentuk biofilm (W. Gunardi, 2017). *Escherichia coli* dapat membentuk biofilm dengan tingkat pertumbuhan lebih kuat daripada bakteri *Staphylococcus sp.* dan *Salmonella sp.* (Fadhila & Sari, 2019). Biofilm adalah kumpulan sel atau agregat mikroorganisme (protozoa, bakteri, alga atau fungi/jamur) yang ditutupi oleh *extracellular polymeric substances* (fosfolipid, protein, polisakarida, dan asam nukleat) yang dapat melekat pada permukaan biotik maupun abiotik. Dengan kemampuan membentuk biofilm tersebut, bakteri *E. coli* dapat terlindungi dari ancaman eksternal (Vogeleer *et al.*, 2014).

Bakteri yang dapat membentuk biofilm memiliki tingkat resisten antibiotik lebih tinggi daripada bakteri planktonik (Edward & Novianti, 2015). Hal ini disebabkan karena biofilm tersusun atas matriks yang sangat kompleks sehingga mempersulit penetrasi antibiotik terhadap bakteri (Sharma *et al.*, 2016). Sifat resisten terhadap antibiotik ini sangat merugikan, akan tetapi hingga kini belum ditemukan obat yang spesifik yang dapat berfungsi sebagai antibiofilm bakteri.

Pemanfaatan bahan alam sebagai antibakteri dan antibiofilm bakteri terdapat dalam Al-Qur'an Surat Asy-Syu'ara' ayat 7-8 sebagai berikut:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمَا أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ - ٧

إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً لِّقَوْمٍ مُّؤْمِنِينَ - ٨

Artinya : “Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, betapa banyak kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam pasangan (tumbuh-tumbuhan) yang baik? Sungguh, pada yang demikian itu terdapat tanda (kebesaran Allah), tetapi kebanyakan mereka tidak beriman.” (Departemen Agama RI, 2017).

Ayat Al-Qur'an di atas telah menjelaskan bahwa Allah Swt. menciptakan tumbuh-tumbuhan itu bukan merupakan suatu kebetulan melainkan terdapat hikmah yang bisa diambil. Sebagai umat Islam, sudah seharusnya kita bersyukur atas semua yang telah dianugerahkan Allah Swt. dan dapat memanfaatkannya dengan baik. Salah satu cara memanfaatkan bahan alam tersebut adalah berupa agen antibiofilm bakteri.

Saat ini banyak penelitian tentang pemanfaatan bahan alam yang berpotensi mempunyai aktivitas antibiofilm dan antibakteri. Bahan alam yang memiliki aktivitas antibakteri dan antibiofilm salah satunya adalah *Aspergillus oryzae* yang merupakan fungi dari filum *Ascomycetes* (Pimarahayu, 2019). *Aspergillus oryzae* dapat menghasilkan enzim yang dapat berfungsi sebagai antibakteri (Moon & Cha, 2020). *Aspergillus oryzae* memiliki kemampuan memproduksi enzim ekstraseluler seperti lipase, amilase dan protease yang dapat digunakan untuk industri fermentasi seperti kecap dan cuka (Mulyani *et al.*, 2018).

*Aspergillus oryzae* merupakan jamur yang paling banyak menghasilkan enzim amilase dan enzim protease (Yuliana & Chuzaemi, 2019). Kandungan amilase pada *Aspergillus oryzae* dapat dimanfaatkan untuk mendegradasi karbohidrat penyusun matriks (Khoirudin *et al.*, 2020). Kandungan protease pada *Aspergillus oryzae* dapat dimanfaatkan memutuskan ikatan peptida pada protein yang menjadi integritas biofilm (Prawira *et al.*, 2015). Hal tersebut berhubungan dengan struktur penyusun permukaan sel bakteri *Escherichia coli* yang tersusun atas karbohidrat dan protein (Katrin *et al.*, 2015). Berdasarkan penelitian Cheol Jee yang dilakukan pada tahun 2020, didapatkan bahwa enzim protease jika dikombinasikan dengan  $\alpha$ -amilase dapat menghambat pembentukan biofilm bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* (Cheol Jee *et al.*, 2020).

Berdasarkan uraian di atas, *Aspergillus oryzae* berpotensi untuk dimanfaatkan sebagai alternatif terapi pada ISK akibat bakteri *Escherichia coli* (*E.coli*). Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efektivitas antibakteri dan antibiofilm enzim ekstraseluler dari *Aspergillus oryzae* terhadap bakteri *Escherichia coli*.

## **1.2 Rumusan Masalah**

1. Berapakah Kosentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Kosentrasi Bunuh Minimum (KBM) *Aspergillus oryzae* terhadap *Escherichia coli* pada pasien infeksi saluran kemih ?
2. Berapakah konsentrasi minimal *Aspergillus oryzae* untuk menghambat pertumbuhan atau *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC) biofilm *Escherichia coli* pada pasien infeksi saluran kemih ?

### **1.3 Tujuan Penelitian**

#### **1.3.1 Tujuan Umum**

Untuk mengetahui aktivitas antibakteri dan antibiofilm *Aspergillus oryzae* terhadap pertumbuhan dan biofilm *Escherichia coli* pada pasien infeksi saluran kemih.

#### **1.3.2 Tujuan Khusus**

1. Untuk mengetahui Kosentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Kosentrasi Bunuh Minimum (KBM) *Aspergillus oryzae* terhadap *Escherichia coli* pada pasien infeksi saluran kemih.
2. Untuk mengetahui konsentrasi minimal *Aspergillus oryzae* untuk menghambat pertumbuhan atau *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC) biofilm *Escherichia coli* pada pasien infeksi saluran kemih.

### **1.4 Manfaat Penelitian**

#### **1.4.1 Manfaat Akademis/Toretis**

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan tambahan pengetahuan dan pengembangan ilmu mengenai aktivitas antibiofilm *Aspergillus oryzae* terhadap biofilm *Escherichia coli*.

#### **1.4.2 Manfaat Aplikatif**

Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai pemanfaatan *Aspergillus oryzae* sebagai antibiofilm bakteri.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 *Escherichia coli*

##### 2.1.1 Taksonomi dan Karakteristik *Escherichia coli*

Berikut ini adalah taksonomi bakteri *Escherichia coli* (Jawetz *et al.*, 2013):

Kingdom: *Prokariot*

Divisi: *Gracilicutes*

Kelas: *Scotobacteria*

Ordo: *Eubacteriales*

Famili: *Enterobacteriaceae*

Genus: *Escherichia*

Spesies: *Escherichia coli*

*Escherichia coli* adalah bakteri gram negatif yang berbentuk basil (batang), memiliki panjang 2 mikrometer dan lebarnya 0,5 mikrometer. Bakteri *Escherichia coli* termasuk flora normal yang berada pada saluran pencernaan, namun pada beberapa strain dapat mengakibatkan infeksi oppurtunistik. *E.coli* dapat tumbuh pada temperatur 20° - 40°C dan optimum pada suhu 37°C (Murray *et al.*, 2013; Fhitryani *et al.*, 2017). Bakteri *Escherichia coli* ini bersifat anaerob, tidak dapat membentuk spora dan dapat bergerak (Fhitryani *et al.*, 2017).

##### 2.1.2 Klasifikasi *Escherichia coli*

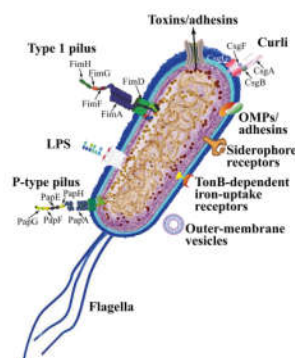
*Escherichia coli* terbagi menjadi dua strain diantaranya adalah *intestinal Escherichia coli (InPEC)* dan *extraintestinal Escherichia coli (ExPEC)*. Grup *intestinal E.coli* terdiri dari 8 sub-grup yaitu *diffusely adherent Escherichia coli (DAEC)*, *adherent-invasive Escherichia coli (AIEC)*, *enterotoxigenic Escherichia*

*coli* (ETEC), *enteroaggregative Escherichia coli* (EAEC), *Shiga-toxin producing Escherichia coli* (STEC), *enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC), *enteroinvasive Escherichia coli* (EIEC), dan *enterohemorrhagic Escherichia coli* (EHEC). Grup *InPEC* ini umumnya menyebabkan penyakit gastroenteritis (Vogeleer *et al.*, 2014). Grup *extraintestinal E.coli* terdiri atas *neonatal meningitis Escherichia coli* (NMEC), *uropathogenic Escherichia coli* (UPEC), *avian pathogenic Escherichia coli* (APEC), dan *sepsis-associated Escherichia coli* (SPEC). Grup *ExPEC* ini umumnya menyebabkan infeksi saluran kemih, meningitis, sepsis neonatal (Sarowska *et al.*, 2019).

### 2.1.3 Faktor Virulensi *Escherichia coli*

*Ur*

*opathogenic Escherichia coli* (UPEC) memiliki faktor virulensi yang terbagi menjadi dua di antaranya adalah faktor virulensi yang diproduksi oleh bakteri tersebut dan faktor virulensi ada pada permukaan sel bakteri. Faktor virulensi yang ada pada permukaan sel bakteri antara lain adalah kapsul polisakarida, *adhesin* atau *fimbrae/pili*, *outer membrane vesicle*, flagel, *non-pilus adhesin*, protektin, dan *curli*. Faktor virulensi yang diproduksi oleh bakteri diantaranya adalah *iron acquisition system* (siderofor), toksin, dan sistem sekresi (Terlizzi *et al.*, 2017).



**Gambar 2.1** Struktur bakteri *Escherichia coli*  
Sumber : Terlizzi *et al.*, 2017.

A

dapun peranan dari masing-masing faktor virulensi tersebut (Kudinha, 2017; Terlizzi *et al.*, 2017; Parvez *et al.*, 2019):

- a. Kapsul polisakarida: berperan sebagai pelindung bakteri dari sistem imun penjamu.
- b. Adhesin atau fimbria/pili: untuk memfasilitasi kolonisasi bakteri dengan menempel ke sel epitel saluran kemih penjamu.
- c. Flagela: memiliki peranan sebagai organel motilitas yang membuat bakteri mampu bergerak secara *ascenden*.
- d. *Curli*: berperan dalam mensekresikan protein monomer terlarut dan pembentukan biofilm bakteri yang memicu perlekatan pada sel epitel kadung kemih.
- e. Toksin (*HlyA*): untuk melisiskan sel darah merah dan memiliki sifat toksik kepada sel penjamu.
- f. Protektin (*Outer membrane protease T* dan *uropathogenic specific protein*): untuk menghindari dari sistem imun penjamu.
- g. *Iron acquisition system* (siderofor): untuk menghasilkan zat besi yang nantinya zat besi ini berperan dalam transport dan penyimpanan oksigen.

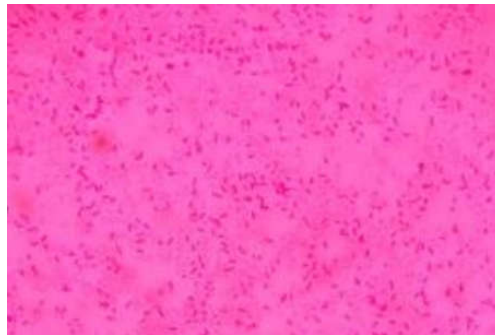
#### **2.1.4 Identifikasi *Escherichia coli***

##### **2.1.5.1 Mikroskopis**

Secara mikroskopis, identifikasi *Escherichia coli* dapat menggunakan pewarnaan Gram. Tujuan pewarnaan ini untuk mengetahui susunan, ukuran dan bentuk bakteri. Hasil dari pewarnaan Gram menunjukkan bahwa bakteri



*Escherichia coli* bewarna merah muda dan berbentuk batang. Warna merah muda pada bakteri *E.coli* disebabkan oleh bakteri tersebut memiliki dinding sel yang disusun oleh lapisan lemak yang mudah rusak saat dicuci dengan alkohol, sehingga saat dilakukan pewarnaan kurang mampu mempertahankan zat warna kristal violet melainkan lebih mampu mempertahankan zat warna safranin yang memberikan warna merah (Ulfah *et al.*, 2017).



**Gambar 2.2** Identifikasi *Escherichia coli* dengan pewarnaan gram  
Sumber: Ulfah *et al.*, 2017.

#### **2.1.5.2 Pembiakan *Escherichia coli* pada medium diferensial**

Medium diferensial merupakan media yang memiliki kandungan karbohidrat dan zat pewarna khusus yang memberikan suatu tampilan yang khas pada koloni. Medium yang termasuk dari medium diferensial yaitu agar *Desoxycholate*, agar *Eosin Methylene Blue (EMB)*, dan agar *MacConkey*. Fungsi dari medium diferensial ini adalah untuk melihat perbedaan antara koloni tidak bewarna (tidak memfermentasi laktosa) dengan koloni bewarna (memfermentasi laktosa) (Jawetz *et al.*, 2013).



**Gambar 2.3** Morfologi koloni *Escherichia coli* pada cawan agar *Eosin Methylene Blue*

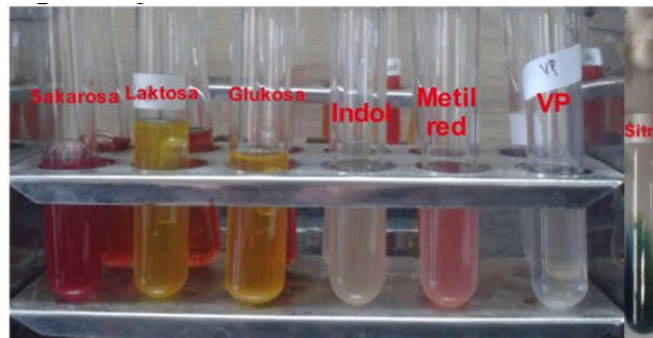
Sumber: Juwita *et al.*, 2014.

### 2.1.5.3 Uji Biokimia *Escherichia coli*

Uji biokimia pada bakteri *Escherichia coli* dapat menggunakan uji gula dan uji *IMViC* (*Indole, Methyl Red, Voges-Proskauer, Citrat*). Uji *Indole* bertujuan untuk mengetahui kemampuan suatu bakteri dalam menghasilkan *Indole* dari *tryptophan* sebagai sumber karbon. Uji *Methyl Red* bertujuan untuk melihat kemampuan bakteri dalam fermentasi glukosa serta memproduksi dan mempertahankan asam. Uji *Voges-Proskauer* bertujuan untuk melihat adanya *acetonin* dalam kultur cair bakteri, namun uji ini negatif pada bakteri *E.coli* karena bakteri ini mampu memfermentasikan karbohidrat menjadi produk asam dan tidak dapat memproduksi produk netral seperti *acetonin*. Uji *Citrat* untuk mengetahui kemampuan bakteri dalam memanfaatkan sitrat sebagai sumber karbon dan energi yang dapat digunakan (Rahayu & Gumilar, 2017).

Uji gula pada bakteri *Escherichia coli* menunjukkan bakteri tersebut mampu memfermentasikan sukrosa, glukosa, laktosa, dan hidrogen sulfida ( $H_2S$ ). Dalam uji tersebut ditandai dengan adanya warna merah pada media laktosa dan

glukosa berubah menjadi kuning. Namun, pada media sakrosa tetap bewarna merah (Rahayu & Gumilar, 2017).



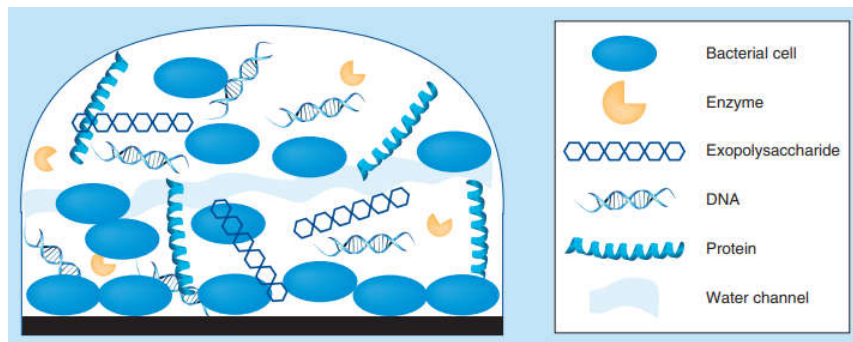
**Gambar 2.4** Hasil Uji Biokimia *Escherichia coli*  
Sumber: Rahayu & Gumilar, 2017

## 2.2 Biofilm

### 2.2.1 Definisi dan struktur penyusun Biofilm

Biofilm adalah kumpulan sel atau agregat mikroorganisme (protozoa, bakteri, alga atau fungi/jamur) yang ditutupi oleh *extracellular polymeric substances* (fosfolipid, protein, polisakarida, dan asam nukleat) yang dapat melekat pada permukaan biotik maupun abiotik. Dengan kemampuan membentuk biofilm tersebut, bakteri *E. coli* dapat terlindungi dari ancaman eksternal (Vogeleer *et al.*, 2014).

Struktur penyusun biofilm diantaranya adalah sel bakteri, eksopolisakarida, enzim, air, protein, DNA dan RNA (Rabin *et al.*, 2015).

