

**UJI AKTIVITAS ANTIBIOFILM *Aspergillus terreus*
TERHADAP BIOFILM *Klebsiella pneumoniae***

SKRIPSI

Oleh:

DWI WAHYU UTAMI

NIM. 18910003



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

2021

**UJI AKTIVITAS ANTIBIOFILM *Aspergillus terreus*
TERHADAP BIOFILM *Klebsiella pneumoniae***

SKRIPSI

Diajukan Kepada :

Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri

Maulana Malik Ibrahim Malang

Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan Dalam Memperoleh Gelar Sarjana

Kedokteran (S. Ked)

Oleh:

DWI WAHYU UTAMI

NIM. 18910003

PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER

FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN

UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK

IBRAHIM MALANG

2021

UJI AKTIVITAS ANTIBIOFILM *Aspergillus terreus*

TERHADAP BIOFILM *Klebsiella pneumoniae*

SKRIPSI

Oleh:

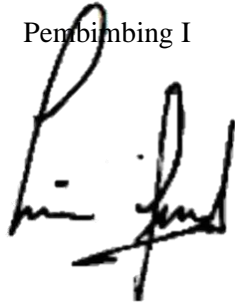
DWI WAHYU UTAMI

NIM. 18910003

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji :

Tanggal: 22 Desember 2021

Pembimbing I



dr. Alvi Milliana, M. Biomed
NIP. 198204042011012011

Pembimbing II



dr. Iwal Reza Ahdi
NIP. 198607202018011002

Mengesahkan,
Ketua Program Studi Pendidikan Dokter



dr. Tias Pramesti Griana., M.Biomed

NIP. 198105182011012011

**UJI AKTIVITAS ANTIBIOFILM *Aspergillus terreus*
TERHADAP BIOFILM *Klebsiella pneumoniae***




SKRIPSI

Oleh:

DWI WAHYU UTAMI
NIM. 18910003

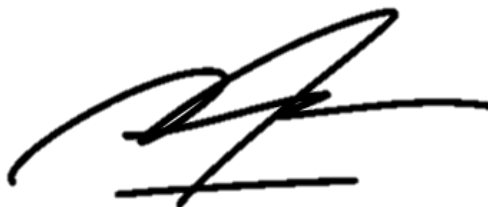
Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi dan Dinyatakan Diterima sebagai
Salah Satu Persyaratan untuk Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran (S.Ked)

Tanggal: 22 Desember 2021

Penguji Utama	<u>dr. Christyaji Indradmojo, Sp. PD</u> NIP. 19640420201701012111	
Ketua Penguji	<u>dr. Iwal Reza Ahdi</u> NIP. 198607202018011002	
Sekretaris Penguji	<u>dr. Alvi Milliana, M. Biomed</u> NIP. 198204042011012011	

Mengesahkan,

Ketua Program Studi Pendidikan dokter



Dr. Tias Pramesti Griana., M.Biomed

NIP. 198105182011012011

LEMBAR KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Dwi Wahyu Utami

NIM : 18910003

Program Studi : Pendidikan Dokter

Fakultas : Kedokteran dan Ilmu Kesehatan

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

Malang, 22 Desember 2021



Dwi Wahyu Utami

NIM. 18910003

KATA PENGANTAR

Assalamu 'alaikum Warrahmatullahi Wabarakatuh

Segala puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT, tuhan semesta alam, yang telah melimpahkan Rahmat, Taufiq, Hidayah, serta Inayah-Nya sampai hari ini, tak lupa shalawat dan salam senantiasa tercurahkan kepada junjungan umat baginda Rasulullah SAW. Penulis sangat bersyukur mampu menyelesaikan penulisan proposal skripsi yang berjudul “Uji Aktivitas Antibiofilm *Aspergillus terreus* terhadap Biofilm *Klebsiella pneumoniae*” dengan baik. Penulisan proposal skripsi ini disusun sebagai syarat kelulusan studi di Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

Selanjutnya penulis haturkan rasa terimakasih atas doa dan bantuan dalam penyelesaian tugas akhir ini. Ucapan terimakasih penulis sampaikan terutama kepada:

1. Prof. Dr. dr. Bambang Pardjianto, Sp. B., Sp. BP-RE (K) dan dilanjutkan oleh Prof. Dr. dr. Yuyun Yueniwati Wadjib, M. Kes, Sp. Rad (K), selaku Dekan Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. dr. Tias Pramesti, M. Biomed, selaku ketua Program Studi Pendidikan Dokter FKIK UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Ucapan terimakasih terkhusus penulis haturkan kepada dr. Alvi Milliana, M.Biomed sebagai pembimbing akademik sekaligus pembimbing I skripsi yang telah membimbing dengan baik dari awal masuk perkuliahan hingga penyusunan tugas akhir.
4. dr. Iwal Reza Ahdi, Sp. PD, selaku pembimbing II skripsi yang telah memberikan banyak arahan yang sangat berharga.

5. dr. Christyaji Indradmojo, Sp. EM, selaku dosen penguji utama proposal skripsi.
6. Seluruh civitas akademika Program Studi Pendidikan Dokter, terutama seluruh dosen dan laboran terimakasih atas segenap ilmunya.
7. Kepada orang tua, kakek, dan kakak saya, yang telah membantu secara keuangan dan doanya sehingga saya bisa bertahan hingga sekarang.
8. Kepada Rizqi Ayuningtyas, teman laboratorium saya, yang sangat membantu ketika saya melakukan penelitian
9. Semua pihak yang ikut membantu dalam menyelesaikan proposal skripsi ini baik berupa moril maupun materil.

Penulis menyadari bahwa dalam penulisan skripsi ini jauh dari kata sempurna.

Penulis berharap semoga hasil skripsi ini nantinya bisa bermanfaat bagi siapapun.

Amiin Ya Rabbal 'Alamiin.

Wassalamu 'alaikum Wr. Wb.

Malang, 20 Desember 2021

Dwi Wahyu Utami

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	ii
HALAMAN PERSETUJUAN.....	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
HALAMAN PERNYATAAN.....	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL.....	xiii
LAMPIRAN.....	xiv
ABSTRAK	xv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah Penelitian	5
1.2.1 Rumusan Masalah Umum Penelitian.....	5
1.2.2 Rumusan Masalah Khusus Penelitian	5
1.3 Tujuan Masalah Penelitian	5
1.3.1 Tujuan Masalah Umum Penelitian.....	5
1.3.2 Tujuan Masalah Khusus Penelitian.....	5
1.4 Manfaat Penelitian.....	6
1.4.1 Manfaat Akademis	6
1.4.2 Manfaat Aplikatif.....	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	7
2.1.1 Taksonomi <i>Klebsiella pneumoniae</i>	7
2.1.2 Karakteristik <i>Klebsiella pneumoniae</i>	7
2.1.3 Faktor Virulensi <i>Klebsiella pneumoniae</i>	8
2.1.4 Identifikasi <i>Klebsiella pneumoniae</i>	10
2.1.4.1 Mikroskopis.....	10
2.1.4.2 Biakan pada Medium Diferensial.....	11
2.1.4.3 Uji Biokimia	12
2.1.4.4 Manifestasi Klinis Akibat <i>Klebsiella pneumoniae</i>	15
2.2 Biofilm.....	18
2.2.1 Definisi Biofilm	18

2.2.2	Struktur Pembentuk Biofilm.....	18
2.2.3	Mekanisme Pembentukan Biofilm.....	19
2.2.4	Quorum Sensing.....	21
2.2.5	Biofilm dan Quorum Sensing pada <i>Klebsiella pneumoniae</i>	22
2.2.6	Uji Pembentukan Biofilm	23
2.2.6.1	Metode Tabung.....	23
2.2.6.2	Metode Congo Red Agar (CRA).....	24
2.2.6.3	Metode <i>Tissue Culture Plate</i> (TCP) dan Pewarnaan Kristal Violet 25	
2.3	<i>Aspergillus terreus</i>	26
2.3.1	Taksonomi <i>Aspergillus terreus</i>	26
2.3.2	Karakteristik <i>Aspergillus terreus</i>	27
2.3.3	Kandungan <i>Aspergillus terreus</i>	28
2.3.4	<i>Aspergillus terreus</i> sebagai Antibakteri dan Antibiofilm	28
2.4	Antibiofilm	29
2.4.1	Definisi Antibiofilm.....	29
2.4.2	Mekanisme Antibiofilm	30
2.5	Kerangka Teori.....	31
BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN		33
3.1	Kerangka Konsep Penelitian	33
3.2	Hipotesis Penelitian.....	35
BAB IV METODE PENELITIAN		36
4.1	Desain Penelitian.....	36
4.2	Lokasi dan Waktu Penelitian.....	36
4.3	Variabel Penelitian	36
4.3.1	Variabel Bebas	36
4.3.2	Variabel Terikat	37
4.4	Populasi dan Sampel Penelitian.....	37
4.4.1	Jumlah Pengulangan.....	37
4.5	Alat dan Bahan Penelitian	38
4.5.1	Alat Penelitian.....	38
4.5.2	Bahan Penelitian.....	38
4.5.2.1	Jamur <i>Aspergillus terreus</i>	38
4.5.2.2	Bakteri <i>Klebsiella pneumoniae</i>	39
4.5.2.3	Bahan Lainnya.....	39
4.6	Kriteria Inklusi dan Eksklusi.....	39

4.6.1	Kriteria Inklusi	39
4.6.2	Kriteria Eksklusi.....	40
4.7	Definisi Operasional.....	41
4.8	Prosedur Penelitian.....	42
4.8.1	Penyiapan Jamur	42
4.8.1.1	Identifikasi <i>Aspergillus terreus</i>	42
4.8.1.2	Uji Kurva Pertumbuhan <i>Aspergillus terreus</i>	42
4.8.1.3	Pembuatan Media Petumbuhan <i>Aspergillus terreus</i>	42
4.8.1.4	Pembuatan CFS <i>Aspergillus terreus</i>	43
4.8.2	Penyiapan Bakteri	44
4.8.2.1	Identifikasi <i>Klebsiella pneumoniae</i>	44
4.8.2.2	Pembuatan Media Pertumbuhan.....	45
4.8.2.3	Pembuatan Suspensi Bakteri <i>Klebsiella pneumoniae</i>	46
4.8.3	Penyiapan Kelompok Kontrol.....	46
4.8.4	Uji Pertumbuhan Biofilm.....	46
4.8.5	Uji Aktifitas Antibiofilm <i>Aspergillus terreus</i> terhadap <i>Klebsiella pneumoniae</i>	47
4.8.5.1	Uji Pencegahan Perlekatan Biofilm <i>Klebsiella pneumoniae</i>	47
4.8.5.2	Uji Penghambatan Pembentukan Biofilm <i>Klebsiella pneumoniae</i>	49
4.8.5.3	Uji Kerusakan/Penghancuran Biofilm <i>Klebsiella pneumoniae</i>	50
4.9	Analisis Data	53
BAB V HASIL.....		54
5.1	Hasil Uji Karakteristik <i>Aspergillus terreus</i>	54
5.1.1	Hasil Uji Makroskopis <i>Aspergillus terreus</i>	54
5.1.2	Hasil Uji Mikroskopis <i>Aspergillus terreus</i>	54
5.2	Hasil Uji Karakteristik <i>Klebsiella pneumoniae</i>	55
5.2.1	Hasil Uji Pewarnaan Gram.....	55
5.2.2	Hasil <i>Microbact System</i>	56
5.3	Hasil Uji Kurva Pertumbuhan <i>Aspergillus terreus</i>	57
5.4	Hasil Uji Pertumbuhan Biofilm <i>Klebsiella pneumoniae</i>	57
5.5	Hasil Uji Pencegahan Perlekatan Biofilm <i>Klebsiella pneumoniae</i>	58
5.6	Hasil Uji Penghambatan Pembentukan Biofilm <i>Klebsiella pneumoniae</i>	59
5.7	Hasil Uji Kerusakan/Penghancuran Biofilm <i>Klebsiella pneumoniae</i>	61
5.8	Hasil Uji Analisis Data.....	62
5.8.1	Hasil Uji Normalitas	62

5.8.2	Hasil Uji Homogenitas	63
5.8.3	Hasil Uji One Way Annova	64
5.8.4	Hasil Uji <i>Post Hoc</i>	64
5.8.5	Hasil Uji Korelasi.....	66
BAB VI PEMBAHASAN.....		68
6.1	Identifikasi <i>Aspergillus terreus</i>	68
6.2	Identifikasi <i>Klebsiella pneumoniae</i>	68
6.3	Pengukuran Kurva <i>Aspergillus terreus</i>	69
6.4	Uji Pertumbuhan Biofilm	70
6.5	Uji Aktivitas Antibiofilm <i>Aspergillus terreus</i> terhadap Pencegahan Perlekatan Biofilm <i>Klebsiella pneumoniae</i>	70
6.6	Uji Aktivitas Antibiofilm <i>Aspergillus terreus</i> terhadap Penghambatan Pembentukan Biofilm <i>Klebsiella pneumoniae</i>	72
6.7	Uji Aktivitas Antibiofilm <i>Aspergillus terreus</i> terhadap Kerusakan/Penghancuran Biofilm <i>Klebsiella pneumoniae</i>	74
6.8	Integrasi Islam	74
6.9	Keterbatasan Penelitian	76
BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN		78
7.1	Kesimpulan.....	78
7.2	Saran.....	78
DAFTAR PUSTAKA		80
DAFTAR LAMPIRAN		85

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Faktor Virulensi Bakteri <i>Klebsiella pneumoniae</i>	10
Gambar 2.2 Pengecatan Gram dilihat dengan mikroskop perbesaran 1000x yang menunjukkan <i>Klebsiella pneumoniae</i> berwarna merah dan berbentuk batang pendek. ...	11
Gambar 2.3 Koloni <i>Klebsiella pneumoniae</i> pada MacConkey Agar Plate tampak berukuran besar mengkilat dan berwarna merah muda.	12
Gambar 2.4 24 Tes Biokimia yang diujikan di Microbact 12E	15
Gambar 2.5 Stuktur Penyusun Biofilm	19
Gambar 2.6 Tahapan pembentukan biofilm.....	20
Gambar 2.7 Mekanisme Pembentukan Biofilm	21
Gambar 2.8 Intepretasi Uji Tabung: (kiri) <i>strong biofilm producer</i> , (tengah) <i>weak producer</i> , (kanan) <i>none biofilm producer</i>	24
Gambar 2.9 Gambaran Koloni.....	25
Gambar 2.10 Uji Pembentukan Biofilm dengan Metode TCP dengan Pewarnaan Kristal Violet	26
Gambar 2.11 <i>Aspergillus terreus</i>	27
Gambar 2.12 Rantai Selulosa yang Terkandung pada <i>Aspergillus terreus</i>	28
Gambar 4.1 Uji Pewarnaan Gram.	44
Gambar 5.1 Hasil Uji Makroskopis <i>Aspergillus terreus</i>	54
Gambar 5.2 Hasil Pengamatan mikroskopis perbesaran 100X. A menunjukkan stipes, B menunjukkan vesicle, dan C menunjukkan konidiofora.	55
Gambar 5.3 Hasil Uji Pewarnaan Gram <i>Klebsiella pneumoniae</i>	55
Gambar 5.4 Hasil Uji Kurva Pertumbuhan Jamur <i>Aspergillus terreus</i>	57
Gambar 5.5 Hasil Uji Pencegahan Perlekatan Biofilm <i>Klebsiella pneumoniae</i>	59
Gambar 5.6 Hasil Presentase Aktivitas Pencegahan Perlekatan Biofilm <i>Klebsiella pneumoniae</i>	59
Gambar 5.7 Hasil Uji Penghambatan Pembentukan Biofilm <i>Klebsiella pneumoniae</i>	60
Gambar 5.8 Hasil Presentase Aktivitas Penghambatan Pembentukan Biofilm <i>Klebsiella pneumoniae</i>	60
Gambar 5.9 Hasil Uji Kerusakan/Penghancuran Biofilm <i>Klebsiella pneumoniae</i>	61
Gambar 5.10 Hasil Presentase Aktivitas Kerusakan/Penghancuran Biofilm <i>Klebsiella pneumoniae</i>	62

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Interpretasi Uji Tabung.....	23
Tabel 2.2 Interpretasi Metode Congo Red Agar (CRA)	24
Tabel 4.1 Interpretasi Kekuatan Bakteri Pembentuk Biofilm	47
Tabel 5.1 Uji Microbact System pada <i>Klebsiella pneumoniae</i>	56
Tabel 5.2 Hasil Uji Pertumbuhan Biofilm <i>Klebsiella pneumoniae</i>	58
Tabel 5.3 Hasil Uji Post Hoc Pencegahan Perlekatan Biofilm <i>Klebsiella pneumoniae</i> ..	64
Tabel 5.4 Hasil Uji Post Hoc Penghambatan Pembentukan Biofilm <i>Klebsiella pneumoniae</i>	65
Tabel 5.5 Hasil Uji Post Hoc Kerusakan/Penghancuran Biofilm <i>Klebsiella pneumoniae</i>	65
Tabel 5.6 Derajat Hubungan Uji Korelasi (Sarwono, 2006).	67

LAMPIRAN

Lampiran 1 Etik Penelitian	85
Lampiran 2 Microbact System	85
Lampiran 3 Identifikasi Bakteri.....	87
Lampiran 4 Optical Density (OD) Pembuatan Suspensi Bakteri <i>Klebsiella pneumoniae</i>	88
Lampiran 5 Pembuatan Suspensi Bakteri <i>Klebsiella pneumoniae</i>	88
Lampiran 6 Inokulum CFS <i>Aspergillus terreus</i>	89
Lampiran 7 Microplate Uji Pertumbuhan Biofilm.....	89
Lampiran 8 Microplate Uji Pencegahan Perlekatan Biofilm	89
Lampiran 9 Microplate Uji Penghambatan Pembentukan Biofilm	90
Lampiran 10 Microplate Uji Kerusakan/Penghancuran Biofilm.....	90
Lampiran 11 Hasil Uji Normalitas	92
Lampiran 12 Hasil Uji Homogenitas	93
Lampiran 13 Hasil Uji One Way ANNOVA.....	93
Lampiran 14 Hasil Uji Korelasi.....	94

ABSTRAK

UJI AKTIVITAS ANTIBIOFILM *Aspergillus terreus* TERHADAP BIOFILM *Klebsiella pneumoniae*

Dwi Wahyu Utami, Alvi Milliana, Iwal Reza Ahdi

Biofilm merupakan kumpulan bakteri interaktif yang melekat satu sama lain pada substrat biologis maupun non-biologis yang dilindungi dalam matriks eksopolisakarida (EPS). Adapun bakteri yang berada di dalam matriks eksopolisakarida menyebabkan terjadinya perlindungan bakteri dari mekanisme imun pejamu. *Klebsiella pneumoniae* merupakan bakteri yang mampu membentuk biofilm. Pembentukan biofilm melalui 5 tahap, yaitu perlekatan sel, adhesi sel ke sel yang lain, proliferasi dan pertumbuhan sel, pematangan, dan pelepasan atau penyebaran. *Aspergillus terreus* mengandung metabolit sekunder, seperti *terreic acid* dan mengandung enzim seperti, enzim selulase dan protease sehingga diharapkan CFS *A. terreus* mampu mengganggu pertumbuhan biofilm. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antibiofilm *A. terreus* terhadap biofilm *K. pneumoniae*. Penelitian ini menggunakan Metode Tissue Culture Plate (TCP) pada microplate dengan 7 kelompok perlakuan dengan kategori dua kelompok control, yaitu positif dan negative, serta lima kelompok uji dengan masing-masing 4 kali pengulangan. Adapun konsentrasi CFS *A. terreus* yang diujikan, yaitu 100%, 50%, 25%, 12,5%, dan 6,25%. Uji antibiofilm yang digunakan meliputi uji pencegahan perlekatan biofilm, uji penghambatan pertumbuhan biofilm, dan uji kerusakan/penghancuran biofilm. Persentase aktivitas antibiofilm didapatkan melalui rumus yang telah dimasukkan nilai *Optical Density* (OD) tiap uji. Aktivitas antibiofilm *A. terreus* terhadap pencegahan perlekatan, penghambatan pembentukan, dan kerusakan/penghancuran biofilm *K. pneumoniae* didapatkan nilai tertinggi pada konsentrasi CFS *A. terreus* 100%. Berdasarkan hasil tersebut, disimpulkan bahwa pemberian konsentrasi tersebut, CFS *A. terreus* memiliki aktivitas antibiofilm terhadap biofilm *K. pneumoniae*

Kata Kunci : Antibiofilm, biofilm, *Aspergillus terreus*, *Klebsiella pneumoniae*

ABSTRACT

ANTIBIOFILM ACTIVITY TEST OF *Aspergillus terreus* AGAINST BIOFILM OF *Klebsiella pneumoniae*

Dwi Wahyu Utami, Alvi Milliana, Iwal Reza Ahdi

Biofilm is a collection of interactive bacteria that attached to each other on biological and non-biological substrates and protected in an exopolysaccharide matrix (EPS). The bacteria that are in the exopolysaccharide matrix cause bacterial protection from the host immune mechanism. Klebsiella pneumoniae is a bacterium capable of forming biofilm. There are 5 stages of forming a biofilm, namely cell attachment, cell adhesion to other cells, cell proliferation and growth, maturation, and through dispersal. Aspergillus terreus contains secondary metabolites, such as terreic acid and enzymes such as cellulase and protease enzymes, so it is hoped that CFS A. terreus will be able to interfere with biofilm growth. The purpose of this study was to determine the antibiofilm activity of A. terreus against biofilm of K. pneumoniae. This study used the Tissue Culture Plate (TCP) method on microplate with 7 treatments, there are two control groups, namely positive and negative, and five test groups with 4 different categories. The concentrations of CFS A. terreus tested were 100%, 50%, 25%, 12.5%, and 6.25%. Antibiofilm tests used include biofilm adhesion prevention tests, biofilm growth tests, and biofilm damage/destruction tests. The percentage of antibiofilm activity was obtained through a formula that included the Optical Density (OD) value for each test. The highest value antibiofilm activity of A. terreus on prevention of attachment, inhibition of formation, and damage/destruction of K. pneumoniae biofilm was obtained at 100% A. terreus CFS concentration. The results is that present CFS A. terreus has antibiofilm activity against K. pneumoniae biofilm.

Keywords: Antibiofilm, biofilm, *Aspergillus terreus*, *Klebsiella pneumoniae*

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Klebsiella pneumoniae merupakan salah satu bakteri Gram negatif yang berbentuk batang pendek, memiliki ukuran 1-2 x 0,5-0,8 μm , berkapsul, tetapi tidak membentuk spora. *K. pneumoniae* termasuk bakteri fakultatif anaerob (Dolan and Burdon, 2005; Tarina NTI, 2017). Bakteri ini diisolasi untuk pertama kalinya pada tahun 1882 oleh Friedlander dari paru-paru pasien yang meninggal akibat pneumonia. Bakteri tersebut digambarkan sebagai mikroorganisme saprofit, bukan hanya menyebabkan gangguan saluran pencernaan manusia, kulit dan nasofaring, tetapi juga dapat menyebabkan infeksi saluran kemih, infeksi saluran empedu, osteomyelitis, dan bakteremia (Vuotto *et al.*, 2014).

K. pneumoniae merupakan penyebab terbanyak dari infeksi saluran pernapasan akut bagian bawah. Infeksi saluran pernapasan akut bagian bawah juga termasuk dalam penyebab kematian nomer tiga didunia (Soleha and Edwin, 2019). Berdasarkan data dari InfoDATIN, diketahui bahwa jemaah haji yang menderita penyakit pernapasan menduduki peringkat ke-2 setelah penyakit kardiovaskular dengan jumlah 257 jemaah atau berkisar 40,79% (Kementerian Kesehatan Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, 2015). *K. pneumoniae* merupakan penyebab terbesar dari penyakit pneumonia. Pneumonia dapat menyebabkan peradangan pada salah satu atau kedua parenkim paru-paru (Sattar A; Sharma S, 2018). Pneumonia merupakan salah satu penyebab angka kematian tertinggi di dunia (Latuharhary HM, Fatimawali, 2018). Kejadian terbanyak berada di Asia Selatan dan Afrika sub-Sahara. Pada tahun 2016, sebanyak 2.400 kematian anak

per hari disebabkan oleh pneumonia (Sari and Cahyati, 2019). Berdasarkan Riskesdas (2018) menyatakan bahwa prevalensi pneumonia pada tahun 2013 mencapai 4% sedangkan pada tahun 2018 berkisar 4,5%. Pernyataan tersebut menunjukkan adanya kenaikan jumlah penderita pneumonia di Indonesia (Kementerian Kesehatan Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan 1, 2018). Dalam berbagai survei yang dilaksanakan di Jakarta dan Malang, diketahui rata-rata hasil penyebab pneumonia yang diambil dari sputum ialah *K. pneumoniae*. 44,4% kejadian pneumonia di Jakarta dan 19,4% kejadian pneumonia di Malang terjadi diakibatkan dari *K. pneumoniae* (Soleha and Edwin, 2019).

Faktor virulensi yang memainkan peran penting dalam dalam patogenesis infeksi *K. pneumoniae* adalah polisakarida kapsul, fimbae tipe 1 dan fimbrae tipe 3, faktor-faktor yang terlibat dalam adhesi agregat dan siderophores. Strain *K. pneumoniae* yang diisolasi dari Tabung Endotrakeal (ETT) pasien yang terkena pneumonia terkait ventilator (VAP) dilaporkan dapat membentuk biofilm. Fimbrae tipe 1 atau tipe 3, serta kapsul dan LPS merupakan faktor virulensi yang paling banyak terlibat dalam kemampuan *K. pneumoniae* untuk tumbuh dalam membuat biofilm (Vuotto *et al.*, 2014).

