

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

SKRIPSI

Oleh:

ABDURROHMAN BAGUS ASY'ARI

NIM. 18910001



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

2022

**UJI AKTIVITAS ANTIBIOFILM *Aspergillus terreus*
TERHADAP BIOFILM *Streptococcus 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:

ABDURROHMAN BAGUS ASY'ARI

NIM. 18910001

**PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK
IBRAHIM
MALANG
2022**

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

SKRIPSI

Oleh:

ABDURROHMAN BAGUS ASY'ARI

NIM. 18910001

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji :

Tanggal : 19 Desember 2022

Pembimbing I,



Dr. dr. Lailia Nur Rachma, M.Biomed
NIP. 198406232011012009

Pembimbing II



dr. Doby Indrawan, MMRS
NIDT. 19781001201701011113

Mengetahui,

Ketua Program Studi Pendidikan Dokter



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

SKRIPSI

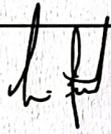
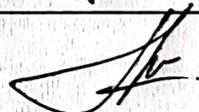
Oleh:

ABDURROHMAN BAGUS ASY'ARI

NIM. 18910001

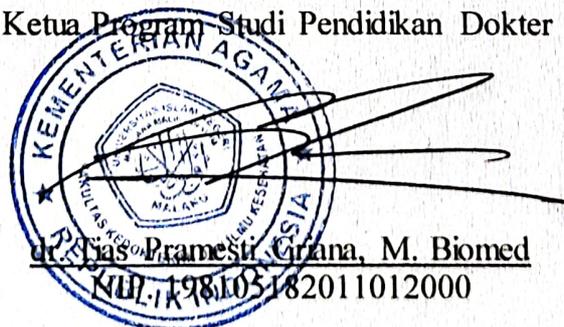
Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
dan Dinyatakan Diterima sebagai Salah Satu Persyaratan
untuk Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran (S.Ked)

Tanggal 19 Desember 2022

Penguji Utama	<u>dr. Alvi Milliana, M.Biomed.</u> NIP. 198204042011012011	
Ketua Penguji	<u>dr. Doby Indrawan, MMRS.</u> NIDT. 19781001201701011113	
Sekretaris Penguji	<u>Dr. dr. Lailia Nur Rachma,</u> <u>M.Biomed.</u> NIP. 198406232011012009	
Penguji Integrasi	<u>dr. M. Rizal Novianto, MHPE</u> NIP. 198511022019031006	

Mengesahkan,

Ketua Program Studi Pendidikan Dokter



dr. Gas Pramesti, Grana, M. Biomed
NIP. 198105182011012000

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Abdurrohman Bagus Asy'ari

NIM : 18910001

Program Studi : Pendidikan Dokter

Fakultas : Kedokteran dan Ilmu Kesehatan

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya 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, 28 Desember 2022



Abdurrohman Bagus Asy'ari

NIM. 18910001

KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Allah SWT berkat Rahmat, Hidayah, dan Karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “UJI AKTIVITAS ANTIBIOFILM *Aspergillus terreus* TERHADAP BIOFILM *Streptococcus pneumoniae*”. Laporan skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk mengerjakan skripsi pada program Strata-1 di Jurusan Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Penulis menyadari dalam penyusunan skripsi ini tidak akan selesai tanpa bantuan dari berbagai pihak. Karena itu pada kesempatan ini kami ingin mengucapkan terima kasih kepada:

- 1) 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) Dr. dr.Lailia Nur Rachma, M.Biomed selaku pembimbing I skripsi yang telah membimbing dengan baik dalam penyusunan tugas akhir.
- 4) dr. Doby Indrawan, MMRS selaku pembimbing II dan dosen pembimbing akademik yang telah memberikan arahan dan dukungan.
- 5) dr. Alvi Milliana, M.Biomed, selaku dosen penguji utama skripsi.
- 6) Seluruh civitas akademika Program Studi Pendidikan Dokter, terutama seluruh dosen dan laboran terimakasih atas segenap ilmunya.
- 7) Kepada orang tua, dan kakak saya, yang telah membantu secara keuangan dan doanya sehingga saya bisa bertahan hingga sekarang.

8) Kepada Asisten Laboratorium Dr. dr. Lailia Nur Rachma yaitu kak Balqis Hanun Hanifah yang telah membantu dalam melakukan penelitian.

9) Semua pihak yang ikut membantu dalam menyelesaikan proposal skripsi ini baik berupa moril maupun materil.

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

Malang, 28 Desember 2022



Abdurrohman Bagus Asy'ari

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
ABSTRAK	xii
BAB I	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 Penelitian	5
1.3.1 Tujuan Umum Penelitian	5
1.3.2 Tujuan Khusus Penelitian	6
1.4 Manfaat Penelitian	6
1.4.1 Manfaat Akademis	6
1.4.2 Manfaat Aplikatif	6
BAB II	7
2.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i>	7
2.1.1 Taksonomi <i>Streptococcus pneumoniae</i>	7
2.1.2 Karakteristik <i>Streptococcus pneumoniae</i>	7
2.1.3 Faktor Virulensi <i>Streptococcus pneumoniae</i>	8
2.1.4 Identifikasi <i>Streptococcus pneumoniae</i>	11
2.1.5 Manifestasi Klinis Akibat <i>Streptococcus pneumoniae</i>	18
2.2 Biofilm.....	21
2.2.1 Definisi Biofilm.....	21
2.2.3 Mekanisme Pembentukan Biofilm.....	23
2.2.4 <i>Quorum Sensing</i>	25
2.2.5 Biofilm dan <i>Quorum Sensing Streptococcus pneumoniae</i>	26
2.2.6 Uji Pembentukan Biofilm	28
2.3 <i>Aspergillus terreus</i>	33
2.3.1 Taksonomi <i>Aspergillus terreus</i>	33
2.3.2 Karakteristik <i>Aspergillus terreus</i>	33

2.3.3	Kandungan Fungi <i>Aspergillus terreus</i>	34
2.3.4	<i>Aspergillus terreus</i> sebagai Antibakteri dan Antibiofilm.....	35
2.4	Antibiofilm.....	36
2.4.1.	Definisi Antibiofilm.....	36
2.4.2	Mekanisme Antibiofilm.....	36
2.5	Kerangka Teori.....	38
BAB III	41
3.1	Kerangka Konsep Penelitian.....	41
3.2	Hipotesis Penelitian.....	43
BAB IV	44
4.1	Desain Penelitian.....	44
4.2	Lokasi dan Waktu Penelitian.....	44
4.3	Variabel Penelitian.....	44
4.3.1	Variabel bebas.....	44
4.3.2	Variabel Terikat.....	45
4.4	Populasi dan Sampel Penelitian.....	45
4.5	Jumlah Pengulangan.....	45
4.6	Alat dan Bahan Penelitian.....	46
4.6.1	Alat Penelitian.....	46
4.6.2	Bahan Penelitian.....	46
4.7	Kriteria Inklusi dan Eksklusi.....	47
4.7.1	Kriteria Inklusi.....	47
4.7.2	Kriteria Eksklusi.....	48
4.8	Definisi Operasional.....	49
4.9	Prosedur Penelitian.....	51
4.9.1	Penyiapan Jamur.....	51
4.9.1.1	Identifikasi <i>Aspergillus terreus</i>	51
4.9.1.2	Pembuatan Media Petumbuhan <i>Aspergillus terreus</i>	51
4.9.1.3	Pembuatan CFS / Supernatan <i>Aspergillus terreus</i>	51
4.9.2	Penyiapan Bakteri.....	52
4.9.3	Uji Aktifitas Biofilm <i>Aspergillus terreus</i> terhadap <i>Streptococcus pneumoniae</i>	56
4.10	Alur Penelitian.....	61
4.11	Analisis Data.....	62
BAB V	63
HASIL	63
5.1	Hasil Uji Karakteristik <i>Aspergillus terreus</i>	63
5.1.1	Hasil Uji Makroskopis <i>Aspergillus terreus</i>	63