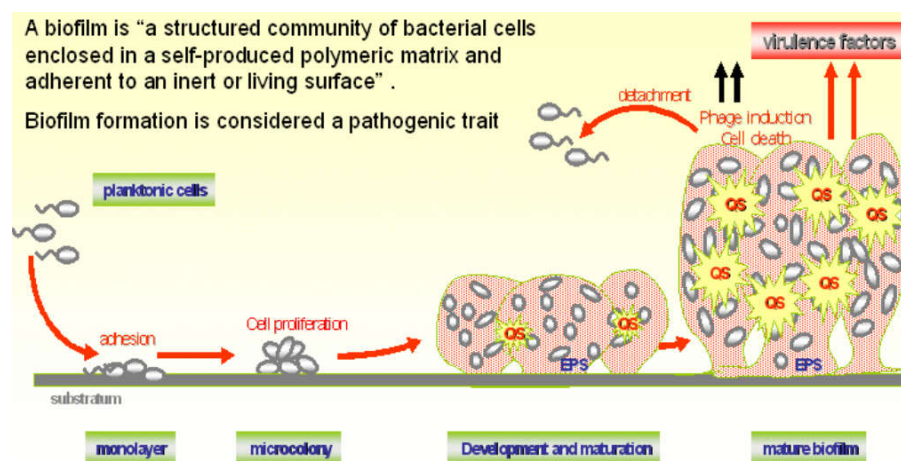


**Gambar 2.5** Struktur penyusun biofilm bakteri  
Sumber: Rabin *et al.*, 2015

### 2.2.2 Mekanisme pembentukan biofilm

Mekanisme pembentukan formasi biofilm berawal dari beberapa sel planktonik atau sel yang hidup bebas melakukan perlekatan pada suatu permukaan yang kemudian melakukan replikasi hingga membentuk satu lapisan tipis biofilm. Selanjutnya, pembelahan itu berhenti selama beberapa jam dan di masa ini terjadi perubahan pada sel planktonik menjadi sel dengan fenotip biofilm. Sel ini berbeda dengan sel planktoniknya secara fisiologik dan metabolik (W. D. Gunardi *et al.*, 2014).

Selama pertumbuhan berlangsung, sel biofilm memproduksi matriks polimer ekstraseluler yang melekatkan bakteri pada permukaan dan dapat melekatkan bakteri satu dengan bakteri lainnya untuk bergabung membentuk suatu mikrokoloni. Setelah itu, sel-sel yang berada di dalam matriks akan menghasilkan suatu sinyal kimia. Sinyal kimia tersebut memiliki peran penting dalam pembentukan karakteristik biofilm menjadi lebih matang. Aksi dari sinyal tersebut adalah suatu mekanisme yang disebut *quorum sensing* atau komunikasi antar sel atau kemampuan yang dimiliki molekul untuk memunculkan suatu aksi yang bergantung pada konsentrasi sinyal dalam lingkungan (W. D. Gunardi *et al.*, 2014).



## Gambar 2.6 Mekanisme pembentukan struktur Biofilm

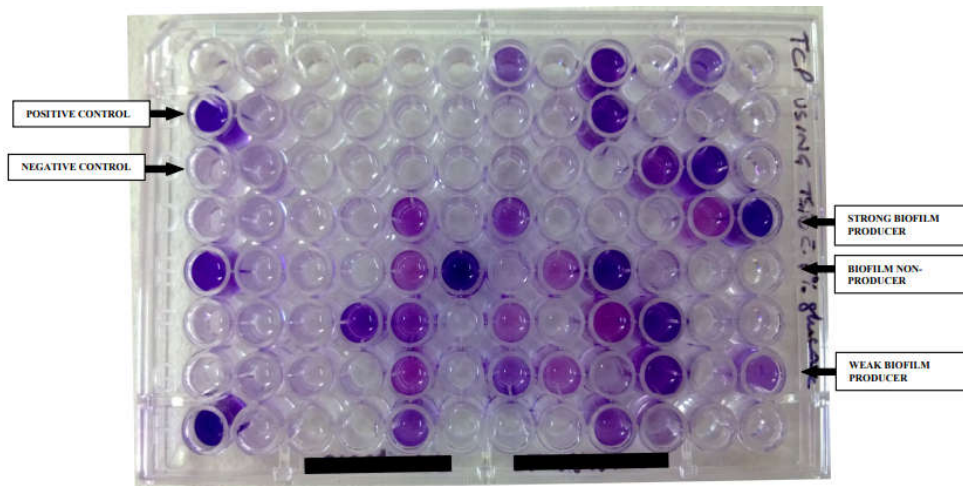
Sumber: Gunardi *et al.*, 2014

Apabila biofilm sudah matang, beberapa sel bakteri akan menyebar untuk mengeksplorasi permukaan lain dan akan menempel pada permukaan baru. Proses tersebut dapat diartikan bahwa dispersi atau *detachment* bukan merupakan akhir daur hidup biofilm, melainkan awal dari daur hidup lainnya. (Toyofuku *et al.*, 2016).

### 2.2.3 Uji Pembentukan Biofilm

#### 2.2.4.1 Metode *Microtiter plate* (MtP)

Metode *Microtiter plate* dapat digunakan sebagai *gold standard*/baku emas dalam mendeteksi biofilm. Metode ini dilakukan untuk mengetahui apakah suatu agen memiliki aktivitas antibiofilm terhadap biofilm yang dibentuk oleh suatu bakteri. Pengukuran biofilm pada metode ini menggunakan *microplate reader* (*microELISA*) (Kirmusaoglu, 2019).



Gambar 2.7 Uji pembentukan biofilm menggunakan metode *Microtiter plate*

Sumber: Ruchi *et al.*, 2018

#### **2.2.4 Biofilm resisten terhadap Antibiotik**

Bakteri yang dapat membentuk biofilm memiliki tingkat resisten antibiotik lebih tinggi daripada bakteri planktonik. Hal ini dikarenakan adanya *Extracellular Polymeric Substances* atau *EPS* pada bakteri yang dapat mempersulit penetrasi antibiotik ke bakteri. Bakteri pembentuk biofilm juga dapat membatasi mobilitas bakteri dan meningkatkan kepadatan sel. Hal tersebut dilakukan bakteri untuk menyediakan lingkungan yang optimal dalam melakukan pertukaran DNA (plasmid) melalui konjugasi. (Rabin *et al.*, 2015). Plasmid berperan dalam membawa gen yang mengatur resistensi terhadap antibiotika. Oleh karena itu, bakteri menjadi tidak sensitif terhadap antibiotik (W. D. Gunardi *et al.*, 2014).

### **2.3 Infeksi Saluran Kemih (ISK)**

#### **2.3.1 Definisi Infeksi Saluran Kemih**

Infeksi saluran kemih merupakan infeksi yang dapat terjadi karena adanya pertumbuhan mikroorganisme pada saluran kemih manusia yaitu ginjal, ureter, kandung kemih, dan uretra (Sari & Muhartono, 2018). Berdasarkan lokasinya, ISK dapat diklasifikasikan menjadi tiga bagian yakni bakteriuria (urin), pyelonefritis (ginjal), dan sistitis (kandung kemih) (Bien *et al.*, 2012).

#### **2.3.2 Epidemiologi Infeksi Saluran Kemih**

Infeksi saluran kemih merupakan infeksi yang banyak terjadi di dunia dan menduduki posisi kedua setelah infeksi saluran pernafasan (Nugraha *et al.*, 2019). Pada tahun 2016, *American Urology Association* menyebutkan terdapat 150 juta kasus infeksi saluran kemih di dunia setiap tahunnya (Lina *et al.*, 2019). Prevalensi ISK di Indonesia pada tahun 2016 menurut Departemen Kesehatan Republik Indonesia mencapai 90-100 kasus per 100.000 penduduk atau sekitar

180.000 kasus baru setiap tahun. Infeksi saluran kemih di provinsi Jawa Timur mencapai 3-4 kasus per 100.000 penduduk setiap tahun (Kemenkes, 2016).

Infeksi saluran kemih adalah infeksi yang mengenai seluruh kelompok usia dan jenis kelamin, namun lebih sering terjadi pada wanita (Sari & Satyabakti, 2015). Infeksi saluran kemih yang timbul akibat pemakaian *catheter-associated UTIs (CAUTISs)* merupakan tipe infeksi saluran kemih yang banyak ditemukan di tempat layanan kesehatan, yakni sekitar dua pertiga dari seluruh kasus infeksi saluran kemih (Semaradana, 2014).

### **2.3.3 Etiologi Infeksi Saluran Kemih**

Penyebab utama infeksi saluran kemih adalah bakteri, namun beberapa jamur dan virus juga dapat menyebabkan infeksi saluran kemih. Agen utama yang berperan dalam penyebab ISK adalah bakteri Gram negatif dan bakteri Gram positif. Bakteri gram negatif dari famili *Enterobacteriaceae*, terdiri dari *Klebsiella*, *Escherichia coli*, dan *Enterobacter*. Bakteri Gram positif terdiri dari *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, dan *Staphylococcus saprophyticus*. Sekitar 80—90% dari semua pasien infeksi saluran kemih, agen penyebab dominannya adalah bakteri *Escherichia coli*. Bakteri *Escherichia coli* yang mampu menyebabkan ISK berasal dari strain *uropathogenic Escherichia coli (UPEC)* (Kudinha, 2017).

### **2.3.4 Faktor Risiko Infeksi Saluran Kemih**

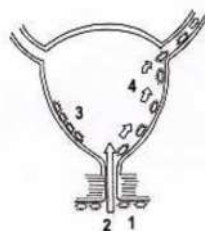
Penggunaan kateter urine atau memiliki penyakit neurologis pada pasien wanita dan anak-anak cenderung berisiko mengalami *catheter-associated UTIs (CAUTISs)* (Ruckle *et al.*, 2020). Ada juga beberapa penyakit yang menjadi faktor risiko ISK, yaitu DM Tipe 2, *HIV* dan inkontinensia urine. Selain itu,

terdapat juga faktor risiko lainnya yang dapat menyebabkan ISK, seperti pemakaian popok anak yang lama, hygiene yang buruk dan anak yang belum di sirkumsisi (Irawan, 2018).

### 2.3.5 Patogenesis Infeksi Saluran Kemih

Infeksi saluran kemih dapat terjadi karena adanya mikroorganisme yang masuk ke dalam saluran kemih manusia yang kemudian melakukan replikasi di urine. Mikroorganisme tersebut masuk ke dalam saluran kemih manusia melalui cara *acending*, limfogen, hematogen, dan dapat juga dari organ disekitarnya yang sebelumnya pernah terinfeksi. Namun, mikroorganisme paling sering masuk ke saluran kemih dengan cara *ascending*. Patogen penyebab infeksi saluran kemih secara umum berasal dari floral normal usus dan hidup di sekitar anus (Purnomo, 2012).

Mekanisme mikroorganisme masuk ke saluran kemih secara *ascending* dimulai dari adanya kolonisasi kuman disekitar uretra kemudian menuju buli-buli dan melakukan penempelan pada dinding buli-buli. Setelah melewati buli-buli, mikroorganisme tersebut menuju ke ureter dan berakhir di ginjal. Apabila mikroorganisme tersebut menginfeksi parenkim dan kapsul ginjal menyebabkan infeksi saluran kemih atas, sedangkan jika mikroorganisme tersebut menginfeksi uretra, buli-buli dan ureter akan menyebabkan infeksi saluran kemih bawah (Purnomo, 2012).



**Gambar 2.8** Mekanisme *Ascending*  
Sumber: Purnomo, 2012



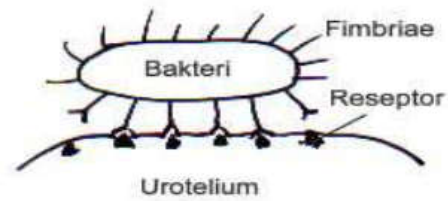
Adanya gangguan keseimbangan antara epitel saluran kemih sebagai *host* dan mikroorganisme penyebab infeksi sebagai *agent* merupakan penyebab terjadinya infeksi saluran kemih. Gangguan keseimbangan tersebut terjadi karena virulensi *agent* yang meningkat atau disebabkan karena sistem pertahanan tubuh *host* mengalami penurunan (Purnomo, 2012).

a. Faktor dari *host*

Epitel saluran kemih sebagai *host* memiliki kemampuan dapat menghalangi mikroorganisme untuk tidak masuk ke dalam saluran kemih. Hal tersebut terjadi karena adanya beberapa faktor, diantaranya adalah pertahanan dari epitel sebagai *host* dan sistem kekebalan tubuh. Adapun kondisi yang mempermudah terjadinya ISK dan menyulitkan terapinya yaitu penyakit-penyakit immunosupresif, diabetes mellitus, usia lanjut dan kehamilan (Purnomo, 2012).

b. Faktor dari *agent* (mikroorganisme)

Bakteri memiliki pili dan fimbriae di permukaannya yang dapat membantu menginfeksi sistem saluran kemih. Pili pada bakteri berperan untuk melakukan penempelan pada urotelium melalui suatu reseptor di permukaannya. Pili bakteri terdapat dua jenis, yaitu tipe pili P yang dapat menyebabkan pielonefritis akut dan tipe pili 1 yang dapat menyebabkan sistitis. Dalam menimbulkan suatu infeksi, bakteri juga memiliki antigen yang mampu memproduksi toksin (*hemolisin*) dan memproduksi enzim urease yang mampu mengubah urine menjadi basa (Purnomo, 2012).



**Gambar 2.9** Bakteri menempel pada sel urotelium  
Sumber: Purnomo, 2012

## 2.4 *Aspergillus oryzae*

### 2.4.1 Taksonomi *Aspergillus oryzae*

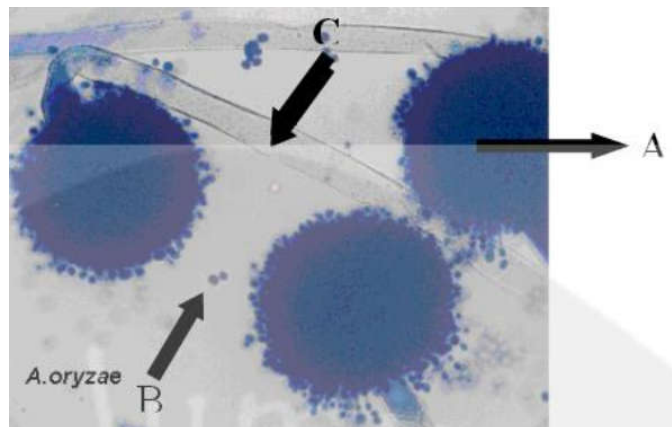
Taksonomi *A. oryzae* menurut Uniprot (2018) dalam (Pimarahayu, 2019):

- Domain : *Eukariot*
- Kingdom : *Fungi*
- Filum : *Ascomycota*
- Subfilum : *Pezizomycotina*
- Kelas : *Eurotiomycetes*
- Subkelas : *Eurotiomycetidae*
- Ordo : *Eurotiales*
- Famili : *Aspergillaceae*
- Genus : *Aspergillus*
- Spesies : *Aspergillus oryzae*

### 2.4.2 Morfologi *Aspergillus oryzae*

*Aspergillus oryzae* mudah ditemukan di alam karena kapang tersebut tumbuh di tanah dan beberapa tanaman kering yaitu serelia, jerami, dan kacang-kacangan. *Aspergillus oryzae* selama pertumbuhannya akan membentuk spora kehijauan dan miselia putih. Suhu pertumbuhan optimum *Aspergillus oryzae* sekitar 35°C, namun suhu untuk produksi adalah 30°C sehingga fermentasi lebih sering dilakukan pada suhu 30°C (Bayuana, 2015).

*Aspergillus oryzae* merupakan kapang parasit atau saprofit dengan masa yang berbentuk filamen atau benang, mutiseluler, tidak berklorofil, dan bercabang. *Aspergillus oryzae* memiliki miselium yang bersekat-sekat. Apabila koloni *Aspergillus oryzae* sudah menghasilkan spora, warnanya akan berubah menjadi coklat kekuningan atau kehitaman serta miselium yang awalnya putih sudah tidak tampak lagi (Bayuana, 2015). *Aspergillus oryzae* memiliki kepala konidia bulat berwarna hijau agak kekuningan. *Aspergillus oryzae* juga memiliki konidifor berdinding kasar dan berbentuk hialin dengan panjang 4-5 mm. *Aspergillus oryzae* memiliki vesikula yang berbentuk semibulat dengan diameter 40-80 mm (Muchtar, 2013).



**Gambar 2.10** Morfologi *Aspergillus oryzae*. A. Kepala Konidia, B. Konidia, C. Konidiofora  
Sumber: Bayuana, 2015

### 2.4.3 Peranan *Aspergillus oryzae*

*Aspergillus oryzae* dalam industri pangan dapat dimanfaatkan dalam pembuatan *koji*, *shoyu*, *sake* dan *miso* (Bayuana, 2015). *Aspergillus oryzae* juga dapat digunakan untuk fermentasi tahap pertama pembuatan tauco, cuka dan kecap (Muchtar, 2013). Dalam fermentasi makanan, *Aspergillus oryzae* menghasilkan sejumlah enzim industri dan bahan kimia khusus yang

memengaruhi warna, rasa dan aroma makanan yang difermentasi (Mulyani *et al.*, 2018).

*Aspergillus oryzae* dapat dimanfaatkan dalam industri pangan karena bukan merupakan mikroba patogen. Hal ini dibuktikan pada saat proses fermentasi *Aspergillus oryzae* tidak menghasilkan *aflatoxin*. Apabila pada makanan terdapat kadar *aflatoxin* yang tinggi akan menyebabkan keracunan (Bayuana, 2015).

*Aspergillus oryzae* mampu menghasilkan enzim ekstraseluler, seperti enzim amilase dan protease. Enzim amilase pada *Aspergillus oryzae* banyak dimanfaatkan dalam industri gula cair, pembuatan pati termodifikasi dan juga bermanfaat dalam industri tekstil (Bayuana, 2015). Dalam industri tekstil, *Aspergillus oryzae* dimanfaatkan untuk menghilangkan pewarna *azo* dari larutan air yang telah digunakan untuk mewarnai tekstil sehingga pewarna tersebut tidak dapat mencemari air (Corso *et al.*, 2012). Enzim protease pada *Aspergillus oryzae* banyak digunakan pada industri susu untuk koagulasi kasein dalam keju dan untuk pengembangan rasa, serta dapat juga bermanfaat dalam industri kue untuk mendapatkan keseragaman tekstur, rasa dan konsistensi dari adonan kue (Rocha-Pizaña *et al.*, 2020). *Aspergillus oryzae* juga mampu memproduksi enzim Naringinase yang dapat menghilangkan rasa pahit dalam industri sari buah jeruk (Zhu *et al.*, 2017).