Biofilm merupakan bakteri interaktif yang terkumpul dan melekat di permukaan keras atau saling melekat satu sama lain yang dilingkupi oleh matriks eksopolisakarida. Matriks eksopolisakarida dapat melindungi bakteri dari mekanisme imun pejamu. Pembentukan biofilm melalui beberapa tahap, seperti perlekatan sel pada substrat biologis maupun non-biologis, adhesi sel ke sel yang lain, proliferasi dan pertumbuhan sel, pematangan, dan pelepasan/penyebaran (Jawetz, Melnick and Aldeberg, 2004; Samal and Das, 2018).

Dalam pembentukan biofilm, terjadi mekanisme komunikasi antar bakteri yang disebut sebagai Pengindera Kuorum atau *Quorum Sensing*. Mekanisme ini juga dilakukan ketika situasi stress lingkungan seperti, pemberian antibiotik, kekurangan nutrisi, dan lain-lain. Biofilm menyebabkan bakteri mempunyai pertahanan permukaan yang kuat akan fagositosis, aktivasi gen yang menghasilkan strain dan penyebaran yang lebih ganas, dan anti-mikroba (Samal and Das, 2018). Karena adanya pembentukan biofilm oleh bakteri *K. pneumoniae*, maka efek yang dihasilkan ialah menyebabkan terjadinya resistensi antibiotik. *K. pneumoniae* mengalami resistensi antibiotik terhadap antibiotik penisilin, sefalosporin, dan aztreonam (Vuotto *et al.*, 2014; Tarina NTI, 2017).

Dalam penelitian sebelumnya, dikatakan bahwa biofilm *E. coli* dapat dihambat menggunakan *Aspergillus terreus* dikarenakan metabolit sekunder yang dikandungnya, yaitu *terreic acid* (Sharma *et al.*, 2016). Hal tersebut membuat peneliti ingin melakukan penelitian terhadap biofilm *K. pneumoniae* dikarenakan karakteristik *E. coli* dan *K. pneumoniae* memiliki kemiripan berupa bakteri Gram negatif berbentuk batang. Selain itu, peneliti tertarik untuk melakukan penelitian dikarenakan seiring bertambahnya waktu, semakin banyak resistensi obat yang dikarenakan bakteri *K. pneumoniae*.

Disebutkan dalam hadist shahih Riwayat Imam Muslim, bahwa Rasulullah *shallallahu 'alaihi wa sallam* bersabda: “*Setiap penyakit ada obatnya. Apabila ditemukan obat yang tepat untuk suatu penyakit, akan sembuhlah penyakit itu dengan izin Allah 'azza wajalla.*”. Berdasarkan hadist tersebut Rasulullah menjelaskan bahwa setiap penyakit ada obatnya. Adapun tugas dari manusia ialah meneliti dan mencari obat yang sesuai dengan penyakit agar penyakit dapat

terobati. Allah berfirman pada Surah Taa Haa ayat 53 yang artinya: “(Tuhan) yang telah menjadikan bumi sebagai hamparan bagimu, dan menjadikan jalan-jalan di atasnya bagimu, dan yang menurunkan air (hujan) dari langit. Kemudian Kami tumbuhkan dengannya (air hujan itu) berjenis-jenis aneka macam tumbuhan.”. Berdasarkan ayat tersebut dapat diambil makna dan disyukuri bahwa salah satu dari rahmat Allah SWT ialah berbagai macam tumbuhan yang dapat dimanfaatkan dengan baik oleh manusia. Al-Qur’an juga sebagai ayat qauliyah (tanda-tanda kekuasaan Allah yang tertulis) yang memberi petunjuk untuk merenungkan alam semesta (tafakkur alam) sebagai tanda kekuasaan Allah (ayat kauniyah) (Rizal S, 2020).

Aspergillus terreus merupakan golongan *Aspergillus* yang banyak ditemukan di alam terutama tersebar paling luas di daerah tropis maupun subtropis. *Aspergillus* merupakan jamur yang sering ditemukan di berbagai habitat, yaitu saprofit di tanah, produk pakan, dan makanan (Andriani, 2019). Hal tersebut diyakini peneliti bahwa apapun yang diciptakan oleh Allah tidak akan sia-sia termasuk jamur. Adapun kutipan ayat Ali Imran ayat 191 yang artinya: “(yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri, duduk atau dalam keadaan berbaring, dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata), “Ya Tuhan kami, tidaklah Engkau menciptakan semua ini sia-sia; Mahasuci Engkau, lindungilah kami dari azab neraka.”

Dengan adanya kandungan yang menghambat biofilm dari *A. terreus*, peneliti tertarik melakukan penelitian untuk mengetahui adanya aktivitas antibiofilm *A. terreus* terhadap biofilm *K. pneumoniae*.

1.2 Rumusan Masalah Penelitian

1.2.1 Rumusan Masalah Umum Penelitian

“Apakah terdapat aktivitas antibiofilm *Aspergillus terreus* terhadap *Klebsiella pneumoniae*?”.

1.2.2 Rumusan Masalah Khusus Penelitian

- a. Apakah aktivitas antibiofilm *Aspergillus terreus* mampu mencegah perlekatan biofilm *Klebsiella pneumoniae*?
- b. Apakah aktivitas antibiofilm *Aspergillus terreus* mampu menghambat pertumbuhan biofilm *Klebsiella pneumoniae*?
- c. Apakah aktivitas antibiofilm *Aspergillus terreus* mampu merusak/menghancurkan biofilm *Klebsiella pneumoniae*?

1.3 Tujuan Masalah Penelitian

1.3.1 Tujuan Masalah Umum Penelitian

Untuk mengetahui aktivitas antibiofilm *Aspergillus terreus* terhadap biofilm *Klebsiella pneumoniae*

1.3.2 Tujuan Masalah Khusus Penelitian

- a. Untuk mengetahui aktivitas antibiofilm *Aspergillus terreus* yang mampu mencegah perlekatan biofilm *Klebsiella pneumoniae*
- b. Untuk mengetahui aktivitas antibiofilm *Aspergillus terreus* yang mampu menghambat pertumbuhan biofilm *Klebsiella pneumoniae*
- c. Untuk mengetahui aktivitas antibiofilm *Aspergillus terreus* yang mampu merusak/menghancurkan biofilm *Klebsiella pneumoniae*.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademis

Adapun manfaat akademis yang dapat diambil dari penelitian ini, yaitu

- a. Penelitian ini dapat digunakan sebagai sumber pengetahuan tentang antibiofilm *Aspergillus terreus* terhadap biofilm *Klebsiella pneumoniae*.
- b. Penelitian ini dapat digunakan sebagai sumber literatur lanjutan dalam pengembangan ilmu Kesehatan.

1.4.2 Manfaat Aplikatif

- a. Menjadi salah satu referensi dalam mewujudkan program strategi eradikasi *Klebsiella pneumoniae*
- b. Memberikan pilihan obat alternatif terapi farmakologi dalam mengatasi resistensi bakteri *Klebsiella pneumoniae*

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Klebsiella pneumoniae*

2.1.1 Taksonomi *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae termasuk dari genus *Klebsiella*. Bakteri tersebut memiliki karakteristik dengan bentuk batang, pendek, fakultatif anaerob, tidak membentuk spora, dan non-motil. Adapun taksonomi dari *K. pneumoniae* sebagai berikut:

Kingdom	: <i>Bacteriae</i>
Phylum	: <i>Proteobacteria</i>
Classis	: <i>Gamma Proteobacteria</i>
Ordo	: <i>Enterobacteriales</i>
Famili	: <i>Enterobacteriaceae</i>
Genus	: <i>Klebsiella</i>
Spesies	: <i>Klebsiella sp</i> (Fauziah, 2019).

2.1.2 Karakteristik *Klebsiella pneumoniae*

Theodor Albrecht Edwin Klebs merupakan peneliti bakteriologis asal Jerman yang pertama kali mengidentifikasi *K. pneumoniae* pada tahun 1834-1913 (Drotman *et al.*, 2010). *K. pneumoniae* termasuk dari bakteri fakultatif anaerob. Bakteri fakultatif anaerob ialah bakteri yang dapat hidup dalam keadaan terdapat oksigen dan tidak cukup oksigen. Bakteri ini tergolong dalam bakteri Gram negatif yang berbentuk batang pendek. Adapun ukuran dari bakteri tersebut, yaitu 1-2 x 0,5-0,8 μm . Bakteri ini akan tumbuh optimal pada suhu 37°C. Karakteristik dari bakteri ini ialah mempunyai kapsul dan tidak menghasilkan atau membentuk spora

(Dolan and Burdon, 2005; Putri, Sukini and Yodong, 2017; Tarina NTI, 2017; Khotimah, 2020).

2.1.3 Faktor Virulensi *Klebsiella pneumoniae*

Resistensi terhadap antibiotik telah terjadi pada bakteri *K. pneumoniae* (Dita *et al.*, 2019). Bakteri tersebut membentuk biofilm pada substrat biologis maupun non biologis dikarenakan terdapat faktor adhesi yang merupakan bagian dari faktor virulensi. Adapun beberapa faktor adhesi dari *K. pneumoniae* adalah sebagai berikut:

a. Fimbriae Tipe 1 (fimH)

Fimbriae Tipe 1 (fimH) dimediasi oleh gugus gen fim H. Fimbriae tersebut menyebabkan perlekatan bakteri pada epitel substrat. Fimbriae tipe 1 ini sering dijumpai pada sebagian besar famili *enterobacteria*.

b. Fimbriae Tipe P (pap)

Fimbriae Tipe P (pap) diinisiasi oleh gen pap. Fimbriae ini menyebabkan terjadinya penyebaran yang lebih efisien. Hal tersebut mengakibatkan bakteri mampu melekat, bertahan, dan menginvasi.

c. Fimbriae Tipe 3

Fimbriae Tipe 3 mempunyai fungsi dalam mempermudah adhesi dari *K. pneumoniae* ke jenis sel lainnya dan mempermudah pembentukan biofilm pada substrat biologis maupun non biologis.

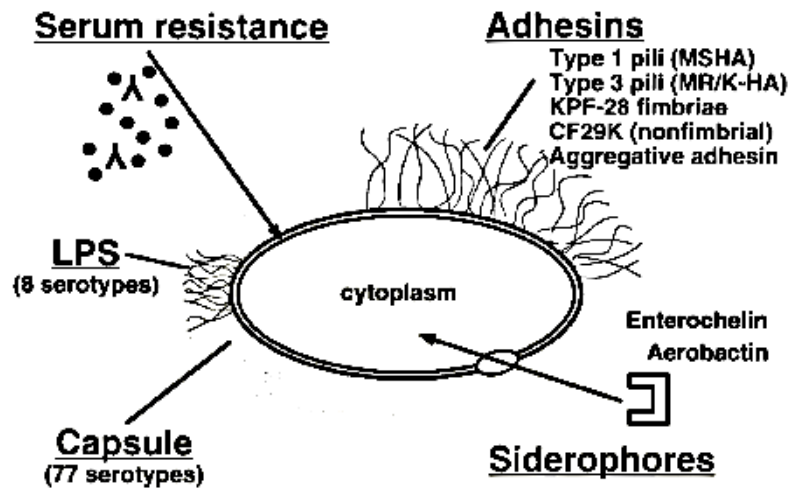
d. Kapsul antigen K

Kapsul ini dianggap faktor virulensi yang paling penting dalam pembentukan biofilm. Kapsul ini menghindari adhesi dari bakteri yang lain dan juga menyebabkan resisten dari ancaman fagositosis.

e. Pili Konjugatif

Pili konjugatif digunakan untuk menghubungkan bakteri ketika melakukan konjugasi atau bertukarnya materi genetik serta membantu perlekatan satu sama lainnya (Sahputri, Lindarto and Ganie, 2018). Perlekatan terjadi dikarenakan pili mempunyai kandungan protein yang membuat terjadinya ikatan dengan molekul gula penyusun dari membran sel inang atau yang sering disebut protein hemagglutinin. Selain itu, protein dari pili juga dapat membentuk ikatan dengan reseptor dari permukaan sel inang atau yang disebut dengan protein adhesin (Dita *et al.*, 2019).

Diketahui faktor virulensi lainnya ialah *Lipopolysaccharide* (LPS) yang terdiri dari tiga bagian: lipid A, O-antigen, dan *core polysaccharide* yang menghubungkan lipid A dan O-antigen. *K. pneumoniae* mempunyai lipid A yang ikut berkontribusi pada resistensi terhadap pertahanan bawaan, terutama termasuk resistensi terhadap peptida, antimikroba, dan mutasi gen. O-antigen mencegah masuknya komponen ke aktivator (misalnya porin dan LPS kasar). Hal tersebut menunjukkan bahwa O-antigen ikut berkontribusi terhadap resistensi terhadap pembunuhan bakteri yang dimediasi komplemen (Li *et al.*, 2014).



Gambar 2.1 Faktor Virulensi Bakteri *Klebsiella pneumoniae* (Nugraha, 2019)

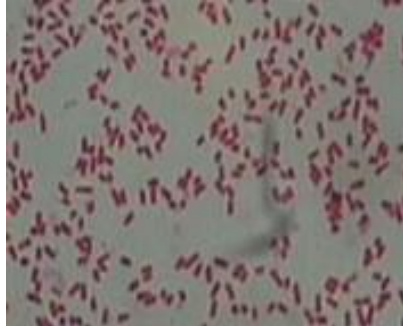
2.1.4 Identifikasi *Klebsiella pneumoniae*

2.1.4.1 Mikroskopis

Pewarnaan Gram dapat dilakukan dalam mengidentifikasi *K. pneumoniae*. Metode ini dinamakan dengan nama dari penemunya, Denmark Hans Christian Gram (1853–1938). Adapun hasil dari pewarnaan ini dibagi menjadi dua, yaitu Gram negatif dan Gram positif. Zat pewarna kristal violet akan dipertahankan oleh bakteri Gram positif dan menyebabkan bewarna ungu apabila dilihat dengan mikroskop. Sebaliknya, Bakteri Gram negatif akan bewarna merah dikarenakan terjadi kehilangan zat pewarna kristal violet setelah pencucian dengan alkohol, serta diberi pewarnaan selanjutnya yang menggunakan zat pewarna air fuchsin atau safranin (Putri, Sukini and Yodong, 2017).

Lipoprotein dan selaput luar merupakan komponen khusus dari dinding sel bakteri Gram negatif. Porin yang terdapat pada saluran khusus yang terdapat pada selaput luar yang berfungsi mempermudah difusi pasif senyawa hidrofил dengan

berat molekul rendah (gula, asam amino, ion-ion tertentu) (Putri, Sukini and Yodong, 2017).



Gambar 2.2 Pengecatan Gram dilihat dengan mikroskop perbesaran 1000x yang menunjukkan *Klebsiella pneumoniae* berwarna merah dan berbentuk batang pendek (Dita et al., 2019).

2.1.4.2 Biakan pada Medium Diferensial

K. pneumoniae termasuk famili *Enterobacteriaceae* yang dapat memfermentasi laktosa. Hal tersebut dapat diuji menggunakan kultur pada medium diferensial yang terkandung zat warna khusus dan karbohidrat, misalnya agar *MacConkey*. Garam empedu dan kristal violet terkandung dalam agar tersebut yang berfungsi sebagai penghambat pertumbuhan dari bakteri Gram positif. Hal tersebut dapat digunakan sebagai cara khusus dalam mengidentifikasi Gram negatif dikarenakan tidak semua bakteri dapat tumbuh dengan baik di media tersebut. Interpretasi dari *K. pneumoniae* pada agar *MacConkey* tampak koloni besar, mukoid, cembung dan berwarna merah muda. Warna merah muda didapatkan dikarenakan bakteri memfermentasi laktosa. Adapun sebaliknya, jika terdapat bakteri lainnya yang tidak memfermentasi laktosa akan tidak berwarna (pucat) (Kambuno Dicky, 2017; Fauziah, 2019).



Gambar 2.3 Koloni *Klebsiella pneumoniae* pada MacConkey Agar Plate tampak berukuran besar mengkilat dan berwarna merah muda (Baban, 2017).

2.1.4.3 Uji Biokimia

a) Triple Sugar Iron Agar (TSIA)

TSIA ialah media yang mempunyai fungsi dalam mengidentifikasi bakteri berdasarkan karakter spesifik yang dikeluarkan oleh bakteri. 0,1% glukosa, 1% sukrosa, 1% laktosa, dan ferrosulfat merupakan kandungan yang berada pada media TSIA. Zat-zat tersebut dimasukkan kedalam tabung reaksi dengan posisi miring. Inokulasi pertumbuhan bakteri ke dalam tabung reaksi. Jika memfermentasikan glukosa maka warna yang terbentuk ialah warna kuning karena menghasilkan sejumlah asam. *Klebsiella sp.* dapat diuji menggunakan TSIA dan menunjukkan warna kuning. Hal tersebut menunjukkan bahwa *Klebsiella sp.* dapat memfermentasikan glukosa (Marhafanny, 2017).

b) Uji Motilitas pada Agar Semisolid

Pergerakan bakteri dapat diuji dengan uji motilitas pada agar semisolid. Uji ini dilakukan dengan cara menginokulasikan pada

medium, apabila terdapat bakteri yang motil, maka bakteri tersebut akan tumbuh keluar medium dan menjadi keruh. Hal tersebut berkebalikan dengan *Klebsiella sp.* yang bersifat non-motil dan tampak hanya tumbuh pada garis inokulum (Marhafanny, 2017).

c) Uji Indol

Kemampuan suatu organisme yang dapat menghasilkan indol dapat dilihat melalui Uji Indol. Indol merupakan degradasi asam amino triptofan. Triptofanase dapat menghidrolisis triptofan untuk menghasilkan produk akhir, salah satunya ialah indol. Produksi triptofanase dapat terdeteksi oleh uji ini. Interpretasi dari uji ini dikatakan positif apabila bewarna merah dan sebaliknya, apabila negatif maka warna yang terbentuk ialah kuning. Pada uji ini, *K. pneumoniae* merupakan bakteri dengan indol negatif (Marhafanny, 2017).

d) Uji Metil Merah dan Voges - Proskauer (VP)

Produksi asam kuat saat fermentasi glukosa dapat terdeteksi oleh uji metil merah. Uji ini menggunakan parameter berupa indikator pH. Adapun pH 6,00 menunjukkan warna kuning hingga 4,4 menunjukkan warna merah. Produksi, pengelola asam, dan fermentasi glukosa dapat ditentukan oleh Uji Voges-Proskauer. Uji ini dapat menunjukkan kemampuan organisme sebagai sistem *buffer* dan penghasil produk netral (asetil metil karbinol atau aseton) yang merupakan hasil dari fermentasi glukosa. Konversi dari asetoin atau asetil metil karbinol ialah diasetil, dan dibantu oleh reagensia potassium hydroxide 40% dan

naphtol sebagai katalisator. Hal tersebut menyebabkan pada uji ini akan menunjukkan warna merah. Pada famili *Enterobacteriaceae*, seperti *Klebsiella* dan *Enterobacter*, diketahui bahwa dapat menghasilkan asetoin. Hal tersebut menyebabkan *Klebsiella sp.* menghasilkan warna merah yang menunjukkan bahwa hasil positif (Marhafanny, 2017).

e) Uji sitrat

Medium padat yang mengandung garam-garam amonium, natrium sitrat, *bromthymol blue*, dan agar merupakan kandungan yang digunakan untuk Uji sitrat. Sumber energi dari medium ini ialah sitrat. Medium ini menggunakan indikator pH *bromthymol blue* dimana saat suasana alkali akan menunjukkan warna biru. Sitrat akan berubah menjadi asam piruvat dan CO₂ yang selanjutnya akan menjadi Na₂CO₃. Na₂CO₃ menyebabkan terbentuknya medium warna biru dikarenakan suasana alkali (Marhafanny, 2017).

f) Uji Urease

Amonia, air, dan karbondioksida merupakan hasil dari mekanisme hidrolisis urea oleh enzim urease yang dimiliki bakteri. Enzim tersebut dapat ditemukan melalui inokulasi bakteri di medium yang mengandung urea sebagai sumber karbon. Setelah itu, dapat dilakukan inkubasi pada suhu 35°C. Terdeteksi adanya amonia dapat menggunakan indikator pH melalui perubahan pH dengan timbulnya warna merah (suasana alkali) (Marhafanny, 2017).

Dalam pengidentifikasian *K. pneumoniae*, bisa dilakukan pemeriksaan *Microbact System* yang merupakan sistem identifikasi komersial untuk

enterobacteria dan bakteri Gram negatif lainnya. Uji ini terdiri dari 12 tes biokimia (Ling, Hut and French, 1988). Adapun tes biokimia diujikan di *microbact system* seperti berikut:

<i>API20E</i>	
<i>Test</i>	<i>Abbreviation</i>
β-Galactosidase	ONPG
Arginine dihydrolase	ADH
Lysine decarboxylase	LDC
Ornithine decarboxylase	ODC
Citrate utilisation	CIT
Hydrogen sulphide production	H ₂ S
Urea hydrolysis	URE
Tryptophan deaminase	TDA
Indole production	IND
Voges-Proskauer reaction	VP
Gelatin liquefaction	GEL
Acid from:	
Glucose	GLU
Mannitol	MAN
Inositol	INO
Sorbitol	SOR
Rhamnose	RHA
Sucrose	SAC
Meliobiose	MEL
Amygdalin	AMY
Arabinose	ARA

Gambar 2.4 24 Tes Biokimia yang diujikan di Microbact 12E (Ling, Hut and French, 1988)

2.1.4.4 Manifestasi Klinis Akibat *Klebsiella pneumoniae*

K. pneumoniae dapat ditemukan di saluran pernapasan dan tinja. *K. pneumoniae* umumnya dikenal sebagai penyebab pneumonia (Oliveira *et al.*, 2014; Karen and Jeffery, 2016). Pneumonia dapat diklasifikasikan menjadi dua, yaitu *Community Acquired Pneumonia* (CAP) yang didapat dari masyarakat dan *Hospital Acquired Pneumonia* (HAP) yang didapat di rumah sakit. *K. pneumoniae* sendiri merupakan bagian dari *Hospital Acquired Pneumonia* (HAP).

Adapun gejala pneumonia ialah berupa demam, menggigil, berkeringat, batuk, sakit dada karena pleuritis, dan sesak. Saat pemeriksaan fisik ditemukan adanya retraksi dada pada area bawah ketika bernafas, takipneu, perkusi redup, ronki, suara pernafasan bronkial, *pleural friction rub*, dan ditemukan konsolidasi pada pemeriksaan radiologi (Damayanti and Ryusuke, 2017).

K. pneumoniae dapat menyebabkan penyakit lainnya seperti infeksi saluran kemih dan bakteremia, rinitis atrofi kronik, artritis septik, dan meningitis bakterial (Oliveira *et al.*, 2014; Karen and Jeffery, 2016). Adapun penjelasan lebih lanjut seperti berikut:

1) Infeksi Saluran Kemih dan Bakteremia

Infeksi Saluran Kemih (ISK) ialah infeksi saluran kemih dikarenakan terjadi invasi bakteri secara *ascending*. Hal tersebut menjelaskan bahwa bakteri tersebut masuk dari uretra ke kandung kemih, ureter, dan ginjal. Adapun bakteri yang sering menyebabkan ISK adalah *Escherichia coli*, *K. pneumoniae*, dan *Proteus* (Nazmi *et al.*, 2017).

Bakteremia merupakan terdapatnya aliran darah yang mengandung bakteri. Bakteri anaerob merupakan penyebab infeksi yang terjadi hampir semua anatomis. Organisme ini merupakan penyebab yang sering menyebabkan infeksi aliran darah pada kultur darah positif dengan kisaran 1-17% (Pratama, 2017).

2) Rinitis Atrofi Kronik

Rinitis Atrofi Kronik adalah penyakit hidung kronik dengan tanda khas seperti atrofi mukosa hidung progresif, krusta, fetor, dan perluasan rongga hidung (Hayati and Pawarti, 2018).

3) Artritis Septik

Artritis septik juga terjadi pada sendi sakroiliaka atau yang disebut sakroiliitis infeksi. Kelainan ini terjadi dengan kisaran antara 1% dan 2% dari semua pasien dengan artritis septik. Hal ini menjadi

tantangan diagnostik mengingat manifestasi mirip patologi muskuloskeletal lain seperti penyakit tulang belakang degeneratif dan *spondylodiscitis* (Chee and Lim, 2018).

4) Meningitis Bakterial

Meningitis bakterial merupakan penyakit yang menginfeksi Sistem Syaraf Pusat (SSP). Penyakit ini sering terjadi pada usia < 2 tahun. Puncak kejadian ini terjadi pada usia 6-18 bulan. Epidemiologi dari penyakit ini berkisar 1,2 juta kejadian tiap tahun dengan kejadian 2%-30% kematian di dunia (Yanuar, Puspitasari and Nuryastuti, 2005).

Bakteri ini memiliki *sequence type 16* yang dapat menguraikan spektrum luas β -laktamase dan menyebabkan resistensi terhadap berbagai penisilin dan sefalosporin. ST 258 merupakan strain yang menyebabkan terjadinya multidrug resistant yang disebut “penghasil karbapenamase” karena resisten terhadap semua antibiotik β -laktam termasuk agen karbapenem spektrum luas (Karen and Jeffery, 2016).

K. pneumoniae memiliki transmisi utama, yaitu melalui infeksi yang berasal dari rumah sakit dan melalui saluran pencernaan. Faktor risiko dari infeksi bakteri ini, seperti pasien dengan penyakit diabetes mellitus (DM), tumor, pernah mendapatkam tindakan invasif (trakeostomi dan pemasangan kateter urin), perawatan ICU (berkisar ± 2 minggu), pemakaian antibiotik lebih dari dua minggu, gagal ginjal kronis, penyakit hati kronis, penggunaan ventilasi mekanik, dan lain-lain (Harapan, Tahulending and Tumbol, 2018).