5.1.2	Hasil Uji Mikroskopis <i>Aspergillus terreus</i>	63
5.1.3	Hasil Uji Karakteristik <i>Streptococcus pneumoniae</i>	64
5.2	Hasil Uji Pertumbuhan Biofilm <i>Streptococcus pneumoniae</i>	65
5.3	Hasil Uji Pencegahan Perlekatan Biofilm <i>Streptococcus pneumoniae</i>	66
5.4	Hasil Uji Penghambatan Pembentukan Biofilm <i>Streptococcus pneumoniae</i>	67
5.5	Hasil Uji Penghancuran Biofilm <i>Streptococcus pneumoniae</i>	69
5.6	Hasil Uji Analisis Data	71
5.7.1	Hasil Uji Normalitas dan Homogenitas.....	71
5.7.2	Hasil Uji <i>One Way Anova</i> dan <i>Kruskal-Wallis</i>	72
5.7.3	Hasil Uji <i>Mann-Whitney U</i> dan <i>Post Hoc</i>	72
5.7.4	Hasil Uji Korelasi	74
BAB VI	77
6.1	Identifikasi <i>Aspergillus terreus</i>	77
6.2	Identifikasi <i>Streptococcus pneumoniae</i>	77
6.3	Uji Aktivitas Antibiofilm <i>Aspergillus terreus</i> terhadap Pencegahan Perlekatan Biofilm <i>Streptococcus pneumoniae</i>	78
6.4	Uji Aktivitas Antibiofilm <i>Aspergillus terreus</i> terhadap Penghambatan Pembentukan Biofilm <i>Streptococcus pneumoniae</i>	80
6.5	Uji Aktivitas Antibiofilm <i>Aspergillus terreus</i> terhadap Penghancuran Biofilm <i>Streptococcus pneumoniae</i>	82
6.6	Integrasi Islam	85
BAB VII	87
7.1	Kesimpulan	87
7.2	Saran.....	87
DAFTAR PUSTAKA	89
DAFTAR LAMPIRAN	96
	Lampiran 1 Surat Etik Penelitian	96
	Lampiran 2 Mikroplate Uji Pertumbuhan Biofilm	97
	Lampiran 3 Hasil SPSS Uji Norma litas dan Homogenitas	97
	Lampiran 4 Hasil SPSS Uji <i>Kruskal Wallis</i>	98
	Lampiran 5 Hasil SPSS Uji <i>One Way Anova</i>	98
	Lampiran 6 Hasil SPSS Uji <i>Post Hoc Tukey</i>	98
	Lampiran 7 Hasil SPSS Uji <i>Mann Whitney U</i>	100
	Lampiran 8 Hasil SPSS Uji Korelasi <i>Spearman</i>	100
	Lampiran 9 Hasil SPSS Uji Korelasi <i>Pearson</i>	101

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Interpretasi dari metode <i>Congo Red Agar</i> (CRA)	28
Tabel 2.2 Interpretasi Metode Tabung	30
Tabel 2.3 Interpretasi bakteri pembentuk biofilm pada metode <i>Tissue Culture Plate</i> (TCP)	32
Tabel 4.1 Interpretasi/hasil Kekuatan Bakteri yang Membentuk Biofilm	56
Tabel 5.1 Hasil uji pertumbuhan biofilm <i>S. pneumoniae</i>	65
Tabel 5.2 Hasil Uji Normalitas dan Homogenitas	71
Tabel 5.3 Hasil Uji <i>Mann-Whitney U</i> Pencegahan Perlekatan Biofilm <i>S. pneumoniae</i>	73
Tabel 5.4 Hasil Uji <i>Post Hoc Tukey HSD</i> Penghambatan Pertumbuhan Biofilm <i>S. pneumoniae</i>	73
Tabel 5.5 Hasil Uji <i>Post Hoc Tukey HSD</i> Penghancuran Biofilm <i>S. pneumoniae</i>	74
Tabel 5.6 Derajat Hubungan Uji Korelasi	75

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Faktor Virulensi Bakteri <i>S. pneumoniae</i>	11
Gambar 2.2 Struktur Dinding Sel Bakteri.	12
Gambar 2.3 Pengecatan Gram <i>S. pneumoniae</i>	12
Gambar 2.4 Zona <i>alpha hemolysis</i> (Hijau).....	13
Gambar 2.5 Koloni <i>S. pneumoniae</i>	14
Gambar 2.6 Katalase Negatif pada Bakteri <i>S. pneumoniae</i>	15
Gambar 2.7 Uji <i>Optochin</i>	16
Gambar 2.8 Uji <i>Bile Solubility</i>	17
Gambar 2. 9 Uji reaksi <i>quellung</i>	18
Gambar 2.10 Struktur Pembentuk Biofilm.	23
Gambar 2.11 Tahap Pembentukan Biofilm secara Umum.	24
Gambar 2.13 Siklus Hidup Pembentukan Biofilm pada <i>Streptococci</i>	27
Gambar 2.14 Plate CRA.	29
Gambar 2.15 Interpretasi Metode Tabung.....	30
Gambar 2.16 Uji Biofilm dengan Metode <i>Tissue Culture Plate</i> (TCP).	32
Gambar 2. 17 Makroskopis dan Mikroskopis <i>A. terreus</i>	34
Gambar 4.1 Metode Pewarnaan Gram.....	53
Gambar 5.1 Hasil Identifikasi Makroskopis <i>A. terreus</i>	63
Gambar 5. 2 Perbesaran 400x. A menunjukkan stipes, B menunjukkan vesikel dan C menunjukkan konidiospora.....	64
Gambar 5.3 Hasil uji pewarnaan Gram <i>S. pneumoniae</i>	65
Gambar 5.4 Hasil Uji Pencegahan Perlekatan Biofilm <i>S. pneumoniae</i>	67
Gambar 5.5 Hasil Presentase Aktivitas Pencegahan Perlekatan Biofilm <i>S. pneumoniae</i>	67
Gambar 5.6 Hasil Uji Penghambatan Pembentukan Biofilm <i>S. pneumoniae</i>	68
Gambar 5.7 Hasil Persentase Aktivitas Penghambatan Pembentukan Biofilm <i>S. pneumoniae</i>	69
Gambar 5.8 Hasil Uji Penghancuran Biofilm <i>S. pneumoniae</i>	70
Gambar 5. 9 Hasil presentase Aktivitas Penghancuran Biofilm <i>S. pneumoniae</i> ..	70