#### **2.4.4 Kandungan *Aspergillus oryzae***

Menurut Wedhastri 1990 dalam Bayuana 2015, *Aspergillus oryzae* merupakan kapang yang mampu memproduksi enzim  $\alpha$ -galaktosidase,  $\alpha$ -amilase, glutaminase, proteinase, selulase, amiloglukosidase, dan  $\alpha$ -glukosidase dalam

kadar yang banyak (Bayuana, 2015). Dalam penelitian Bhardwaj pada tahun 2019, ditemukan bahwa *Aspergillus oryzae* menghasilkan enzim xylanase yang berpotensi menghidrolisis berbagai biomassa (Bhardwaj *et al.*, 2019). *Aspergillus oryzae* juga memiliki kemampuan menghasilkan enzim ekstraseluler seperti amilase, lipase, protease dan selulase (Benoit-Gelber *et al.*, 2017).

#### **2.4.5 *Aspergillus oryzae* sebagai Antibakteri dan Antibiofilm**

Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Moon & Cha pada tahun 2019, didapatkan bahwa *Aspergillus oryzae* mampu menghambat pertumbuhan dan aktivitas bakteri. Ada beberapa faktor yang dapat mempengaruhi aktivitas antibakteri yaitu kandungan senyawa antibakteri, jenis bakteri yang dihambat, konsentrasi ekstrak dan daya difusi ekstrak (Fitriani, 2014). Semakin tinggi konsentrasi senyawa ekstrak yang diberikan pada uji daya hambat suatu bakteri, akan mempengaruhi diameter zona bening yang terbentuk (Rahmawati *et al.*, 2014).

Selain memiliki kemampuan sebagai antibakteri, *Aspergillus oryzae* juga memiliki kemampuan menghambat pembentukan dari biofilm bakteri. Hal tersebut dikarenakan *Aspergillus oryzae* memiliki kemampuan memproduksi enzim ekstraseluler antara lain enzim  $\alpha$ -amilase dan enzim protease (Cheol Jee *et al.*, 2020).

##### **2.4.5.1 Enzim Amilase**

Enzim amilase adalah kelompok enzim karbohidrase yang mampu menghidrolisis pati dan glikogen, serta menguraikan amilum menjadi maltosa. Enzim amilase sendiri terdapat tiga macam, yaitu  $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -amilase, dan  $\gamma$ -amilase (glukoamilase) (Asadullah, 2014).

*Aspergillus oryzae* merupakan salah satu kapang yang dikenal paling banyak memproduksi enzim  $\alpha$ -amilase (Yuliana & Chuzaemi, 2019). Enzim  $\alpha$ -amilase pada *Aspergillus oryzae* dapat dimanfaatkan untuk mendegradasi polisakarida (karbohidrat) yang merupakan struktur pembentuk biofilm pada sel bakteri (Khoirudin *et al.*, 2020). Selain sebagai antibiofilm, enzim amilase juga memiliki kemampuan sebagai antimikroba. Aktivitas antimikroba enzim amilase ditunjukkan dengan terdapatnya zona bening pada uji zona hambat (Rotua Silitonga *et al.*, 2020).

#### **2.4.5.2 Enzim Protease**

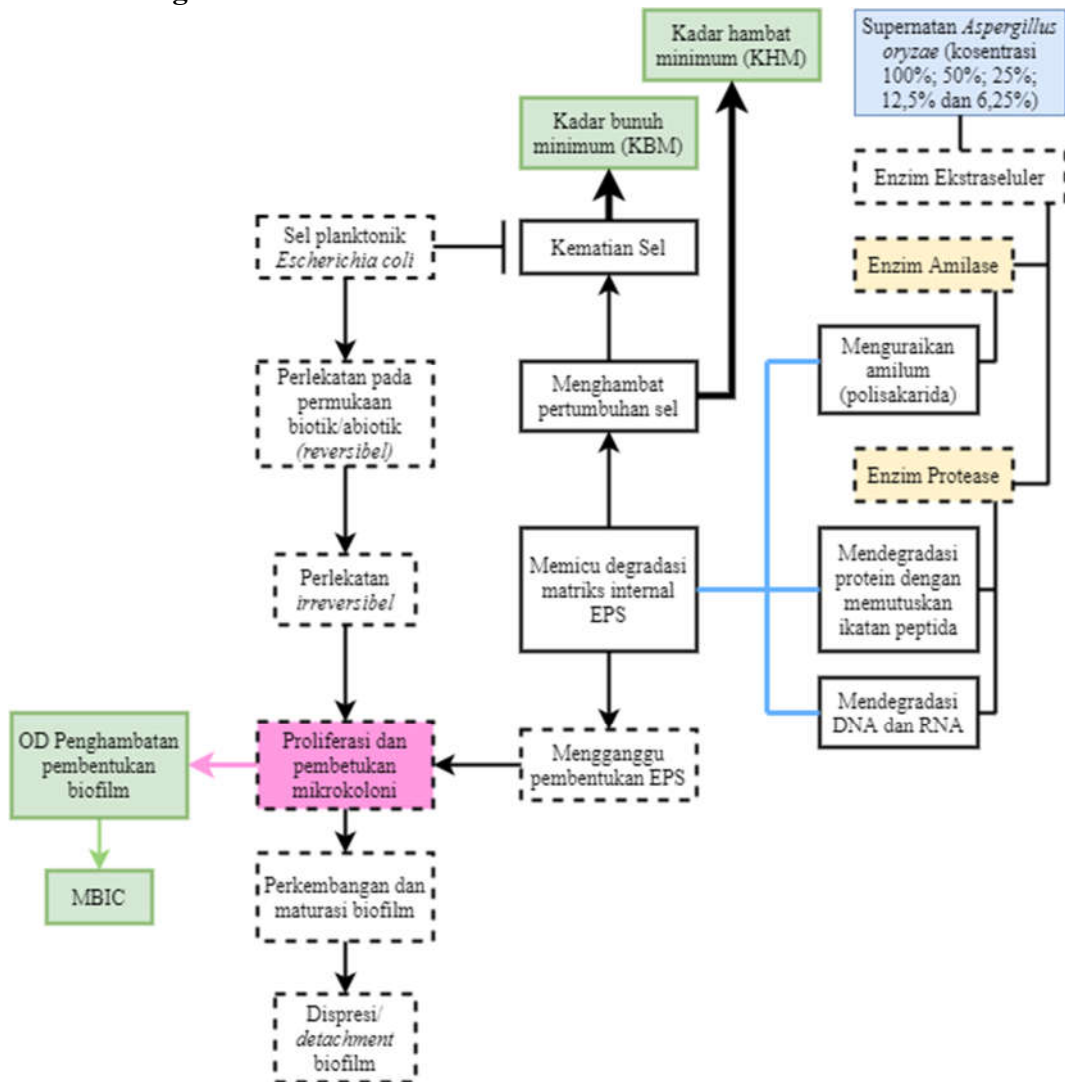
Enzim Protease merupakan enzim yang termasuk metabolit sekunder yang dapat bersifat sebagai antimikroba, antibiofilm, inhibitor enzim dan memiliki sifat yang berguna dalam bidang farmasi (Asadullah, 2014). *Aspergillus oryzae* merupakan salah satu kapang yang dikenal paling banyak memproduksi enzim protease (Yuliana & Chuzaemi, 2019). Enzim protease pada *Aspergillus oryzae* dapat dimanfaatkan memutuskan ikatan peptida pada protein yang menjadi integritas biofilm (Prawira *et al.*, 2015). Enzim protease juga mampu mendenaturasikan atau mendegradasi protein dan asam-asam nukleat (DNA dan RNA) (Mozer, 2015). Dalam penelitian Gofar pada tahun 2014, didapatkan bahwa enzim ekstraseluler protease mampu membentuk zona jernih yang luas dalam pengujian daya hambat bakteri karena sifatnya yang mampu menguraikan protein (Gofar *et al.*, 2014).

#### **2.4.6 Supernatan *Aspergillus oryzae***

Supernatan merupakan hasil metabolit dari kapang isolat *Aspergillus oryzae*. Supernatan pada kapang dapat diperoleh dengan menggunakan alat

sentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu 4°C (Rafsen, 2018). Enzim amilase dan protease merupakan enzim ekstraseluler, sehingga enzim berada dalam cairan (supernatan) hasil fermentasi (Rocha-Pizaña *et al.*, 2020). Enzim ekstraseluler yang disintesis sel bakteri akan dibuang ke media tumbuhnya sehingga enzim ekstraseluler tersebut dapat dipisahkan dari miselia melalui alat sentrifugasi (Arini *et al.*, 2016).

## 2.5 Kerangka Teori Penelitian



Keterangan:

→ Menginduksi

—| Menghambat

— Mengandung

----- Variabel yang tidak diteliti

■ Variabel bebas

■ Variabel tergantung

■ Proses pertumbuhan biofilm

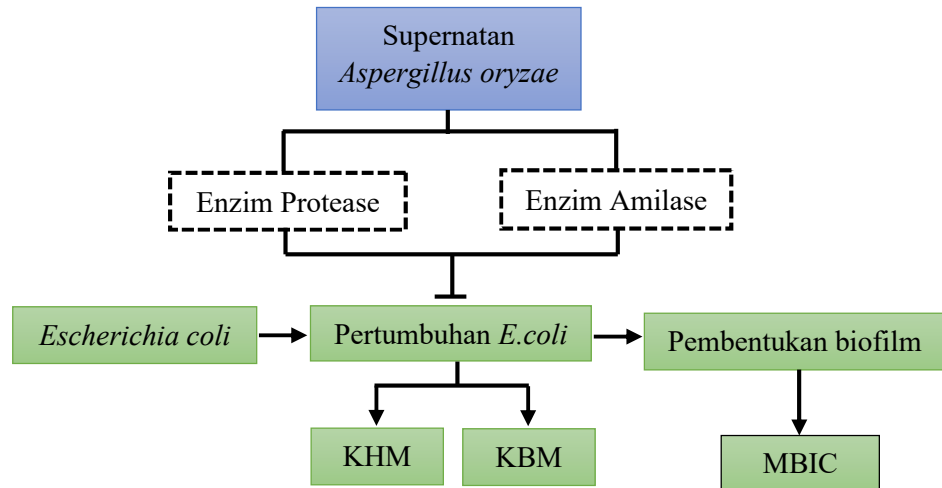
Gambar 2.11 Kerangka Teori Penelitian



## BAB III

### KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

#### 3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Keterangan :



**Gambar 3.1** Kerangka Konsep Penelitian.

Supernatan *Apergillus oryzae* memiliki kandungan enzim ekstraseluler yaitu berupa enzim protease dan enzim amilase. Adanya kandungan enzim ekstraseluler yang dimiliki *Apergillus oryzae* tersebut diduga mampu menghambat pembentukan biofilm dan pertumbuhan *Escherichia coli*.

#### 3.2 Hipotesis Penelitian

Ho: *Apergillus oryzae* tidak memiliki aktivitas antibakteri dan antibiofilm terhadap pertumbuhan dan biofilm *Escherichia coli* pada pasien infeksi saluran kemih.

H<sub>1</sub>: *Apergillus oryzae* memiliki aktivitas antibakteri dan antibiofilm terhadap pertumbuhan dan biofilm *Escherichia coli* pada pasien infeksi saluran kemih.

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1 Rancangan Penelitian dan Jumlah Pengulangan

Rancangan penelitian ini adalah eksperimental murni (*trueexperimental design*) dengan pendekatan *posttest-only control group design*. Uji untuk mengetahui aktivitas antibakteri dan antibiofilm *Aspergillus oryzae* dilakukan dengan metode *microtiter plate biofilm assay*.

Dalam penelitian ini menggunakan delapan jenis kelompok perlakuan, diantaranya adalah lima kelompok uji (konsentrasi supernatan *Aspergillus oryzae* 100%, 50%, 25%, 12,5%, dan 6,25%), kelompok kontrol positif, kelompok kontrol negatif, dan kelompok kontrol media. Jumlah pengulangan dalam penelitian ditentukan dengan Rumus *Federer*. Rumus *Federer* merupakan rumus jumlah subjek untuk penelitian eksperimental (Suhaerah, 2012). Jumlah pengulangan pada penelitian ini, sebagai berikut:

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

$$(8-1)(n-1) \geq 15$$

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

$$7n-7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 3,14$$

Jadi, jumlah pengulangan setiap kelompok perlakuan adalah sebanyak 3 kali.

Keterangan :

t = kelompok perlakuan

n = jumlah pengulangan

#### 4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang pada bulan September 2021 sampai dengan bulan November 2021.

**Tabel 4.1** Jadwal Penelitian

Hari ke-1	Pembuatan Inokulum <i>Aspergillus oryzae</i>
Hari ke-2	Pembuatan Supernatan <i>Aspergillus oryzae</i>
Hari ke-3	Penyiapan Suspensi Bakteri
Hari ke-4	Pembuatan media pertumbuhan bakteri
Hari ke-5	Uji Pembentukan Biofilm <i>Escherichia coli</i>
Hari ke-6	Uji Kosentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Uji Penghambatan Pertumbuhan Biofilm <i>Escherichia coli</i> (MBIC)
Hari ke-7	Uji Kosentrasi Bunuh Minimum (KBM) dan Uji Penghambatan Pertumbuhan Biofilm <i>Escherichia coli</i> (MBIC)
Hari ke-8	Uji Penghambatan Pertumbuhan Biofilm <i>Escherichia coli</i> (MBIC)

#### 4.3 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi yang digunakan pada penelitian ini yaitu biakan bakteri *Escherichia coli*. Sampel pada penelitian ini menggunakan biakan *Escherichia coli* pembentuk *biofilm* yang diisolasi dari pasien ISK.

## **4.4 Variabel Penelitian**

### **4.4.1 Variabel Bebas**

Variabel bebas pada penelitian ini adalah berbagai konsentrasi supernatan *Asperillus oryzae*, yaitu 100%, 50%, 25%, 12,5%, dan 6,25%.

### **4.4.2 Variabel Tergantung**

Variabel tergantung dari penelitian ini adalah Kosentrasi Hambat Minimum (KHM), Kosentrasi Bunuh Minimum (KBM), dan kosentrasi minimal biofilm *Asperillus oryzae* untuk penghambatan pertumbuhan/*Minimum Biofilm Inhibitory Concentration (MBIC) Escherichia coli*.

## **4.5 Kriteria Inklusi dan Eksklusi**

### **4.5.1 Kriteria Inklusi**

1. Supernatan *Aspergillus oryzae* yang terbuat dari inokulum dengan masa inkubasi selama 4 hari pada suhu 28°C di *inkubator shaker*.
2. Koloni *Escherichia coli* yang diisolasi dari pasien infeksi saluran kemih.
3. Koloni *Escherichia coli* yang berusia 24 jam.
4. Koloni *Escherichia coli* yang mampu membentuk biofilm pada uji pertumbuhan biofilm dengan metode *microtiter plate biofilm*.

### **4.5.2 Kriteria Eksklusi**

1. Supernatan *Aspergillus oryzae* yang tidak terbuat dari inokulum dengan masa inkubasi selama 4 hari pada suhu 28°C di *inkubator shaker*.

2. Koloni *Escherichia coli* yang tidak diisolasi dari pasien infeksi saluran kemih.
3. Koloni *Escherichia coli* yang tidak berusia 24 jam.
4. Koloni *Escherichia coli* yang tidak mampu membentuk biofilm pada uji pertumbuhan biofilm dengan metode *microtiter plate biofilm*.

## **4.6 Alat dan Bahan Penelitian**

### **4.6.1 Alat Penelitian**

Alat dalam penelitian ini menggunakan *Microplate 96 wells*, oven, *Microplate Reader*, autoklaf, *Laminar Air Flow (LAF)*, spektrofotometer, gelas ukur, timbangan analitik, tabung reaksi, kuvet, cawan petri, bunsen, ose, pipet tetes, timer, mikropipet, gelas ukur, *erlenmeyer*, tabung falcon, tabung *eppendorf*, kain lap, *syringe filter 0,22 µm*, *yellow dispot tip*, *blue dispot tip*, *aluminium foil*, *ice pack*, baskom kecil, *cotton swab*, dan rak tabung.

### **4.6.2 Bahan Penelitian**

- a. Bakteri uji pada penelitian ini yaitu bakteri *Escherichia coli* yang didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Brawijaya Malang yang diisolasi dari pasien infeksi saluran kemih.
- b. Bahan uji pada penelitian ini yaitu *Asperillus oryzae* yang didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

## **4.7 Definisi Operasional**

- a. Bakteri *Escherichia coli*

Bakteri *Escherichia coli* merupakan bakteri yang mampu membentuk biofilm dan didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi FKIK UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.

b. Supernatan *Aspergillus oryzae*

Supernatan *Aspergillus oryzae* merupakan hasil metabolit dari kapang isolat *Aspergillus oryzae* yang diperoleh dari pemisahan enzim ekstraseluler dengan selnya menggunakan alat sentrifugasi.

c. Kelompok Uji

Kelompok uji merupakan supernatan *Aspergillus oryzae* dengan variasi konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5% dan 6,25% ditambahkan dengan suspensi bakteri *Escherichia coli*.

d. Kontrol Positif

Kontrol positif adalah campuran antibiotik siprofloksasin 100  $\mu$ L yang ditambahkan dengan suspensi bakteri *Escherichia coli*.

e. Kontrol Negatif

Kontrol negatif merupakan campuran *TSB (Tryptic Soy Broth)* dan glukosa 1% ditambahkan dengan suspensi bakteri *Escherichia coli*.

f. Kontrol Media

Kontrol media adalah campuran media *TSB (Tryptic Soy Broth)* 100  $\mu$ L dan media *PDB (Potato Dextrose Broth)*.

g. Uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)

Uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) merupakan uji untuk mengetahui konsentrasi minimal supernatan *Aspergillus oryzae* dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.

h. Uji Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM)

Uji Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) merupakan uji untuk mengetahui konsentrasi minimal supernatan *Aspergillus oryzae* dalam membunuh bakteri *Escherichia coli*.

i. Nilai OD (*Optical Density*)

Nilai OD (*Optical Density*) merupakan suatu ukuran kuantitatif kepadatan biofilm *Escherichia coli*.

j. *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC)

*MBIC* merupakan konsentrasi supernatan *Aspergillus oryzae* terendah yang dapat menghambat pertumbuhan biofilm *Escherichia coli*.