2.2 Biofilm

2.2.1 Definisi Biofilm

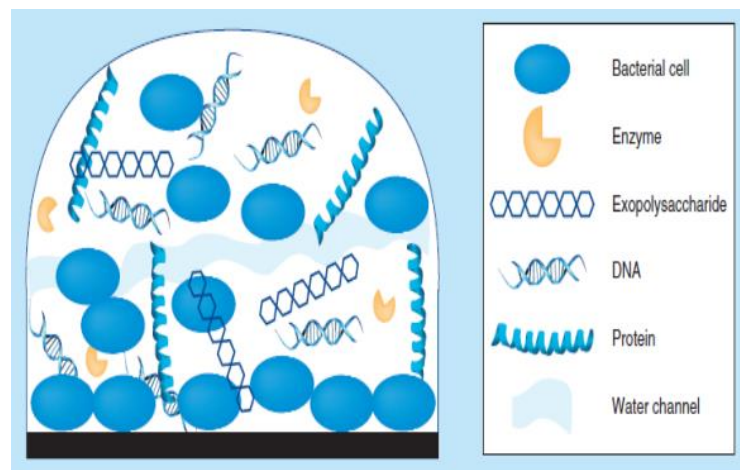
Sejak awal penemuan mikroskop, Van Leeuwenhoek menemukan biofilm mikroba pada saat melakukan pengamatan mikroorganisme permukaan gigi. Biofilm merupakan kumpulan bakteri interaktif yang melekat satu sama lain pada substrat biologi maupun non biologi yang dilindungi dalam matriks eksopolisakarida (Jawetz, Melnick and Aldeberg, 2004; Homenta, 2016; Purbowati, 2018). Peningkatan toleransi bakteri terhadap lingkungan yang merugikan merupakan salah satu efek dari pembentukan biofilm (Hidayati and H. C. Liuwan, 2019).

Adapun bakteri yang berada di dalam matriks eksopolisakarida menyebabkan terjadinya perlindungan bakteri dari mekanisme imun pejamu. Matriks memiliki fungsi menjadi sawar terhadap antimikroba, sehingga menyebabkan antibiotik sulit dalam proses mengeradikasi bakteri. Resistensi antimikroba salah satunya terjadi dikarenakan bakteri membentuk biofilm. Hal tersebut merupakan alasan mengapa infeksi bakteri yang menghasilkan biofilm sulit diobati (Jawetz, Melnick and Aldeberg, 2004).

2.2.2 Struktur Pembentuk Biofilm

Substansi Polimerik Ekstraseluler (SPE) merupakan struktur pembentuk biofilm. Substansi polimerik ekstraseluler mengandung 50-90% dari total karbon organik biofilm. SPE berfungsi sebagai bahan penyusun matriks primer biofilm yang dikeluarkan bakteri ke lingkungan. Penyusun dari SPE ialah eksopolisakarida, protein, dan asam nukleat (DNA) (Homenta, 2016; Hidayati and H. C. Liuwan, 2019).

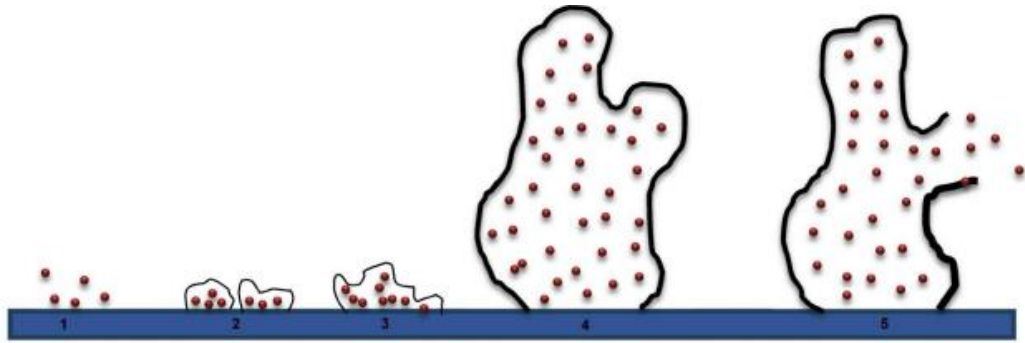
Eksopolisakarida sendiri dapat terlihat pada mikroskop elektron. Pada lapang pandang terlihat untaian panjang yang bercabang dan menempel atau melekat pada permukaan sel. Eksopolisakarida sendiri mempunyai fungsi sebagai penyangga dari karbohidrat, protein, lipid, asam nukleat yang menyatu. Pertukaran *environmental Deoxyribonucleatid Acid* (DNA) dapat terjadi dikarenakan adanya biofilm yang berfungsi dalam penyediaan lingkungan yang optimal. Hal tersebut menyebabkan pengkodean resistensi antibiotik (Hidayati and H. C. Liuwan, 2019).



Gambar 2.5 Stuktur Penyusun Biofilm (Hidayati and H. C. Liuwan, 2019)

2.2.3 Mekanisme Pembentukan Biofilm

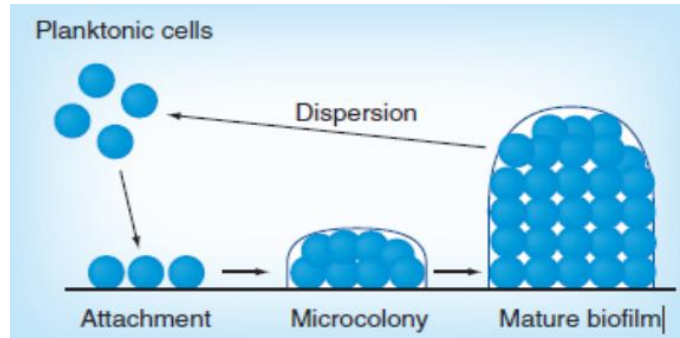
Biofilm bakteri dibentuk untuk melindungi sel bakteri dari lingkungan yang merugikan kondisi dan kekurangan nutrisi. Adapun mekanime pembentukan biofilm melalui beberapa tahap, seperti perlekatan sel, adhesi sel ke sel yang lain, proliferasi dan pertumbuhan sel, pematangan, dan pelepasan atau penyebaran (Samal and Das, 2018).



Gambar 2.6 Tahapan pembentukan biofilm: (1) Perlekatan sel, (2) Adhesi sel ke sel yang lain, (3) proliferasi dan pertumbuhan sel, (4) pematangan, dan (5) pelepasan/penyebaran (Samal and Das, 2018).

Tahap awal ialah perlekatan sel. Bakteri melekat pada permukaan tubuh atau melekat pada organisme yang lain. Bakteri melakukan perlekatan dengan interaksi yang lemah atau gaya *van der Waals*. Hal tersebut mengakibatkan menyebabkan interaksi dapat berpisah dan kembali lagi secara reversibel. Interaksi tersebut menyebabkan adanya perlekatan bakteri dan permukaan secara irreversibel (Abida, 2020). Nutrisi, suhu yang sesuai, alat gerak, protein, dan karbohidrat mempunyai pengaruh terhadap kecepatan perlekatan. Setelah tahapan perlekatan sel, bakteri melanjutkan ke tahapan adhesi sel ke sel yang lain. Pada tahap ini terjadi perlekatan dari bakteri satu dengan bakteri yang lainnya sehingga membentuk mikrokoloni yang stabil. Tahapan Proliferasi dan Pertumbuhan Sel merupakan tahapan lanjutan dari perkembangan mikrokoloni, dimana hal tersebut menyebabkan terbentuknya sinyal berupa bahan kimia. Sinyal tersebut mempunyai fungsi dalam pembentukan eksopolisakarida yang dapat melindungi bakteri dan menyebabkan terjadinya pembelahan bakteri terus berlanjut. Tahapan selanjutnya ialah tahapan pematangan sel. Pada tahapan tersebut, terjadi ekspresi gen dalam pembentukan biofilm yang lebih besar dengan pembentukan saluran berisi air untuk pengangkutan nutrisi ke dalam biofilm. Saluran air ini tidak hanya mendistribusikan

nutrisi tetapi juga memiliki kemampuan untuk menghilangkan bahan yang merugikan bagi koloni bakteri. Tahapan yang terakhir ialah pelepasan dan penyebaran. Pada tahap ini bakteri melakukan penghentian produksi eksopolisakarida yang menyebabkan terjadi pelepasan bakteri dan kembali menyebar (Samal and Das, 2018).



Gambar 2.7 Mekanisme Pembentukan Biofilm (Hidayati and H. C. Liuwan, 2019).

2.2.4 *Quorum Sensing*

Quorum Sensing (QS) merupakan mekanisme dimana banyak spesies bakteri dapat berkomunikasi dengan bakteri yang lain selama pembentukan biofilm. Mekanisme tersebut membantu dalam komunikasi antara intraspecies dan interspecies selama pembentukan biofilm atau dalam kondisi lingkungan yang merugikan seperti pemberian antibiotik, kekurangan nutrisi dan lain-lain. QS merangsang koordinasi ekspresi gen dengan sel yang lain. Molekul pensinyalan dalam penginderaan kuorum menempel pada reseptor bakteri lain dan membantu dalam transkripsi gen baik dari spesies bakteri yang sama atau antara bakteri dari spesies yang berbeda. Bakteri tersebut menyebarkan sinyal kimiawi yang dikenali oleh bakteri lain sehingga bersatu membentuk struktur biofilm yang kompleks (Samal and Das, 2018).

Bakteri melakukan komunikasi satu sama lain menggunakan asil-homoserine lakton (AHL) yang memicu QS pada bakteri Gram negatif. AHL sendiri mempunyai beberapa tipe, tergantung dari panjang dan fungsi dari rantai samping asil. Ekspresi gen QS yang terjadi pada bakteri Gram positif diatur oleh peptide kecil. Sedangkan yang mengatur QS yang terjadi pada Gram positif dan negatif diatur oleh *autoinducer-2* (AI-2) (Hidayati and C. C. Liuwan, 2019).

2.2.5 Biofilm dan *Quorum Sensing* pada *Klebsiella pneumoniae*

Biofilm dibentuk dari kolonisasi bakteri yang terdiri dari satu atau campuran spesies bakteri yang melekat pada permukaan. Biofilm menyebabkan adanya pertumbuhan dan kelangsungan hidup di lingkungan yang tidak bersahabat. Pembentukan atau penyusunan biofilm diawali oleh beberapa bakteri yang hidup bebas melekat pada permukaan, lalu mengalami perbanyakan diri dan melakukan penebalan terus-menerus. Bakteri yang menghasilkan biofilm akan dilindungi oleh matriks berupa Substansi Polimerik Ekstraseluler (SPE). Sel-sel bakteri dalam matriks melakukan pengeluaran sinyal bahan kimia agar pembentukan biofilm yang lebih matur. Sinyal tersebut merupakan proses *quorum sensing* yang berarti komunikasi yang dilakukan antar sel untuk melakukan aksi yang tergantung dari konsentrasi sinyal lingkungan (Sahputri, Lindarto and Ganie, 2018).

Pembentukan biofilm *K. pneumoniae*, melalui pelepasan molekul pengatur tipe-2 QS (*autoinducer*, AI-2) di kompartemen ekstraseluler. AI-2 adalah sinyal non-spesifik bakteri yang digunakan oleh bakteri Gram negatif dan Gram positif dan disintesis oleh *S-ribosylhomocysteine lyase* (LuxS). LuxS mengubah *S-ribosylhomocysteine* menjadi *homocysteine* dan (*S*) -4,5-dihydroxy-2,3-

pentanedione (DPD), yang terbentuk secara spontan menjadi molekul AI-2 (De Araujo *et al.*, 2010).

2.2.6 Uji Pembentukan Biofilm

Biofilm dapat diuji ada atau tidaknya dengan beberapa metode. Adapun metode yang diujikan, yaitu metode tabung, metode *Congo Red Agar*, dan metode *Tissue Culture Plate* (TCP) dengan pewarnaan kristal violet, dan lain-lain (Ruchi, Sujata and Anuradha, 2018).

2.2.6.1 Metode Tabung

Metode tabung merupakan salah satu metode kualitatif untuk mendeteksi biofilm. Pada metode ini, sekumpulan organisme uji dikultur semalaman diinokulasi dalam tabung kaca borosilikat yang berisi 10 ml *Trypticase Soy Broth* (TSB) dengan glukosa 1%. Tabung kemudian diinkubasi pada suhu 37 ° C selama 24 jam secara aerob. Setelah inkubasi, tabung dicuci dengan larutan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) pada pH 7,3 dan dikeringkan. Tabung kemudian diwarnai menggunakan kristal violet (0,1%) selama 15 menit (Ruchi, Sujata and Anuradha, 2018). Adapun intepretasi dari uji tabung seperti berikut:

Tabel 2.1 Interpretasi Uji Tabung

Skor	Interpretasi
1	Weak/ None biofilm production
2	Moderate biofilm production
3	High/Strong biofilm production

(Ruchi, Sujata and Anuradha, 2018)



Gambar 2.8 Intepretasi Uji Tabung: (kiri) strong biofilm producer, (tengah) weak producer, (kanan) none biofilm producer (Ruchi, Sujata and Anuradha, 2018).

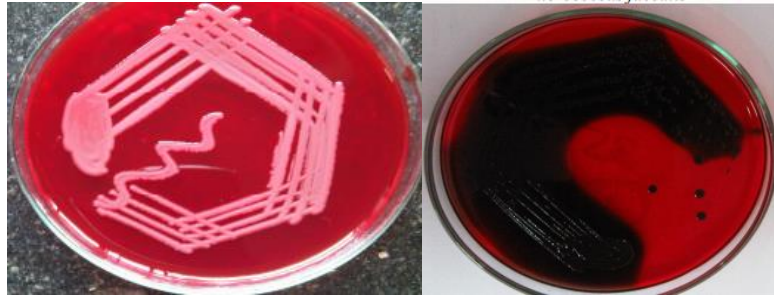
2.2.6.2 Metode Congo Red Agar (CRA)

Metode *Congo Red Agar* (CRA) merupakan metode skrining kualitatif sederhana yang berfungsi untuk mendeteksi produksi biofilm. Metode ini menggunakan bahan berupa *congo red stain*, glukosa, *blood agar base*, dan aquades yang selanjutnya disterilkan pada autoklaf. Kemudian, dilakukan inokulasi organisme uji dan dilanjutkan dengan penginkubasian pada suhu 37 ° C selama 24 jam (Ruchi, Sujata and Anuradha, 2018; Lesmana *et al.*, 2019). Interpretasi dilakukan dengan menggunakan skala warna berikut:

Tabel 2.2 Interpretasi Metode *Congo Red Agar* (CRA)

Warna	Interpretasi
Hitam, <i>dry crystalline colonies</i>	Menghasilkan biofilm
Koloni merah/merah muda/ Bordeaux colonies	Tidak menghasilkan biofilm

(Ruchi, Sujata and Anuradha, 2018; Lesmana *et al.*, 2019).



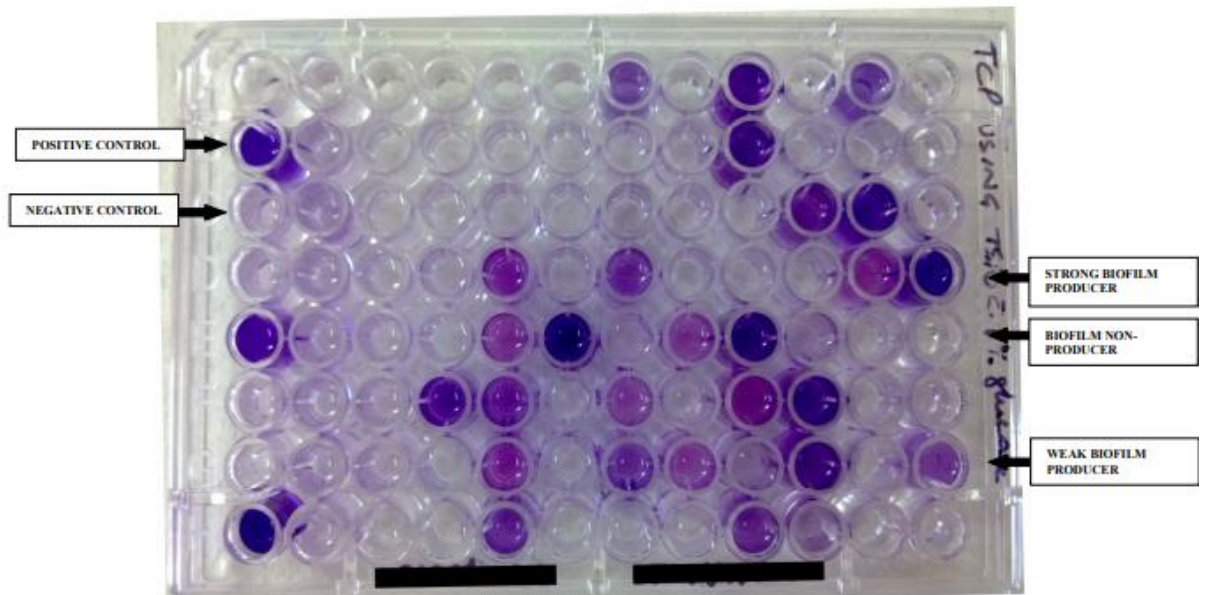
Gambar 2.9 Koloni berwarna pink menunjukkan tidak menghasilkan biofilm (kiri) dan Koloni berwarna hitam menunjukkan menghasilkan biofilm (kanan) (Ruchi, Sujata and Anuradha, 2018).

2.2.6.3 Metode *Tissue Culture Plate* (TCP) dan Pewarnaan Kristal Violet

Metode *tissue culture plate* atau metode dilusi pada *microtiter plate* merupakan metode yang sering dilakukan dan merupakan metode *gold standard* untuk menguji adanya biofilm. Metode ini merupakan metode kuantitatif, sehingga metode ini menghasilkan nilai yang objektif. Menumbuhkan bakteri ke *well microplate* merupakan cara kerja dari uji ini. Organisme diinokulasikan pada 10 mL dari Trypticase Soy Broth (TSB) dengan glukosa 1% dan diinkubasi pada 37 °C selama 24 jam. Setelah itu, dilakukan pencucian sebanyak tiga kali dengan larutan saline. Pemberian warna menggunakan 150 µl *crystal violet* merupakan tahapan selanjutnya. Setelah ditunggu 15 menit, maka *micro plate* bisa dicuci dan diberikan 95% ethanol selama 30 menit. Biofilm dihitung jumlahnya menggunakan pembacaan *Optical Density* (OD) melalui pembacaan pada *ELISA plate reader* dengan panjang gelombang 595 nm (Ruchi, Sujata and Anuradha, 2018). Interpretasi hasil pengukuran OD adalah sebagai berikut:

- a) *Non biofilm producer*/ Tidak membentuk biofilm (0) apabila $0 \leq OD < OD_c$
(*Optical Density Cut-off Value*)
- b) *Weak biofilm producer*/ Pembentuk biofilm lemah (+ atau 1) apabila $OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$,

- c) *Moderate biofilm producer*/ Pembentuk biofilm sedang (++ atau 2) apabila $2 \times OD_c < OD 4 \times OD_c$
- d) *Strong biofilm producer*/ Pembentuk biofilm kuat (+++ atau 3) apabila $4 \times OD_c < OD$ (Ruchi, Sujata and Anuradha, 2018).



Gambar 2.10 Uji Pembentukan Biofilm dengan Metode TCP dengan Pewarnaan Kristal Violet (Ruchi, Sujata and Anuradha, 2018)

2.3 *Aspergillus terreus*

2.3.1 Taksonomi *Aspergillus terreus*

Aspergillus terreus termasuk dari genus *Aspergillus*. *Aspergillus* merupakan jamur yang memiliki filamen panjang, dan juga membentuk miselia dan konidiofora (Andriani, 2019). Adapun taksonomi dari *A. terreus* sebagai berikut:

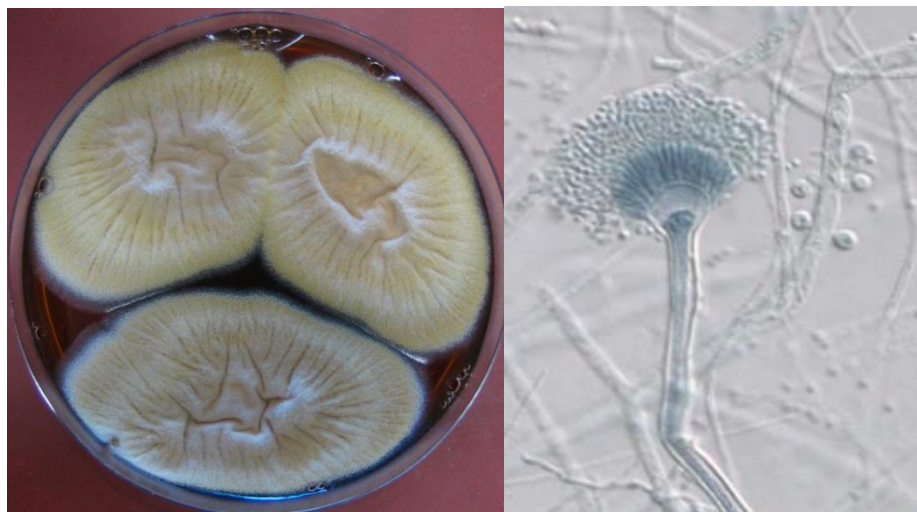
Kingdom	: Fungi
Subkingdom	: Dikarya
Phylum	: <i>Ascomycota</i>
Subphylum	: <i>Pezizomycotina</i>
Class	: <i>Eurotiomycetes</i>

Subclass : *Eurotiomycetidae*
Order : *Eurotiales*
Family : *Aspergillaceae*
Genus : *Aspergillus*
Spesies : *Aspergillus* sp.(Zulkifli, 2015)

2.3.2 Karakteristik *Aspergillus terreus*

Aspergillus terreus termasuk jenis jamur *Asepergillus* yang bersifat saprofit dan dapat ditemukan di tanah, terutama daerah tropis. *A. terreus* memiliki suhu optimal dalam proses pertumbuhan berkisar pada 37 °C. *A. terreus* membentuk koloni dengan ukuran 1-2,5 cm dalam 7 hari (Setiawan, 2010; Lass-Flörl, 2018).

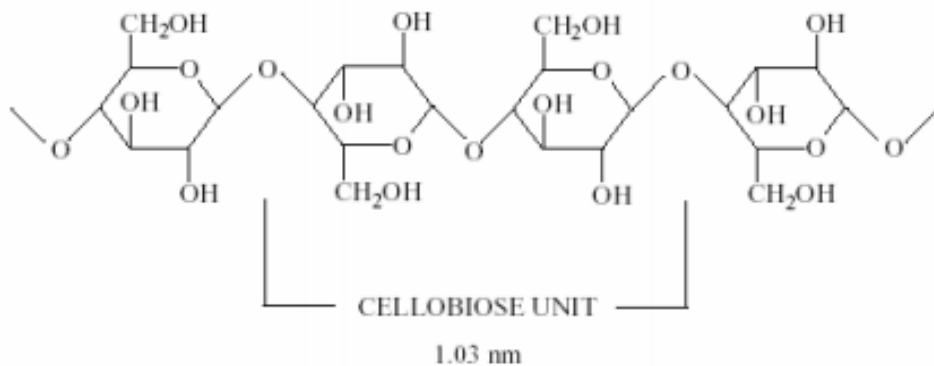
A. terreus memiliki memiliki konidiofora halus bewarna coklat kekuningan, dimana dengan bertambahnya umur koloni, maka warna akan semakin gelap. Konidiofora juga memiliki ciri lain, seperti vesikel sedikit bulat, halus dan membentuk globusa sampai elips (Nazip, 2006; Pujiati, 2018).



Gambar 2.11 *Aspergillus terreus* (Zulkifli, 2015; Lass-Flörl, 2018)

2.3.3 Kandungan *Aspergillus terreus*

A. terreus merupakan jamur berfilamen yang mempunyai kandungan berupa enzim selulase. Terdapat dua unit enzim selulase yang dihasilkan, yaitu endo 1,4 β -glukanase yang mempunyai fungsi dalam menghidrolisis serat selulosa menjadi rantai pendek. Lalu, enzim ekso 1,4 β -glukanase memecah rantai yang telah dipecah sebelumnya dan menghasilkan senyawa sederhana terlarut. Selain itu *A. terreus* juga mengandung enzim protease. Apabila enzim tersebut dikeluarkan, maka dapat terjadi perombakan protein menjadi peptida sederhana yang selanjutnya dapat disederhanakan kembali menjadi asam amino (Setiawan, 2010).



Gambar 2.12 Rantai Selulosa yang Terkandung pada *Aspergillus terreus* (Nazip, 2006)

2.3.4 *Aspergillus terreus* sebagai Antibakteri dan Antibiofilm

Secara umum, jamur dapat menghasilkan senyawa metabolit sekunder yang merupakan senyawa bioaktif yang bermanfaat sebagai antibiotik, antikanker, antimikroba dan antioksidan. Begitu juga dengan *A. terreus*, jamur tersebut menghasilkan metabolit sekunder berupa *aspulvinone* dan *asterriquinone* (Akilandeswari and Pradeep, 2017). Selain itu, *A. terreus* juga menghasilkan

terreic acid, *terreulactone A*, *terreineol*, *sulochrin*, *terrain*, *terrelactone A*, *terremides A* dan *B* juga dapat berfungsi sebagai antibakteri (El-Halim *et al.*, 2014).

Pada sebuah studi menunjukkan bahwa terjadi aktivitas antibiofilm *A. terreus*. Adapun kandungan *terreic acid* yang dihasilkan *A. terreus* menunjukkan efek penghambatan biofilm oleh *E. coli*. Temuan ini juga menunjukkan adanya hubungan bahwa penghambat GlmU nonspesifik seperti *iodoacetamide*, *N-ethyl maleimide* (NEM), dan analog NEM yang telah dilaporkan efektif melawan pembentukan biofilm bakteri Gram negatif dan Gram positif (Sharma *et al.*, 2016).