ABSTRAK

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

Abdurrohman Bagus Asy'ari, Lailia Nur Rachma, Doby Indrawan

Biofilm adalah kumpulan sel mikroorganisme khususnya bakteri yang dapat menempel pada permukaan biologis atau benda mati dan diselubungi oleh matriks eksopolisakarida. Matriks eksopolisakarida berfungsi melindungi bakteri dari mekanisme imun penjamu. *Streptococcus pneumoniae* merupakan bakteri Gram positif yang mampu membentuk biofilm. Pembentukan biofilm bakteri terdiri dari 5 tahap, yaitu perlekatan sel, adhesi sel ke sel yang lain, proliferasi dan pertumbuhan sel, pematangan sel, serta pelepasan dan penyebaran sel. Penghambatan biofilm saat ini banyak memanfaatkan bahan alam. Salah satu bahan alam yang belum banyak diteliti adalah golongan jamur. Jamur *Aspergillus* diyakini memiliki metabolit sekunder yang bersifat antimikroba salah satunya *Aspergillus terreus*. *Aspergillus terreus* mampu memproduksi *terreic acid*, enzim selulase, dan protease yang bersifat antimikroba. Akan tetapi potensi *A. terreus* dalam menghambat biofilm belum diteliti. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibiofilm *A. terreus* terhadap biofilm *S. pneumoniae*. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah TCP (*Tissue Culture Plate*) dalam *microplate*. Terdapat 6 kelompok perlakuan dengan kategori 5 kelompok uji dan satu kelompok kontrol negatif. Masing-masing dari kelompok tersebut adalah 4 kali pengulangan. Konsentrasi yang digunakan pada CFS *A. terreus* adalah 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, dan 3,12%. Uji antibiofilm yang diteliti adalah uji pencegahan perlekatan biofilm, uji penghambatan pertumbuhan biofilm, dan uji penghancuran biofilm. Hasil penelitian diperoleh *A. terreus* mempunyai aktivitas antibiofilm yang kuat terhadap biofilm *S. pneumoniae*. Aktivitas tertinggi dalam mencegah perlekatan, menghambat pertumbuhan, dan menghancurkan biofilm *S. pneumoniae* adalah pada konsentrasi CFS 50%. Hasil konsentrasi tersebut masing-masing sebesar 49,76%, 55,25%, dan 44,40%.

Kata Kunci: Biofilm, Antibiofilm, *Streptococcus pneumoniae*, CFS, *Aspergillus terreus*

ABSTRACT

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

Abdurrohman Bagus Asy'ari, Lailia Nur Rachma, Doby Indrawan

Biofilm is a group of microorganisms, especially bacteria, that adheres to abiotic and biotic surfaces. It is enveloped in a matrix called exopolysaccharide. Exopolysaccharide matrix works to protect the bacteria from the host's immune system. *Streptococcus pneumoniae* is a Gram-positive bacterium that can form biofilm. The formation of biofilm includes 5 phases, which are cell adhesion, cells adhering to one another, cell proliferation and growth, cell maturation, and cell dispersion. At the time of this research, biofilm inhibition often uses natural compounds. One of the natural compounds that haven't been studied fully is the fungi. *Aspergillus* fungi is believed to contain secondary metabolites which has antimicrobial properties, one of those fungi is the *Aspergillus terreus*. *Aspergillus terreus* produces terreic acid, cellulase enzyme, and protease enzyme which have microbial properties. However, the potential of *A. terreus* in inhibiting biofilm hasn't been studied at the time of this research. The purpose of this study is to analyze the antibiofilm activity of *A. terreus* against *S. pneumoniae*. The method used in this study is the Tissue Culture Plate (TCP) in a microplate. There are 6 groups which include 5 experimental groups and 1 negative control. Each groups is repeated 4 times. The concentration of *A. terreus* CFS used are 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, and 3,12%. The antibiofilm tests used in this study are the adhesion prevention test, the biofilm formation inhibition test, and biofilm destruction test. The results of this study show that *A. terreus* has antibiofilm activity against *S. pneumoniae*. The highest percentage from the adhesion prevention test, the biofilm formation inhibition test, and biofilm destruction test are from the 50% CFS group, with an activity of 49,76%, 55,25%, and 44,40%, respectively.

Keywords: Biofilm, Antibiofilm, *Streptococcus pneumoniae*, CFS, *Aspergillus terreus*

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar belakang

Pneumonia merupakan infeksi saluran nafas yang mengenai parenkim paru dan merupakan penyebab utama morbiditas serta mortalitas pada bayi dan anak di seluruh dunia (WHO, 2017). Menurut WHO tahun 2017, pneumonia menyebabkan kematian pada anak dibawah usia lima tahun sebanyak 5,5 juta di dunia. Menurut Kemenkes RI (2020), prevalensi pneumonia pada anak di bawah usia lima tahun pada tahun 2009 berkisar 25,9% sedangkan pada tahun 2019 mencapai 52,9%. Pernyataan tersebut menunjukkan adanya peningkatan jumlah pneumonia di Indonesia (Kemenkes RI, 2020).

Streptococcus pneumoniae merupakan salah satu bakteri penyebab pneumonia. *S. pneumoniae* tergolong flora normal pada traktus respiratorius, Akan tetapi bakteri ini dapat menjadi patogen dimana penyebarannya melalui kontak langsung dengan sekret pernafasan. Selain itu, bakteri ini menyebar melalui autoinokulasi dari pasien (CDC, 2017; Sari *et al.*, 2020). *S. pneumoniae* adalah bakteri Gram positif, berantai pendek, memiliki ukuran 0,5-1,25 μm , berkapsul, non motil dan tidak membentuk spora. *S. pneumoniae* termasuk bakteri anaerob fakultatif (Soedarto, 2015; Mahato *et al.*, 2019; Britannica, 2022).

S. pneumoniae mempunyai faktor virulensi berupa pili yang panjang dan memiliki kemampuan untuk melakukan adhesi serta kolonisasi. Protein adhesin yang terdapat pada pili diduga sebagai faktor virulensi dalam proses

terjadinya infeksi (Mufida *et al.*, 2020). Selain itu, faktor virulensi dari *S. pneumoniae* adalah kemampuan untuk membentuk biofilm. Biofilm *S. pneumoniae* disatukan oleh matriks ekstraseluler yang terdiri dari DNA, protein dan polisakarida. Matriks ekstraseluler tersebut memiliki berbagai zat polimer ekstraseluler yang menyebabkan resistensi antimikroba di nasofaring (Chao *et al.*, 2014). Adapun biofilm *S. pneumoniae* terbentuk di permukaan abiotik seperti perangkat medis atau pada permukaan biologis seperti lapisan epitel dan permukaan mukosa (Chao Y, Bergenfelz C, 2019).