## 4.8 Prosedur Penelitian

### 4.8.1 Sterilisasi Alat

Sebelum menggunakan semua alat penelitian, disterilkan dahulu menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C.

### 4.8.2 Pembuatan Inokulum *Aspergillus oryzae*

Pembuatan inokulum *Aspergillus oryzae* bertujuan untuk memfermentasikan dan mengestraksi metabolit yang dimiliki oleh jamur tersebut. Pembuatan inokulum *Aspergillus oryzae* menggunakan glukosa 2%, koloni jamur *Aspergillus oryzae*, dan media *PDB* (*Potato Dextrose Broth*) yang telah disterilkan di autoklaf. Perbandingan antara *Aspergillus oryzae* yang telah diisolasi dengan media yaitu 1 : 9. Pembuatan inokulum dimulai dengan mencampurkan 45 ml *PDB* (*Potato Dextrose Broth*) yang telah steril dengan 1ml glukosa 2% dalam tabung Erlenmeyer. Selanjutnya, ambil sebanyak 5 ml koloni jamur *Aspergillus*



*oryzae* dengan diameter 8 mm dengan menggunakan ose. Campurkan koloni jamur tersebut ke dalam media *PDB (Potato Dextrose Broth)* yang telah diberi glukosa 2%. Selanjutnya, larutan tersebut di inkubasi di suhu ruangan 28°C selama 3 hari. Inkubasi dilakukan selama 3 hari karena pada jam ke-72 *Aspergillus oryzae* mengalami fase penurunan untuk memperbanyak sel sehingga supernatan dari *A.oryzae* bisa digunakan untuk antibiofilm (Ismail, 2011).

#### **4.8.3 Pembuatan Supernatan *Aspergillus oryzae***

Pembuatan supernatan *Aspergillus oryzae* bertujuan untuk memisahkan enzim ekstraselulernya dari selnya. Pembuatan supernatan *Aspergillus oryzae* dimulai dengan memindahkan inokulum *Aspergillus oryzae* ke dalam tabung *ependorf* dan dimasukkan ke freezer selama 10 – 15 menit, jangan sampai membeku. Setelah larutan dingin, lakukan sentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 10.000 rpm. Selanjutnya, larutan dikeluarkan dari alat sentrifugasi lalu disaring dengan *syringe filter* 0,22 µm yang steril dan ditampung di tabung falcon atau gelas beaker yang telah dilingkupi *ice pack*. Supernatan *Aspergillus oryzae* sudah jadi dan siap untuk digunakan.

#### **4.8.4 Penyiapan Bakteri**

##### **4.8.4.1 Pembuatan Media Pertumbuhan Bakteri**

Dalam penelitian ini media dibuat menggunakan *TSB (Trypticase Soy Broth)* ditambahkan 5% glukosa. *TSB (Trypticase Soy Broth)* sebanyak 200 ml disterilisasi dahulu menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C. Selanjutnya, tambahkan 10 ml glukosa 5% ke *TSB (Trypticase Soy Broth)* yang sudah disterilisasi. Tujuan menambahkan glukosa 5% adalah untuk peningkatan kekuatan bakteri *Escherichia coli* dalam membentuk biofilm.

#### 4.8.4.2 Penyiapan Suspensi Bakteri

Suspensi bakteri *Escherichia coli* dibuat dengan mengambil satu ose kultur *Escherichia coli* yang sudah diremajakan, kemudian dilakukan inokulasi ke tabung reaksi campuran 3 ml *TSB (Trypticase Soy Broth)* dan glukosa 5%. Selanjutnya, tabung reaksi dihomogenkan dan diinkubasikan secara anaerob selama 18 jam dengan suhu 37°C. Selanjutnya, ukur nilai *Optical Density* menggunakan alat spektrofotometer dengan panjang gelombang 595 nm hingga diperoleh nilai *Optical Density (OD)* 0,5. Suspensi bakteri *Escherichia coli* siap digunakan.

#### 4.8.5 Uji Kosentrasi Hambat Minimum (KHM)

Pada penelitian ini, uji kosentrasi hambat minimum (KHM) menggunakan metode dilusi tabung, namun, diganti dengan *microplate 96 wells* untuk meminimalkan jumlah bahan dan alat yang digunakan. Supernatan *Aspergillus oryzae* yang dibutuhkan yaitu dengan kosentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, dan 6,25%. Supernatan *Aspergillus oryzae* sebanyak 100 µL dimasukkan ke sumur uji dengan kosentrasi 100% pada *microplate 96 wells*. Selanjutnya, 100 µL supernatan *Aspergillus oryzae* dimasukkan ke dalam sumur uji dengan kosentrasi 50% yang telah terisi 100 µL media *PDB (Potato Dextrose Broth)*. Selanjutnya, ambil 100 µL dari *microplate 50%* untuk didilusikan pada plate kosentrasi 25%, 12,5%, dan 6,25%. Tujuan diberikan 5 kosentrasi yang berbeda dalam *microplate* adalah untuk memperluas cakupan hasil dari penelitian ini bahwa dalam kosentrasi berapa supernatan *Aspergillus oryzae* yang paling mampu membunuh bakteri *Escherichia coli*. Selanjutnya, suspensi bakteri *Escherichia coli* sebanyak 100 µL masukkan ke dalam tiap kosentersasi pada *microplate 96 wells*.

Selanjutnya, pembuatan kontrol positif dengan memasukkan 100  $\mu$ L antibiotik siprofloksasin dan 100  $\mu$ L suspensi bakteri *Escherichia coli* pada *microplate 96 wells*. Untuk pembuatan kontrol media, masukkan sebanyak 100  $\mu$ L media *PDB (Potato Dextrose Broth)* dan 100  $\mu$ L media *TSB (Tryptic Soy Broth)* yang ditambahkan glukosa 5% pada *microplate 96 wells*. Selanjutnya, pembuatan kontrol negatif dengan memasukkan suspensi bakteri *Escherichia coli* sebanyak 100  $\mu$ L pada *microplate 96 wells*. Selanjutnya, tutup *Microplate* dan lakukan inkubasi dengan inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam.

Selanjutnya, *microplate* diukur menggunakan *Microplate Reader* pada panjang gelombang 595 nm. Pengukuran dengan *Microplate Reader* akan menghasilkan nilai *Optical Density (OD)* yang beragam pada masing-masing *well*. Normalnya, *Optical Density (OD)* akan meningkat dari konsentrasi tertinggi (100%) hingga terendah (6,25%). Untuk mengidentifikasi KHM, maka dapat dianalisis dengan mengetahui *Optical Density (OD)* pada *well* yang mulai menunjukkan angka konstan hingga ke konsentrasi yang lebih rendah. *Optical Density (OD)* yang mulai menunjukkan angka konstan tersebut merupakan KHM dari *Aspergillus oryzae* terhadap *Escherichia coli*.

#### **4.8.6 Uji Kosentrasi Bunuh Minimum (KBM)**

Pada penelitian ini, uji kosentrasi bunuh minimum menggunakan metode streak. Media yang ditanam merupakan media pada *well* yang menunjukkan *Optical Density (OD)* dengan konsentrasi hambat minimum (KHM) serta *well* dengan konsentrasi di atasnya. Media pada *well* diambil sebanyak 3  $\mu$ L dengan menggunakan *yellow micropipete* lalu dituangkan pada *cotton swab*. Selanjutnya, melakukan streak *cotton swab* pada media tanam *TSA (Trypticase Soy Agar)*

sebanyak tiga kali pada bagian cawan petri berbeda hingga merata. Setelah itu, lakukan inkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Selanjutnya, menghitung Kosentrasi bunuh minimum (KBM) dengan *colony counter*.

#### **4.8.7 Uji Aktivitas Biofilm**

##### **4.8.8.1 Uji Pembentukan Biofilm *Escherichia coli***

Uji ini menggunakan metode *microtiter plate biofilm*. Tujuan dilakukan uji ini adalah melihat apakah bakteri *Escherichia coli* dapat membentuk biofilm atau tidak dan untuk melihat kekuatan *Escherichia coli* dalam pembentukan biofilm. Kelompok uji penelitian ini menggunakan 200 µL suspensi *Escherichia coli*, namun untuk kelompok kontrol menggunakan 200 µL *TSB (Tryptic Soy Broth)* dan glukosa 5% yang keduanya dimasukkan ke dalam *microplate 96 wells*. Selanjutnya, tutup *microtiter plate* dan lakukan inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, tanpa dilakukan pengadukan. Masa inkubasi dilakukan selama 24 jam karena koloni bakteri *E. coli* mengalami peningkatan pertumbuhan melebihi jumlah inokulasi bakteri awal sehingga pada jam ke-24 koloni bakteri dapat dilakukan uji pembentukan biofilm (Marfuati *et al.*, 2017) . Setelah dilakukan inkubasi, isi *microplate 96 wells* dibuang, kemudian dicuci dengan larutan *PBS (Phosphat Buffer Saline)* steril untuk meluruhkan sel planktonik yang tidak dapat melekat pada dinding *microplate*. Langkah terakhir, keringkan *microplate 96 wells*.

Setelah kering, 200 µL kristal violet 0,1% dimasukkan ke dalam *microplate* untuk memberi warna biomassa biofilm. Selanjutnya, lakukan inkubasi selama 20 menit pada suhu ruang. Setelah inkubasi, buang isi *microplate 96 wells*, kemudian *microplate 96 wells* dibilas tiga kali dengan Aquades steril. Hal ini

dilakukan untuk meluruhkan sel yang tidak dapat melekat pada dinding *microplate 96 wells*. Selanjutnya, *microplate 96 wells* dikeringkan dengan suhu ruang. Setelah kering, 200  $\mu\text{L}$  asam asetat 30% masukkan ke dalam tiap *microplate* dan lakukan inkubasi selama 15 menit dengan suhu ruang. Selanjutnya, *microplate* dilakukan pengukuran menggunakan alat *microplate reader* dengan panjang gelombang 595 nm untuk memperoleh nilai *Optical Density (OD)* bakteri uji dan *Optical Density (OD)* kontrol.

Untuk mengetahui kekuatan biofilm yang dihasilkan oleh bakteri uji dapat dilihat melalui nilai *Optical Density (OD)*, yang diperoleh dengan cara membandingkan nilai  $OD_{isolat}$  dengan nilai *Optical Density cut-off (ODcut)* (Ruchi *et al.*, 2018). Rumus menghitung nilai *OD* sebagai berikut:

$$OD = \text{rata-rata nilai } OD_{isolat} - ODCut$$

Rumus menghitung *ODcut* sebagai berikut:

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

Keterangan:

$ODcut$  = *Optical Density cut-off*

$ODc$  = *Optical Density control*

$SD$  = *Standard deviation*

**Tabel 4.2** Interpretasi kekuatan bakteri pembentuk biofilm

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

$OD_{cut}$  = Optical Density cut-off,  $OD_{isolat}$  = Optical Density isolat (Ramadan *et al.*, 2017).

#### 4.8.8.2 Uji Penghambatan Pertumbuhan Biofilm *Escherichia coli* (MBIC)

Uji ini menggunakan supernatan *Aspergillus oryzae* dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, dan 6,25%. Supernatan *Aspergillus oryzae* sebanyak 100  $\mu$ L masukkan ke sumur uji dengan konsentrasi 100% pada *microplate 96wells*. Selanjutnya, sebanyak 100  $\mu$ L supernatan *Aspergillus oryzae* dimasukkan ke dalam sumur uji dengan konsentrasi 50% yang telah terisi 100  $\mu$ L media *PDB (Potato Dextrose Broth)*. Selanjutnya, ambil 100  $\mu$ L dari *microplate 50%* untuk didilusikan pada plate konsentrasi 25%, 12,5%, dan 6,25%. Tujuan diberikan 5 konsentrasi yang berbeda dalam *microplate* adalah untuk memperluas cakupan hasil dari penelitian ini bahwa dalam konsentrasi berapa supernatan *Aspergillus oryzae* yang paling mampu membunuh bakteri *Escherichia coli*. Selanjutnya, sebanyak 100  $\mu$ L suspensi bakteri *Escherichia coli* dimasukkan ke dalam tiap kosentersasi pada *microplate 96 wells*.

Selanjutnya, pembuatan kontrol positif dengan memasukkan 100  $\mu$ L antibiotik siprofloksasin sebanyak 100 dan 100  $\mu$ L suspensi bakteri *Escherichia coli microplate 96 wells*. Untuk pembuatan kontrol media, masukkan 100  $\mu$ L media *PDB (Potato Dextrose Broth)* dan 100  $\mu$ L media *TSB (Tryptic Soy Broth)* yang ditambahkan glukosa 5% pada *microplate 96 wells*. Selanjutnya, pembuatan kontrol negatif dengan memasukkan suspensi bakteri *Escherichia coli* sebanyak 100  $\mu$ L pada *microplate 96 wells*. Kontrol negatif digunakan untuk mengetahui potensi kelompok kosentersasi dalam menghambat pertumbuhan biofilm. Dinyatakan memiliki aktivitas antibiofilm apabila hasil OD kelompok kosentersasi lebih rendah daripada kontrol

negatif. Selanjutnya, tutup *Microplate* dan lakukan inkubasi dengan inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam.

Setelah dilakukan inkubasi, keluarkan dari *microplate*, kemudian dicuci tiga kali menggunakan larutan *PBS (Phosphat Buffer Saline)* steril lalu keringkan. Setelah kering, 200 µL kristal violet 0,1% masukkan ke *microplate*, untuk mewarnai biomassa biofilm. Selanjutnya, dilakukan inkubasi selama 15 menit dengan suhu ruang. Setelah diinkubasi, isi *microplate* dibilas tiga kali dengan Aquades steril bertujuan untuk meluruhkan sel yang tidak dapat melekat pada dinding *microplate*. Selanjutnya, *microplate* dikeringkan dengan suhu ruang. Setelah kering, 200 µL larutan Asam Asetat 30% masukkan ke dalam tiap *microplate*. Setelah itu, inkubasi *microplate* selama 15 menit dengan suhu ruang. Selanjutnya, *microplate 96 wells* dilakukan pengukuran dengan alat *microplate reader* dengan panjang gelombang 595 nm.

Penghambatan pertumbuhan biofilm dapat dihitung menggunakan rumus berikut:

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

Keterangan:

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

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

#### 4.9 Denah Perlakuan Uji Aktivitas Antibakteri dan Antibiofilm

Denah perlakuan uji aktivitas antibakteri dan antibiofilm pada *microplate 96 wells*, sebagai berikut:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	● (Pink)	● (Cyan)	● (White)	● (White)	● (Dark Green)	● (Medium Green)	● (Light Green)	● (Very Light Green)	● (White)	● (White)	● (Orange)	● (Grey)
B	● (Pink)	● (Cyan)	● (White)	● (White)	● (Dark Green)	● (Medium Green)	● (Light Green)	● (Very Light Green)	● (White)	● (White)	● (Orange)	● (Grey)
C	● (Pink)	● (Cyan)	● (White)	● (White)	● (Dark Green)	● (Medium Green)	● (Light Green)	● (Very Light Green)	● (White)	● (White)	● (Orange)	● (Grey)
D	● (White)	● (White)	● (White)	● (White)	● (White)	● (White)	● (White)	● (White)	● (White)	● (White)	● (White)	● (White)
E	● (White)	● (White)	● (White)	● (White)	● (White)	● (White)	● (White)	● (White)	● (White)	● (White)	● (White)	● (White)
F	● (White)	● (White)	● (White)	● (White)	● (White)	● (White)	● (White)	● (White)	● (White)	● (White)	● (White)	● (White)
G	● (White)	● (White)	● (White)	● (White)	● (White)	● (White)	● (White)	● (White)	● (White)	● (White)	● (White)	● (White)
H	● (White)	● (White)	● (White)	● (White)	● (White)	● (White)	● (White)	● (White)	● (White)	● (White)	● (White)	● (White)

Keterangan:

- (Dark Green) Kelompok uji kosentrasi 100%
- (Medium Green) Kelompok uji kosentrasi 50%
- (Light Green) Kelompok uji kosentrasi 25%
- (Very Light Green) Kelompok uji kosentrasi 12,5%
- (White) Kelompok uji kosentrasi 6,25%
- (Pink) Kontrol positif
- (Cyan) Kontrol negatif
- (Orange) Kontrol media
- (Grey) Kontrol supernatan (CFS)

**Gambar 4.1** Denah perlakuan uji aktivitas antibakteri dan antibiofilm pada *microplate 96 wells*. Semua kelompok uji dan kelompok kontrol dimasukkan secara bersamaan kemudian dilakukan inkubasi selama 24 jam di inkubator dengan suhu 37°C.



## **4.10 Perhitungan Konsentrasi Supernatan Minimal Antibakteri dan Antibiofilm**

### **4.10.1 Konsentrasi Supernatan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)**

Konsentrasi supernatan minimal untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* (KHM) ditentukan dari konsentrasi supernatan *Aspergillus oryzae* terendah yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E.coli* biasanya ditunjukkan dalam satuan mg/L.