Secara kimiawi, *terreic acid* adalah kuinon epoksida. Terdapat penelitian yang menunjukkan bahwa epoksida mengandung produk alami seperti fosfomisin yang diproduksi oleh spesies *Streptomyces* telah menunjukkan aktivitas antimikroba. Struktur ini stabil secara kimiawi dan juga menunjukkan stabilitas di bawah kondisi pengujian biologis. Hal tersebut dapat bermanfaat sebagai peluang dalam pembuatan obat untuk optimalisasi aktivitas biologis (Sharma *et al.*, 2016).

2.4 Antibiofilm

2.4.1 Definisi Antibiofilm

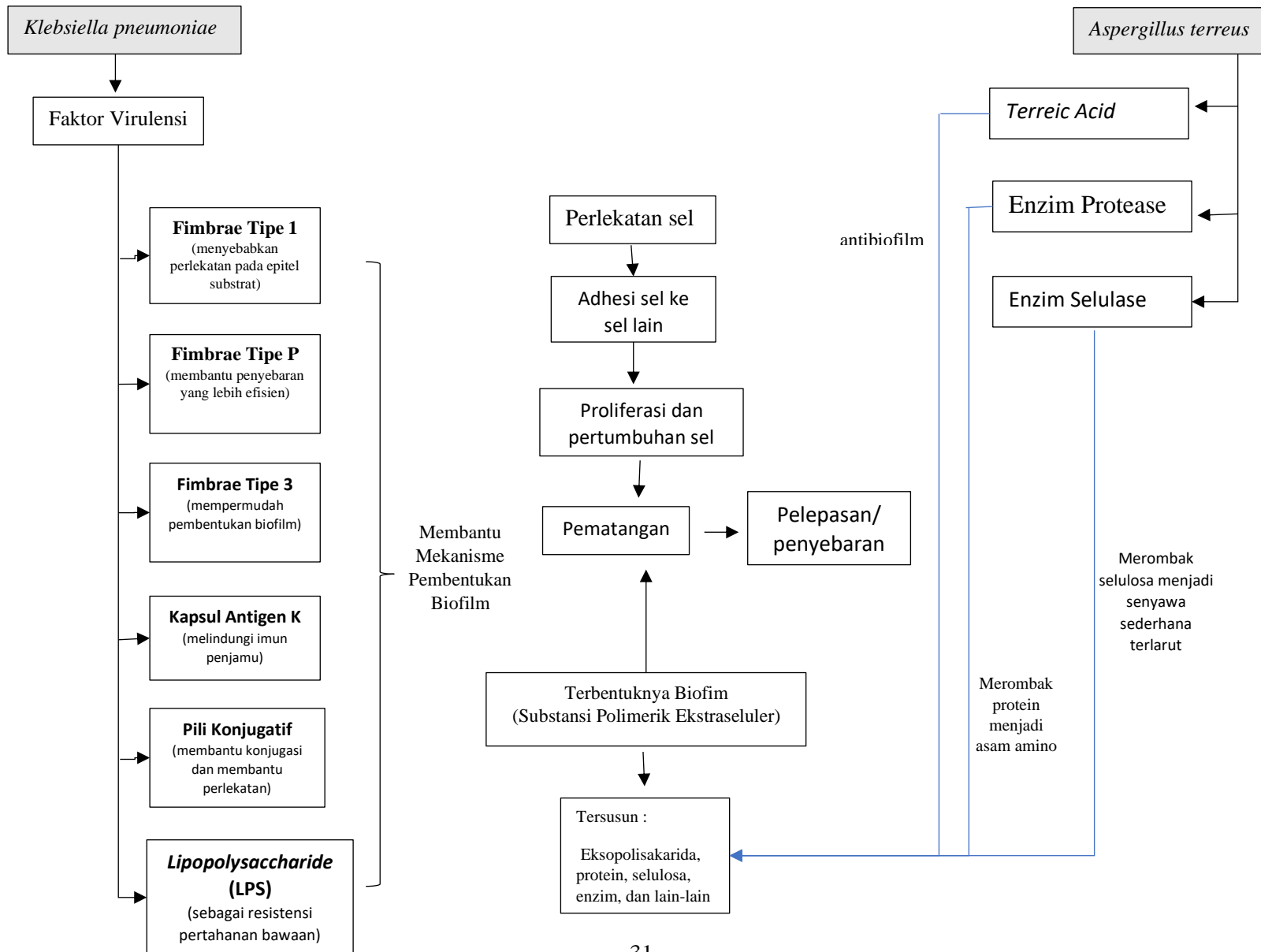
Antibiofilm merupakan senyawa yang dapat berfungsi sebagai pengurang biomassa bakteri melalui cara kerjanya berupa perubahan terhadap kualitas atau integritas biofilm. Senyawa bakterisida maupun non bakterisida merupakan bagian senyawa antibiofilm, dimana pada beberapa penelitian menunjukkan antibiofilm positif walaupun tidak dapat membunuh bakteri. Secara umum, pengelompokan senyawa antibiofilm dibagi menjadi dua, yaitu senyawa sintesis dan alami. *non-thermal plasma*, substansi *photodynamic*, *nanoparticles*, modifikasi dari permukaan *topographic*, dan peptide atau molekul yang lain merupakan bagian

senyawa antibiofilm sintesis. protozoa, bakteri, dan tumbuhan termasuk dari gen antibiofilm alami (Miquel *et al.*, 2016).

2.4.2 Mekanisme Antibiofilm

Modulasi dalam pembentukan biofilm dengan mekanisme penghambatan dari perlengketan bakteri dan juga mengacaukan biofilm matur merupakan cara kerja antibiofilm. Adanya gangguan dari komunikasi antar bakteri terjadi karena terdapat mekanisme *Quorum Sensing*. Mekanisme tersebut merupakan cara kerja antibiofilm yang dikenal sebagai *Quorum Sensing Inhibitor* (QSI). Pengurangan dari sintesis dan aktivitas protein N-Acyl Homoserine Lactone (AHL), penghambatan produksi molekul QS, peniruan dari molekul QS, pendegradasian dari AHL merupakan mekanisme tersering yang dikerjakan dari QSI (Miquel *et al.*, 2016).

2.5 Kerangka Teori



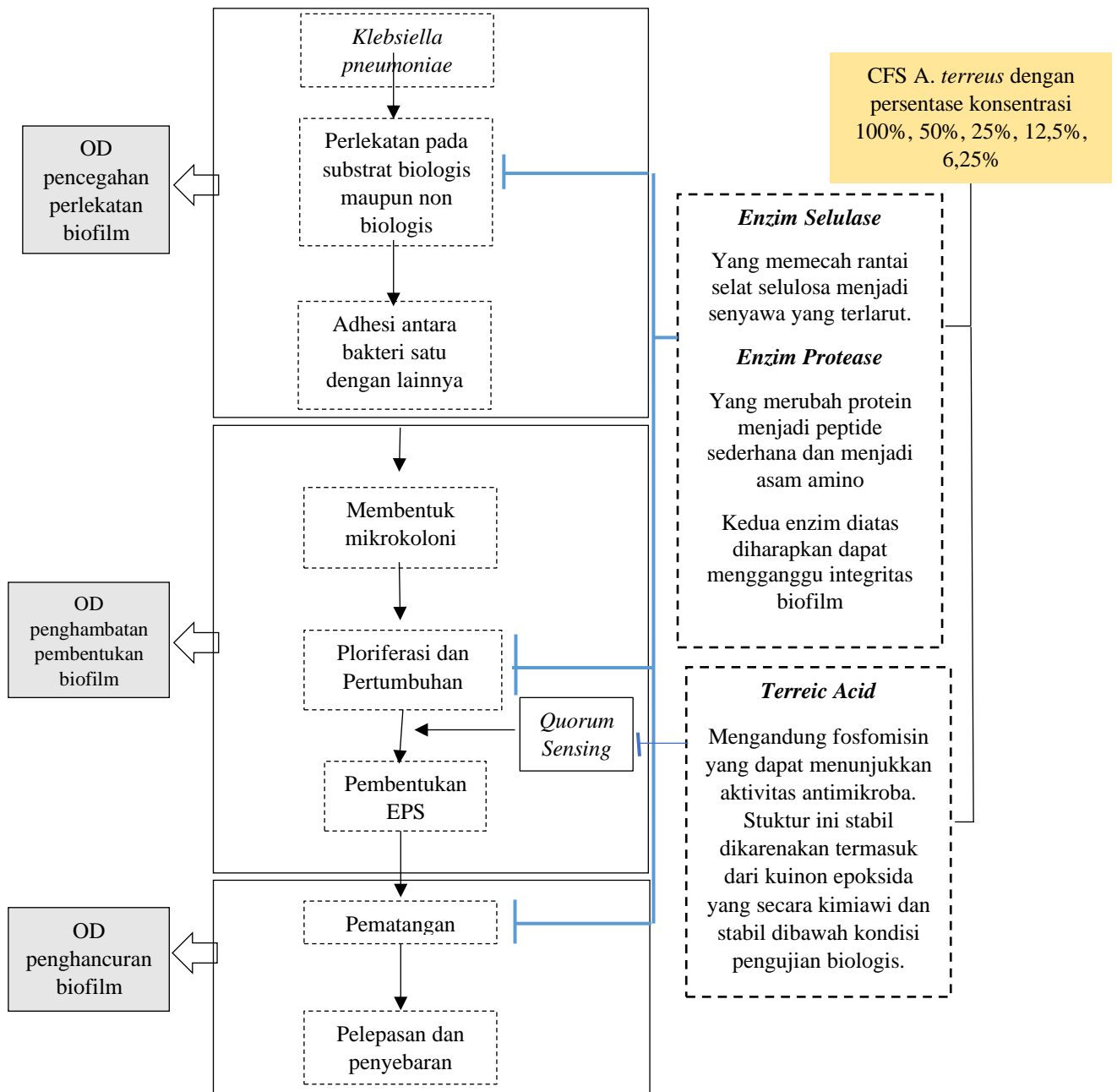
Klebsiella pneumoniae memiliki faktor virulensi berupa fimbriae tipe 1 yang menyebabkan perlekatan pada epitel substrat biologis maupun non biologis, fimbriae tipe p yang membantu penyebaran bakteri lebih efisien, fimbriae tipe 3 yang mempermudah pembentukan biofilm, kapsul antigen K untuk melindungi bakteri dari imun penjamu, pili konjugatif untuk membantu proses kojugasi dengan pertukaran materi genetik dan membantu perlekatan, dan LPS yang membantu bakteri menjadi resisten dan bertahan dari lingkungan yang merugikan. Faktor virulensi tersebut membantu *K. pneumoniae* membentuk biofilm melalui proses perlekatan sel, adhesi sel ke sel yang lain, proliferasi dan pertumbuhan sel, pematangan dan pelepasan/penyebaran. Biofilm tersusun dari Substansi Polimerik Ekstraseluler (SPE) yang terbentuk dari eksopolisakarida, protein, selulosa, dan yang lainnya.

Aspergillus terreus memiliki kandungan enzim protease yang dapat merombak protein menjadi asam amino, enzim selulase yang dapat merombak selulosa menjadi senyawa sederhana terlarut. Hal tersebut diharapkan dapat mengganggu dari Substansi Polimerik Ekstraseluler (SPE). *A. terreus* juga mengandung senyawa metabolit seperti *terreic acid* yang bekerja seperti fosfomisin yang mempunyai efek antibiofilm. *Terreic acid* juga tersusun seperti kuinon epoksida yang menyebabkan struktur tetap stabil secara kimiawi walaupun dalam keadaan lingkungan yang merugikan. Diharapkan kandungan tersebut dapat digunakan sebagai antibiofilm terhadap Biofilm *K. pneumoniae*.




BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Keterangan :

-  : Menghambat
-  : Variabel bebas
-  : Variabel Terikat

K. pneumoniae termasuk bakteri yang dapat menghasilkan biofilm. Terbentuknya biofilm melalui beberapa tahap. Tahapan awal yang dilakukan ialah perlekatan bakteri pada substrat biologis maupun non biologis. Setelah terjadi perlekatan pada substrat, dilanjutkan tahapan selanjutnya, yaitu adhesi bakteri satu dengan yang lainnya dan membentuk mikrokoloni. Selanjutnya, mikrokoloni berproliferasi dan mengalami pertumbuhan. Selanjutnya, bakteri tersebut akan mengeluarkan sinyal kimiawi yang digunakan untuk berkomunikasi dengan bakteri lainnya. Hal tersebut dinamakan *quorum sensing*. Sinyal tersebut berfungsi dalam pembentukan Eksopolisakarida (EPS) yang dapat melindungi bakteri dan menyebabkan pembelahan bakteri terus berlanjut. Tahapan selanjutnya ialah tahapan pematangan dan yang terakhir ialah pelepasan dan penyebaran. Adapun pada tahapan pelepasan dan penyebaran terjadi penghentian produksi EPS yang menyebabkan terjadinya pelepasan dan penyebaran bakteri.

A. terreus menghasilkan senyawa beberapa senyawa metabolit sekunder, seperti *terreic acid*, enzim selulase, dan enzim protease. Enzim selulase dan protease diharapkan dapat mencegah pembentukan biofilm dan mengganggu integritas dari EPS biofilm *K. pneumoniae*. Enzim selulase dapat menghidrolisis selulosa menjadi rantai pendek yang mudah terlarut. Sedangkan, enzim protease dapat merubah protein

menjadi peptide sederhana yang selanjutnya dihidrolisis menjadi asam amino. Disisi lain, *terreic acid* dapat bekerja seperti fosfomisin yang mempunyai efek antimikroba dan antibiofilm. Diketahui juga bahwa senyawa tersebut termasuk dari kuinon epokdida yang mempunyai stuktur yang stabil secara kimiawi dan dibawah kondisi pengujian biologis. Kandungan ini akan digunakan sebagai bahan penelitian dari *A. terreus* dalam bentuk *Cell Free Supernathan (CFS)*.

Adapun kandungan dari *A. terreus* diharapkan dapat mencegah perlekatan, pertumbuhan, dan merusak/penghancurkan biofilm *K. pneumoniae*. Dalam mengukur hal tersebut, dapat dilakukan penilaian menggunakan pembacaan nilai *Optical Density (OD)* masing-masing uji dengan *ELISA plate reader*. OD tersebut menunjukkan konsentrasi biofilm *K. pneumoniae* yang terbentuk setelah diberi CFS jamur *A. terreus*.

3.2 Hipotesis Penelitian

Adapun Hipotesis yang diambil ialah *Aspergillus terreus* memiliki aktivitas antibiofilm *Klebsiella pneumoniae*.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain eksperimental murni yang dilakukan secara *in vitro* di Laboratorium Mikrobiologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibiofilm *Aspergillus terreus* terhadap *Klebsiella pneumoniae*. Penelitian ini menggunakan *Tissue Culture Plate* (TCP) atau *microtiter plate* yang dilakukan dengan cara masing-masing *well plate* yang akan diisi oleh kelompok uji dan kelompok kontrol. Pengukuran yang dilakukan melalui penilaian *Optic Density* (OD) dari setiap kelompok uji melalui penggunaan ELISA *plate reader*.

4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian uji aktivitas antibiofilm *Aspergillus terreus* terhadap biofilm *Klebsiella pneumoniae* dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Maulana Malik Ibrahim Malang. Penelitian ini akan dilakukan selama rentang waktu Juli - September tahun 2021.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Nilai konsentrasi CFS *A. terreus* merupakan variabel bebas dari penelitian ini. Terdapat 5 kelompok konsentrasi yang digunakan pada penelitian ini, yaitu 100%, 50%, 25%, 12,5% dan 6,25%. Hal tersebut didukung dengan metode serial dilusi

(pengenceran bertingkat) dengan perbandingan 1:2 (Lolongan, Waworuntu and Mintjelungan, 2016).

4.3.2 Variabel Terikat

Nilai *Optical Density* (OD) dari antibiofilm yang diukur melalui ELISA *plate reader* merupakan variabel terikat. Adapun OD yang diukur ialah OD pencegahan perlekatan biofilm, OD penghambatan pertumbuhan biofilm, dan OD Kerusakan biofilm *K. pneumoniae*.

4.4 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi Penelitian yang digunakan ialah biakan bakteri dari spesies *K. pneumoniae*. Adapun sampel yang diambil ialah biakan *K. pneumoniae* tersebut didapatkan pada bulan Juli dari Laboratorium Wiyasa Mandiri Malang.

4.4.1 Jumlah Pengulangan

Pada penelitian ini jumlah perlakuan yang akan dilakukan sebanyak 8 perlakuan. Untuk menentukan jumlah pengulangan minimal, maka perlu dilakukan perhitungan menggunakan rumus Federer. Perhitungan jumlah perlakuan adalah sebagai berikut (Dawley, 2014).

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

Keterangan :

n = jumlah pengulangan tiap perlakuan

t = jumlah perlakuan

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

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

$7(n-1)$	≥ 15
$7n-7$	≥ 15
$7n$	≥ 22
N	$\geq 3,14$

Berdasarkan perhitungan Rumus Federer diatas, arti dari $n \geq 3,14$ ialah 4 kali pengulangan untuk 8 kelompok perlakuan. Hal dapat disimpulkan bahwa dapat dilakukan 4 kali pengulangan pada tiap perlakuan

4.5 Alat dan Bahan Penelitian

4.5.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini berupa *microplate flat bottom* 96 wells, ELISA *micro plate reader*, spatula, timbangan analitik, vortex, mikropipet, inkubator, Laminar Air Flow (LAF), spektrofotometer, eppendorf, elenmeyer, ose, bunsen, cawan petri steril, tabung *glass*, autoklaf, *inkubator shaker*, *colony counter*, *timer*, oven, gelas ukur, microtip kuning, microtip biru, *ice pack*, *alumunium foil*, *plastic wrap*, *cotton swab*, kertas saring whatman, *filter paper* 0,22 μm , sentrifugasi, kuvet, mikroskop, dan *object glass*.

4.5.2 Bahan Penelitian

4.5.2.1 Jamur *Aspergillus terreus*

Jamur *A. terreus* merupakan bahan yang akan diujikan pada penelitian ini. Jamur tersebut akan diinokulasi dan diinkubasi berdasarkan masa stasioner dari pertumbuhan jamur *A. terreus*.

4.5.2.2 Bakteri *Klebsiella pneumoniae*

Koloni bakteri *K. pneumoniae* yang diperoleh dari Laboratorium Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Maulana Malik Ibrahim Malang merupakan bakteri yang akan diujikan.

4.5.2.3 Bahan Lainnya

Medium agar Mac Conkey, *Trypticase Soy Broth* (TSB), *Potato Dextrose Broth* (PDB), *Phosphate-Buffered Saline* (PBS), *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA), larutan glukosa, alkohol, aquades, asam asetat, gentamycin, safranin, dan kristal violet.

4.6 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

4.6.1 Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi dari penelitian ini yaitu:

- a. Jamur *Aspergillus terreus*
 - 1) Jamur *A. terreus* yang berwarna coklat kekuningan hingga gelap.
 - 2) Jamur *A. terreus* yang telah diinkubasi selama 3 hari pada suhu 28°C.
 - 3) CFS *A. terreus* yang telah dilakukan penyaringan menggunakan kertas Whatmann, sentrifugasi, dan *filter paper* 0,22 µm.
 - 4) CFS *A. terreus* yang telah dilakukan serial delusi dengan konsentrasi 100%, 50%, 25 %, 12,5%, dan 6,25%,
- b. Koloni *Klebsiella pneumoniae*
 - 1) Koloni *K. pneumoniae* yang berusia 24 jam.
 - 2) Koloni *K. pneumoniae* yang berwarna merah dan berbentuk batang pada uji pewarnaan Gram.

- 3) Koloni *K. pneumoniae* yang menunjukkan hasil sesuai sifat-sifat bakteri tersebut pada uji biokimia menggunakan *Microbact System*.

4.6.2 Kriteria Eksklusi

Kriteria eksklusi dari penelitian ini yaitu:

- a. CFS *A. terreus* yang terkontaminasi oleh mikroorganisme lain.
- b. CFS *A. terreus* yang belum tersaring sepenuhnya.
- c. Koloni *K. pneumoniae* yang terkontaminasi mikroorganisme lain.
- d. Tidak menunjukkan sifat *K. pneumoniae* berdasarkan pengujian *Micobact System*.

4.7 Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Satuan	Skala
1	<i>K. pneumoniae</i>	Bakteri Gram negatif dan mampu membentuk biofilm yang diambil dari Laboratorium Wiyasa Mandiri Malang. Bakteri yang digunakan ialah yang telah berbentuk inokulum pada media TSB.	Micropipet	μL	Interval
2	CFS <i>A. Terreus</i>	Jamur berfilamen yang termasuk dalam genus <i>Aspergillus</i> yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Maulana Malik Ibrahim Malang. CFS <i>A. terreus</i> dengan variasi persentase 100%, 50%, 25%, 12,5%, dan 6,25%	<i>Micropipet</i>	μL	Interval
3	Aktivitas Pencegahan Perlekatan Biofilm	Hasil kuantitatif yang menunjukkan efek setelah dilakukan uji kerusakan biofilm pada bakteri <i>K. pneumoniae</i> terhadap kepadatan biofilm.	ELISA <i>Plate Reader</i>	Nilai Optical Density: Absorbance (A)	Rasio
4	Aktivitas Penghambatan Pembentukan Biofilm	Hasil kuantitatif yang menunjukkan efek setelah dilakukan uji kerusakan biofilm pada bakteri <i>K. pneumoniae</i> terhadap kepadatan biofilm.	ELISA <i>Plate Reader</i>	Nilai Optical Density: Absorbance (A)	Rasio
5	Aktivitas Kerusakan/Penghancuran Perlekatan Biofilm	Hasil kuantitatif yang menunjukkan efek setelah dilakukan uji kerusakan/penghancuran biofilm pada bakteri <i>K. pneumoniae</i> terhadap kepadatan biofilm.	ELISA <i>Plate Reader</i>	Nilai Optical Density: Absorbance (A)	Rasio

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Penyiapan Jamur

4.8.1.1 Identifikasi *Aspergillus terreus*

Uji mikroskopis dilakukan dengan membuat preparat di *object glass*, yang selanjutnya ditetesi aquades melalui pipet. Selanjutnya, diletakkan koloni jamur di *object glass* tersebut dan ditutup oleh *cover glass*. Setelah preparat telah dibuat, maka dapat dilakukan pengamatan dibawah mikroskop (Shofiana, Sulistyowati and Muhibuddin, 2015).

Adapun untuk mengamati secara makroskopis, dapat dilakukan dengan inokulasi pada media PDA di cawan petri menggunakan ose atau swab steril. Setelah itu, menginkubasikan cawan petri pada inkubator selama 5-7 hari dengan suhu 25-30°C (Shofiana, Sulistyowati and Muhibuddin, 2015).

4.8.1.2 Uji Kurva Pertumbuhan *Aspergillus terreus*

Untuk menentukan kurva pertumbuhan pada *A. terreus* dapat dilakukan langkah awal berupa penyiapan tabung reaksi yang telah diisi 3 mL PDB steril. Selanjutnya dapat dimasukkan koloni jamur ke tabung menggunakan ose, dan dilanjutkan proses homogenisasi melalui alat *incubator shaker* selama 24 jam. Setelah itu, dapat dilakukan pengenceran hingga hasil OD berkisar $\leq 0,05$. Selanjutnya, diambil 1,5 mL campuran jamur dan PDB yang kemudian dimasukkan ke kuvet. Kuvet tersebut diletakkan ke *incubator shaker* dan dikur nilai OD setiap 5 jam (Modifikasi Safitri, Fauzana and Fauziah, 2011).

4.8.1.3 Pembuatan Media Petumbuhan *Aspergillus terreus*

Pembuatan media pertumbuhan *A. terreus* menggunakan media *Potato Dextrose Broth* (PDB). Media tersebut dibuat dari bubuk PDB yang ditambahkan

dengan aquades dengan takaran 24 gr: 1000mL. Selanjutnya, PDB tersebut disterilkan menggunakan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121 °C. Kemudian, media tersebut dapat ditambahkan glukosa 2% (Modifikasi Safitri, Fauzana and Fauziah, 2011).

4.8.1.4 Pembuatan CFS *Aspergillus terreus*

Pembuatan CFS dibutuhkan inokulum jamur yang dibuat dari 5 mL dari suspensi *A. terreus* yang telah dicampurkan dengan 45 mL PDB steril dan telah diberi 1 mL larutan glukosa 2%. Selanjutnya, dapat dimasukkan ke inkubator *shaker* dengan suhu 28 °C selama 3 hari. Menyaring hasil inokulum tersebut menggunakan *Whatman* yang kemudian ditampung di pada falcon merupakan langkah selanjutnya. Hasil saringan tersebut dipindahkan ke tabung *eppendorf* yang selanjutnya diletakkan di *freezer* agar mengurangi terjadinya kerusakan protein jamur. Langkah selanjutnya ialah melakukan sentrifugasi yang selanjutnya dilakukannya penyaringan CFS menggunakan *filter paper* 0,22 µm. Selanjutnya, CFS dapat digunakan dan harus dalam keadaan dingin agar menghindari kerusakan protein (Hasiani, Ahmad and Rijai, 2015; Prateeksha *et al.*, 2020).