Biofilm adalah kumpulan sel mikroorganisme khususnya bakteri yang dapat menempel pada permukaan biologis atau benda mati. Biofilm tersebut diselimuti oleh matriks yang diproduksi oleh koloni bakteri. Biofilm ini terbungkus di dalam suatu matriks yang dinamakan eksopolisakarida. Bakteri yang ada di dalam matriks eksopolisakarida dapat terlindung dari mekanisme imun penjamu (Adelberg, Jawetz, 2017; Mundiri *et al.*, 2020). Untuk membentuk biofilm, bakteri melewati beberapa tahapan, diantaranya perlekatan sel, adhesi sel ke sel yang lain, proliferasi dan pertumbuhan sel, pematangan sel, serta pelepasan dan penyebaran sel (Samal & Das, 2018).

Mekanisme komunikasi antar bakteri atau quorum sensing diperlukan untuk membentuk biofilm. Mekanisme tersebut dapat teraktivasi ketika dalam kondisi stress lingkungan, antara lain antibiotik, kekurangan nutrisi dan lain-lain. Dengan adanya biofilm, bakteri dapat menghindari pertahanan seperti fagositosis, melawan agen antimikroba, dan penyebaran gen lebih ganas (Samal & Das, 2018). Karena adanya pembentukan biofilm oleh bakteri *S. pneumoniae*, maka efek yang dihasilkan ialah menyebabkan terjadinya

resistensi antibiotik. *S. pneumoniae* mengalami resistensi antibiotik terhadap beta-laktam, makrolida, lincosamides, fluoroquinolones, tetracyclines, dan trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP-SMX) (Cherazard R *et al.*, 2017). Resistensi yang ditimbulkan mengakibatkan tatalaksana menjadi sulit. Oleh karena itu, banyak peneliti yang tertarik dengan bahan alam yang telah disediakan oleh Allah SWT.

Dalam sebuah hadits shahih Riwayat Abu Dawud:

إِنَّ اللَّهَ أَنْزَلَ الدَّاءَ وَالتَّوَاءَ وَجَعَلَ لِكُلِّ دَاءٍ نَوَاءً فَتَدَاوُوا وَلَا تَدَاوُوا بِحَرَامٍ

Artinya: "Sesungguhnya Allah telah menurunkan penyakit dan obatnya, demikian pula Allah menjadikan bagi setiap penyakit ada obatnya. Maka berobatlah kalian dan janganlah berobat dengan yang haram." (HR. Abu Dawud). Dalam Hadist tersebut disebutkan bahwa seorang Muslim dianjurkan mengobati penyakitnya. Sebab, diturunkannya penyakit oleh Allah SWT manusia dianjurkan menemukan obat yang tepat untuk menyembuhkan penyakit tersebut. Selain itu, Allah memerintahkan kita untuk mengonsumsi makanan dan minuman yang halal.

Allah SWT berfirman pada Surah Taa Haa ayat 53 yang artinya "Allah 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 tumbuh-tumbuhan.". Ayat Al-Quran ini berisi perintah kepada manusia untuk memperhatikan bahan-bahan alam yang telah Allah

ciptakan. Oleh karena itu, pengembangan obat berbasis bahan alam ialah salah satu cara untuk mendapatkan obat yang berpotensi memiliki aktivitas sebagai antibiofilm.

Saat ini, para peneliti banyak melakukan penelitian terhadap bahan alam yang mempunyai aktivitas sebagai antibiofilm. Bahan alam ini diantaranya adalah dari golongan *Aspergillus*. *Aspergillus* merupakan fungi dari subfilum *Pezizomycotina* (Zulkifli, 2015). *Aspergillus* ini termasuk mikroorganisme eukariot yang diakui sebagai salah satu organisme hidup yang daerah penyebarannya paling luas dan berlimpah di alam. Selain itu, jamur ini mampu hidup di daerah tropis maupun subtropis. *Aspergillus* juga sering ditemukan di berbagai habitat, umumnya di saprofit tanah, produk pakan dan makanan yang disimpan (Andriani, 2019).

Salah satu jenis *Aspergillus* yang terdapat di alam adalah *Aspergillus terreus*. *Aspergillus terreus* tersebut tersebar luas di seluruh dunia yang terdapat dalam tanah subur. Jamur ini telah diisolasi dari jagung, padi, rempah-rempah, rhizosfer gandum, kapas, biji-bijian, dan lain-lain. Bahan isolasi tersebut dapat ditemukan didalam gudang yang telah disimpan dalam waktu yang lama. *Aspergillus terreus* memiliki koloni konidia, berwarna putih, dan halus. *Aspergillus terreus* termasuk jamur selulolitik yang dapat menghasilkan enzim hidrolitik seperti selulase, amilase, lipase, pektinase dan proteinase (Lass-Flörl, 2018; Setiawan, 2010). Selain senyawa aktif yang telah disebutkan, *A. terreus* memiliki senyawa metabolit sekunder. Metabolit sekunder memiliki fungsi pertahanan diri dari lingkungan yang tidak menguntungkan (Verpoorte and Alferman, 2000). Pada era sekarang,

senyawa ini dijadikan pengembangan obat-obatan, peptisida, antibakteri dan sebagainya. Pada hasil studi sebelumnya, suatu senyawa metabolit tersebut bernama *terreic acid* memiliki efek penghambatan biofilm terhadap *E. coli* (Sharma *et al.*, 2016).

Berdasarkan kandungan *A. terreus* yang dapat menghambat biofilm, maka peneliti ingin melakukan penelitian yang berjudul potensi antibiofilm *A. terreus* terhadap biofilm *S. pneumoniae*.

1.2 Rumusan Masalah Penelitian

1.2.1 Rumusan Masalah Umum Penelitian

Apakah terdapat aktivitas antibiofilm *Aspergillus terreus* terhadap biofilm *Streptococcus pneumoniae*?

1.2.2 Rumusan Masalah Khusus Penelitian

1.2.2.1 Apakah CFS *Aspergillus terreus* mampu mencegah perlekatan biofilm *Streptococcus pneumoniae*?

1.2.2.2 Apakah CFS *Aspergillus terreus* mampu menghambat pertumbuhan biofilm *Streptococcus pneumoniae*?

1.2.2.3 Apakah CFS *Aspergillus terreus* mampu menghancurkan biofilm *Streptococcus pneumoniae*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum Penelitian

Untuk mengetahui aktivitas antibiofilm *Aspergillus terreus* terhadap biofilm *Streptococcus pneumoniae*.

1.3.2 Tujuan Khusus Penelitian

1.3.2.1 Untuk membuktikan kemampuan CFS *Aspergillus terreus* dalam mencegah perlekatan biofilm *Streptococcus pneumoniae*.

1.3.2.2 Untuk membuktikan kemampuan CFS *Aspergillus terreus* dalam menghambat pertumbuhan biofilm *Streptococcus pneumoniae*.

1.3.2.3 Untuk membuktikan kemampuan CFS *Aspergillus terreus* dalam menghancurkan biofilm *Streptococcus pneumoniae*.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademis

1.4.1.1 Penelitian ini dapat menjadi tambahan pengetahuan mengenai aktivitas antibiofilm *Aspergillus terreus* terhadap biofilm *Streptococcus pneumoniae*.