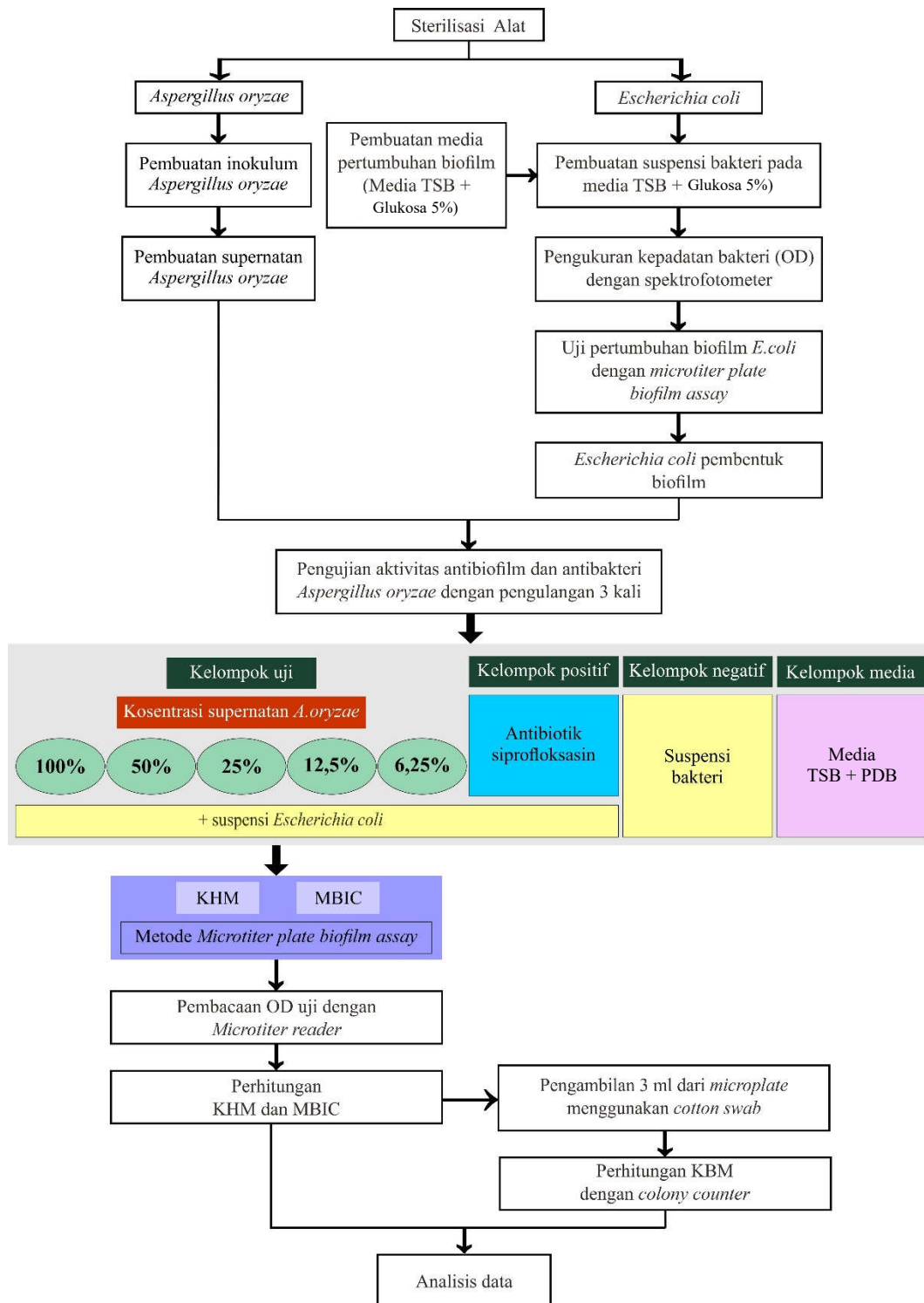
### **4.10.2 Konsentrasi Supernatan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM)**

Konsentrasi supernatan minimal untuk membunuh pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* (KBM) ditentukan dari konsentrasi supernatan *Aspergillus oryzae* terendah yang dapat membunuh pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* biasanya ditunjukkan dalam satuan mg/L.

### **4.10.3 Konsentrasi Supernatan Minimal Penghambatan Biofilm (MBIC)**

*Minimum Biofilm Inhibition Concentration* atau konsentrasi supernatan minimal penghambatan biofilm ditentukan dari konsentrasi supernatan *Aspergillus oryzae* terendah yang mampu menghambat pertumbuhan biofilm *Escherichia coli*.

## 4.11 Alur Penelitian



Gambar 4.2 Alur penelitian.

#### 4.12 Analisis Data

Data penelitian ini dianalisis menggunakan program *SPSS (Statistical Package for the Social Sciences)* versi 26. Data tersebut dilakukan analisis dengan menggunakan uji *One-Way Anova (One-Way Analysis of Variance)*. Uji *Anova* dilakukan untuk mengetahui perbedaan rerata lebih dari dua kelompok data.

Untuk mengetahui distribusi data dilakukan uji normalitas, yakni menggunakan uji *Saphiro-Wilk*. Penelitian ini menggunakan uji *Saphiro-Wilk* karena jumlah sampel data kurang dari 50 sampel. Jika didapatkan nilai lebih dari 0,05, maka data tersebut terdistribusi normal; sedangkan jika didapatkan nilai kurang dari 0,05 maka data tidak terdistribusi normal. Selanjutnya, data dilakukan uji *Lavene* untuk mengetahui apakah data tersebut homogen atau tidak. Data dinyatakan homogen apabila data diperoleh nilai di atas 0,05.

Apabila data didapatkan tidak homogen dan tidak terdistribusi normal, maka tidak dapat dilakukan uji *Anova*. Data tersebut akan dilakukan uji *Kruskal Wallis*. Apabila dari uji *Kruskal Wallis* atau uji *Anova* didapatkan perbedaan signifikan dengan nilai kurang dari 0,05, maka dapat dilanjutkan menggunakan uji *Post Hoc* untuk mengetahui perbedaan signifikan konsentrasi dari penelitian.

## BAB V

### HASIL PENELITIAN

#### 5.1 Hasil Identifikasi Jamur

Uji identifikasi Jamur *Aspergillus oryzae* pada penelitian ini menggunakan uji makroskopis dan uji mikroskopis.

#### 6.1 Uji Makroskopis

Uji identifikasi secara makroskopis jamur *Aspergillus oryzae* secara makroskopis menggunakan media *Potato Dextrose Agar (PDA)*. Pertumbuhan Jamur *Aspergillus oryzae* pada medium *PDA* menghasilkan spora berwarna putih kekuningan.



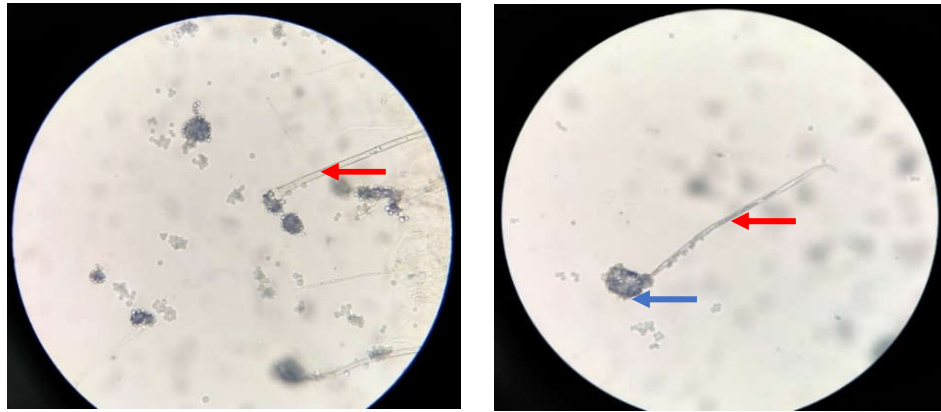
**Gambar 5.1** Hasil identifikasi *Aspergillus oryzae* secara makroskopis.

Keterangan:

→ : Spora *Aspergillus oryzae*

#### 6.2 Uji Mikroskopis

Uji Identifikasi jamur *Aspergillus oryzae* secara mikroskopis menunjukkan adanya vesikula berbentuk semibulat yang di kelilingi konidia dan konidiofora yang memiliki bentuk seperti batang yang memanjang dengan tekstur halus dan cenderung tidak berwarna.



**Gambar 5.2** Hasil identifikasi *Aspergillus oryzae* secara mikroskopis.

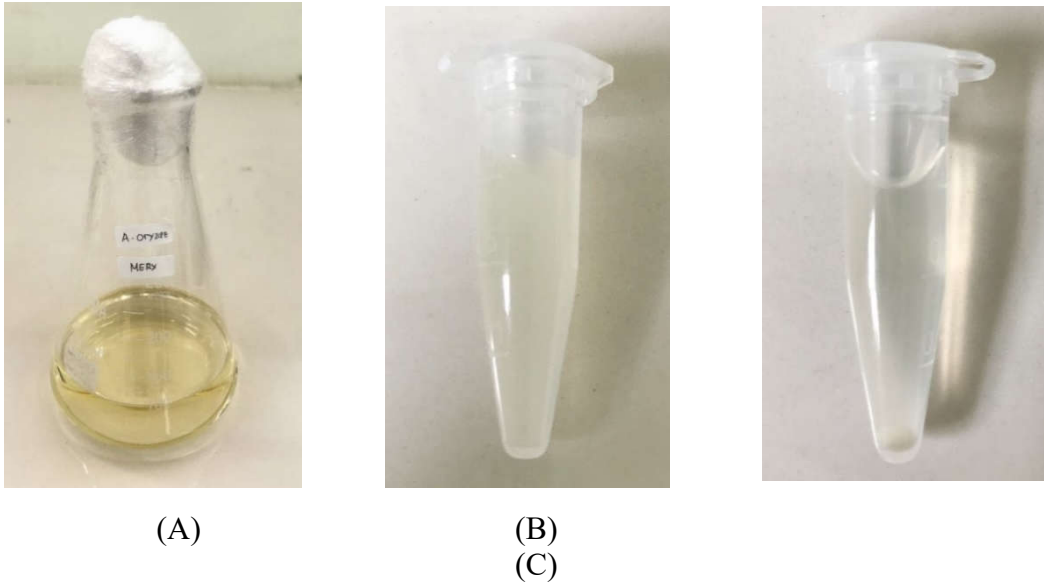
Keterangan:

→ : konidiofor

→ : konidia

## **5.2 Hasil Pembuatan *Cell Free Supernatant (CFS)***

*Cell Free Supernatant* didapatkan dari jamur *Aspergillus oryzae* yang telah diambil sporanya dan diinokulasikan pada 100 mL *Potato Dextrose Broth (PDB)*. Inokulum jamur kemudian diinkubasi pada suhu 28<sup>0</sup>C dalam *incubator shaker* selama 3 hari. Pada hari ketiga inkubasi, inokulum jamur dikeluarkan lalu dipindahkan ke dalam tabung *eppendorf*. Selanjutnya, dilakukan sentrifugasi dan disaring dengan *syringe filter* 0,22 µm hingga didapatkan *CFS* berwarna kuning bening. Hasil *CFS* dapat dilihat pada gambar 5.3.



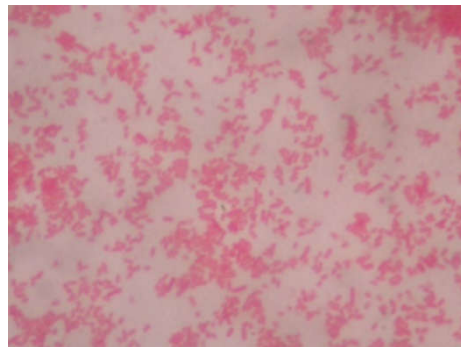
**Gambar 5.3** (A) inokulum *A. Oryzae* sebelum dilakukan penyaringan, (B) CFS *A. Oryzae* setelah dipindahkan ke tabung *eppendorf*, (C) CFS *A. Oryzae* setelah dilakukan sentrifugasi.

### 5.3 Hasil Identifikasi Bakteri

Uji identifikasi bakteri *Escherichia coli* pada penelitian ini menggunakan uji mikroskopis, uji makroskopis dan uji biokimia (*IMViC*).

#### 5.3.1 Uji Mikroskopis

Uji identifikasi secara mikroskopis pada sampel bakteri *Escherichia coli* dilakukan menggunakan pewarnaan Gram. Hasil pewarnaan gram menunjukkan bakteri *E. Coli* bewarna merah mudah dan berbentuk batang pendek. Hasil tersebut menunjukkan bahwa sampel bakteri ini merupakan bakteri gram negatif.



**Gambar 5.4** Hasil uji pewarnaan Gram bakteri *Escherichia coli*

### 5.3.2 Uji Makroskopis

Uji identifikasi secara makroskopis pada sampel bakteri *Escherichia coli* dilakukan menggunakan media *Mac Conkey Agar (MCA)*. Pada media *Mac Conkey Agar (MCA)* tampak koloni yang berbentuk bulat, kecil, bewarna merah dengan tepi rata dan elevansi koloni cembung.



**Gambar 5.5** Koloni *E.coli* pada media *Mac Conkey Agar (MCA)*.

### 5.3.3 Uji Biokimia

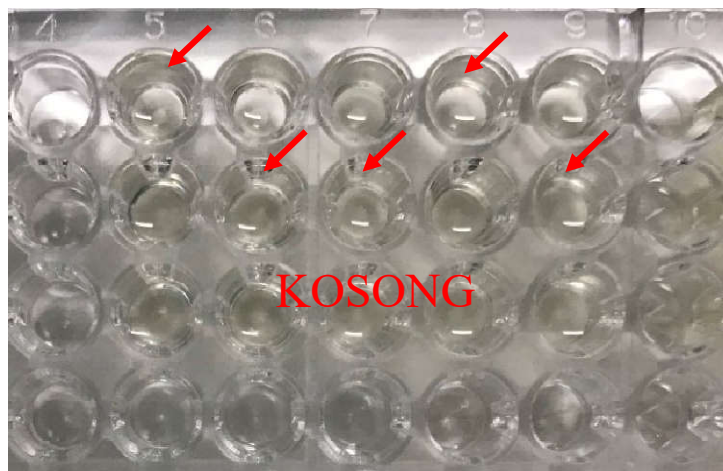
Uji biokimia *IMViC (Indole, Voges-Proskarer, and Citrat)* dan *TSI* terhadap sampel bakteri *E. Coli* dapat dilihat pada tabel 5.1 berikut.

**Tabel 5.1** Hasil uji biokimia IMViC terhadap bakteri uji

No.	Uji IMViC	Hasil
1.	Indol	Positif
2.	<i>Voges-Proskarer</i>	Negatif
3.	Sitrat	Negatif
4.	Urease	Negatif
5.	TSI	H <sub>2</sub> S (-), G (+)

#### 5.4 Hasil Uji Kosentrasi Hambat Minimum (KHM)

Hasil uji kadar hambat minimum (KHM) pada penelitian ini dilakukan menggunakan *microplate v button*. Pada dasar *microplate v button* terdapat titik keruh di semua kelompok sampel. Hal tersebut menunjukkan bahwa CFS *A.oryzae* tidak memiliki kemampuan untuk menghambat bakteri *Escherichia coli*.



**Gambar 5.6** Hasil uji kadar hambat minimum pada *microplate v button*

Keterangan:

→ : Titik keruh

#### 5.5 Hasil Uji Kosentrasi Bunuh Minimum (KBM)

Uji kadar bunuh minimum (KBM) menggunakan kosentrasi terendah CFS *A.oryzae* yang mampu membunuh 99% atau 100% bakteri. Uji ini dilakukan setelah mendapatkan hasil dari uji kadar hambat minimum. Namun, pada penelitian ini CFS *A.oryzae* tidak memiliki kadar hambat minimum, sehingga penulis tidak melanjutkan uji kadar bunuh minimum.



## 5.6 Hasil Uji Pembentukan Biofilm

Hasil uji pembentukan biofilm bakteri *Escherichia coli* menggunakan metode *microtiter plate biofilm assay* dengan *Optical Density* suspensi bakteri uji 0,5 setelah dilakukan inkubasi 24 jam dengan suhu 37°C. Hasil uji pembentukan biofilm *Escherichia coli* dapat dilihat pada tabel 5.2.

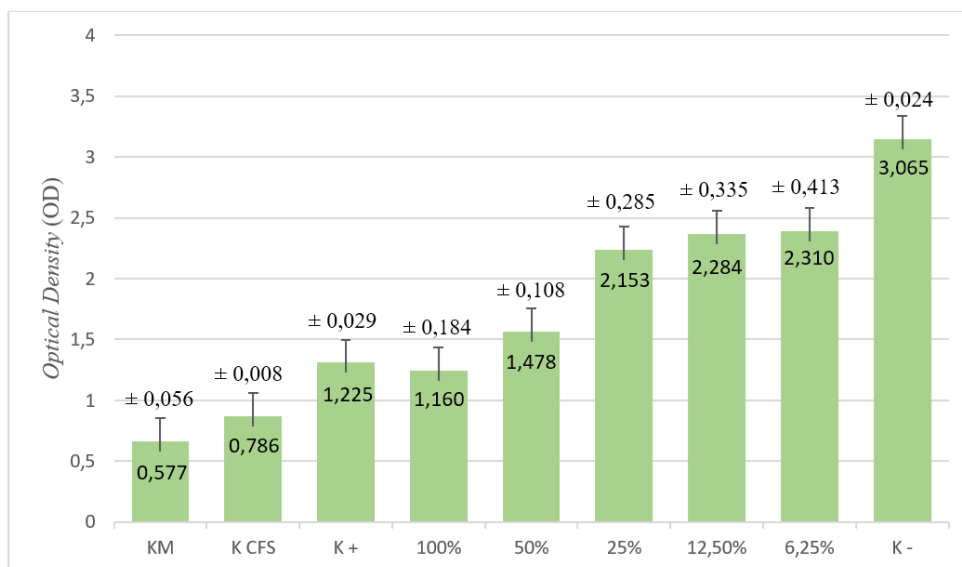
**Tabel 5.2** Hasil uji deteksi pertumbuhan biofilm *E.coli*

Kelompok perlakuan	<i>Optical Density</i>					
	Pengulangan			Rata-rata	SD	OD <sub>cut</sub>
	1	2	3			
Kelompok uji: Suspensi bakteri <i>E.coli</i>	2,431	2,555	2,467	2,484	0,052	0,481
Kelompok kontrol: media <i>PDB</i> dan <i>TSB</i> + glukosa 5%	0,596	0,635	0,500	0,313	0,056	

Dari tabel diatas dapat ditentukan hasil pembentukan biofilm *Escherichia coli* dengan membandingkan nilai  $OD_{isolat}$  dengan  $OD_{cut}$ . Nilai  $OD_{cut}$  didapatkan dengan rumus  $ODc + (3 \times SD \ ODC)$ . Bakteri memiliki kemampuan pembentukan biofilm yang kuat apabila memenuhi kriteria hasil  $4 \times OD_{cut} < OD_{isolat}$ . Dari hasil penelitian ini menunjukkan bakteri *Escherichia coli* termasuk dalam kelompok *strong-biofilm producer* karena memenuhi kriteria  $4 \times OD_{cut} < OD_{isolat}$  yaitu sebesar  $1,672 < 2,484$ .