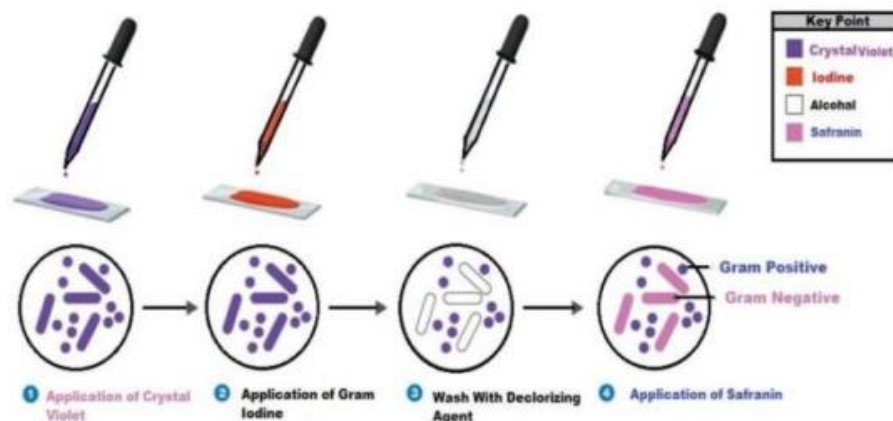
Pembuatan serial delusi CFS *A. terreus* menggunakan teknik pengenceran bertingkat dengan perbandingan 1:2. Dibuat media 15 mL berupa TSB yang telah dicampur dengan glukosa 2%. 3 mL media dimasukkan kedalam tabung reaksi pada setiap konsentrasi, yaitu 100%, 50%, 25%, 12,5%, dan 6,25%. Selanjutnya, 3 mL CFS *A. terreus* dimasukkan ke konsentrasi 100% dan dilakukan pencampuran menggunakan vortex. Kemudian, diambil 3 mL dari konsentrasi 100% dan dimasukkan pada tabung konsentrasi 50%, lalu dicampurkan menggunakan vortex.

Hal tersebut dilakukan hingga mencapai konsentrasi terendah, yaitu konsentrasi 6,25% (Modifikasi Lolongan, Waworuntu and Mintjelungan, 2016)

4.8.2 Penyiapan Bakteri

4.8.2.1 Identifikasi *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae akan diidentifikasi dengan Uji Pewarnaan Gram. Langkah awal yang dilakukan ialah persiapan *object glass* untuk pengujian. Selanjutnya, *object glass* ditetesi dengan aquades steril dan diberikan 1 ose koloni *K. pneumoniae*. Setelah kering, diayunkannya *object glass* diatas bunsen hingga terasa hangat. Pemberian Kristal violet merupakan langkah selanjutnya dan ditunggu selama 2 menit, lalu dicuci dengan aquades dan dikeringkan. Selanjutnya, dilakukan penetesan larutan iodium dan ditunggu selama 2 menit, lalu dicuci dengan aquades dan dikeringkan. Setelah itu, diberikan tetesan alkohol 97% pada preparat dan ditunggu selama 30 detik. Kemudian, dibilas dengan menggunakan aquades dan ditunggu hingga kering. Langkah terakhir ialah pemberian safranin yang ditunggu selama 30 detik dan dibilas dengan aquades lalu ditunggu hingga kering. Maka, pereparar dapat diamati dibawah mikroskop (Khotimah, 2020).



Gambar 4.1 Uji Pewarnaan Gram. 1) Pengaplikasian Kristal Violet, 2) Pengaplikasian larutan iodin, 3) Pembilasan dengan declorizing agent, 4) Peengaplikasian Safranin (Sya'diyah, 2021).

Dalam mengidentifikasi *K. pneumoniae*, peneliti akan melakukan pemeriksaan *Microbact System*. Adapun langkah yang dilakukan sebagai berikut:

1. Lakukan kultur murni organisme selama 18-24 jam untuk diidentifikasi.
2. Lakukan uji oksidase untuk menentukan kit yang akan digunakan.
3. Pilih 1 sampai 3 koloni yang diisolasi dan diemulsi dalam larutan garam.
4. Tempatkan Test Strip atau Microplate di baki penahan dan kupas kembali segel.
5. Tambahkan 4 tetes suspensi bakteri ke setiap lubang.
6. Tambahkan 2 tetes Mineral Oil (MB1093A) ke *black wells*.
7. Ganti segel dan inkubasi pada suhu $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ selama 18-24 jam.
8. Keluarkan dari inkubator dan tambahkan reagen seperti pada **Gambar 2.4**
9. Catat hasil pada formulir laporan dan interpretasikan menggunakan *Microbact*.

4.8.2.2 Pembuatan Media Pertumbuhan

Untuk menumbuhkan dari *K. pneumoniae*, maka diperlukan media *Trypticase Soy Broth* (TSB). Media TSB dibuat dengan cara mencampurkan bubuk TSB dan aquades dengan takaran 30 gr: 1000 mL. Langkah selanjutnya ialah mensterilkan media tersebut melalui autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit. Kemudian, media tersebut ditambahkan dengan glukosa 5%.

4.8.2.3 Pembuatan Suspensi Bakteri *Klebsiella pneumoniae*

Dalam pembuatan suspensi bakteri dibutuhkan inokulasi *K. pneumoniae* pada tabung reaksi dengan takaran 1 ose. Tabung reaksi tersebut sebelumnya berisi media TSB 3 mL yang telah dicampurkan glukosa 5% sebanyak 60 μ L. Media tersebut dihomogenkan menggunakan *vortex* dilanjutkan dengan memasukkan ke inkubator dengan suhu 37°C selama 18 jam. Setelah itu, ditambahkan lagi TSB 2 mL dan glukosa 1% sebanyak 40 μ L yang kemudian dihomogenkan lagi menggunakan *vortex* dan dimasukkan ke inkubator dengan suhu dan rentang waktu yang sama seperti sebelumnya. Selanjutnya, mengukur nilai OD melalui alat spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm sampai hasilnya menunjukkan nilai OD yang berkisar 0,4-0,6.

4.8.3 Penyiapan Kelompok Kontrol

Kelompok kontrol yang digunakan pada penelitian ini ialah kelompok kontrol positif, kontrol negatif, dan kontrol media. Antibiotik gentamisin 0,1% dengan suspensi *K. pneumoniae* merupakan kontrol positif. Suspensi bakteri *K. pneumoniae* dengan campuran TSB dan 1 % glukosa merupakan kontrol negatif. Media TSB dengan 1% glukosa merupakan kontrol media.

4.8.4 Uji Pertumbuhan Biofilm

Langkah awal pada Uji Pertumbuhan Biofilm ialah dengan memasukkan kelompok uji, yaitu suspensi *K. pneumoniae* pada *wells* sebesar 200 μ L. Kelompok media diisi dengan media campuran TSB dan glukosa 1% sebesar 200 μ L. Kemudian, *microplate* ditutup dan dilindungi *aluminium foil* serta *plastic wrap* dan diinkubasi dengan suhu 37 °C selama 24 jam. Setelah 24 jam, *microplate* dapat dikeluarkan dan dibuka didalam LAF. Selanjutnya, *microplate* dicuci dengan PBS

steril sebanyak tiga kali dan masukkan kristal violet 0,1% sebanyak 200 μ L dan dilanjutkan proses inkubasi dengan selama 15 menit dengan suhu ruang. Setelah waktu terlampaui, dapat dikeluarkan kristal violet dan dilanjutkan mencuci dengan aquades sebanyak tiga kali. Kemudian, asam asetat 30% dimasukkan sebanyak 200 μ L ke semua *wells* dan dilanjutkan proses inkubasi dengan suhu ruang selama 15 menit. Langkah terakhir ialah, menghitung nilai OD menggunakan ELISA *plate reader* dengan panjang gelombang 595 nm.

Diperlukan perhitungan rumus dalam menentukan kekuatan biofilm bakteri uji, nilai OD_{isolat} dibandingkan dengan nilai Optical Density cut-off (ODcut). Nilai OD didapatkan dari pengurangan rata-rata nilai OD_{isolat} oleh nilai ODCut (OD= rata-rata nilai OD_{isolat} – ODCut) (Modifikasi Cadavid *et al.*, 2018; Abida, 2020). Interpretasi dari perhitungan rumus ini sebagai berikut:

Tabel 4.1 Interpretasi Kekuatan Bakteri Pembentuk Biofilm

Rata-rata nilai OD	Kekuatan Penghasil Biofilm
$OD_{isolat} \leq ODCut$	<i>Non-biofilm producer</i> (0)
$ODcut < OD_{isolat} \leq 2x ODCut$	<i>Weak-biofilm producer</i> (+ atau 1)
$2x ODCut < OD_{isolat} \leq 4x ODCut$	<i>Moderate- biofilm producer</i> (++ atau 2)
$4x ODCut < OD_{isolate}$	<i>Strong- biofilm producer</i> (+++ atau 3)

(Ruchi, Sujata and Anuradha, 2018)

4.8.5 Uji Aktifitas Antibiofilm *Aspergillus terreus* terhadap *Klebsiella pneumoniae*

4.8.5.1 Uji Pencegahan Perlekatan Biofilm *Klebsiella pneumoniae*

Pada pengujian pencegahan perlekatan biofilm ini dibutuhkan berbagai macam konsentrasi supenatan sebagai kelompok uji, yaitu konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, dan 6,25%. Selanjutnya, konsentrasi tersebut dimasukkan masing-

masing 200 μ L pada *well* kelompok uji. *Well* kontrol positif diisi dengan gentamisin 0,1% sebanyak 200 μ L. Kontrol media diisi dengan TSB, PDB, dan glukosa 1%, dilanjutkan dengan penutupan *microplate* dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1 jam. Langkah berikutnya ialah mencuci dengan PBS sebanyak tiga kali dan ditunggu hingga kering. Sebelum dilakukan pencucian, perlu dibuang dahulu isi yang ada di *microplate*. Selanjutnya, masukkan suspensi *K. pneumoniae* pada kelompok uji, kelompok kontrol positif, dan kelompok kontrol negatif sebanyak masing-masing 200 μ L. Kemudian, kontrol media diisi larutan glukosa 1% dengan TSB dan PDB yang sebelumnya telah dicampurkan. Setelah itu, lakukan penutupan *microplate* dan berikan lapisan penutup tambahan dari *aluminium foil* dan *plastic wrap*. Setelah ditutup dengan rapat, *microplate* dapat diletakkan di inkubator dengan suhu 37°C selama 72 jam.

Setelah mencapai waktunya, *microplate* dapat dikeluarkan dan dibuang isi dari semua *wells*, lalu dilanjutkan pencucian menggunakan larutan PBS sebanyak tiga kali. Setelah mengering, dilanjutkan dengan pengisian menggunakan pewarna kristal violet 0,1% sebanyak 200 μ L pada semua *well-plate* dan diamkan selama 15 menit pada suhu ruang. Setelah itu, kristal violet dapat dibuang dan dicuci oleh aquades steril sebanyak tiga kali dan ditunggu hingga mengering. Langkah selanjutnya ialah dimasukkanlah asam asetat 30% sebanyak 200 μ L pada semua *well-plate* dan dilanjutkan inkubasi selama 15 dengan suhu ruang. Setelah itu, nilai OD dapat diukur dengan ELISA *plate reader* dengan panjang gelombang 595 nm (Modifikasi Abida, 2020). Perhitungan perlekatan biofilm dapat dilakukan menggunakan rumus seperti berikut:

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

Keterangan:

ODkn : Nilai OD kontrol negatif

ODuji : Nilai OD kelompok uji

4.8.5.2 Uji Penghambatan Pembentukan Biofilm *Klebsiella pneumoniae*

Pada pengujian penghambatan pembentukan biofilm ini dibutuhkan berbagai macam konsentrasi supunan sebagai kelompok uji, yaitu konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, dan 6,25%. Selanjutnya, konsentrasi tersebut dimasukkan ke *well* masing-masing 100 μ L sebagai kelompok uji. *Well* kontrol positif akan dimasukkan antibiotik gentamisin 0,1% sebanyak 100 μ L. 100 μ L suspensi bakteri dimasukkan ke kontrol positif, negatif, dan kelompok uji. Kontrol media diisi dengan TSB, PDB, dan glukosa 1%. Langkah selanjutnya *microplate* ditutup dan diinkubasi 24 jam pada suhu 37 °C. Langkah berikutnya ialah membuang isi dan dilanjutkan mencuci dengan PBS sebanyak tiga kali dan ditunggu hingga kering selama 24 jam.

Setelah ditunggu semalaman, isilah *wells* tersebut menggunakan pewarna kristal violet 0,1% sebanyak 200 μ L dan diamkan selama 15 menit pada suhu ruang. Setelah diberi kristal violet, dapat dilakukan pencucian oleh aquades steril sebanyak tiga kali dan ditunggu hingga mengering. Langkah selanjutnya ialah dimasukanlah asam asetat 30% sebesar 200 μ L pada wemua *well-plate* dan dilanjutkan inkubasi selama 15 dengan suhu ruang. Setelah itu, nilai OD dapat diukur dengan ELISA *plate reader* dengan panjang gelombang 595 nm (Modifikasi Abida, 2020). Perhitungan perlekatan biofilm dapat dilakukan menggunakan rumus seperti berikut:

% Pencegahan Penghambatan Pembentukan biofilm =

$$\frac{OD_{kn} - OD_{uji}}{OD_{kn}} \times 100\%$$

Keterangan:

- a. OD_{kn} : Nilai OD kontrol negatif
- b. OD_{uji} : Nilai OD kelompok uji

4.8.5.3 Uji Kerusakan/Penghancuran Biofilm *Klebsiella pneumoniae*

Pada pengujian Kerusakan/Penghancuran biofilm ini diawali dengan pemberian suspensi *K. pneumoniae* sebanyak 200 µL pada kelompok uji, kontrol positif, dan kontrol negatif. Kontrol media diisi dengan 200 µL TSB, PDB, dan glukosa 1%. Selanjutnya microplate diinkubasi dengan suhu 37 °C selama 72 jam. Selanjutnya isi microplate dibuang dan dibilas dengan PBS sebanyak tiga kali dan dikeringkan terbalik.

Selanjutnya, dibutuhkan berbagai macam konsentrasi CFS jamur *A. terreus* sebagai kelompok uji, yaitu konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, dan 6,25%. Selanjutnya, konsentrasi tersebut dimasukkan masing-masing 200 µL pada *well* kelompok uji. Gentamisin 0,1% sebanyak 200 µL dimasukkan ke *well* kontrol positif. Kontrol negatif diisi 200 µL suspensi bakteri *K. pneumoniae*. Kontrol media diisi dengan 200 µL TSB, PDB, dan glukosa 1 %. Setelah itu, dilanjutkan dengan ditutupnya *microplate* dan letakkan di inkubator pada suhu 37 °C selama 1 jam. Selanjutnya, buang isi microplate dan cuci dengan PBS sebanyak tiga kali dan ditunggu hingga kering.

Kemudian, *microplate* dapat dikeluarkan dan dilanjutkan pembuangan semua isi dari masing-masing *wells*, lalu mencuci menggunakan larutan PBS sebanyak tiga kali. Setelah mengering, dilanjutkan dengan pengisian menggunakan

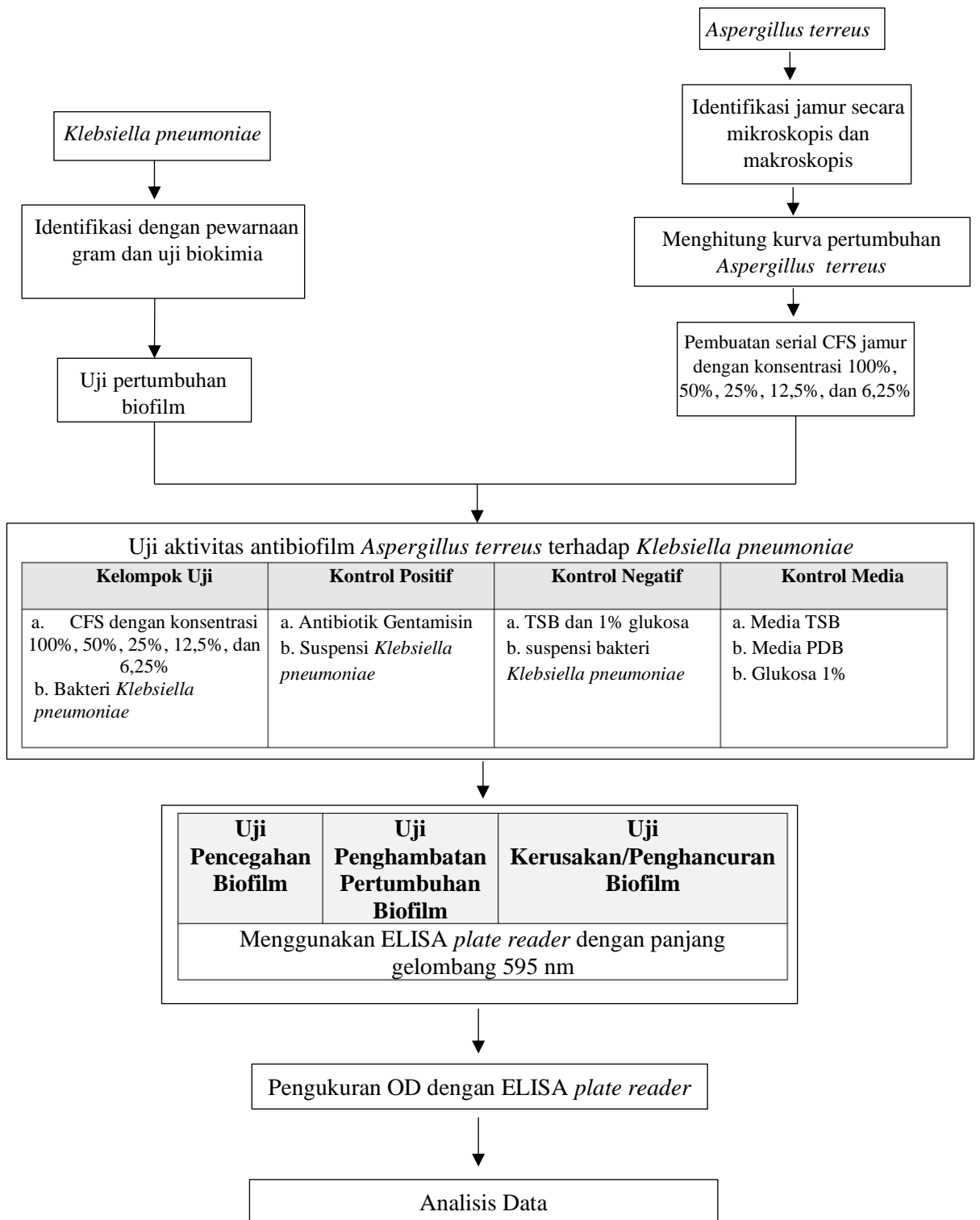
pewarna kristal violet 0,1% sebanyak 200 μ L pada semua *well-plate* dan diamkan selama 15 menit pada suhu ruang. Setelah itu, dibuanglah kristal violet dan dicuci oleh aquades steril sebanyak tiga kali, kemudian ditunggu hingga mengering. Langkah selanjutnya ialah dimasukanlah asam asetat 30% sebanyak 200 μ L pada semua *well-plate* dan dilanjutkan inkubasi selama 15 dengan suhu ruang. Setelah itu, nilai OD dapat diukur dengan ELISA *plate reader* dengan panjang gelombang 595 nm (Modifikasi Abida, 2020). Perhitungan perlekatan biofilm dapat dilakukan menggunakan rumus seperti berikut:

$$\% \text{ Kerusakan/Penghancuran biofilm} = \frac{\text{OD}_{\text{kn}} - \text{OD}_{\text{uji}}}{\text{OD}_{\text{kn}}} \times 100\%$$

Keterangan:

- a. OD_{kn} : Nilai OD kontrol negatif
- b. OD_{uji} : Nilai OD kelompok uji

4.8 Alur Penelitian



4.9 Analisis Data

Analisis data yang diterapkan pada penelitian ini menggunakan aplikasi *IBM SPSS Statistic* analisis. Langkah awal yang dapat dilakukan ialah dengan uji normalitas dan uji homogenitas. Melalui aplikasi *IBM SPSS Statistic* analisis dapat diidentifikasi uji normalitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk*. Apabila ditemukan nilai $> 0,05$ dari sig. atau signifikansi atau nilai probabilitas, maka dapat dikatakan distribusi data normal. Setelah itu, dapat dilakukan uji homogenitas melalui uji *Lavenne*. Apabila didapatkan nilai $> 0,05$ maka dapat dikatakan varians data tidak berbeda secara signifikan atau varians homogen (Nuryadi *et al.*, 2017).

Selanjutnya, dilakukan uji parametrik berupa *One Way ANOVA*. Apabila hasil tidak terdistribusi normal dan tidak homogen, dapat dilakukan uji non parametrik berupa *Kruskall Wallis*. Ketika hasil uji *One Way ANOVA* menunjukkan Sig. $< 0,05$ maka menunjukkan bahwa adanya perbedaan signifikan sedangkan sebaliknya, Sig. $> 0,05$ maka menunjukkan tidak terdapat perbedaan signifikan. Setelah terdapat perbedaan signifikan (Sig. $< 0,05$), maka dapat dilakukan Uji *Post Hoc* untuk mengetahui perbedaan nilai yang signifikan pada kelompok perlakuan. Selanjutnya, dilakukan uji *Pearson* untuk mengetahui adanya korelasi antara konsentrasi CFS dengan efek pada perlekatan biofilm, penghambatan pertumbuhan biofilm, dan Kerusakan biofilm melalui pengukuran nilai *Optical Density (OD)* (Abida, 2020).

BAB V

HASIL

5.1 Hasil Uji Karakteristik *Aspergillus terreus*

5.1.1 Hasil Uji Makroskopis *Aspergillus terreus*



Gambar 5.1 Hasil Uji Makroskopis *A. terreus*

Uji Makroskopis *A. terreus* dilakukan dengan menumbuhkan koloni jamur menggunakan media PDA. Berdasarkan hasil pengamatan, didapatkan koloni jamur menghasilkan koloni coklat kekuningan hingga gelap. Hal tersebut merupakan ciri dari koloni jamur *A. terreus*.

5.1.2 Hasil Uji Mikroskopis *Aspergillus terreus*

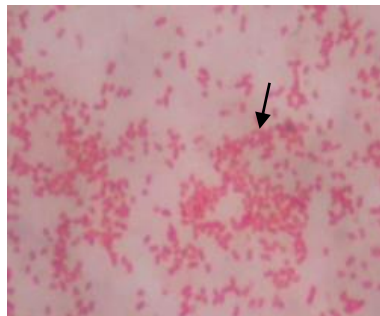
A. terreus dapat diidentifikasi menggunakan mikroskop. Pada identifikasi ini, didapatkan stipes, vesicle, dan konidiofora seperti **Gambar 5.1** sebagai berikut.



Gambar 5.2 Hasil Pengamatan mikroskopis perbesaran 100X. A menunjukkan stipes, B menunjukkan vesicle, dan C menunjukkan konidiofora.

5.2 Hasil Uji Karakteristik *Klebsiella pneumoniae*

5.2.1 Hasil Uji Pewarnaan Gram



Gambar 5.3 Hasil Uji Pewarnaan Gram *K. pneumoniae*

Berdasarkan hasil Uji Pewarnaan Gram dengan mikroskop pada perbesaran 100X didapatkan bakteri yang memiliki bentuk basil dan bewarna merah yang menunjukkan bakteri dengan sifat merupakan Gram negatif.

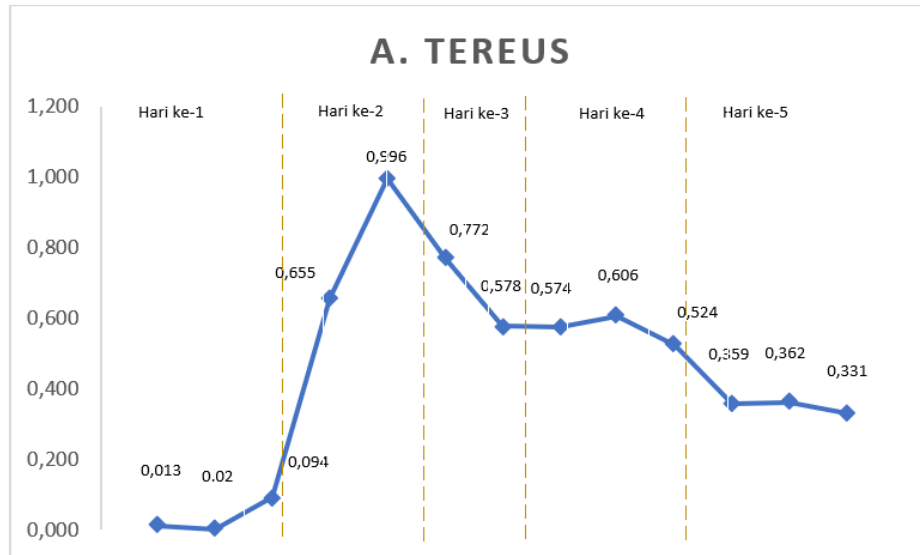
5.2.2 Hasil Microbact System

Bakteri *K. pneumoniae* dapat diidentifikasi menggunakan Uji Biokimia. Uji tersebut dikerjakan melalui *Microbact System*. Adapun hasil dari uji tersebut yaitu sebagai berikut:

Tabel 5.1 Uji Microbact System pada *Klebsiella pneumoniae*

No	Indikator	Hasil
1	Lysine	+
2	Ornithine	-
3	H ₂ S	-
4	Glucose	+
5	Mannitol	+
6	Xylose	+
7	ONPG	+
8	Indole	-
9	Urease	+
10	V-P	+
11	Citrate	+
12	TDA	-

5.3 Hasil Uji Kurva Pertumbuhan *Aspergillus terreus*



Gambar 5.4 Hasil Uji Kurva Pertumbuhan Jamur *A. terreus*

Kurva pertumbuhan didapatkan dari hasil pengukuran OD menggunakan spektrofotometri. Berdasarkan grafik diatas, jamur mengalami fase lag di hari ke-1 (0,013-0,094 A), fase ekspansional di hari ke-2 (0,094-0,996), fase akhir pertumbuhan/stasioner di hari ke-3 dan ke-4 (0,772-0,606), dan fase kematian di hari ke 4 dan ke-5 (0,524-0,331).