1.4.1.2 Penelitian ini dapat menjadi sumber literatur dalam perkembangan ilmu kesehatan selanjutnya.

1.4.2 Manfaat Aplikatif

1.4.2.1 Penelitian ini dapat dijadikan referensi guna mewujudkan program streategi terkait bahan potensi antibiofilm *Aspergillus terreus*.

1.4.2.2 Memberikan pilihan obat alternatif pengobatan farmakologi dalam mengatasi resistensi bakteri *Streptococcus pneumoniae*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Streptococcus pneumoniae*

2.1.1 Taksonomi *Streptococcus pneumoniae*

Taksonomi *Streptococcus pneumoniae* diklasifikasikan sebagai berikut (Jawetz *et al.*, 2005).

Kingdom	: <i>Bacteria</i>
Filum	: <i>Firmicutes</i>
Kelas	: <i>Diplococcic</i>
Ordo	: <i>Lactobacillales</i>
Familia	: <i>Streptococaceae</i>
Genus	: <i>Streptococcus</i>
Spesies	: <i>Streptococcus pneumoniae</i>

2.1.2 Karakteristik *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae atau *pneumokokus* bersifat Gram-positif yang berbentuk kokus berpasangan (diplokokus atau rantai pendek). Dalam pewarnaan Gram bakteri bewarna ungu dan bulat. Bakteri ini tersusun berukuran diameter antara 0,5 dan 1,25 μm . Bakteri bersifat non-motil, tidak berspora, tumbuh secara aerob dan anaerob fakultatif. Sama seperti *Streptococcus* yang lain, *S. pneumoniae* tidak mempunyai enzim katalase tetapi dapat memfermentasi glukosa menjadi asam laktat. *S. pneumoniae* hidup pada saluran pernafasan atas yang merupakan mikroflora normal pada manusia. Bakteri ini tumbuh pada suhu 30° - 35° C. Pertumbuhan optimal

didalam media adalah pH netral berkisar antara 7,6 – 7,8 (Waluyo, 2016; Maulidyna, 2018).

2.1.3 Faktor Virulensi *Streptococcus pneumoniae*

Beberapa faktor virulensi pneumokokus telah diidentifikasi, namun sedikit yang diketahui tentang penyakit yang mendasar dan bagaimana faktor tersebut diekspresikan selama perkembangan penyakit. *S. pneumoniae* menghiasi permukaannya dengan filamen multimerik panjang yang dikenal sebagai pili yang terdiri dari subunit yang terhubung secara kovalen. Meskipun fungsi biologisnya belum sepenuhnya dijelaskan, pili *pneumokokus* telah dikaitkan dengan virulensi dan kemampuan mikroorganisme untuk lebih melekat pada sel epitel dan menempati nasofaring (de Angelis, 2011).

Menurut Brooks & Mias (2018), *S. pneumoniae* menghasilkan racun yang berbahaya bagi inangnya. Faktor virulensinya bekerja dengan menghambat respon sistem kekebalan tubuh, menghindari mekanisme pertahanan, atau dengan kontak langsung dengan jaringan tubuh dan mengganggu aktivasi sistem kekebalan tubuh. Berikut ini beberapa faktor virulensi utama *S. pneumoniae* Menurut Brooks & Mias (2018) adalah:

a. Kapsul polisakarida

Kapsul ini membantu bakteri menempel pada inang yang menyebabkan peradangan dan terlindung dari sistem imun. Adapun variasi serotipe *S. pneumoniae* yang dicirikan oleh polisakarida di lapisan luar kapsul seperti serotipe tiga mengakibatkan infeksi berat serta memiliki kematian yang tinggi. Kapsul polisakarida dapat

mengalami peralihan serotipe pada strain *S. pneumoniae* sehingga resisten terhadap antibiotik dan virulensi bakteri semakin meningkat.

b. *Lipoteichoic acid*

Lipoteichoic acid merupakan komponen dinding sel *S. pneumoniae*. Dinding sel ini berperan penting dikarenakan memberikan perlindungan serta membentuk sel.

c. *Pneumolysin*

Pneumolysin dilepaskan sebagai hasil dari lisis sel serta beracun bagi sel inang. *Pneumolysin* mengikat membran yang mengandung kolesterol, dan membentuk pori-pori yang kemudian menyebabkan lisis sel inang. Selain menyebabkan lisis sel, *pneumolysin* berperan dalam mendorong pembentukan biofilm.

d. *Autolysin*

Enzim ini terlibat dalam autolisis bakteri yang menghasilkan pelepasan *pneumolysin*, asam *teichoic*, dan komponen lain dari dalam sel. Contohnya adalah lytic amidase (LytA). *Autolysin* akan meningkatkan kolonisasi sel nasofaring karena pelepasan racun seperti *pneumolysin* selama destruksi/penghancuran dinding sel.

e. *Pneumococcal surface proteins*

Streptococcus pneumoniae memiliki berbagai macam protein yang terpapar pada permukaan. Dalam patogenesis *Pneumococcal surface proteins*, bertindak sebagai perekat untuk sel inang dan menghambat sistem kekebalan inang. *Pneumococcal surface proteins* dikategorikan menjadi empat kelompok, yaitu CBPs,

lipoprotein, protein non-klasik, dan protein yang memiliki motif LPXTG (X mewakili asam amino apa pun) dan dapat terikat secara kovalen melalui pembelahan sortase pada motif.

f. Pili

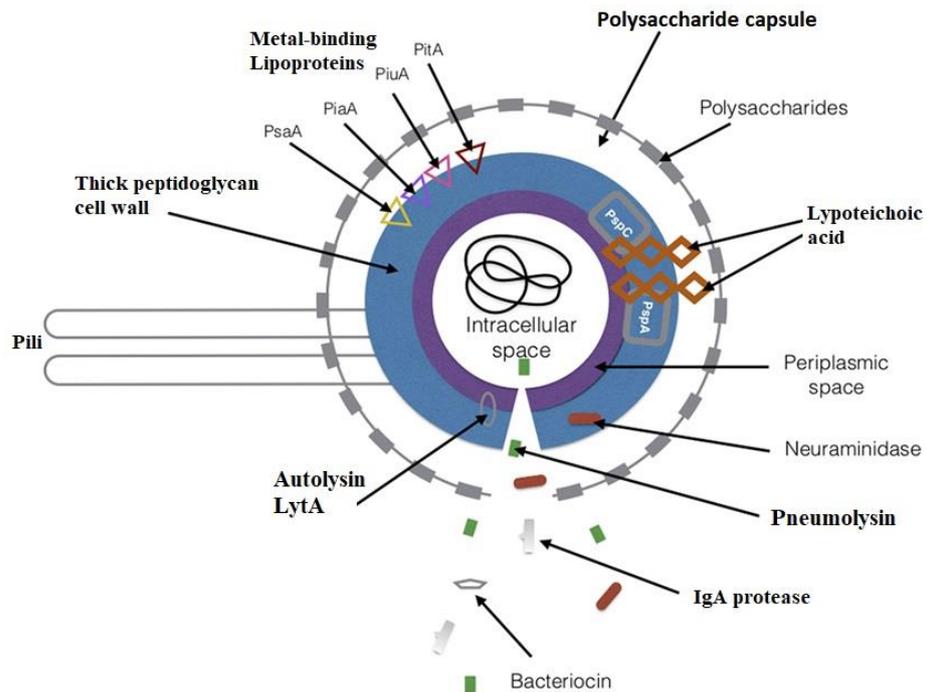
Pili berfungsi membantu perlekatan bakteri *S. pneumoniae* serta kolonisasi sel epitel di dalam nasofaring dan paru-paru inang. Pili ini juga membantu bakteri menghindari fagositosis oleh sel imun.