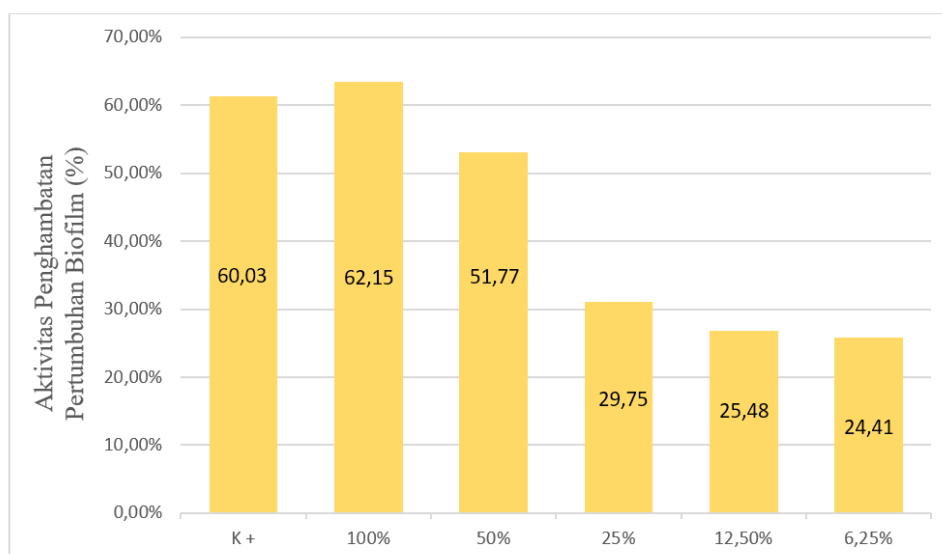
## 5.7 Hasil Uji Penghambatan Pertumbuhan Biofilm *Escherichia coli*

*Optical Density (OD)* pada uji penghambatan pertumbuhan biofilm menunjukkan grafik meningkat pada kelompok uji. Nilai *OD* tertinggi pada kelompok uji adalah *CFS* dengan konsentrasi 6,25% dan *OD* terendah kelompok uji adalah *CFS* dengan konsentrasi 50%. Hasil *OD* uji penghambatan pertumbuhan biofilm bakteri *Escherichia coli* dapat dilihat pada gambar 5.7.



**Gambar 5.7** Hasil OD uji penghambatan pertumbuhan biofilm *E.coli*.

Hasil persentase uji penghambatan pertumbuhan biofilm tertinggi terlihat pada *Cell Free Supernatant (CFS) A.oryzae* dengan konsentrasi 100% yaitu sebesar 62,15% dan hasil terendah terlihat pada *CFS A.oryzae* dengan konsentrasi 6,25% yaitu sebesar 24,41%. Hasil persentase penghambatan pembentukan biofilm dapat dilihat pada gambar 5.7.



**Gambar 5.8** Persentase penghambatan pertumbuhan biofilm *E.coli*.

Hasil analisis data uji penghambatan pertumbuhan biofilm pada penelitian ini menggunakan program *SPSS (Statistical Package for the Social Sciences)* versi

26. Pada uji normalitas *Saphiro Wilk* didapatkan  $p > 0,05$  menunjukkan bahwa data pada penelitian ini terdistribusi normal. Pada uji homogenitas *Levene* didapatkan nilai 0,000 ( $p < 0,05$ ) menunjukkan bahwa data tidak homogen atau varian data berbeda. Setelah data diketahui terdistribusi normal, maka dapat dilanjutkan dengan uji *One-Way ANOVA*. Pada uji *One-Way ANOVA* didapatkan nilai 0,000 ( $p < 0,05$ ) menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan. Untuk melihat perbedaan signifikan dari setiap perlakuan yang diberikan digunakan uji *Post-Hoc Games-Howell* dengan kriteria nilai  $p < 0,05$ . Hasil uji *Post-Hoc Games-Howell* dapat dilihat pada tabel 5.3.

**Tabel 5.3** Hasil uji *Post-Hoc Games-Howell* penghambatan pertumbuhan biofilm.

Perlakuan	Nilai Probabilitas								
	K+	K-	KM	K.CFS	100%	50%	25%	12,5%	6,25%
K+		0,000	0,005	0,006	0,999	0,329	0,134	0,203	0,278
K-	0,000		0,000	0,000	0,020	0,008	0,106	0,336	0,476
KM	0,005	0,000		0,152	0,187	0,013	0,038	0,080	0,119
K.CFS	0,006	0,000	0,152		0,411	0,055	0,063	0,110	0,156
100%	0,999	0,020	0,187	0,411		0,572	0,087	0,152	0,234
50%	0,329	0,008	0,013	0,055	0,572		0,232	0,313	0,418
25%	0,134	0,106	0,038	0,063	0,087	0,232		0,995	0,995
12,5%	0,203	0,336	0,080	0,110	0,152	0,313	0,995		1,000
6,25%	0,278	0,476	0,119	0,156	0,234	0,418	0,995	1,000	

## BAB VI

### PEMBAHASAN

#### 6.1 Identifikasi Karakteristik jamur *Aspergillus oryzae*

Jamur yang digunakan dalam penelitian ini adalah jamur dari spesies *Aspergillus oryzae*. Hal tersebut ditunjukkan dari hasil uji identifikasi jamur *Aspergillus oryzae* pada gambar 5.1 didapatkan spora berwarna putih kekuningan sesuai dengan karakteristik jamur *A. Oryzae* yang disebutkan oleh Bayuana (2015). Pada gambar 5.2, hasil uji identifikasi *A. Oryzae* terlihat juga vesikula berbentuk semibulat yang di kelilingi konidia dan konidiofor yang memiliki bentuk seperti batang yang memanjang dengan tekstur halus dan cenderung tidak berwarna sesuai dengan karakteristik jamur *A. Oryzae* yang disebutkan oleh Muchtar (2013).

#### 6.2 Identifikasi Karakteristik bakteri *Escherichia coli*

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *Escherichia coli*. Hal tersebut ditunjukkan dari hasil uji identifikasi secara makroskopis yang dilakukan pada media *MacConkey Agar (MCA)* pada gambar 5.5, didapatkan koloni bakteri *Escherichia coli* berbentuk bulat, kecil, berwarna merah dengan tepi rata dan elevansi koloni cembung sesuai dengan yang disebutkan oleh Jawetz *et al.*, (2013). Uji identifikasi secara mikroskopis pada gambar 5.4 terlihat bakteri *E. Coli* berwarna merah mudah dan berbentuk batang pendek yang menunjukkan bahwa *Escherichia coli* merupakan bakteri gram negatif seperti yang disebutkan oleh Ulfah *et al.*, (2017). Pada uji biokimia *TSIA*, didapatkan bahwa bakteri *E. Coli* dapat menghasilkan gula dan tidak ditemukan adanya H<sub>2</sub>S. Pada hasil uji indole didapatkan bakteri *E. coli* mampu memanfaatkan sitrat sebagai sumber

karbon yang ditandai dengan hasil positif pada uji ini. Pada hasil uji *Voges-Proskauer* memberikan hasil negatif karena *Escherichia coli* memfermentasikan karbohidrat menjadi produk asam dan tidak menghasilkan produk netral seperti *acetoin*. Pada uji sitrat didapatkan hasil negatif karena bakteri *E.coli* ini tidak mampu mengubah medium biru menjadi hijau. Dan memberikan hasil negatif pada uji urease yang berarti bakteri *E.coli* tidak mampu menghasilkan enzim urease (Rahayu & Gumilar, 2017).

### **6.3 Uji Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum**

#### **(KBM)**

Aktivitas pembentukan biofilm pada agen antibiofilm dapat ditentukan melalui nilai konsentrasi dibawah Kadar Hambat Minimum (KHM) (Fitria *et al.*, 2018). Oleh karena itu, sebelum melakukan uji pembentukan biofilm dan uji penghambatan pertumbuhan biofilm, peneliti melakukan uji Kadar Hambat Minimum (KHM) terlebih dahulu. Kosentrasi hambat minimum (KHM) adalah kosentrasi agen antibakteri terendah yang masih dapat menghambat pertumbuhan organisme tertentu. Uji Kadar Hambat minimum (KHM) dapat ditentukan dengan pengamatan kekeruhan pada dasar *microplate* (Vifta *et al.*, 2017). Pada penelitian ini, hasil uji Kadar Hambat Minimum (KHM) *Aspergillus oryzae* terhadap bakteri *Escherichia coli* menyatakan bahwa *A.oryzae* tidak memiliki aktivitas menghambat pertumbuhan bakteri *E.coli* ditunjukkan dengan terdapat kekeruhan di dasar *microplate v button*. Hal tersebut disebabkan karena senyawa antibiofilm pada CFS *A.oryzae* hanya mampu menghambat pertumbuhan biofilm tanpa mengganggu proses pertumbuhan planktonik. Untuk uji Kadar Bunuh Minimum (KBM) dapat dilakukan dengan melakukan kultur sampel dari sumuran yang

diduga menghasilkan nilai KHM pada media agar (Fitria *et al.*, 2018). Dikarenakan pada penelitian ini uji KHM menyatakan *CFS A.oryzae* tidak memiliki KHM, maka penulis tidak melakukan uji Kadar Bunuh Minimum (KBM).

#### **6.4 Uji Pembentukan Biofilm *Escherichia coli***

Pada penelitian ini, uji pembentukan biofilm menggunakan metode *microtiter plate biofilm assay*. Metode *microtiter plate* ini merupakan metode kuantitatif yang mampu mengetahui kemampuan bakteri *Escherichia coli* dalam membentuk biofilm dan menilai kekuatan bakteri *Escherichia coli* dalam pembentukan biofilm (Kirmusaoglu, 2019). Uji pembentukan biofilm ini dilakukan dengan menggunakan kelompok uji dan kelompok kontrol. Kelompok uji pada penelitian ini yaitu suspensi bakteri *E.coli* yang terdiri dari 1 ose bakteri *E.coli* dan media TSB yang ditambahkan glukosa 5%. Tujuan penambahan glukosa 5% untuk meningkatkan pembentukan biofilm bakteri *E.coli*. Kelompok kontrol pada penelitian terdiri dari media PDB dan media TSB yang ditambahkan glukosa 5%.

Kelompok uji dan kelompok kontrol tersebut dimasukkan ke dalam *microplate 96wells*. Selanjutnya di inkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C di dalam inkubator agar bakteri tersebut membentuk biofilm. Setelah diinkubasi, dilakukan pencucian dengan *Phosphate-Buffered Saline* (PBS) steril. PBS dipilih dalam penelitian ini dikarena *PBS* tersebut mampu membuang sel planktonik pada dinding *microplate* tanpa merusak struktur dinding biofilm bakteri. Selanjutnya biofilm yang berada pada *well microplate* tersebut dilakukan pewarnaan dengan kristal violet 0,1%. Pewarnaan dengan kristal violet 0,1% ini dilakukan untuk mengikat muatan negatif pada permukaan molekul dan polisakarida sehingga

pewarna tersebut melekat pada *well* yang terdapat biofilm. Hasil pewarnaan dengan kristal violet 0,1% akan terlihat cincin bewarna ungu pada permukaan atas dinding *microplate*. Setelah itu, dilakukan pemberian asam asetat 30% untuk melarutkan cincin pada dinding microplater tersebut (Azeredo *et al.*, 2017).

Setelah pemberian asam asetat 30%, dilakukan pengukuran nilai *Optical Density (OD)* menggunakan *microplate reader* dengan panjang gelombang 595 nm. Pada uji deteksi pembentukan biofilm didapatkan hasil  $OD_{isolat}$  sebesar 2,484 dan  $OD_{cut}$  0,418. Hasil tersebut menunjukkan bahwa bakteri *Escherichia coli* termasuk dalam kelompok *strong-biofilm producer*. Kekuatan bakteri *Escherichia coli* dalam membentuk biofilm memenuhi kriteria hasil  $4 \times OD_{cut} < OD_{isolat}$ . Hal tersebut sesuai dengan hasil penelitian yang sebelumnya dilakukan oleh Ramadhan (2017) yang membuktikan bahwa bakteri *Escherichia coli* termasuk dalam kategori pembentuk biofilm kuat dengan memenuhi kriteria  $4 \times OD_{cut} < OD_{isolat}$ .

### **6.5 Uji Penghambatan Pertumbuhan Biofilm *Escherichia coli***

Pada penelitian ini, uji penghambatan pertumbuhan biofilm menggunakan metode *microtiter plate biofilm assay*. Metode *microtiter plate* ini merupakan metode kuantitatif yang mampu mendeteksi kemampuan konsentrasi CFS *Aspergillus oryzae* dalam menghambat pertumbuhan biofilm bakteri *Escherichia coli*. Berbagai konsentrasi CFS *Aspergillus oryzae* dimasukkan secara bersamaan dengan suspensi bakteri *E.coli* kedalam *microplate 96wells*. Setelah itu, dilakukan inkubasi selama 24 jam di dalam inkubator dengan suhu 37°C. Selanjutnya dilakukan tahapan pencucian, pewarnaan dan perhitungan *Optical Density (OD)* seperti pada uji pembentukan biofilm.

Hasil *Optical Density (OD)* uji penghambatan pertumbuhan dapat dilihat pada gambar 5.6. Berdasarkan hasil *Optical Density (OD)* tersebut kontrol positif dan kontrol *CFS* dengan berbagai konsentrasi memiliki nilai *OD* lebih rendah dari pada kontrol negatif. Hal ini menunjukkan *CFS* dengan berbagai konsentrasi tersebut mampu menghambat pertumbuhan biofilm bakteri *E.coli*. *CFS* dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5% dan 6,25% memiliki nilai *Optical Density (OD)* 1,160; 1,478; 2,135; 2,284 dan 2,310. Hal tersebut menunjukkan *CFS A. Oryzae* dengan konsentrasi 100% memiliki nilai *OD* paling rendah sebesar 1,160 dan hasil persentase uji aktivitas penghambatan pertumbuhan sebesar 62,15%. Penurunan nilai *Optical Density (OD)* pada *CFS* menandakan terdapat pengurangan intensitas warna ungu pada pewarnaan dengan kristal violet. Hal tersebut menunjukkan terdapat penurunan ketebalan pada matriks biofilm bakteri uji (Khotimah, 2020).

Hasil *Optical Density (OD)* uji penghambatan pertumbuhan biofilm kemudian dianalisis menggunakan *SPSS* versi 26. Dari analisis data uji penghambatan pembentukan biofilm, didapatkan bahwa data terdistribusi normal dengan nilai  $p > 0,05$ . Pada uji homogenitas menunjukkan bahwa data tidak bersifat homogen karena  $p < 0,05$ . Setelah memenuhi syarat parametrik maka dapat dilanjutkan dengan uji *One-Way ANOVA*. Pada uji *One-Way ANOVA* menunjukkan nilai  $p < 0,05$  yang berarti data memiliki perbedaan yang signifikan. Setelah itu, dapat dilakukan uji *Post-Hoc Games-Howell* karena data normal tetapi variannya berbeda atau tidak homogen serta sampel pada penelitian ini tidak berpasangan. Dari uji *Post-Hoc Games-Howell* terdapat perbedaan nilai yang signifikan pada ke tiga kontrol konsentrasi (100%, 50% dan 25%) dan kontrol



positif terhadap kontrol negatif dengan nilai  $p < 0,05$ . Hal tersebut membuktikan bahwa *CFS A.oryzae* dan antibiotik siprofloksasin dapat menghambat pertumbuhan biofilm bakteri *Escherichia coli*. Pada kontrol positif tidak terdapat perbedaan nilai yang signifikan dengan ke lima konsentrasi (100%, 50%, 25%, 12,5% dan 6,25%) dengan nilai  $p > 0,05$  sehingga artinya kelompok *CFS A.oryzae* dengan berbagai konsentrasi memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan biofilm yang sama dengan kontrol positif dengan nilai *Optical Density (OD)* yang berbeda.

Jamur *Aspergillus oryzae* memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan biofilm karena mengandung enzim ekstraseluler berupa enzim  $\alpha$ -amilase dan protease (Yuliana & Chuzaemi, 2019). Enzim  $\alpha$ -amilase pada *Aspergillus oryzae* mampu mendegradasi polisakarida (karbohidrat) yang merupakan struktur pembentuk biofilm pada sel bakteri (Khoirudin *et al.*, 2020). Enzim protease pada *Aspergillus oryzae* mampu memutuskan ikatan peptida pada protein yang menjadi integritas biofilm (Prawira *et al.*, 2015). Hal tersebut dibuktikan dengan hasil uji antibiofilm pada penelitian ini menunjukkan adanya penurunan nilai *Optical Density (OD)* kontrol negatif terhadap *Optical Density (OD)* semua kontrol *CFS Aspergillus oryzae*.