5.4 Hasil Uji Pertumbuhan Biofilm *Klebsiella pneumoniae*

Uji pertumbuhan biofilm dilakukan dengan menggunakan spektrofotometri dan diukur nilai OD. Hasil kurva pertumbuhan biofilm *K.pneumoniae* tampak pada **Tabel 5.2** Berdasarkan **Tabel 5.2**, dapat ditentukan hasil pertumbuhan biofilm *K. pneumoniae* dengan membandingkan nilai ODisolat dengan ODcut. Nilai ODcut didapatkan dengan rumus $OD_{kontrol} + (3 \times SD \text{ } OD_{kontrol})$. OD kontrol dengan nilai 0,419 dan SD kontrol dengan nilai 0,028 dimasukkan kedalam rumus tersebut dan didapatkan ODcut dengan nilai 0,503. Kemudian, dapat disimpulkan bahwa

bakteri *K. pneumoniae* pembentuk biofilm yang sedang atau *moderate- biofilm producer* apabila memenuhi kriteria hasil $2x \text{ OD}_{\text{cut}} < \text{OD}_{\text{isolate}} \leq 4x \text{ OD}_{\text{cut}}$ yaitu $1,006 < 1.253 \leq 2,012$

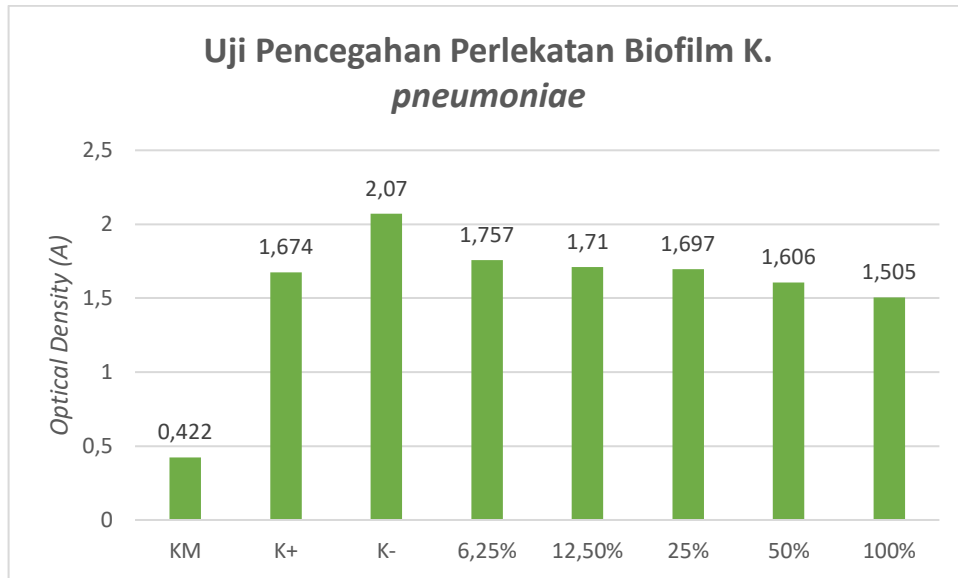
Tabel 5.2 Hasil Uji Pertumbuhan Biofilm *K. pneumoniae*

Kelompok	Optical Densitiy (OD)					ODcut
	Pengulangan			Rata-rata	SD	
	1	2	3			
Kelompok control: Media TSB dan glukosa 1%	0,391	0,419	0,458	0,419	0,028	0,503
Kelompok Uji: Bakteri <i>K. pneumoniae</i>	1,097	1,198	1,465	1,253	0,155	

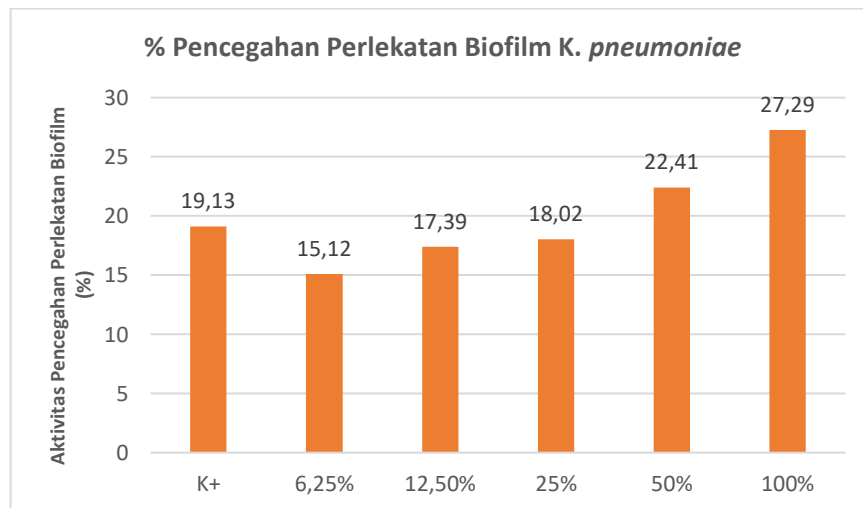
5.5 Hasil Uji Pencegahan Perlekatan Biofilm *Klebsiella pneumoniae*

Hasil Uji Pencegahan Perlekatan Biofilm *K. pneumoniae* ditampilkan pada **Gambar 5.5**. Gambar tersebut membandingkan nilai OD antara kelompok uji, kontrol negatif, kontrol media, dan kontrol positif. Pada **Gambar 5.5** didapatkan Hasil dengan nilai absorbansi dari OD KM ialah 0,0422, OD K+ ialah 1,674, OD K- ialah 2,07, dan OD kelompok uji tertinggi dimiliki oleh CFS *A. terreus* 6,25% dengan nilai 1,757 dan yang terendah, yaitu CFS *A. terreus* 100% dengan nilai 1,505. Selanjutnya, OD kelompok uji dimasukkan ke rumus persentase aktivitas antibiofilm *A. terreus* terhadap pencegahan perlekatan biofilm *K. pneumoniae* dan didapatkan hasil seperti pada **Gambar 5.6**.

Berdasarkan **Gambar 5.6**, didapatkan Hasil Presentase Aktivitas Antibiofilm *A. terreus* pada Pencegahan Perlekatan Biofilm *K. pneumoniae* dengan nilai tertinggi pada konsentrasi CFS *A. terreus* 100% dengan nilai 27,29% dan yang terendah pada CFS *A. terreus* 6,25% dengan nilai 15,12%.



Gambar 5.5 Hasil Uji Pencegahan Perlekatan Biofilm *K. pneumoniae*

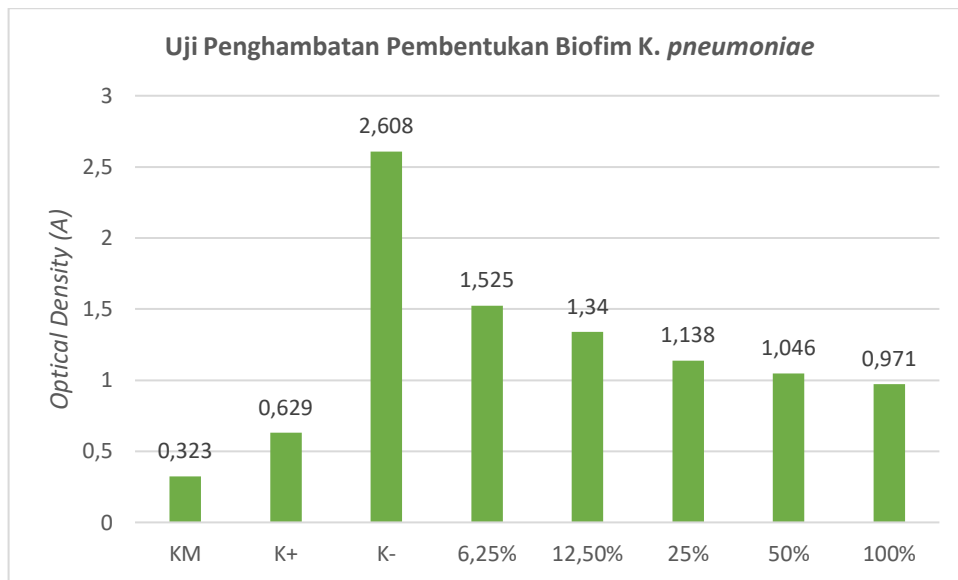


Gambar 5.6 Hasil Presentase Aktivitas Pencegahan Perlekatan Biofilm *K. pneumoniae*

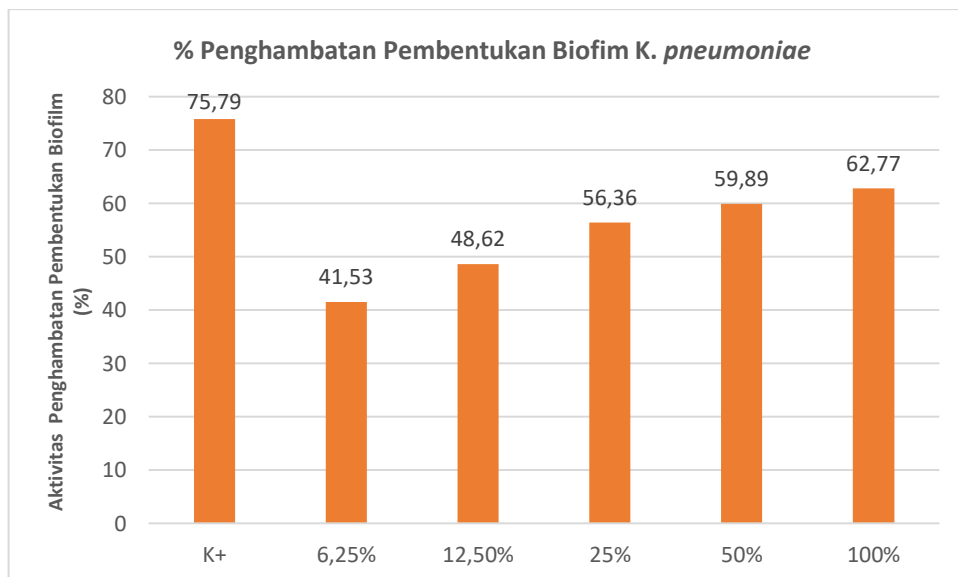
5.6 Hasil Uji Penghambatan Pembentukan Biofilm *Klebsiella pneumoniae*

Hasil perbandingan nilai OD kelompok uji, kontrol negatif, kontrol media, dan kontrol positif pada uji penghambatan pembentukan biofilm *K. pneumoniae* dapat dilihat pada **Gambar 5.7**. Berdasarkan **Gambar 5.7**, didapatkan nilai absorbansi dari OD KM ialah 0,323, OD K+ ialah 0,629, OD K- ialah 2,608, serta OD tertinggi dari Kelompok Uji dimiliki oleh CFS *A. terreus* 6,25% dengan nilai

1,525 dan OD terendah dimiliki oleh CFS *A. terreus* 100% dengan nilai 0,971. Selanjutnya, OD kelompok uji dimasukkan ke rumus presentase aktivitas antibiofilm *A. terreus* terhadap penghambatan pembentukan biofilm *K. pneumoniae* dan didapatkan hasil seperti pada **Gambar 5.8**.



Gambar 5.7 Hasil Uji Penghambatan Pembentukan Biofilm *K. pneumoniae*



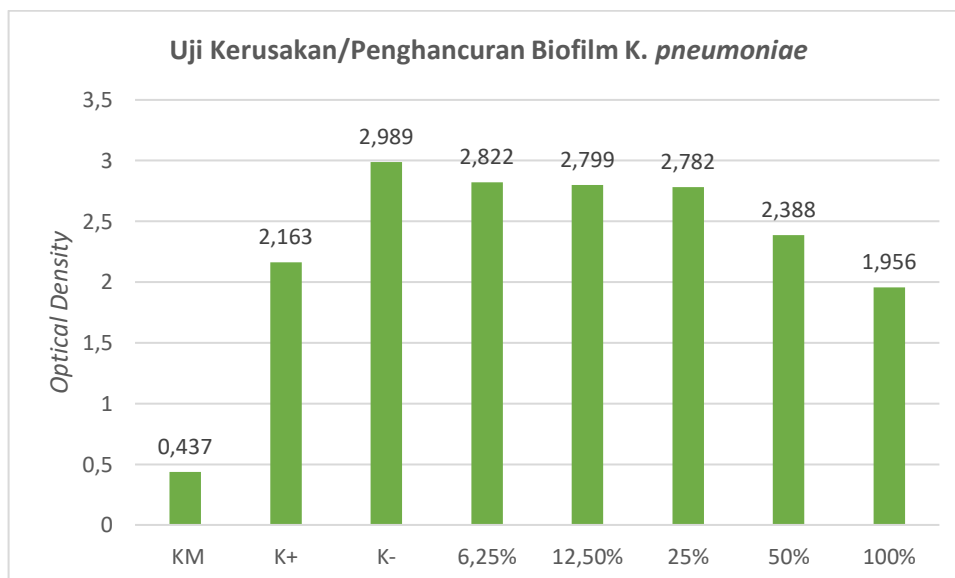
Gambar 5.8 Hasil Presentase Aktivitas Penghambatan Pembentukan Biofilm *K. pneumoniae*

Berdasarkan **Gambar 5.8** didapatkan hasil Presentase Aktivitas Antibiofilm *A. terreus* pada Penghambatan Pembentukan Biofilm *K. pneumoniae*

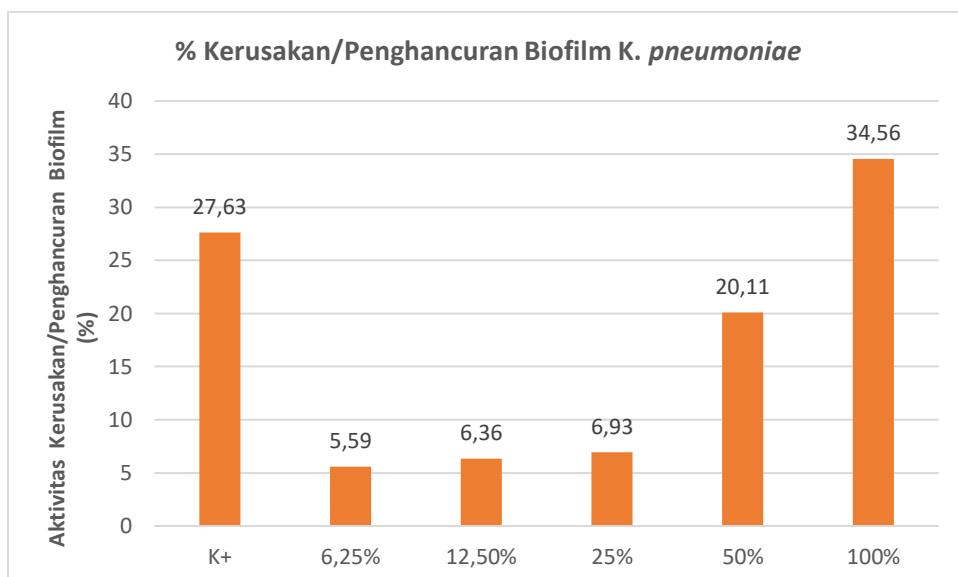
dengan nilai tertinggi pada CFS *A. terreus* 100% dengan nilai 62,77% dan yang terendah ialah CFS *A. terreus* 6,25% dengan nilai 41,53%.

5.7 Hasil Uji Kerusakan/Penghancuran Biofilm *Klebsiella pneumoniae*

Hasil perbandingan nilai OD kelompok uji, kontrol negatif, kontrol media, dan kontrol positif pada uji kerusakan/penghancuran biofilm *K. pneumoniae* dapat dilihat pada **Gambar 5.9**. Berdasarkan **Gambar 5.9**, didapatkan nilai absorbansi dari OD KM ialah 0,437, OD K+ ialah 2,163, OD K- ialah 2,989, serta OD tertinggi pada kelompok uji ialah CFS *A. terreus* 6,25% dengan nilai 2,822 dan OD terendahnya ialah CFS *A. terreus* 100% dengan nilai 1,956. Selanjutnya, OD kelompok uji dimasukkan ke rumus presentase aktivitas antibiofilm *A. terreus* terhadap kerusakan/penghancuran biofilm *K. pneumoniae* dengan hasil seperti **Gambar 5.10**.



Gambar 5.9 Hasil Uji Kerusakan/Penghancuran Biofilm *K. pneumoniae*



Gambar 5.10 Hasil Presentase Aktivitas Kerusakan/Penghancuran Biofilm *K. pneumoniae*

Berdasarkan **Gambar 5.10** didapatkan hasil Presentase Aktivitas Antibiofilm *A. terreus* pada Kerusakan/Penghancuran Biofilm *K. pneumoniae* dengan nilai tertinggi pada CFS *A. terreus* 100% dengan nilai 34,5% dan yang terendah ialah CFS *A. terreus* 6,25% dengan nilai 5,59%.

5.8 Hasil Uji Analisis Data

5.8.1 Hasil Uji Normalitas

Hasil uji normalitas menggunakan *Shapiro-wilk* dikarenakan data kurang dari 50. Berdasarkan **Lampiran 11**, variabel signifikan pencegahan perlekatan biofilm *K. pneumoniae* terhadap kelompok perlakuan KM ialah 0,826, K+ ialah 0,816, K- ialah 0,085, CFS *A. terreus* 100% ialah 0,579, CFS *A. terreus* 50% ialah 0,792, CFS *A. terreus* 25% ialah 0,306, CFS *A. terreus* 12,5% ialah 0,493, dan CFS *A. terreus* 6,25% ialah 0,245. Adapun data pencegahan perlekatan biofilm *K. pneumoniae* menunjukkan $\text{sig} > 0,05$ yang menginterpretasikan data mengalami signifikansi dan dapat disimpulkan data terdistribusi normal. Apabila data telah

terdistribusi normal, maka dapat dilanjutkan dengan uji parametrik berupa Uji *One Way Annova*.

Uji Normalitas Penghambatan Pembentukan Biofilm *K. pneumoniae* terhadap perlakuan KM ialah 0,481, K+ ialah 0,194, K- ialah 0,905, CFS *A. terreus* 100% ialah 0,647, CFS *A. terreus* 50% ialah 0,688, CFS *A. terreus* 25% ialah 0,664, CFS *A. terreus* 12,5% ialah 0,188, dan CFS *A. terreus* 6,25% ialah 0,893. Adapun data penghambatan pembentukan biofilm *K. pneumoniae* menunjukkan sig > 0,05 yang menginterpretasikan data mengalami signifikansi dan dapat disimpulkan data terdistribusi normal. Apabila data telah terdistribusi normal, maka dapat dilanjutkan dengan uji parametrik berupa Uji *One Way Annova*.

Uji Normalitas Kerusakan/Penghancuran Biofilm *K. pneumoniae* terhadap perlakuan KM ialah 0,200, K+ ialah 0,405, K- ialah 0,459, CFS *A. terreus* 100% ialah 0,944, CFS *A. terreus* 50% ialah 0,550, CFS *A. terreus* 25% ialah 0,302, CFS *A. terreus* 12,5% ialah 0,224, dan CFS *A. terreus* 6,25% ialah 0,362. Adapun data kerusakan/penghancuran biofilm *K. pneumoniae* menunjukkan sig > 0,05 yang menginterpretasikan data mengalami signifikansi dan dapat disimpulkan data terdistribusi normal. Apabila data telah terdistribusi normal, maka dapat dilanjutkan dengan uji parametrik berupa Uji *One Way Annova*.

5.8.2 Hasil Uji Homogenitas

Dikarenakan data yang terkumpul <50, maka uji homogenitas yang digunakan pada penelitian ini ialah uji homogenitas Lavene. Data dikatakan homogen apabila nilai p-value (sig) > 0.05. Berdasarkan **Lampiran 12**, didapatkan sig dari Pencegahan perlekatan biofilm *K. pneumoniae* ialah 0,074, penghambatan pembentukan biofilm *K. pneumoniae* ialah 0,070, dan Kerusakan/Penghancuran

biofilm *K. pneumoniae* ialah 0,079. Maka, dapat disimpulkan bahwa data yang digunakan ialah data homogen.

5.8.3 Hasil Uji One Way Annova

Pada *Uji One Way Annova*, data dikatakan adanya perbedaan signifikan apabila nilai sig < 0.05. Berdasarkan **Lampiran 13**, hasil uji diperoleh signifikansi pencegahan perlekatan biofilm *K. pneumoniae* ialah 0,000. Nilai signifikansi penghambatan pembentukan biofilm *K. pneumoniae* ialah 0,000. Nilai signifikansi kerusakan/penghancuran biofilm *K. pneumoniae* ialah 0,000. Maka dapat disimpulkan bahwa adanya pengaruh aktivitas antibiofilm *A. terreus* yang mampu mencegah perlekatan, menghambat pembentukan, dan merusak/menghancurkan biofilm *K. pneumoniae*.

5.8.4 Hasil Uji Post Hoc

Hasil Uji *Post Hoc* yang telah dilakukan, didapatkan hasil Uji *Post Hoc* Pencegahan Perlekatan Biofilm *K. pneumoniae* pada **Tabel 5.3** sebagai berikut:

Tabel 5.3 Hasil Uji *Post Hoc* Pencegahan Perlekatan Biofilm *K. pneumoniae*

Perlakuan	Nilai Probabilitas							
	KM	K+	K-	100%	50%	25%	12,5%	6,25%
KM		0,202	*0,042	*0,012	*0,016	*0,000	*0,000	*0,002
K+	0,202		0,983	0,767	0,847	0,069	0,076	0,307
K-	*0,042	0,983		0,997	0,999	0,302	0,326	0,793
100%	0,012	0,767	0,997		1,000	0,668	0,699	0,988
50%	*0,016	0,847	0,999	1,000		0,571	0,602	0,968
25%	*0,000	0,069	0,302	0,668	0,571		1,000	0,982
12,5%	*0,000	0,076	0,326	0,699	0,602	1,000		0,987
6,25%	*0,002	0,307	0,793	0,988	0,968	0,982	0,987	

Keterangan: KM (Kontrol Media), K+ (Kontrol Positif), K- (Kontrol Negatif), *(tanda bahwa data terdapat signifikansi, yaitu sig <0,05)

Berdasarkan **Tabel 5.3**, tidak didapatkan signifikansi K-, CFS *A. terreus* 100%, 50 %, 25%, 12,5%, dan 6,25% terhadap K- dikarenakan sig > 0,05. Hal tersebut menunjukkan bahwa sedikit perbedaan OD kelompok uji dengan OD K+.

Maka, CFS *A. terreus* 100%, 50%, 25%, 12,5%, dan 6,25% mempunyai efektifitas pencegahan perlekatan terhadap biofilm *K. pneumoniae* yang tidak jauh berbeda dengan konsentrasi kontrol positif.

Hasil Uji *Post Hoc* Penghambatan Pembentukan Biofilm *K. pneumoniae* ditampilkan pada **Tabel 5.4** sebagai berikut.

Tabel 5.4 Hasil Uji *Post Hoc* Penghambatan Pembentukan Biofilm *K. pneumoniae*

Perlakuan	Nilai Probabilitas							
	KM	K+	K-	100%	50%	25%	12,5%	6,25%
KM		*0,000	*0,000	*0,000	*0,000	*0,000	*0,000	*0,000
K+	*0,000		*0,002	0,414	0,984	1,000	1,000	0,957
K-	*0,000	*0,002		*0,000	*0,000	*0,004	*0,006	*0,018
100%	*0,000	0,414	*0,000		0,887	0,275	0,213	0,076
50%	*0,000	0,984	*0,000	0,887		0,929	0,873	0,549
25%	*0,000	1,000	*0,004	0,275	0,929		1,000	0,993
12,5%	*0,000	1,000	*0,006	0,213	0,873	1,000		0,998
6,25%	*0,000	0,957	*0,018	0,076	0,549	0,993	0,998	

Keterangan: KM (Kontrol Media), K+ (Kontrol Positif), K- (Kontrol Negatif), *(tanda bahwa data terdapat signifikansi, yaitu sig <0,05)

Berdasarkan **Tabel 5.4**, hasil uji *Post hoc* pencegahan perlekatan biofilm *K. pneumoniae* menunjukkan CFS *A. terreus* 100%, 50%, 25%, 12,5%, dan 6,25% terhadap K+ tidak didapatkan adanya perbedaan bermakna dikarenakan sig > 0,005. Hal tersebut menunjukkan bahwa sedikit perbedaan OD kelompok uji dengan OD K+. Maka, CFS *A. terreus* 100%, 50%, 25%, 12,5%, dan 6,25% mempunyai efektifitas menghambat pembentukan biofilm *K. pneumoniae* yang tidak jauh berbeda dengan konsentrasi kontrol positif.

Hasil Uji *Post Hoc* Kerusakan/Penghancuran Biofilm *K. pneumoniae* ditampilkan pada **Tabel 5.5** sebagai berikut.