g. *Patogenicity islands* (PAIs)

PAIs merupakan bagian genom bakteri yang membantu dalam virulensi patogen. PAIs mengkode *pneumococcal serine-rich repeat protein* (PsrP) untuk perlekatan *S. pneumoniae* ke sel-sel di dalam paru-paru. Produksi PsrP yang semakin banyak, maka akan menyebabkan pertumbuhan biofilm pada bakteri *S. pneumoniae*.

h. Biofilm

Biofilm menyatu pada matriks ekstraseluler polisakarida yang menempel pada permukaan. Matriks ekstraseluler memberikan perlindungan dan meningkatkan virulensi *S. pneumoniae*. Biofilm dibentuk sebagai respon terhadap stres dan kondisi yang tidak menguntungkan untuk meningkatkan kelangsungan hidup bakteri (Brooks & Mias, 2018).

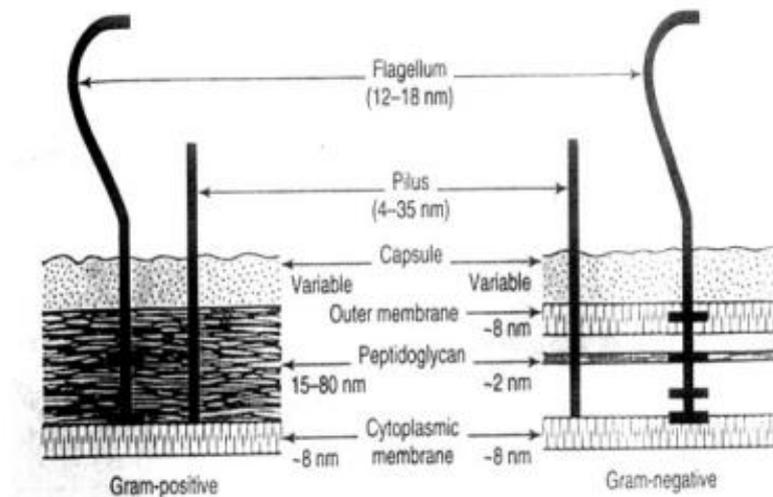


Gambar 2. 1 Faktor Virulensi Bakteri *S. pneumoniae*. Pada gambar virulensi yang berperan adalah lipoprotein, kapsul polisakarida, *lypoteichoic acid*, *pneumolysin*, *autolysin*, dan pili (Brooks & Mias, 2018).

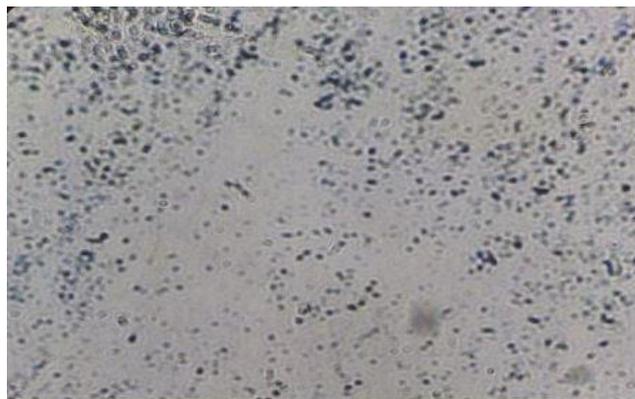
2.1.4 Identifikasi *Streptococcus pneumoniae*

2.1.4.1 Mikroskopis

Streptococcus pneumoniae akan terlihat berbentuk kokus seperti rantai berwarna ungu jika diberi pengecatan Gram kristal violet, safranin dan iodine di bawah mikroskop. Warna ungu tersebut disebabkan karena dinding sel bakteri *S. pneumoniae* 50-90% terdiri dari peptidoglikan, sehingga menjerat zat warna kristal violet tidak terbilas dalam proses selanjutnya. Hal ini menunjukkan berwarna ungu pada *S. pneumoniae* merupakan Gram positif (Anggi, 2016). Sedangkan Gram negatif, bakteri tampak berwarna merah dikarenakan terjadi kehilangan zat warna kristal violet dan akan menyerap pewarna safranin sehingga sel bakteri berwarna merah (Putri, Sukini & Yodong, 2017).



Gambar 2.2 Struktur Dinding Sel Bakteri. Perbandingan struktur dari dinding sel bakteri positif (kiri) dan Gram negatif (kanan) (Putri, Sukini and Yodong, 2017).



Gambar 2.3 Pengecatan Gram *S. pneumoniae*. Dilihat dengan mikroskop perbesaran 1000x yang menunjukkan bakteri berwarna ungu dan berbentuk kokus (Waluyo, 2016).

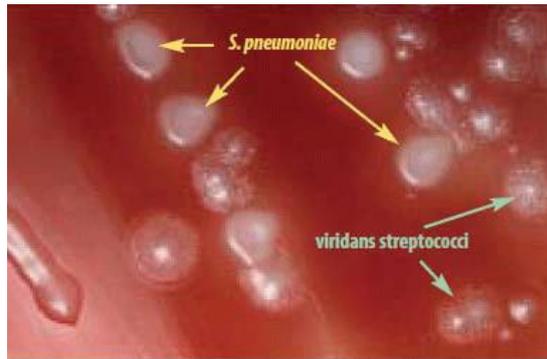
2.1.4.2 Biakan pada Medium Diferensial

Media diferensial merupakan media untuk mengidentifikasi ciri khas dari mikroba yang tumbuh. *S. pneumoniae* paling banyak menggunakan media agar darah (BAP), akan tetapi juga dapat tumbuh di media agar coklat (CAP). Terlihat pada media agar darah, koloni *S. pneumoniae* muncul sebagai koloni kecil, berwarna abu-abu, lembab (kadang mukoidal), dan secara khas menghasilkan zona hemolisis alfa (hijau) (Gambar 2.4). Sifat alfa-hemolitik ini juga dimiliki oleh

Streptococcus viridans yang sulit dibedakan dengan bakteri *pneumokokus* muda. Meskipun demikian, setelah kultur *pneumokokus* dibiarkan 24-48 jam, koloni menjadi rata, dan bagian tengah menjadi lebih cekung (Gambar 2.5). Sebelum prosedur identifikasi dan pengujian karakterisasi, isolat harus selalu diperiksa kemurnian pertumbuhannya dan satu koloni harus digores ulang, bila perlu, untuk mendapatkan kultur murni. Untuk identifikasi dan prosedur karakterisasi, penting untuk menguji koloni alfa-hemolitik yang berumur kurang dari satu hari, biasanya ditanam semalam pada suhu 35-37 ° C dengan ~ 5% CO₂ (atau dalam wadah lilin) (CDC, 2011).