## **6.6 Kajian Integrasi Islam mengenai Aktivitas Antibiofilm *Aspergillus oryzae* terhadap biofilm *Escherichia coli***

Penelitian uji aktivitas antibiofilm *Aspergillus oryzae* terhadap biofilm *Escherichia coli* selaras dengan ayat Al-Qur'an Surat Asy-Syua'ara' ayat 7-8 berikut ini (Depatemen Agama RI, 2017):

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ - ٧

إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً لِّقُلِّبَ أَكْثَرَهُمْ مُّؤْمِنِينَ - ٨

Artinya : “Dan apakah mereka tidak memperhatikan bumi, betapa banyak kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam pasangan (tumbuh-tumbuhan) yang baik ? Sungguh, pada yang demikian itu terdapat tanda (kebesaran Allah), tetapi kebanyakan mereka tidak beriman.”

Ayat tersebut menjelaskan bahwa Allah SWT telah menciptakan berbagai macam tumbuhan di bumi ini. Salah satu tumbuhan yang sedang dimanfaatkan dan dikembangkan dalam beberapa penelitian sebagai antibiofilm bakteri adalah dari spesies jamur. *Aspergillus* merupakan salah satu spesies jamur yang tersebar luas di seluruh dunia karena spora jamur mudah tersebar melalui angin. Salah satu jamur yang termasuk spesies *Aspergillus* adalah *Aspergillus oryzae*. Berdasarkan hasil penelitian ini, jamur *Aspergillus oryzae* terbukti memiliki aktivitas antibiofilm terhadap biofilm bakteri *Escherichia coli*.

## 6.7 Kelemahan Penelitian

Penelitian ini masih banyak keterbatasan baik dari segi peneliti maupun karena faktor lainnya. Pada penelitian ini tidak didapatkan kadar hambat minimum (KHM) dan kadar bunuh minimum (KBM) yang dipengaruhi oleh beberapa faktor. Salah satunya adalah metode yang digunakan pada penelitian ini yaitu metode penelitian *microtiter plate biofilm*, yang merupakan *gold standard*/baku emas dalam mendeteksi biofilm. Metode tersebut kurang efektif untuk uji KHM karena metode tersebut hanya mampu melihat kekeruhan dan

kejernihan tanpa mengetahui nilai dari KHM. Selain itu, media pertumbuhan suspensi bakteri *E. coli* yang digunakan untuk uji KHM pada penelitian ini ditambahkan glukosa 5%, dimana penambahan glukosa tersebut semakin memperkuat ketahanan bakteri *E. coli* dan menjadi lebih sulit untuk dibunuh. Pada penelitian ini juga tidak dilakukan uji fitokimia sehingga tidak dapat diketahui senyawa yang berpotensi sebagai antibiofilm dan antibakteri yang terkandung dalam jamur *Aspergillus oryzae*.

## BAB VII

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 7.1 Kesimpulan

1. *Cell Free Supernatant (CFS) Aspergillus oryzae* memiliki persentase tertinggi aktivitas penghambatan pertumbuhan terhadap biofilm bakteri *Escherichia coli* pada konsentrasi 100% yaitu sebesar 62,15%.
2. Hasil uji Kosentrasi Hambat Minimum (KHM) menunjukkan bahwa *Cell Free Supernatant (CFS) Aspergillus oryzae* tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*.
3. Hasil uji Kosentrasi Bunuh Minimum (KBM) menunjukkan bahwa *Cell Free Supernatant (CFS) Aspergillus oryzae* tidak dapat membunuh bakteri *Escherichia coli*.
4. Hipotesis pada penelitian ini ditolak karena *Cell Free Supernatant (CFS) Aspergillus oryzae* hanya memiliki aktivitas antibiofilm terhadap biofilm bakteri *Escherichia coli*, tanpa memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli*.

#### 7.2 Saran

1. Diperlukan penelitian lanjutan mengenai senyawa aktif yang terkandung dalam *Aspergillus oryzae*, selain enzim amilase dan enzim protease, serta mekanisme kerja senyawa tersebut sebagai agen antibiofilm dan antibakteri.
2. Bagi peneliti selanjutnya dapat melakukan penelitian menggunakan metode dan teknik penelitian yang berbeda.

## DAFTAR PUSTAKA

- Arini, N., Sudarwanto, M., Sudirman, I., & Indrawati, A. (2016). Pemanfaatan Supernatan *Lactobacillus plantarum* Sebagai Penghambat Pertumbuhan *Escherichia coli* pada Dangke Susu Sapi (UTILIZATION OF LACTOBACILLUS PLANTARUM SUPERNATAN AS AN INHIBITOR OF *ESCHERICHIA COLI* GROWTH IN COW'S MILK DANGKE). *Jurnal Veteriner*, 17(3), 365–373. <https://doi.org/10.19087/jveteriner.2016.17.3.365>
- Asadullah, M. (2014). *Isolasi Bakteri Amilolitik dari Bekatul dan Uji Kemampuan untuk Produksi Enzim Amilase Kasar Pada Berbagai Jenis Media Produksi*. UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Azeredo, J., Azevedo, N. F., Briandet, R., Cerca, N., Coenye, T., Costa, A. R., Desvaux, M., Di Bonaventura, G., Hébraud, M., Jaglic, Z., Kačániová, M., Knöchel, S., Lourenço, A., Mergulhão, F., Meyer, R. L., Nychas, G., Simões, M., Tresse, O., & Sternberg, C. (2017). Critical review on biofilm methods. *Critical Reviews in Microbiology*, 43(3), 313–351. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1208146>
- Bayuana, D. R. (2015). *KARAKTERISTIK NATA HASIL FERMENTASI AIR CUCIAN BERAS MENGGUNAKAN *Aspergillus oryzae* dan *Acetobacter xylinum**. UNIVERSITAS JEMBER.
- Benoit-Gelber, I., Gruntjes, T., Vinck, A., van Veluw, J. G., Wösten, H. A. B., Boeren, S., Vervoort, J. J. M., & de Vries, R. P. (2017). Mixed colonies of *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* cooperatively degrading wheat bran. *Fungal Genetics and Biology*, 102, 31–37. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2017.02.006>
- Bhardwaj, N., Kumar, B., Agarwal, K., Chaturvedi, V., & Verma, P. (2019). Purification and characterization of a thermo-acid/alkali stable xylanases from *Aspergillus oryzae* LC1 and its application in Xylo-oligosaccharides production from lignocellulosic agricultural wastes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 122, 1191–1202. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.09.070>
- Bien, J., Sokolova, O., & Bozko, P. (2012). Role of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. *International Journal of Nephrology*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/681473>
- Cheol Jee, S., Kim, M., Sung, J.-S., & Kadam, A. A. (2020). Efficient Biofilms Eradication by Enzymatic-Cocktail of Pancreatic Protease Type-I and Bacterial  $\alpha$ -Amylase. *Polymers*, 1–13.
- Corso, C. R., Almeida, E. J. R., Santos, G. C., Morão, L. G., Fabris, G. S. L., & Mitter, E. K. (2012). Bioremediation of direct dyes in simulated textile effluents by a paramorphogenic form of *Aspergillus oryzae*. *Water Science and Technology*, 65(8), 1490–1495. <https://doi.org/10.2166/wst.2012.037>
- Edward, Y., & Novianti, D. (2015). Biofilm Pada Otitis Media Supuratif Kronik.

*Jambi Medical Journal*, 3(1), 68–78.

- Fadhila, F., & Sari, S. R. (2019). Gambaran Pembentukan Biofilm *Escherichia coli* yang Diisolasi dari Air Bersih Perpipaan. *The 1st Proceeding Publication of Creativity and Research Medical Laboratory Technology DIV*, 1(1), 73–77.
- Fhitryani, S., Suryanto, D., & Karim, A. (2017). Pemeriksaan *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella sp.* pada Jamu Gendong yang Dijajakan di Kota Medan. *BIOLINK (Jurnal Biologi Lingkungan, Industri, Kesehatan)*, 3(Vol 3, No 2 (2017): Januari), 144.
- Fitria, A., Nugraha, A. T., Meliani, Y., & Choriah, A. (2018). Aktivitas Bakterisidal dan Antibiofilm Batang *Jatropha multifida L.* terhadap *Staphylococcus aureus* dan MRSA. *Jurnal Ilmu-Ilmu MIPA*, 18(1), 2503–2364.
- Fitriani, E. (2014). *UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK ETANOL DAUN SIRSAK (Annona muricata L.) TERHADAP Shigella flexneri SECARA IN VITRO*. UNIVERSITAS TANJUNGPURA.
- Gofar, N., Widjajanti, H., & Mulya, P. (2014). *KARET UNTUK MENEKAN PERTUMBUHAN BAKTERI PROTEOLITIK PADA BAHAN OLAHAN KARET ( BOKAR ) Antagonistic Bacteria Exploration from Rubber Plant Tissue and Rhizosfer to Suppress the Growth of Proteolytic Bacteria from Slab*. 16(2), 61–66.
- Gunardi, W. (2017). Peran Berbagai Jenis Gen Virulensi Uropathogenic *Escherichia coli* dalam Pembentukan Biofilm. *Jurnal Kedokteran Meditek*, 23(64), 22–26.
- Gunardi, W. D., Korespondensi, A., Terusan, J., No, A., & Barat, J. (2014). *Peranan Biofilm dalam Kaitannya dengan Penyakit Infeksi*. 6.
- Irawan, erna. (2018). Faktor-Faktor Penyebab Infeksi Saluran Kemih (ISK) (Literature Review). *Prosiding Seminar Nasional Dan Penelitian Kesehatan 2018*, 1(1), 2013–2016. <https://doi.org/10.31227/osf.io/yt8nz>
- Jawetz, Melnick, & Adelberg. (2013). *Mikrobiologi Kedokteran* (A. Adityaputri (ed.); 25th ed.). ECG.
- Juwita, U., Haryani, Y., & Jose, C. (2014). Jumlah Bakteri Coliform dan Deteksi *Escherichia coli* pada Daging Ayam di Pekanbaru. *JOM FMIPA*, 1(2), 48–55.
- Katrin, D., Idiawati, N., & Sitorus, B. (2015). Uji Aktivitas Antibakteri dari Ekstrak Daun Malek (*Litsea gracieae* Vidal) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Jkk*, 4(1), 7–12. <https://jurnal.untan.ac.id/index.php/jkkmipa/article/view/11720/11003>
- Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. (2016). Profil Kesehatan Indonesia 2016. In *Profil Kesehatan Provinsi Bali*. <http://www.depkes.go.id/resources/download/pusdatin/profil-kesehatan->

- Khoirudin, M., Saleh, M. I., Mariana, M., Shofiatun, M., Wulandari, R. L., Reading, I. H., Widyaningsih, W., Afdaliah, S. N., Rao, & Research, M. of E. and. (2020). Uji Aktivitas Antidiabetes Ekstrak Daun KEPEL (*Stelechocarpus burahol*) SECARA IN VITRO MENGGUNAKAN METODE INHIBISI ENZIM  $\alpha$ -AMILASE. In *Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology* (Vol. 7, Issue 2). <http://repository.unsri.ac.id/24701/>
- Kirmusaoglu, S. (2019). The Method for Detection of Biofilm and Screening Antibiofilm Agents. In *Antimicrobial, Antibiotic Resistance, Antibiofilm Strategies and Activity Methods* (pp. 1–17). IntechOpen.
- Kudinha, T. (2017). The Pathogenesis of Escherichia Coli Urinary Tract Infection. *Escherichia Coli - Recent Advances on Physiology, Pathogenesis and Biotechnological Applications*, 46–69. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.69030>
- Lina, L. F., Ferasinta, F., Oktavidiati, E., & Lestari, D. P. (2019). Analisis Cara Penanganan Dengan Kejadian Infeksi Saluran Kemih Pada Pasien Di Poliklinik Urologi Rsud Dr M Yunus Bengkulu. *Jurnal Surya Muda*, 1(1), 33–36. <https://doi.org/10.38102/jsm.v1i1.35>
- Marfuati, N., Rakhmawatie, M. D., & Akmalia, N. R. (2017). Efektifitas Dosis Siprofloksasin terhadap Pertumbuhan Uropatogen Escherichia coli SECARA in vitro The Effectivity of Ciprofloxacin on The Growth Of Uropatogenic Escherichia Coli in Vitro. *Jurnal Kedokteran Muhammadiyah*, 2(2), 1–7.
- Moon, K., & Cha, J. (2020). Enhancement of antioxidant and antibacterial activities of salvia miltiorrhiza roots fermented with aspergillus oryzae. *Foods*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/foods9010034>
- Mozer, H. (2015). Uji Aktivitas Antifungi Ekstrak Etanol 96% Kulit Batang Kayu Jawa (*Lannea coromandelica*) Terhadap *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, dan *Trichophyton rubrum*. UIN Jakarta.
- Muchtar, M. (2013). PEMANFAATAN KULIT BUAH KAKAO SEBAGAI MEDIA PADAT UNTUK MEMPRODUKSI ENZIM AMILASE OLEH *Aspergillus niger* dan *Aspergillus oryzae*. Universitas Hasanuddin Makassar.
- Mulyani, D., Ifitah, D. E., & Srihardyastutie, A. (2018). Pengaruh Waktu Inkubasi terhadap Biotransformasi Minyak Jarak (*Ricinus communis* L.) oleh *Aspergillus oryzae*. *Indonesian Journal Of Essential Oil*, 3(2), 76–88.
- Nugraha, C., Hasin, A., & Aswad, H. (2019). Pengaruh Lama Sentrifugasi Sampel Urine Terhadap Hasil Pemeriksaan Sedimen Lekosit Urine Pada Penderita Infeksi Saluran Kemih (Isk) Di Laboratorium D-Iii Analis Kesehatan Universitas Indonesia Timur. *Jurnal Media Laboran*, 9(2), 6–12.
- Parvez, A. S., & Rahman, D. (2019). Virulence Factors of Uropathogenic *E.coli* Microbiology of Urinary Tract Infections - Microbial Agents and Predisposing Factor. <https://doi.org/10.5772/Intechopen.79557>

- Pimarahayu, L. (2019). *Digital Digital Repository Repository Universitas Universitas Jember Jember Digital Digital Repository Repository Universitas Universitas Jember*.
- Prawira, I., Rukmi, I., & Wijanarka. (2015). Produksi Enzim Protease *Aspergillus Flavus* Pam-25 Dengan Variasi Ph Dan Waktu Inkubasi Indra Prawira , Isworo Rukmi , Wijanarka Progam studi Biologi , Fakultas Sains dan Matematika , Universitas Diponegoro Jl . Prof Soedarto SH , Tembalang 50275 Abstrak P. *Biologi*, 4(2), 10–16.
- Purnomo, B. B. (2012). *Dasar-Dasar Urologi* (3rd ed.). CV Sagung Seto.
- Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E., & Sintim, H. O. (2015). Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Medicinal Chemistry*, 7(4), 493–512. <https://doi.org/10.4155/fmc.15.6>
- Rafsen, H. (2018). *OPTIMASI PRODUKSI DAN KARAKTERISASI ENZIM  $\alpha$ -AMILASE DARI ISOLAT BAKTERI TERMOFIL *Bacillus sp* RSSII4B SUMBER AIR PANAS LEJJA SOPPENG SULAWESI SELATAN*. UNIVERSITAS HASANUDDIN MAKASSAR.
- Rahayu, S., & Gumilar, M. (2017). Uji CEMARAN AIR MINUM MASYARAKAT SEKITAR MARGAHAYU RAYA BANDUNG DENGAN IDENTIFIKASI BAKTERI *Escherichia coli*. *IPJST*, 4(2), 50–56.
- Rahmawati, N., Sudjarwo, E., & Widodo, E. (2014). Uji aktivitas antibakteri ekstrak herbal terhadap bakteri *Escherichia coli*. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*, 24(3), 24–31.
- Ramadan, E. M., Abou-Taleb, K. A., Galal, G. F., & Abdel-Hamid, N. S. (2017). Antibacterial, antibiofilm and antitumor activities of grape and mulberry leaves ethanolic extracts towards bacterial clinical strains. *Annals of Agricultural Sciences*, 62(2), 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.aos.2017.11.002>
- Rocha-Pizaña, M. del R., Chen, W. N., Lee, J. J. L., Buitimea-Cantúa, N. E., González-Nimi, E., & Gutierrez-Urbe, J. A. (2020). Production of a potential collagenolytic protease by nejayote fermentation with *Aspergillus oryzae*. *International Journal of Food Science and Technology*, 55(10), 3289–3296. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14592>
- Rotua Silitonga, L., Nursyirwani, N., & Effendi, I. (2020). Isolation, Identification and Sensitivity of Amilolitic Bacteria From Mangrove Ecosystem Sediment in Purnama Marine Station Dumai on the Pathogenic Bacteria. *Asian Journal of Aquatic Sciences*, 2(3), 257–266. <https://doi.org/10.31258/ajoas.2.3.257-266>
- Ruchi, T., Sujata, B., & Anuradha, D. (2018). Comparison of Phenotypic Methods for the Detection of Biofilm Production in Indwelling Medical Devices Used in NICU & PICU in a Tertiary Care Hospital in Hyderabad, India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(09),