Tabel 5.5 Hasil Uji *Post Hoc* Kerusakan/Penghancuran Biofilm *K. pneumoniae*

Perlakuan	Nilai Probabilitas							
	KM	K+	K-	100%	50%	25%	12,5%	6,25%
KM		*0,000	*0,000	*0,001	*0,000	*0,000	*0,000	*0,000
K+	*0,000		0,121	0,994	0,990	0,384	0,353	0,315
K-	*0,001	0,121		*0,031	0,419	0,994	0,996	0,998

100%	*0,000	0,994	*0,031		0,768	0,120	0,108	0,094
50%	*0,000	0,990	0,419	0,768		0,835	0,806	0,764
25%	*0,000	0,384	0,994	0,120	0,835		1,000	1,000
12,5%	*0,000	0,353	0,996	0,108	0,806	1,000		1,000
6,25%	*0,000	0,315	0,998	0,094	0,764	1,000	1,000	

Keterangan: KM (Kontrol Media), K+ (Kontrol Positif), K- (Kontrol Negatif), *(tanda bahwa data terdapat signifikansi, yaitu sig <0,05)

Berdasarkan *Tabel 5.5*, tidak didapatkan Hasil Uji *Post Hoc* Kerusakan/Penghancuran Biofilm *K. pneumoniae* dikarenakan sig >0,05 pada K-, CFS *A. terreus* 100%, 50%, 25%, 12,5%, dan 6,25% terhadap K+. Hal tersebut menunjukkan bahwa sedikit perbedaan OD kelompok uji dengan OD K+. Maka, CFS *A. terreus* 100%, 50%, 25%, 12,5%, dan 6,25% mempunyai efektifitas merusak/menghancurkan biofilm *K. pneumoniae* yang tidak jauh berbeda dengan konsentrasi kontrol positif.

5.8.5 Hasil Uji Korelasi

Pada Uji Korelasi, data dikatakan terjadi signifikansi apabila nilai sig < 0.05. Disisi lain, nilai koefisien pearson korelasi dapat diklasifikasikan untuk menentukan derajat hubungan uji korelasi seperti pada **Tabel 6.1**. Berdasarkan **Lampiran 14**, didapatkan hasil uji korelasi pada uji pencegahan perlekatan biofilm *K. pneumoniae* dengan nilai koefisien pearson korelasi adalah 0,770 dan signifikan 0,000 (sig < 0,05) yang artinya terdapat korelasi yang sangat kuat dan terjadi signifikansi. Hasil uji korelasi pada uji penghambatan pembentukan biofilm *K. pneumoniae*, diapatkan nilai koefisien pearson korelasi adalah 0,503 dengan signifikan 0,012 (sig < 0,05) yang artinya terdapat korelasi kuat dan terjadi signifikansi. Hasil uji korelasi pada uji kerusakan/penghancuran biofilm *K. pneumoniae*, didapatkan nilai koefisien pearson korelasi adalah 0,650 dengan

signifikan 0,001 ($\text{sig} < 0,05$) yang artinya terdapat korelasi kuat dan terjadi signifikansi.

Tabel 5.6 Derajat Hubungan Uji Korelasi (Sarwono, 2006).

Nilai	Interpretasi
0	Tidak ada korelasi antara dua variabel
$> 0 - 0,25$	Korelasi sangat lemah
$> 0,25 - 0,5$	Korelasi cukup
$> 0,5 - 0,75$	Korelasi kuat
$> 0,75 - 0,99$	Korelasi sangat kuat
1	Korelasi sempurna

BAB VI

PEMBAHASAN

6.1 Identifikasi *Aspergillus terreus*

Dalam melakukan penelitian, diperlukan identifikasi jamur terlebih dahulu. Jamur yang digunakan dalam penelitian ini ialah jamur yang berspesies *Aspergillus terreus*. Jamur tersebut bisa ditanam menggunakan media PDA. Berdasarkan identifikasi secara makroskopis pada **Gambar 5.1**, didapatkan koloni berbentuk bulat halus yang bewarna coklat kekuningan hingga gelap (Pujiati, 2018). Sedangkan, secara mikroskopis pada **Gambar 5.2**, *A. terreus* ditemukan stipes, vesicle, dan konidia (Zulkifli, 2015).

6.2 Identifikasi *Klebsiella pneumoniae*

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini ialah *Klebsiella pneumoniae* yang diuji dengan pewarnaan Gram, dengan interpretasi bentuk batang bewarna merah seperti pada **Gambar 5.3**. Hal tersebut terjadi dikarenakan bakteri kehilangan zat pewarna kristal violet setelah dilakukan pencucian menggunakan alkohol, sehingga pada pewarnaan selanjutnya, bakteri mengikat safranin dan menunjukkan bahwa *K. pneumoniae* bewarna merah yang dikategorikan sebagai bakteri Gram negatif.

Pada uji **Tabel 5.1 Microbact System** menunjukkan bahwa *K. pneumoniae* menghasilkan hasil positif pada uji *lysine*, *glucose*, manitol, *xylose*, ONPG, urease, V-P, dan sitrat. Pada uji *lysine*, dikatakan positif disebabkan merubah warna kuning menjadi ungu dikarenakan pembentukan amin dalam keadaan asam. Pada uji *glucose*, *K. pneumoniae* dikatakan positif dikarenakan menghasilkan glukosa dengan interpretasi mempertahankan warna merah dari *methyl red*. Pada Uji

manitol, *K. pneumoniae* ditemukan positif dikarenakan merubah warna menjadi kuning akibat fermentasi manitol. *K. pneumoniae* ditemukan positif pada uji *xylose* dikarenakan ditemukannya perubahan dari biru menjadi warna kuning akibat bakteri memfermentasi *xylose*. Pada pengujian ONPG (*orthoNitrophenyl-β-galactoside*), *K. pneumoniae* dikatakan positif dikarenakan menghasilkan enzim *β-galactoside* yang membentuk warna kuning. Pada Uji Urease, *K. pneumoniae* dikatakan positif dikarenakan menghasilkan warna merah karena bakteri menghasilkan amonia. Pada uji *Voges-Proskauer*, *K. pneumoniae* dikatakan positif dikarenakan menghasilkan asetoin yang menyebabkan terbentuknya warna merah. Pada pengujian sitrat, *K. pneumoniae* didapatkan hasil positif dikarenakan terbentuknya warna biru akibat Na_2CO_3 yang dikeluarkan bakteri dalam suasana alkali.

6.3 Pengukuran Kurva *Aspergillus terreus*

Pengukuran kurva jamur dilakukan setelah identifikasi bakteri dan jamur. Pengukuran ini berguna untuk mengetahui waktu inkubasi ketika menginokulum jamur. Pada pengukuran kurva *A. terreus*, setiap 5 jam akan dilakukan pengecekan *Optical Density* (OD). Dikarenakan terdapat kendala berupa keterbatasan waktu, maka pengukuran dilakukan 2 kali sehari. Pada hari pertama merupakan fase lag yang merupakan bentuk penyesuaian jamur terhadap lingkungannya. Pada hari kedua menunjukkan fase ekspansional dikarenakan jamur sudah aktif membelah dan mulai memperbanyak diri. Hal tersebut menyebabkan terbentuknya kurva yang semakin meningkat tajam. Di hari ketiga dan keempat, jamur mengalami fase akhir pertumbuhan/stasioner dengan membentuk kurva yang mengalami penurunan perlahan serta diawali dengan produksi metabolit sekunder yang berguna sebagai

antibiofilm (Tyas, 2021). Pada hari keempat dan kelima, jamur mengalami fase kematian dengan membentuk kurva yang terus mengalami penurunan (Sya'diyah, 2021).

6.4 Uji Pertumbuhan Biofilm

Dalam penelitian ini, penting dilakukan uji pertumbuhan biofilm untuk mengetahui kemampuan dan kekuatan bakteri dalam membentuk biofilm. Pada uji ini dilakukan pengukuran selama 24 jam dan didapatkan OD rata-rata kelompok uji, yaitu 1,253. Untuk menentukan kekuatan *K. pneumoniae* dalam membentuk biofilm dapat dilakukan pengukuran dengan memasukkan nilai OD_{cut} dan OD_{isolat}. Bakteri *K. pneumoniae* didapatkan $2x \text{ OD}_{\text{cut}} < \text{OD}_{\text{isolat}} \leq 4x \text{ OD}_{\text{cut}}$ yaitu $1,006 < 1,253 \leq 2,012$. Hal tersebut menunjukkan bahwa derajat pembentukan biofilm bakteri yang digunakan untuk penelitian ini merupakan pembentuk biofilm sedang atau *moderate-biofilm producer*. Hal tersebut didukung dengan penelitian yang menunjukkan bahwa 37 dari 80 sampel *K. pneumoniae* merupakan *moderate-biofilm producer*, 6 sampel menunjukkan *strong producer*, 29 sampel menunjukkan *weak producer*, dan 8 sampel menunjukkan *non-producer* (Ma, Hendrayana and Sukrama, 2021).

6.5 Uji Aktivitas Antibiofilm *Aspergillus terreus* terhadap Pencegahan

Perlekatan Biofilm *Klebsiella pneumoniae*

Adapun proses perlekatan merupakan langkah pertama dalam membentuk biofilm. Proses perlekatan dapat dilakukan pada substrat biologis maupun non-biologis (Khoiriah, 2021). Salah satu faktor yang berperan dalam perlekatan bakteri ialah motilitas bakteri yang dibantu dengan Fimbriae Tipe 1 (fimH), Fimbriae Tipe P (pap), Fimbriae Tipe 3, dan Pili Konjugatif yang merupakan faktor virulensi dari

K. pneumoniae. Pada proses perlekatan, faktor lingkungan, sifat fisika, kimia bakteri, dan permukaan juga sangat berpengaruh dalam proses pertumbuhan biofilm (Abida, 2020).

Uji pencegahan perlekatan biofilm pada penelitian ini merupakan uji yang berfungsi untuk mengetahui kemampuan CFS *A. terreus* dalam mencegah perlekatan pada tahap awal pembentukan biofilm. Berdasarkan **Gambar 5.5**, didapatkan nilai absorbansi uji pencegahan perlekatan biofilm *K. pneumoniae* tertinggi pada CFS *A. terreus* 6,25% dengan nilai 1,757 dikarenakan pada pengujian tersebut, konsentrasi 6,25% merupakan konsentrasi terkecil dan berefek minimum pada proses pencegahan perlekatan biofilm, sehingga cairan yang dibentuk keruh dan menghasilkan OD yang tinggi. Sebaliknya, nilai absorbansi terendah pada CFS *A. terreus* 100% dengan nilai 1,505 dikarenakan pada pengujian tersebut, konsentrasi 100% merupakan konsentrasi yang tidak mengalami pengenceran bertingkat, sehingga efek yang didapatkan untuk pencegahan perlekatan biofilm lebih besar. Hal tersebut menyebabkan cairan tidak terlalu keruh dan nilai OD yang dihasilkan paling rendah dibanding kelompok uji yang lainnya. Pada **Gambar 5.6**, presentase aktivitas antibiofilm *A. terreus* pada uji pencegahan perlekatan biofilm *K. pneumoniae* tertinggi terletak pada CFS *A. terreus* 100% dengan nilai 27,29% dan yang terendah ialah CFS *A. terreus* 6,25% dengan nilai 15,12%. Hal tersebut menunjukkan bahwa CFS *A. terreus* 100% berefek tinggi pada aktivitas pencegahan perlekatan biofilm *K. pneumoniae* dikarenakan pada konsentrasi tersebut, merupakan konsentrasi maksimal tanpa ada pengenceran. Sedangkan CFS *A. terreus* 6,25% mempunyai efek yang paling kecil terhadap

pencegahan perlekatan biofilm *K. pneumoniae* dikarenakan pada konsentrasi tersebut, merupakan konsentrasi yang paling banyak mengalami pengenceran.

Adapun pada **Tabel 5.3** Uji Analisa *Post Hoc*, nilai CFS *A. terreus* 6,25% hingga 100% terhadap K+ tidak mengalami perbedaan yang signifikan, hal tersebut menunjukkan bahwa pada konsentrasi terendah tidak memiliki perbedaan jauh dengan aktivitas antibiofilm K+ dalam pencegahan perlekatan biofilm *K.pneumoniae*. Dapat disimpulkan bahwa pada kelompok uji (CFS *A. terreus* 100%, 50%, 25%, 12,5%, dan 6,25%) sudah mampu melakukan pencegahan perlekatan biofilm *K. pneumoniae* yang hampir sama dengan kelompok positif (*Gentamycin*).

6.6 Uji Aktivitas Antibiofilm *Aspergillus terreus* terhadap Penghambatan Pembentukan Biofilm *Klebsiella pneumoniae*

Pembentukan EPS merupakan faktor penting dalam proses pembentukan biofilm. Selulosa dan protein merupakan bagian dari penyusun dari EPS. Adapun kandungan dari *A. terreus*, seperti enzim selulase yang dapat menghidrolisis serat selulosa dan enzim protease yang dapat berfungsi dalam perombakan protein menjadi peptide sederhana diharapkan dapat menghambat dari pembentukan biofilm melalui perombakan dari EPS yang dibentuk oleh *K. pneumoniae* (Setiawan, 2010).

Uji penghambatan pembentukan biofilm pada penelitian ini merupakan uji yang dilakukan dengan memasukkan secara bersamaan *K. pneumoniae* dengan *Aspergillus terreus* sehingga diharapkan enzim yang dikeluarkan oleh jamur dapat menghambat pembentukan bakteri uji. Berdasarkan **Gambar 5.7**, didapatkannilai absorbansi uji penghambatan pembentukan biofilm *K. pneumoniae* dengan OD

tertinggi pada CFS *A. terreus* 6,25%, yaitu 1,525 dikarenakan pada pengujian tersebut, konsentrasi 6,25% merupakan konsentrasi terkecil dan berefek minimum pada proses penghambatan pembentukan biofilm, sehingga cairan yang dibentuk keruh dan menghasilkan OD yang tinggi. Sebaliknya, nilai absorbansi terendah pada CFS *A. terreus* 100% dengan nilai 0,971 dikarenakan pada pengujian tersebut, konsentrasi 100% merupakan konsentrasi yang tidak mengalami pengenceran bertingkat, sehingga efek yang didapatkan untuk penghambatan pembentukan biofilm lebih besar. Hal tersebut menyebabkan cairan tidak terlalu keruh dan nilai OD yang dihasilkan paling rendah dibanding kelompok uji yang lainnya. Pada **Gambar 5.8**, didapatkan presentase aktivitas penghambatan pembentukan biofilm *K. pneumoniae* tertinggi dimiliki oleh CFS *A. terreus* 100% dengan nilai 62,77%. Sedangkan konsentrasi terendah terdapat pada konsentrasi CFS *A. terreus* 6,25% dengan nilai 21,53%. Hal tersebut menunjukkan bahwa CFS *A. terreus* 100% berefek tinggi pada aktivitas penghambatan pembentukan biofilm *K. pneumoniae* dikarenakan pada konsentrasi tersebut, merupakan konsentrasi maksimal tanpa ada pengenceran. Sedangkan CFS *A. terreus* 6,25% mempunyai efek yang paling kecil terhadap penghambatan pembentukan biofilm *K. pneumoniae* dikarenakan pada konsentrasi tersebut, merupakan konsentrasi yang paling banyak mengalami pengenceran.

Adapun pada **Tabel 5.4 Uji Post Hoc**, nilai CFS *A. terreus* 6,25% hingga 100% terhadap K+ tidak mengalami perbedaan yang signifikan, hal tersebut menunjukkan bahwa pada konsentrasi terendah tidak memiliki perbedaan jauh dengan aktivitas antibiofilm K+ dalam menghambat pembentukan biofilm *K.pneumoniae*. Dapat disimpulkan bahwa pada kelompok uji (CFS *A. terreus*

100%, 50%, 25%, 12,5%, dan 6,25%) sudah mampu melakukan penghambatan pembentukan biofilm *K. pneumoniae* yang hampir sama dengan kelompok positif (*Gentamycin*).

6.7 Uji Aktivitas Antibiofilm *Aspergillus terreus* terhadap

Kerusakan/Penghancuran Biofilm *Klebsiella pneumoniae*

Adapun saat biofilm telah mengalami maturasi, maka lapisan EPS yang terbentuk juga semakin tebal dan banyak. Hal tersebut berefek dengan peningkatan pertahanan dari bakteri dan biofilm dari situasi yang merugikan. Maka perlu pengujian akan efektivitas CFS *A. terreus* terhadap maturitas biofilm setelah biofilm sudah terbentuk oleh *K. pneumoniae*.

Berdasarkan **Gambar 5.9** didapatkan hasil uji kerusakan/penghancuran biofilm *K. pneumoniae* dengan OD tetinggi pada CFS *A. terreus* 6,25% dengan nilai 2,822 A dikarenakan pada pengujian tersebut, konsentrasi 6,25% merupakan konsentrasi terkecil dan berefek minimum pada proses penghambatan pembentukan biofilm, sehingga cairan yang dibentuk keruh dan menghasilkan OD yang tinggi. Sebaliknya, nilai terendah pada CFS *A. terreus* 100% dengan nilai 1,956 A dikarenakan pada pengujian tersebut, konsentrasi 100% merupakan konsentrasi yang tidak mengalami pengenceran bertingkat, sehingga efek yang didapatkan untuk pengahambatan pembentukan biofilm lebih besar. Hal tersebut menyebabkan cairan tidak terlalu keruh dan nilai OD yang dihasilkan paling rendah dibanding kelompok uji yang lainnnya. Pada **Gambar 5.10**, didapatkan presentase aktivitas kerusakan/penghancuran biofilm *K. pneumoniae* tertinggi dimiliki CFS 100% dengan nilai 34,56% dan yang paling rendah ialah CFS 6,25% dengan nilai 5,59%. Hal tersebut menunjukkan bahwa CFS *A. terreus* 100% berefek tinggi pada

aktivitas kerusakan/penghancuran biofilm *K. pneumoniae* dikarenakan pada konsentrasi tersebut, merupakan konsentrasi maksimal tanpa ada pengenceran. Sedangkan CFS *A. terreus* 6,25% mempunyai efek yang paling kecil terhadap kerusakan/penghancuran biofilm *K. pneumoniae* dikarenakan pada konsentrasi tersebut, merupakan konsentrasi yang paling banyak mengalami pengenceran.

Adapun pada **Tabel 5.5** Uji *Post Hoc*, nilai CFS *A. terreus* 6,25% hingga 100% terhadap *K+* tidak mengalami perbedaan yang signifikan, hal tersebut menunjukkan bahwa pada konsentrasi terendah tidak memiliki perbedaan jauh dengan aktivitas antibiofilm *K+* dalam merusak/menghancurkan biofilm *K.pneumoniae*. Dapat disimpulkan bahwa pada kelompok uji (CFS *A. terreus* 100%, 50%, 25%, 12,5%, dan 6,25%) sudah mampu melakukan kerusakan/penghancuran biofilm *K. pneumoniae* yang hampir sama dengan kelompok positif (*Gentamycin*).

6.8 Integrasi Islam

Sebagai manusia diharapkan untuk tidak berputus asa dan diharuskan untuk terus berikhtiar. Salah satu bentuk ikhtiar yang dapat dilakukan manusia ialah dengan mencari pengobatan untuk menyembuhkan suatu penyakit dikarenakan setiap penyakit pasti ada obatnya. Hadist Shahih Riwayat Imam Muslim menyebutkan akan hal tersebut, bahwa Rasulullah *shallallahu 'alaihi wa sallam* bersabda: “*Setiap penyakit ada obatnya. Apabila ditemukan obat yang tepat untuk suatu penyakit, akan sembuhlah penyakit itu dengan izin Allah 'azza wajalla.*”.

Pada Surah Taa Haa ayat 53 Allah berfirman yang artinya: “*(Tuhan) yang telah menjadikan bumi sebagai hamparan bagimu, dan menjadikan jalan-jalan di atasnya bagimu, dan yang menurunkan air (hujan) dari langit. Kemudian Kami*

tumbuhkan dengannya (air hujan itu) berjenis-jenis aneka macam tumbuhan-tumbuhan". Sebagai manusia, diharuskan banyak bersyukur atas rahmat yang telah diberikan Allah SWT dengan adanya banyak tumbuhan yang bisa digunakan dan bermanfaat bagi manusia.

Adapun salah satu bagian dari bahan alami yang dapat digunakan untuk menghambat pertumbuhan biofilm ialah golongan *Aspergillus*, yaitu *Aspergillus terreus* dengan kandungannya berupa enzim dan metabolit sekunder yang berfungsi sebagai faktor penghambat pertumbuhan biofilm. Oleh karena itu, peneliti ingin melakukan penelitian agar dapat berguna bagi banyak manusia dan mendapatkan ridho Allah SWT.

6.9 Keterbatasan Penelitian

Adapun keterbatasan penelitian disebutkan sebagai berikut:

1. Peneliti mempunyai keterbatasan waktu dalam mengukur kurva pertumbuhan jamur *A. terreus*, sehingga dilakukan peneliti 2 kali dalam sehari.
2. Sebelum mendapatkan hasil, peneliti sempat melakukan 1 kali percobaan, tetapi dikarenakan hasil yang didapatkan terjadi kontaminasi berupa kelompok uji mempunyai nilai OD yang lebih tinggi ketimbang kontrol negatif yang berisi bakteri *K. pneumoniae* dan media. Peneliti merefleksikan diri dan melakukan perbaikan berupa pembuatan denah sebelum perlakuan dan melakukan sterilisasi berulang.
3. Peneliti mengalami keterbatasan berupa bahan yang kurang, hal tersebut dapat teratasi dengan dilakukannya perhitungan persediaan yang dilebihkan dari sebagaimana mestinya.

4. Hasil yang didapatkan peneliti terus menaik seiring bertambahnya konsentrasi CFS *A. terreus*, sehingga peneliti tidak tahu konsentrasi optimal dikarenakan hasil tidak menunjukkan grafik yang turun kembali.
5. Peneliti belum menemukan tingkat toksisitas dan efek samping dari dosis tertinggi, yaitu konsentrasi CFS *A. terreus* 100%.

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

1. *Aspergillus terreus* memiliki aktivitas antibiofilm terhadap biofilm *Klebsiella pneumoniae*.
2. *Aspergillus terreus* memiliki aktivitas pencegahan perlekatan terhadap biofilm *Klebsiella pneumoniae* dengan aktivitas tertinggi pada konsentrasi CFS *A. terreus* 100% sebesar 27,29%
3. *Aspergillus terreus* memiliki aktivitas terhadap penghambatan pembentukan *Klebsiella pneumoniae* dengan presentase aktivitas tertinggi pada konsentrasi CFS *A. terreus* 100% sebesar 62,77%.
4. *Aspergillus terreus* memiliki aktivitas terhadap kerusakan/penghancuran biofilm *Klebsiella pneumoniae* dengan aktivitas tertinggi pada konsentrasi CFS *A. terreus* 100% sebesar 24,56%

7.2 Saran

Saran yang dapat diambil ialah sebagai berikut :

1. Pada penelitian selanjutnya, diperlukan pengukuran kurva pertumbuhan setiap 5 jam.
2. Diperlukan penelitian lanjutan tentang kandungan atau senyawa dari *Aspergillus terreus* dan mekanisme kerja yang lebih spesifik sebagai antibiofilm.
3. Diperlukan penelitian yang pengambilannya berasal dari *Klebsiella pneumoniae* dari penderita penyakit pernapasan.

6. Diperlukan penelitian tentang aktivitas antibiofilm *A. terreus* terhadap biofilm *K. pneumonie* dengan metode yang berbeda, seperti metode tabung, *congo red agar*, sumuran, atau yang lainnya.
7. Diperlukan penelitian lanjutan akan toksisitas dan efek samping dari penggunaan CFS *A. terreus* konsentrasi tertinggi, yaitu 100%.

DAFTAR PUSTAKA

- Abida, H. Y. (2020) 'Uji Aktivitas Antibiofilm Ekstrak Daun Murbei Hitam (*Morus Nigra* L.) terhadap Biofilm *Escherichia Coli* Skripsi'.
- Akilandeswari, P. and Pradeep, B. V. (2017) 'Aspergillus Terreus Kmbf1501 a Potential Pigment Producer Under Submerged Fermentation', *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 9(4), p. 38. doi: 10.22159/ijpps.2017v9i4.16176.
- Andriani, D. (2019) 'IDENTIFIKASI JAMUR Aspergillus sp PADA KACANG HIJAU', *Insan Cendekia Medika Jombang*.
- Baban, S. T. (2017) 'Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of Extended Spectrum Beta- Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from Urinary Tract Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) - Producing *Klebsiella* sp', *Jour*, (August 2017), pp. 1–28.
- Cadavid, E. *et al.* (2018) 'Induction of biofilm formation in *klebsiella pneumoniae* ATCC 13884 by several drugs: The possible role of Quorum sensing modulation', *Antibiotics*, 7(4), pp. 1–14. doi: 10.3390/antibiotics7040103.
- Chee, Y. C. and Lim, C. H. (2018) 'Klebsiella pneumoniae sacroiliac septic arthritis: First case report', *IDCases*, 14, p. e00459. doi: 10.1016/j.idcr.2018.e00459.
- Damayanti, K. and Ryusuke, O. (2017) 'Pneumonia', *FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS UDAYANA*, pp. 7–41.
- Dawley, J. S. (2014) 'Pengaruh Pemberian Buah Pepaya (*Carica Papaya* L.) terhadap Kadar Trigliserida pada Tikus Sprague Dawley dengan Hiperkolesterolemia', *Journal of Nutrition College*, 3(1), pp. 90–97.
- De Araujo, C. *et al.* (2010) 'Quorum sensing affects biofilm formation through lipopolysaccharide synthesis in *Klebsiella pneumoniae*', *Research in Microbiology*, 161(7), pp. 595–603. doi: 10.1016/j.resmic.2010.05.014.
- Dita, R. F. *et al.* (2019) 'Protein which Serves as a Virulence Factor', *Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember*, 5(2), pp. 69–76.
- Dolan, J. A. and Burdon, K. L. (2005) *Ananthanarayan and Paniker's Textbook of Microbiology, The American Journal of Nursing*. doi: 10.2307/3457962.
- Drotman, D. P. *et al.* (2010) *Emerging Infectious Disease*. Vol. 16, N. CDC.
- El-Halim, A. *et al.* (2014) 'Efficacy of the fungi *Aspergillus terreus* and *Penicillium janthinellum* as biological control agents against *Biomphalaria alexandrina* snails', *International Journal of Environmental Science and Engineering (Ijese)*, 5(January), pp. 25–37.
- Fauziah, S. R. (2019) 'IDENTIFIKASI *Klebsiella* sp PADA ES CAMPUR YANG

DIJUAL DI JALAN WILLIAM ISKANDAR MEDAN', pp. 1–21.