Gambar 2.4 Zona *alpha hemolysis* (Hijau). Pertumbuhan bakteri *S. pneumoniae* menggunakan agar darah. Tampak tanda panah zona hijau *alpha hemolysis* disekitarnya (CDC, 2011).

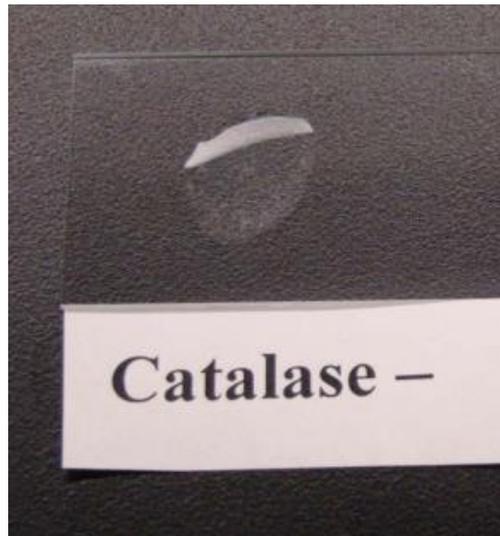


Gambar 2.5 Koloni *S. pneumoniae*. Pada koloni diatas terlihat pusat yang rata dan tertekan, sedangkan streptokokus viridans mempertahankan pusat yang terangkat (CDC, 2011).

2.1.4.3 Uji Biokimia

a. Uji Katalase

Uji katalase ini menunjukkan hasil positif apabila terdapat gelembung udara akibat hasil dari pemecahan H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 . Gelembung yang dihasilkan tersebut membuktikan adanya oksigen dalam cairan. Bakteri *S. pneumoniae* pada test katalase menunjukkan tes negatif. Semua bakteri streptococcus memiliki katalase negatif dan juga membuktikan bahwa bakteri tersebut adalah jenis bakteri *Streptococcus sp.*, (CDC, 2011).

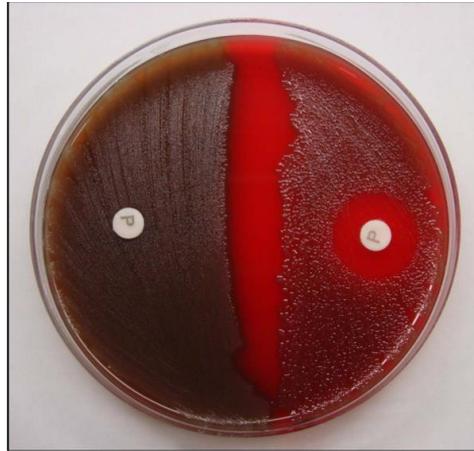


Gambar 2.6 Katalase Negatif pada Bakteri *S. pneumoniae*. Preparat menunjukkan tidak tampak gelembung dari koloni yang telah ditambahkan. Bakteri *streptococcus* bersifat katalase negatif (CDC, 2011).

b. Uji *Optochin*

Optochin atau *etilhidrocuprin hidroklorida* menggunakan prinsip *disk diffusion* (teknik sumuran) yang dilakukan pada media agar darah. Media agar darah terdapat disk steril yang didalamnya ada kandungan *Optochin* yang ditempatkan pada sektor pertama dari media isolatnya sebelum diinkubasi. Media agar darah diinkubasi selama 24 jam dan diperiksa setelahnya. Tes *Optochin* ini mendeteksi mikroorganisme yang rentan terhadap kandungan *etilhidrocuprin hidroklorida*. Kandungan yang merupakan turunan kina ini menyebabkan *S. pneumoniae* lisis karena adanya perubahan tegangan permukaan dari membran sel bakteri, sehingga menciptakan zona inhibisi pertumbuhan *S. pneumoniae*. Hasil interpretasi dari zona inhibisi menghasilkan diameter ≥ 14 mm, sehingga hasil tersebut mengindikasikan *S. pneumoniae* (Saputro, 2013). Adapun *S. pneumoniae* yang resisten terhadap *Optochin* yang menghasilkan zona

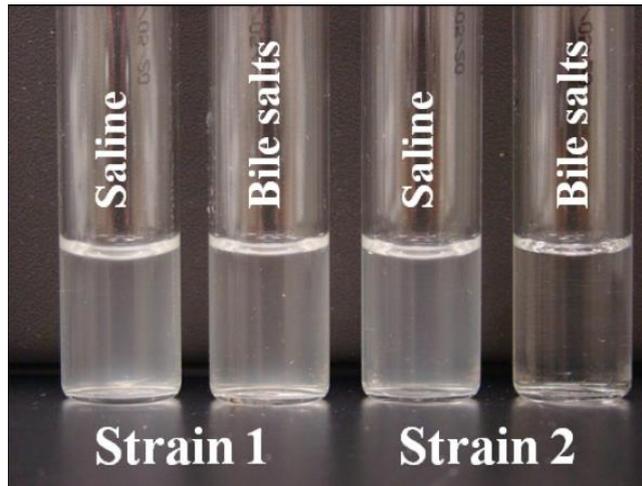
inhibisi <14 mm. Oleh karena itu, tes kelarutan empedu dibutuhkan untuk melisiskan membrane sel bakteri *S. pneumoniae* (Saputro, 2013).



Gambar 2.7 Uji *Optochin*. Strain di sebelah kiri adalah *S. mitis* yang tahan terhadap *Optochin* tanpa zona hambat. Di sebelah kanan adalah *S. pneumoniae* yang peka terhadap *Optochin* (CDC, 2011).

c. *Bile Solubility*/Tes Kelarutan Empedu

Uji kelarutan empedu ini mengandung *sodium deoxycholate* yang mampu membedakan *S. pneumoniae* dengan streptokokus alfa-hemolitik lainnya. *S. pneumoniae* dapat larut dalam empedu, sedangkan semua streptokokus alfa-hemolitik lainnya resisten terhadap empedu. Sodium deoxycholate (2% dalam air) akan melisiskan pneumokokus terhadap dinding selnya (CDC, 2011). Hasil interpretasi menunjukkan positif apabila semua kekeruhan berubah menjadi jernih. Identifikasi ini dilakukan jika bakteri *S. pneumoniae* resisten terhadap tes *Optochin* (Saputro, 2013).



Gambar 2.8 Uji *Bile Solubility*. Strain 1 sebelah kiri adalah sebagai kontrol yang tidak ditambahkan *S. pneumoniae*, sedangkan strain 2 sebelah kanan adalah *S. pneumoniae* yang ditambahkan. Terlihat pada strain 2 tabung yang berisikan garam empedu melarutkan dinding bakteri (CDC, 2011).

d. Uji Reaksi *Quellung*

Dalam serotipe berbasis *quellung* yang tepat, diperlukan mikroskop berkualitas tinggi. Reaksi *quellung* atau *Neufeld* positif adalah hasil dari pengikatan polisakarida kapsular pneumokokus dengan antibodi spesifik tipe yang terkandung dalam antiserum tipe. Reaksi antigen-antibodi menyebabkan perubahan indeks bias kapsul sehingga tampak bengkak dan lebih terlihat. Setelah penambahan metilen biru, sel-sel pneumokokus berwarna biru tua dan dikelilingi oleh halo berbatas tegas yang mewakili tepi luar kapsul. Cahaya yang ditransmisikan melalui kapsul tampak lebih terang daripada sel pneumokokus. Sel tunggal, berpasangan, rantai, dan bahkan gumpalan sel memiliki reaksi *quellung* positif (CDC, 2011).