3265–3273. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.709.405>

- Ruckle, A. F., Maulana, A., & Ghinowara, T. (2020). Faktor Resiko Infeksi Saluran Kemih Pada Pasien Dengan Batu Saluran Kemih. *Biomedika*, *12*(2), 124–130. <https://doi.org/10.23917/biomedika.v12i2.10812>
- Sari, E., & Satyabakti, P. (2015). PERBEDAAN RISIKO INFEKSI NOSOKOMIAL SALURAN KEMIH BERDASARKAN KATETERISASI URIN, UMUR, DAN DIABETES MELITUS. *Berkala Epidemiologi*, *3*(2), 205–216.
- Sari, R., & Muhartono. (2018). Angka Kejadian Infeksi Saluran Kemih (ISK) Dan Faktor Resiko Yang Mempengaruhi Pada Karyawan Wanita Di Universitas Lampung Event Numbers Urinary Tract Infection (Uti) and Risk Factor that Affecting on Female Employees In University of Lampung. *Majority*, *7*(3), 115–120. [http://digilib.unila.ac.id/24540/18/SKRIPSI\\_TANPA\\_BAB\\_PEMBAHASAN.pdf](http://digilib.unila.ac.id/24540/18/SKRIPSI_TANPA_BAB_PEMBAHASAN.pdf)
- Sarowska, J., Futoma-Koloch, B., Jama-Kmiecik, A., Frej-Madrzak, M., Ksiazczyk, M., Bugla-Ploskonska, G., & Choroszy-Krol, I. (2019). Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: Recent reports. *Gut Pathogens*, *11*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13099-019-0290-0>
- Semaradana, W. G. (2014). Infeksi saluran kemih akibat pemasangan kateter – diagnosis dan penatalaksanaan. *Continuing Professional Development*, *41*(10), 737–740.
- Sharma, G., Sharma, S., Sharma, P., Chandola, D., Dang, S., Gupta, S., & Gabrani, R. (2016). *Escherichia coli* biofilm : development and therapeutic strategies. *Journal of Applied Microbiology ISSN 1364-5072*, 309–319. <https://doi.org/10.1111/jam.13078>
- Suhaerah, L. (2012). *Statistika Dasar Untuk Biologi*. Bandung: Fakultas Keguruan. dan Ilmu Pendidikan Universitas Pasundan Bandung.
- Suprihatiningrum, J. (2013).
- Terlizzi, M. E., Gribaudo, G., & Maffei, M. E. (2017). UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) infections: Virulence factors, bladder responses, antibiotic, and non-antibiotic antimicrobial strategies. *Frontiers in Microbiology*, *8*(AUG). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01566>
- Toyofuku, M., Inaba, T., Kiyokawa, T., Obana, N., Yawata, Y., & Nomura, N. (2016). Environmental factors that shape biofilm formation. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, *80*(1), 7–12. <https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1058701>
- Ulfah, N., Erina, & Darniati. (2017). ISOLASI DAN IDENTIFIKASI *Escherichia coli* PADA AYAM PANGGANG DI BEBERAPA RUMAH MAKAN DI KECAMATAN SYIAH KUALA KOTA BANDA ACEH. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Veteriner*, *1*(3), 383–390.
- Vifta, rissa laila, Wansyah, M. A., & Hati, A. K. (2017). Perbandingan Total

Rendemen dan Skrining Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Sirih Hijau (*Piper Betle* L.) secara Mikrodilusi. *Journal of Science and Application Technology*, 2(1), 87–93. <https://doi.org/10.35472/281450>

Vogeeler, P., Tremblay, Y. D. N., Mafu, A. A., Jacques, M., & Harel, J. (2014). Life on the outside: Role of biofilms in environmental persistence of Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 5(JULY), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00317>

Yuliana, A., & Chuzaemi, S. (2019). Pengaruh Lama Fermentasi Ampas Putak (*Corypha gebanga*) Terhadap Kualitas Fisik dan Kualitas Kimia Menggunakan *Aspergillus oryzae*. *Jurnal Nutrisi Ternak Tropis*, 2(1), 19–32. <https://doi.org/10.21776/ub.jnt.2019.002.01.3>

Zeniusa, P., & Ramadhian, M. R. (2017). Efektifitas Ekstrak Etanol Teh Hijau dalam Menghambat Pertumbuhan *Escherichia coli*. *Medical Journal of Lampung University*, 7(1), 26–30. <http://juke.kedokteran.unila.ac.id/index.php/majority/article/view/1740/1694>

Zhu, Y., Jia, H., Xi, M., Li, J., Yang, L., & Li, X. (2017). Characterization of a naringinase from *Aspergillus oryzae* 11250 and its application in the debitterization of orange juice. *Process Biochemistry*, 62, 114–121. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2017.07.012>

# LAMPIRAN

## Lampiran 1. Etik Penelitian

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

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

Judul	Uji Aktivitas Antibakteri dan Antibiofilm <i>Aspergillus niger</i> Terhadap <i>UroPhatogenic Escherichia coli</i>
Sub Judul	Uji Aktivitas Antibakteri dan Antibiofilm <i>Aspergillus niger</i> Terhadap <i>UroPhatogenic Escherichia coli</i>
Peneliti	- Yulia Candra Dewi - Meryta Ade Arofani - Ibrahim Fadhil Senjaya - Dwi Wahyu Utami - Rizqi Ayuning Tyas - Fikri Holly Jihadi Al Hasan - Risna Afiatur Rosyida
Unit / Lembaga	Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang
Tempat Penelitian	Laboratorium FKIK UIN Maulana Malik Ibrahim Malang

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

Malang, 31 Agustus 2021

Ketua



Dr. Doby Indrawan, MMRS  
NIP. 19781001201701011113

### Keterangan :

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

## Lampiran 2. Identifikasi Bakteri *Escherichia coli*

OXOID  
MICROBACT™  
IDENTIFICATION KITS

MICROBACT™ GNB 12A/B/E, 24E

GNB 24E																										
GNB 12A / 12E										GNB 12B																
Oxidase	Motility	Nitrate	Lysine	Ornithine	H <sub>2</sub> S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	V-P	Citrate	TDA	Gelatin	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine
			+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-												
4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
Sum / Suma / Summe / Somma / Soma / Sum / Summa / Somma / Soma / Σβορμα			6			7			6			0														

Identification / Identificación /  
Identification / Identifikation /  
Identificazione / Identification /  
Identifizierung / Identificação /  
Τυποποίηση

*Escherichia coli* 96.39%

## Lampiran 3. Pembuatan CFS *A.oryzae*



Jamur *A.oryzae*  
yang telah di inkubasi



Inokulasi *A.oryzae*



CFS *A.oryzae*  
yang telah di saring



Proses sentrifugasi  
Dengan kecepatan 3000 rpm



CFS Jamur *A.oryzae*

#### Lampiran 4. Pembuatan Suspensi Bakteri



Pengambilan 1 ose  
Bakteri *E.coli*



Memasukkan 1 ose bakteri  
*E.coli* dan TSB + glukosa 5%



Suspensi bakteri  
*E.coli*



Suspensi *E.coli* dilakukan  
Pengukuran *Optical Density* (OD)



*Optical Density* (OD)  
Suspensi *E.coli*

#### Lampiran 5. Prosedur Uji Aktivitas Antibiofilm

##### Uji Deteksi Pembentukan Biofilm *Escherichia coli*



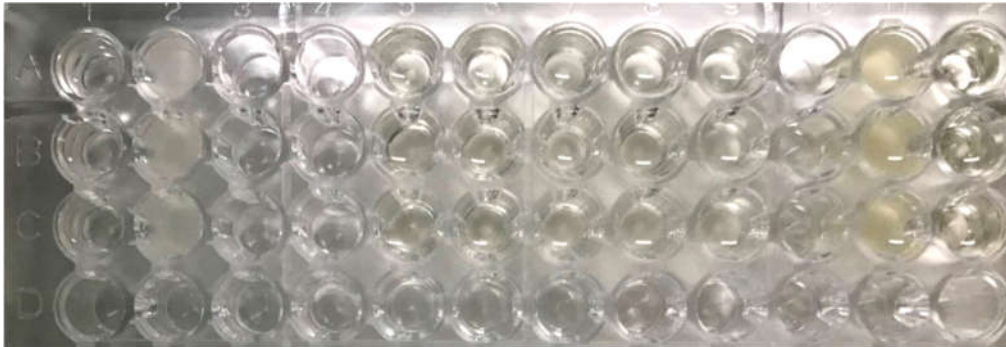
Pewarnaan kelompok uji  
dengan kristal violet 0,1%



Pewarnaan kelompok kontrol  
dengan kristal violet 0,1%



### Uji Penghambatan Pertumbuhan Biofilm

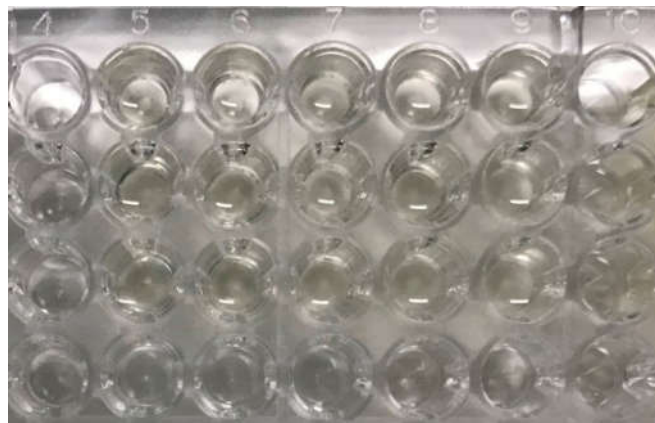


Hasil setelah diinkubasi 24 jam



Hasil setelah pewarnaan menggunakan kristal violet 0,1%

### Uji Kosentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Uji Kosentrasi Bunuh Minimum (KBM)



**Lampiran 6. Data Hasil OD Uji Aktivitas Penghambatan Pertumbuhan Biofilm *E.coli***

Kelompok perlakuan	<i>Nilai Optical Density</i>				Presentase pencegahan
	Pengulangan			Rata-rata ± SD	
	1	2	3		
<b>Kelompok Uji CFS</b>					
100%	1,417	1,070	0,994	1,160 ± 0,184	62,15%
50%	1,606	1,489	1,341	1,478 ± 0,108	51,77%
25%	2,474	2,204	1,781	2,153 ± 0,285	29,75%
12,5%	2,437	1,819	2,596	2,284 ± 0,335	25,48%
6,25%	1,728	2,556	2,647	2,310 ± 0,413	24,41%
<b>Kelompok Kontrol</b>					
Kontrol positif	1,228	1,259	1,188	1,225 ± 0,029	60,03%
Kontrol negatif	3,097	3,063	3,037	3,065 ± 0,024	
Kontrol media	0,596	0,635	0,500	0,577 ± 0,056	
Kontrol CFS	0,794	0,789	0,775	0,786 ± 0,008	

**Lampiran 7. Analisis Data Hasil Uji Aktivitas Penghambatan Pertumbuhan Biofilm *Escherichia coli***

**1. Uji Normalitas**

	Kontrol	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
<u>OpticalDensity</u>	kontrol positif	,200	3	.	,995	3	,860
	kontrol negatif	,202	3	.	,994	3	,853
	kontrol media	,274	3	.	,944	3	,543
	kontrol CFS	,286	3	.	,930	3	,490
	<u>konsentrasi 100%</u>	,322	3	.	,880	3	,323
	<u>konsentrasi 50%</u>	,198	3	.	,995	3	,871
	<u>konsentrasi 25%</u>	,225	3	.	,984	3	,758
	<u>konsentrasi 12,5%</u>	,312	3	.	,896	3	,372
	<u>konsentrasi 6,25%</u>	,353	3	.	,823	3	,172

**2. Uji Homogenitas**

		<u>Test of Homogeneity of Variances</u>			
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
<u>OpticalDensity</u>	<u>Based on Mean</u>	5,453	8	18	,001
	<u>Based on Median</u>	,895	8	18	,540
	<u>Based on Median and with adjusted df</u>	,895	8	5,607	,573
	<u>Based on trimmed mean</u>	4,845	8	18	,003

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

#### ANOVA

OpticalDensity	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	16,316	8	2,040	29,487	,000
Within Groups	1,245	18	,069		
Total	17,561	26			

### 4. Uji *Post-Hoc Games-Howell*

#### Multiple Comparisons

Dependent Variable: OpticalDensity

Tukey HSD

(I) Kontrol	(J) Kontrol	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
kontrol positif	kontrol negatif	-1,840667 <sup>*</sup>	,214733	,000	-2,59306	-1,08827
	kontrol media	,648000	,214733	,125	-,10440	1,40040
	kontrol CFS	,439000	,214733	,535	-,31340	1,19140
	kosentrasi 100%	,064667	,214733	1,000	-,68773	,81706
	kosentrasi 50%	-,253667	,214733	,951	-1,00606	,49873
	kosentrasi 25%	-,928000 <sup>*</sup>	,214733	,010	-1,68040	-,17560
	kosentrasi 12,5%	-1,059000 <sup>*</sup>	,214733	,003	-1,81140	-,30660
	kosentrasi 6,25%	-1,085333 <sup>*</sup>	,214733	,002	-1,83773	-,33294
kontrol negatif	kontrol positif	1,840667 <sup>*</sup>	,214733	,000	1,08827	2,59306
	kontrol media	2,488667 <sup>*</sup>	,214733	,000	1,73627	3,24106
	kontrol CFS	2,279667 <sup>*</sup>	,214733	,000	1,52727	3,03206
	kosentrasi 100%	1,905333 <sup>*</sup>	,214733	,000	1,15294	2,65773
	kosentrasi 50%	1,587000 <sup>*</sup>	,214733	,000	,83460	2,33940
	kosentrasi 25%	,912667 <sup>*</sup>	,214733	,011	,16027	1,66506
	kosentrasi 12,5%	,781667 <sup>*</sup>	,214733	,038	,02927	1,53406
	kosentrasi 6,25%	,755333 <sup>*</sup>	,214733	,049	,00294	1,50773
kontrol media	kontrol positif	-,648000	,214733	,125	-1,40040	,10440
	kontrol negatif	-2,488667 <sup>*</sup>	,214733	,000	-3,24106	-1,73627
	kontrol CFS	-,209000	,214733	,984	-,96140	,54340
	kosentrasi 100%	-,583333	,214733	,209	-1,33573	,16906



	kosentrasi 50%	-,901667 <sup>+</sup>	,214733	,012	-1,65406	-,14927
	kosentrasi 25%	-1,576000 <sup>+</sup>	,214733	,000	-2,32840	-,82360
	kosentrasi 12,5%	-1,707000 <sup>+</sup>	,214733	,000	-2,45940	-,95460
	kosentrasi 6,25%	-1,733333 <sup>+</sup>	,214733	,000	-2,48573	-,98094
kontrol CFS	kontrol positif	-,439000	,214733	,535	-1,19140	,31340
	kontrol negatif	-2,279667 <sup>+</sup>	,214733	,000	-3,03206	-1,52727
	kontrol media	,209000	,214733	,984	-,54340	,96140
	kosentrasi 100%	-,374333	,214733	,715	-1,12673	,37806
	kosentrasi 50%	-,692667	,214733	,085	-1,44506	,05973
	kosentrasi 25%	-1,367000 <sup>+</sup>	,214733	,000	-2,11940	-,61460
	kosentrasi 12,5%	-1,498000 <sup>+</sup>	,214733	,000	-2,25040	-,74560
	kosentrasi 6,25%	-1,524333 <sup>+</sup>	,214733	,000	-2,27673	-,77194
kosentrasi 100%	kontrol positif	-,064667	,214733	1,000	-,81706	,68773
	kontrol negatif	-1,905333 <sup>+</sup>	,214733	,000	-2,65773	-1,15294
	kontrol media	,583333	,214733	,209	-,16906	1,33573
	kontrol CFS	,374333	,214733	,715	-,37806	1,12673
	kosentrasi 50%	-,318333	,214733	,850	-1,07073	,43406
	kosentrasi 25%	-,992667 <sup>+</sup>	,214733	,005	-1,74506	-,24027
	kosentrasi 12,5%	-1,123667 <sup>+</sup>	,214733	,001	-1,87606	-,37127
	kosentrasi 6,25%	-1,150000 <sup>+</sup>	,214733	,001	-1,90240	-,39760
kosentrasi 50%	kontrol positif	,253667	,214733	,951	-,49873	1,00606
	kontrol negatif	-1,587000 <sup>+</sup>	,214733	,000	-2,33940	-,83460
	kontrol media	,901667 <sup>+</sup>	,214733	,012	,14927	1,65406
	kontrol CFS	,692667	,214733	,085	-,05973	1,44506
	kosentrasi 100%	,318333	,214733	,850	-,43406	1,07073
	kosentrasi 25%	-,674333	,214733	,100	-1,42673	,07806
	kosentrasi 12,5%	-,805333 <sup>+</sup>	,214733	,031	-1,55773	-,05294
	kosentrasi 6,25%	-,831667 <sup>+</sup>	,214733	,024	-1,58406	-,07927
kosentrasi 25%	kontrol positif	,928000 <sup>+</sup>	,214733	,010	,17560	1,68040
	kontrol negatif	-,912667 <sup>+</sup>	,214733	,011	-1,66506	-,16027
	kontrol media	1,576000 <sup>+</sup>	,214733	,000	,82360	2,32840
	kontrol CFS	1,367000 <sup>+</sup>	,214733	,000	,61460	2,11940
	kosentrasi 100%	,992667 <sup>+</sup>	,214733	,005	,24027	1,74506
	kosentrasi 50%	,674333	,214733	,100	-,07806	1,42673

	kosentrasi 12,5%	-,131000	,214733	,999	-,88340	,62140
	kosentrasi 6,25%	-,157333	,214733	,997	-,90973	,59506
kosentrasi 12,5%	kontrol positif	1,059000*	,214733	,003	,30660	1,81140
	kontrol negatif	-,781667*	,214733	,038	-1,53406	-,02927
	kontrol media	1,707000*	,214733	,000	,95460	2,45940
	kontrol CFS	1,498000*	,214733	,000	,74560	2,25040
	kosentrasi 100%	1,123667*	,214733	,001	,37127	1,87606
	kosentrasi 50%	,805333*	,214733	,031	,05294	1,55773
	kosentrasi 25%	,131000	,214733	,999	-,62140	,88340
	kosentrasi 6,25%	-,026333	,214733	1,000	-,77873	,72606
	kosentrasi 6,25%	kontrol positif	1,085333*	,214733	,002	,33294
kontrol negatif		-,755333*	,214733	,049	-1,50773	-,00294
kontrol media		1,733333*	,214733	,000	,98094	2,48573
kontrol CFS		1,524333*	,214733	,000	,77194	2,27673
kosentrasi 100%		1,150000*	,214733	,001	,39760	1,90240
kosentrasi 50%		,831667*	,214733	,024	,07927	1,58406
kosentrasi 25%		,157333	,214733	,997	-,59506	,90973
kosentrasi 12,5%		,026333	,214733	1,000	-,72606	,77873

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