- Harapan, I. K., Tahulending, A. and Tumbol, M. V. L. (2018) 'Karakteristik Resistensi *Klebsiella pneumoniae* Yang Resisten Karbapenem Pada Beberapa Rumah Sakit Di Indonesia Dan Pemeriksaan Laboratorium', *Prosiding Seminar Nasional Tahun 2018 Menuju Masyarakat Sehat, Berkarakter dan Berprestasi*, 1(3), pp. 636–650.
- Hasiani, V. V., Ahmad, I. and Rijai, L. (2015) 'Isolasi Jamur Endofit dan Produksi Metabolit Sekunder Antioksidan dari Daun Pacar (*Lawsonia inermis* L.)', 1(4), pp. 146–153.
- Hayati, R. and Pawarti, D. R. (2018) 'Tiga Kasus Rinitis Atrofi Primer (Ozaena) dalam Satu Keluarga', pp. 99–117.
- Hidayati, A. N. and Liuwan, C. C. (2019) 'Peran Biofilm terhadap Infeksi Saluran Genital yang disebabkan oleh Vaginosis Bakterial (The Role of Biofilm in Genital Tract Infection Caused by Bacterial Vaginosis)', pp. 150–158.
- Hidayati, A. N. and Liuwan, H. C. (2019) 'Peran Biofilm terhadap Infeksi Saluran Genital yang disebabkan oleh Vaginosis Bakterial', *Berkala Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin*, 31(2), pp. 150–158.
- Homenta, H. . (2016) 'Infeksi Biofilm Bakterial', *Jurnal e-Biomedik*, 4(1), pp. 1–11. doi: 10.35790/ebm.4.1.2016.11736.
- Jawetz, Melnick and Aldeberg (2004) 'Mikrobiologi Iftdokteran', 23, pp. 251–257.
- Kambuno Dicky, N. T. F. (2017) 'Identifikasi Bakteri Gram Negatif Galur Extended Spectrum Beta Lactamase Pada Ruang NICU RSUD Prof. DR. W. Z. Johannes Kupang', *Jurnal Info Kesehatan*, 15(2), pp. 333–345.
- Karen, C. and Jeffery, H. (2016) *Jawetz Melnick & Adelbergs Medical Microbiology*. 27th edn. McGraw-Hill Education.
- Kementerian Kesehatan Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan (2015) 'Infodatin-Haji.pdf'.
- Kementerian Kesehatan Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan 1 (2018) 'HASIL UTAMA RISKESDAS 2018 Kementerian', *Kemertrian Kesehatan Republik Indonesia*, pp. 1–100.
- Khoiriah, A. N. (2021) *UJI AKTIVITAS ANTIBIOFILM Aspergillus aculeatus TERHADAP BIOFILM Pseudomonas aeruginosa SKRIPSI*.
- Khotimah, A. R. H. (2020) 'Uji Aktivitas Ekstrak Daun Murbei Hitam (*Morus nigra* L.) Sebagai Antibiofilm *Klebsiella pneumoniae*'.
- Lass-Flörl, C. (2018) 'Treatment of infections due to *Aspergillus terreus* species complex', *Journal of Fungi*, 4(3), pp. 1–9. doi: 10.3390/jof4030083.
- Latuharhary HM, Fatimawali, K. B. (2018) 'Isolasi Dan Identifikasi Biomolekuler Bakteri Penyebab Pneumonia Yang Resisten Seftriakson Di Rsup Prof. Dr. R. D. Kandou Manado', *Pharmacon*, 7(3). doi:

10.35799/pha.7.2018.20240.

- Lesmana, M. *et al.* (2019) 'Deteksi Biofilm *Staphylococcus aureus* dari Susu Mastitis Subklinis ubklinis Detection of *Staphylococcus aureus* Biofilm from Subclinical Mastitis Milk', 1(1), pp. 19–25.
- Li, B. *et al.* (2014) 'Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*', *Future Microbiology*, 9(9), pp. 1071–1081. doi: 10.2217/fmb.14.48.
- Ling, J. M., Hut, Y. W. and French, G. L. (1988) 'Evaluation of the Microbact-24E bacterial identification system', *Journal of Clinical Pathology*, 41(8), pp. 910–914. doi: 10.1136/jcp.41.8.910.
- Lolongan, R. A., Waworuntu, O. and Mintjelungan, C. N. (2016) 'Uji konsentrasi hambat minimum (KHM) ekstrak daun pacar air (*Impatiens balsamina* L.) terhadap pertumbuhan *Streptococcus mutans*', *e-GIGI*, 4(2). doi: 10.35790/eg.4.2.2016.14161.
- Ma, I., Hendrayana, M. A. and Sukrama, I. D. M. (2021) 'Antibiogram and biofilm formation among *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Sanglah General Hospital , Bali , Indonesia', 12(1), pp. 360–363. doi: 10.15562/ism.v12i1.909.
- Marhafanny, L. (2017) 'UJI KEPEKAAN ISOLAT KLINIS *Klebsiella pneumoniae* TERHADAP ANTIBIOTIK SKRIPSI', pp. 1–116.
- Miquel, S. *et al.* (2016) 'Anti-biofilm activity as a health issue', *Frontiers in Microbiology*, 7(APR), pp. 1–14. doi: 10.3389/fmicb.2016.00592.
- Nazip, M. (2006) 'Production of cellulase enzyme from', *Faculty of Chemical Engineering and Natural Resources Kolej Universiti Kejuruteraan dan Teknologi Malaysia*, (November), p. 39.
- Nazmi, M. *et al.* (2017) 'Artikel Penelitian Kejadian Infeksi Saluran Kemih oleh Bakteri *Escherichia coli* dan *Klebsiella pneumoniae* Extended Spectrum Beta Lactamase: Studi Kasus di Rumah Sakit Swasta Periode 2012-2015', *J. Kedokt Meditek*, 23(62).
- Nugraha, B. M. S. (2019) *Peran Outer Membrane Protein (OMP) 32 kDa Klebsiella pneumoniae sebagai Protein Hemagglutinin dan Adhesin*. Fakultas Kedokteran Universitas Jember.
- Nuryadi *et al.* (2017) *Dasar-Dasar Statistika Penelitian*.
- Oliveira, R. V. *et al.* (2014) '*Klebsiella pneumoniae* as a main cause of infection in nishikigoi *Cyprinus carpio* (carp) by inadequate handling', *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, 7(2), pp. 86–88.
- Pamuk, S. (2020) 'Epidemiology, pathogenesis, diagnosis and management of COVID-19', *The Turkish Journal of Ear Nose and Throat*, 30(Suppl 1), pp. 1–9. doi: 10.5606/tr-ent.2020.25338.
- Pratama, W. A. (2017) 'Anaerobic bacteremia', *Clinical Infectious Diseases*, 23(SUPPL. 1). doi: 10.1093/clinids/23.supplement_1.s97.

- Prateeksha *et al.* (2020) 'Endolichenic fungus, *Aspergillus quandricinctus* of *Usnea longissima* inhibits quorum sensing and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1', *Microbial Pathogenesis*, 140, p. 103933. doi: 10.1016/j.micpath.2019.103933.
- Pujiati, W. (2018) 'Identifikasi jamur *Aspergillus* sp pada tepung di Terigu (Studi di Pasar Legi Jombang)', p. 67.
- Purbowati, R. (2018) 'Hubungan Biofilm dengan Infeksi: Implikasi pada Kesehatan Masyarakat dan Strategi Mengontrolnya', *Jurnal Ilmiah Kedokteran Wijaya Kusuma*, 5(1), p. 1. doi: 10.30742/jikw.v5i1.1.
- Putri, M. H., Sukini and Yodong (2017) *Mikrobiologi*. Jakarta: KEMENKES.
- Rizal S (2020) 'MANFAAT ALAM DAN TUMBUHAN "SUMBER BELAJAR ANAK" DALAM PERSPEKTIF ISLAM', *CHILDHOOD EDUCATION Jurnal Pendidikan Anak Usia Dini*, 1(9), pp. 96–107.
- Ruchi, T., Sujata, B. and 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), pp. 3265–3273. doi: 10.20546/ijcmas.2018.709.405.
- Safitri, R., Fauzana, N. A. and Fauziah, P. N. (2011) 'Pembuatan Starter Inokulum Jamur *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus oligosporus* dan *Trichoderma viridae* untuk Bibit Fermentasi Kulit Pisang Kepok (*Musa balbisiana* Colla)'. Prosiding Pemanfaatan Sumber Daya Genetik Lokal.
- Sahputri, J., Lindarto, D. and Ganie, R. A. (2018) 'Hubungan Pembentukan Biofilm Oleh Bakteri Gram Negatif Dengan Resistensi Antibiotik Pada Wanita Diabetes Melitus Tipe 2', *AVERROUS: Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Malikussaleh*, 4(1), p. 50. doi: 10.29103/averrous.v4i1.804.
- Samal, S. and Das, P. K. (2018) 'Microbial Biofilms: Pathogenicity and Treatment Strategies', *Pharmatutor*, 6(1), p. 16. doi: 10.29161/pt.v6.i1.2018.16.
- Sari, M. P. and Cahyati, W. H. (2019) 'Tren Pneumonia Balita di Kota Semarang Tahun 2012-2018', *Higeia Journal Public Health*, 3(3), p. 408.
- Sarwono, J. (2006) *Metode Penelitian Kuantitatif dan Kualitatif*. 1st edn. Yogyakarta: Graha Ilmu.
- Sattar A; Sharma S (2018) 'Bacterial Pneumonia', *Pharmatutor*, 6(1), pp. 16–22.
- Setiawan, A. (2010) 'Kandungan Serat Kasar Dan Protein Kasar', *FKH UNAIR*, pp. 1–68.
- Sharma, R. *et al.* (2016) 'Escherichia coli N-Acetylglucosamine-1-Phosphate-Uridyltransferase/Glucosamine-1-Phosphate-Acetyltransferase (GlmU) Inhibitory Activity of Terreic Acid Isolated from *Aspergillus terreus*', *Journal of Biomolecular Screening*, 21(4), pp. 342–353. doi: 10.1177/1087057115625308.

- Shofiana, R. H., Sulistyowati, L. and Muhibuddin, A. (2015) 'Eksplorasi Jamur Endofit dan Khamir Pada Tanaman Cengkeh (*Syzygium aromaticum*) Serta Uji Potensi Antagonismenya Terhadap Jamur Akar Putih (*Rigidoporus microporus*)', *Jurnal HPT*, 3(1), pp. 75–83.
- Soleha, T. U. and Edwin, G. W. putri (2019) 'Pola Resistensi Cephalosporin Generasi III Dan Meropenem pada Bakteri *Klebsiella Pneumoniae* di Laboratorium Kesehatan Daerah Lampung Tahun 2017', *JK Unila*, 3(1), pp. 141–146.
- Sya'diyah, W. (2021) 'Uji Aktifitas Antibiofilm *Aspergillus oryzae* terhadap Biofilm *Klebsiella pneumoniae*'.
- Tarina NTI, K. S. (2017) 'DETEKSI BAKTERI *Klebsiella pneumoniae*', *Farmaka*, 15, pp. 119–126.
- Tyas, S. P. (2021) *Optimasi Pertumbuhan Isolat Actinomycetes (Isolat Te 235) dan Uji Aktivitas terhadap Bakteri Escherichia Coli Dan Staphylococcus Aureus*, *Angewandte Chemie International Edition*, 6(11), 951–952.
- Vuotto, C. *et al.* (2014) 'Antibiotic resistance related to biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae*', *Pathogens*, 3(3), pp. 743–758. doi: 10.3390/pathogens3030743.
- Yanuar, W., Puspitasari, I. and Nuryastuti, T. (2005) 'Outcome Pada Pasien Anak Dengan Meningitis Bakterial Di Evaluation of Definitive Antibiotik Suitability for Clinical Outcomein', *Jurnal Manajemen dan Pelayanan Farmasi*, 6, pp. 187–204.
- Zulkifli, N. A. (2015) 'Morphological and Molecular Identification of *Aspergillus* species isolated from Corn Feed in Penang', (January), p. 44.

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Etik Penelitian

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

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

Judul	Uji Aktivitas Antibakteri dan Antibiofilm <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 *Microbact System*



OXOID
MICROBACT™
 IDENTIFICATION KITS

MICROBACT™ GNB 12A/B/E, 24E

1B 016

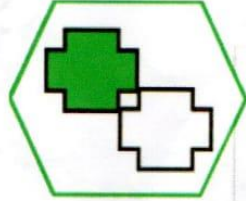
		GNB 24E											GNB 12B														
		GNB 12A / 12E																									
Oxidase	Motility	Nitrate	Lysine	Ornithine	H ₂ S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	V-P	Citrate	TDA	Gelatin	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine	
			+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-													
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	4
Sum / Suma / Summe / Somme / Somma / Sum / Summa / Soma / Αθροισμα			4			7			5			6															

Result / Resultado / Ergebnis /
 Résultat / Risultato / Resultat /
 Resultat / Resultado /
 Αποτέλεσμα

Identification / Identificación /
 Identifikation / Identification /
 Identificazione / Identifikasjon /
 Identifizierung / Identificação /
 Ταυτοποίηση

Klebsiella pneumoniae 97,74%

Lampiran 3 Identifikasi Bakteri



CV. WIYASA MANDIRI

Mitra Segali Laboratorium Kesehatan & Pendidikan
Perum Bumi Mendoroko Raya blok AJ 97 Singosari Malang
Email : wiyasamandiriAJ97@gmail.com Telp. 08125274511

LAPORAN HASIL UJI

No:016/IB /Lab.Wiyasa Mandiri /III/2021

KODE SAMPEL : 016/ IB
NAMA/JENIS SAMPEL : Isolat Bakteri
NAMA PELANGGAN : Dwi Wahyu Utami
ALAMAT : Mahasiswa FK UIN
TANGGAL PENERIMAAN : 15/03/2021
TANGGAL SELESAI ANALISA : 25/03/2021
PARAMETER ANALISA : Uji Fenotip
SPESIFIKASI METODE : Microbact System
HASIL ANALISA :

NO.	KODE SAMPEL ISOLAT	HASIL IDENTIFIKASI
1	016/IB	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

KESIMPULAN : Berdasarkan hasil identifikasi secara Fenotip, sampel Isolat Bakteri dengan kode sampel 016/IB, adalah spesies *Klebsiella pneumoniae*

CATATAN : Hasil uji ini berlaku untuk sampel yang diuji
Hasil Uji Terlampir

Malang, 25 Maret 2021
Direktur CV. Wiyasa Mandiri

Dyah Rokhmayanti, S.Si

Lampiran 4 Optical Density (OD) Pembuatan Suspensi Bakteri *K. pneumoniae*



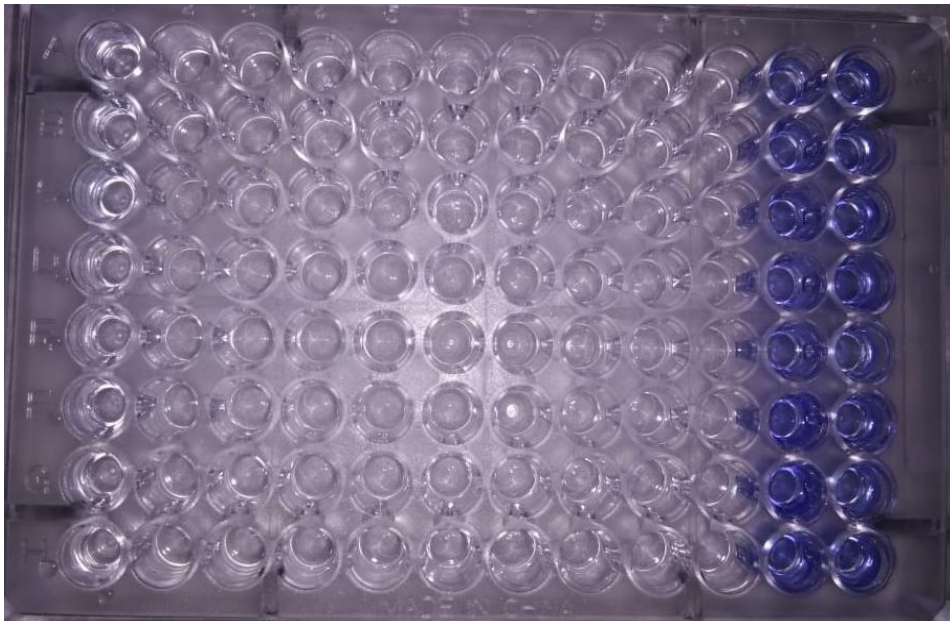
Lampiran 5 Pembuatan Suspensi Bakteri *K. pneumoniae*



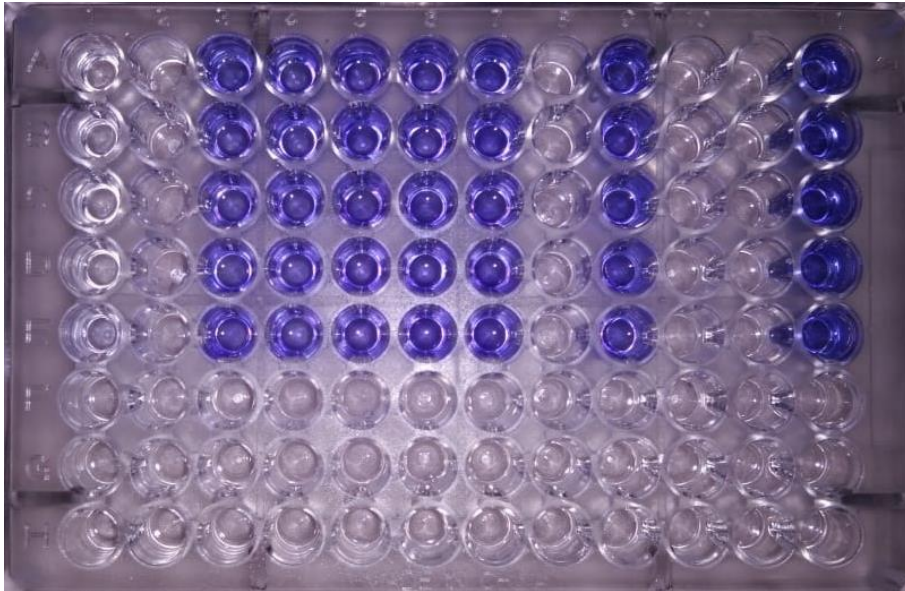
Lampiran 6 Inokulum CFS *A. terreus*



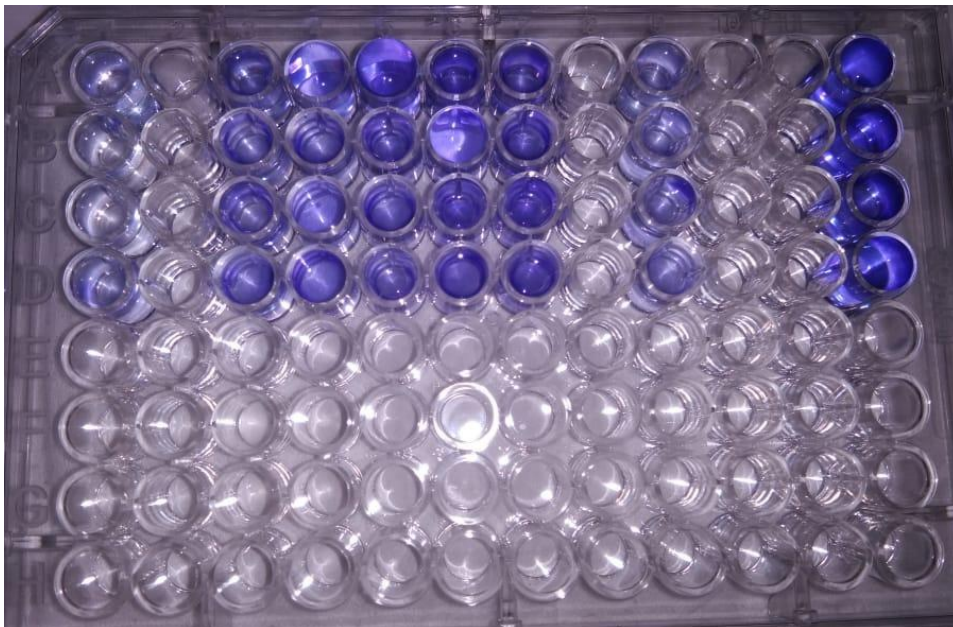
Lampiran 7 Microplate Uji Pertumbuhan Biofilm



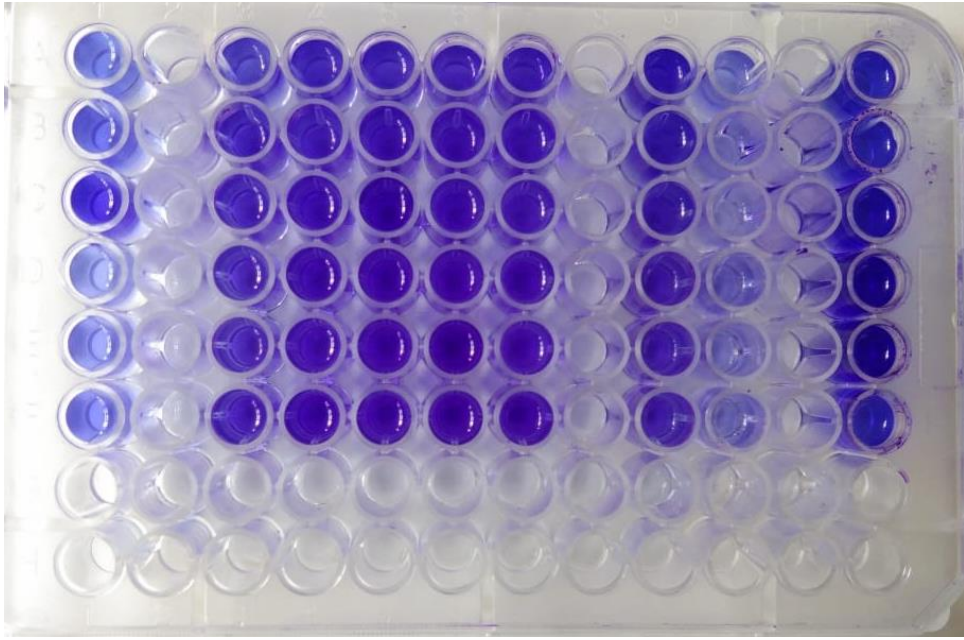
Lampiran 8 Microplate Uji Pencegahan Perlekatan Biofilm



Lampiran 9 Microplate Uji Penghambatan Pembentukan Biofilm



Lampiran 10 Microplate Uji Kerusakan/Penghancuran Biofilm



Lampiran 11 Hasil Uji Normalitas

Perlakuan		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	Df	Sig.
Pencegahan Perlekatan	KM	,208	3	.	,992	3	,826
	K+	,211	3	.	,991	3	,816
	K-	,369	3	.	,788	3	,085
	100%	,266	3	.	,952	3	,579
	50%	,217	3	.	,988	3	,792
	25%	,326	3	.	,874	3	,306
	12,50 %	,286	3	.	,931	3	,493
	6,25%	,338	3	.	,852	3	,245
Penghambatan Pembentukan	KM	,288	3	.	,928	3	,481
	K+	,349	3	.	,832	3	,194
	K-	,190	3	.	,998	3	,905
	100%	,251	3	.	,966	3	,647
	50%	,241	3	.	,974	3	,688
	25%	,247	3	.	,969	3	,664
	12,50 %	,350	3	.	,830	3	,188
	6,25%	,192	3	.	,997	3	,893
Kerusakan/ Penghancuran	KM	,347	3	.	,835	3	,200
	K+	,305	3	.	,906	3	,405
	K-	,293	3	.	,922	3	,459
	100%	,180	3	.	,999	3	,944
	50%	,273	3	.	,945	3	,550
	25%	,327	3	.	,872	3	,302
	12,50 %	,343	3	.	,844	3	,224
	6,25%	,314	3	.	,892	3	,362

a. Lilliefors Significance Correction

Lampiran 12 Hasil Uji Homogenitas

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Pencegahan Perlekatan	4,810	7	16	,074
Penghambatan Pembentukan	2,396	7	16	,070
Kerusakan/Penghancuran	2,303	7	16	,079

Lampiran 13 Hasil Uji One Way ANNOVA

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Pencegahan Perlekatan	Between Groups	4,910	7	,701	7,594	,000
	Within Groups	1,478	16	,092		
	Total	6,387	23			
Penghambatan Pembentukan	Between Groups	4,959	7	,708	77,488	,000
	Within Groups	,146	16	,009		
	Total	5,106	23			
Kerusakan/ Penghancuran	Between Groups	14,523	7	2,075	17,985	,000
	Within Groups	1,846	16	,115		
	Total	16,368	23			

Lampiran 14 Hasil Uji Korelasi

Correlations

		Perlakuan	Pencegahan Perlekatan	Penghambatan Pembentukan	Kerusakan/ Penghancuran
Perlakuan	Pearson Correlation	1	,770**	,503*	,650**
	Sig. (2-tailed)		,000	,012	,001
	N	24	24	24	24
Pencegahan Perlekatan	Pearson Correlation	,770**	1	,668**	,746**
	Sig. (2-tailed)	,000		,000	,000
	N	24	24	24	24
Penghambatan Pembentukan	Pearson Correlation	,503*	,668**	1	,888**
	Sig. (2-tailed)	,012	,000		,000
	N	24	24	24	24
Kerusakan/ Penghancuran	Pearson Correlation	,650**	,746**	,888**	1
	Sig. (2-tailed)	,001	,000	,000	
	N	24	24	24	24