Gambar 2. 9 Uji reaksi *quellung*. Pada gambar menghasilkan positif, terlihat kapsul muncul sebagai lingkaran bening yang membesar di sekitar sel yang ditandai panah (CDC, 2011).

2.1.5 Manifestasi Klinis Akibat *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae termasuk flora normal pada saluran pernafasan, akan tetapi dapat menjadi patogen jika sistem imunitas turun (Sari *et al.*, 2020; Muthmainnah *et al.*, 2020). Secara keseluruhan, penyakit pneumokokus invasif paling sering menyebabkan infeksi pada anak-anak adalah kurang dari 2 tahun, orang dewasa yang lebih tua (> 65 tahun) dan individu dengan penyakit penyerta dan penyakit *immunocompromised* (Cobo *et al.*, 2012)

Pneumonia yang disebabkan oleh mikroorganisme dapat dibagi dua, yaitu *Community Acquired Pneumonia* (CAP) yang didapat dari masyarakat dan *Hospital Acquired Pneumonia* (HAP) yang didapat di rumah sakit. *S. pneumoniae* adalah patogen yang paling sering terdeteksi pada pasien dengan CAP. Namun, dalam sebagian besar kasus (hingga 62 persen dalam beberapa penelitian yang dilakukan di rumah sakit), tidak ada patogen yang terdeteksi meskipun evaluasi mikrobiologis yang ekstensif (Ramirez, 2020).

Streptococcus pneumoniae selain menyebabkan pneumonia, bakteri ini juga menyebabkan penyakit lain, seperti *acute bacterial rhinosinusitis*, *otitis media*, *bakteremia*, dan *meningitis* (Jawad & Farheen, 2020; Sari *et al.*, 2020; CDC, 2017). Berikut penjabaran dari penyakit tersebut antara lain:

1. *Acute Bacterial Rhinosinusitis*

Rinosinusitis bakterialis akut adalah peradangan pada sinus paranasal, biasanya sinus maksilaris yang diakibatkan oleh infeksi bakteri. Patogen yang paling umum menyebabkan penyakit ini adalah *S. pneumoniae* dan *H. influenzae*. Infeksi virus, alergen, dan polutan lingkungan dapat mengganggu pembersihan mukosiliar, yang mengakibatkan stasis mukus dan proliferasi bakteri dalam sinus. Gejalanya meliputi keluarnya cairan dari hidung, hidung tersumbat, nyeri wajah, dan sedikit anosmia (Jawad & Farheen, 2020).

2. *Otitis Media*

Otitis media (OM) termasuk gangguan inflamasi yang mempengaruhi telinga tengah. Otitis media akut umumnya menyerang anak-anak di bawah usia dua tahun dan ditandai dengan timbulnya gejala yang tiba-tiba, nyeri yang signifikan, dan tanda-tanda peradangan dengan akumulasi cairan purulen di belakang membran timpani (Bergenfelz & Hakansson, 2017).

Streptococcus pneumoniae secara efektif menjajah permukaan mukosa nasofaring dimulai dalam beberapa menit

pertama minggu atau bulan kehidupan. Frekuensi dan waktu kolonisasi di nasofaring yang telah lama dapat meningkatkan risiko otitis media (Bergenfelz & Hakansson, 2017).

3. Bakteremia

Bakteremia adalah terdapatnya bakteri yang ada didalam aliran darah. Bakteri anaerob merupakan penyebab infeksi serta menyebabkan bakteremia (Pratama, 2017). Bakteremia didapat dari komunitas ketika *S. pneumoniae* diisolasi dari kultur darah yang diambil dalam waktu 48 jam (Cobo *et al.*, 2012).

4. Meningitis

Banyak bakteri *Streptococcus* dapat menyebabkan meningitis. Yang paling signifikan adalah *S. pneumoniae*. Meningitis terjadi ketika bakteri memasuki aliran darah, kemudian melewati sawar darah otak atau melalui kontak langsung meningen dengan kulit atau rongga hidung. Fokus infeksi yang paling sering adalah kolonisasi bakteri di nasofaring oleh *S. pneumoniae* yang menghindari sistem kekebalan inang. Selama *Invasive Pneumococcal Disease* (IPD), aliran darah diserang oleh bakteri, kemudian sistem komplemen dan koagulasi diaktifkan. Mediator inflamasi dilepaskan secara besar-besaran, yang membuat bakteri lebih mudah melewati sawar darah-otak (Mańdziuk & Kuchar, 2021).

Bakteri ini memiliki resistensi antibiotik terhadap beta-laktam yang umum digunakan. Resistensi penisilin terjadi sebagai

akibat dari modifikasi struktural genetik pada protein pengikat penisilin. Antara 20% dan 40% isolat *S. pneumoniae* resisten terhadap makrolida. Mekanisme resistensi makrolida yaitu adanya perubahan situs target ribosom, perubahan transportasi antibiotik, dan modifikasi dari antibiotik sendiri. Sekitar 22% isolat *S. pneumoniae* resisten terhadap klindamisin. Mekanisme resistensi klindamisin sama dengan makrolida yaitu melibatkan perubahan situs target. Prevalensi resistensi fluorokuinolon adalah rendah, meskipun meningkat. Resistensi *S. pneumoniae* terhadap *fluoroquinolones* terjadi akumulasi mutasi dalam genom bakteri, peningkatan *efflux*, atau akuisisi gen yang dikodekan plasmid. Resistensi *S. pneumoniae* juga meningkat untuk antibiotik tetrasiklin. Mekanisme utama bakteri terhadap tetrasiklin adalah dimediasi oleh 2 gen yang memberikan perlindungan ribosom. Prevalensi resistensi TMP-SMX adalah sekitar 35%. Seperti halnya *fluoroquinolones*, resistensi terhadap TMP-SMX adalah sekunder akibat mutasi pada genom bakteri (Cherazard *et al.*, 2017).

2.2 Biofilm

2.2.1 Definisi Biofilm

Sejak ditemukannya mikroskop, Van Leeuwenhoek menjumpai biofilm mikroba pada saat mengamati menggunakan mikroskop pada permukaan gigi (Homenta, 2016). Istilah biofilm diresmikan pada tahun 1978 oleh Costerto (Hidayati & Liuwan, 2019). Biofilm merupakan bakteri yang berkumpul saling menempel satu dengan

lainnya pada permukaan hidup atau tidak hidup yang dilindungi oleh matriks eksopolisakarida (Jawetz *et al.*, 2004; Homenta, 2016; Jamal *et al.*, 2019). Biofilm tumbuh alami pada bakteri yang berfungsi melindungi bakteri dari lingkungan yang membahayakan (Hidayati & Liuwan, 2019).

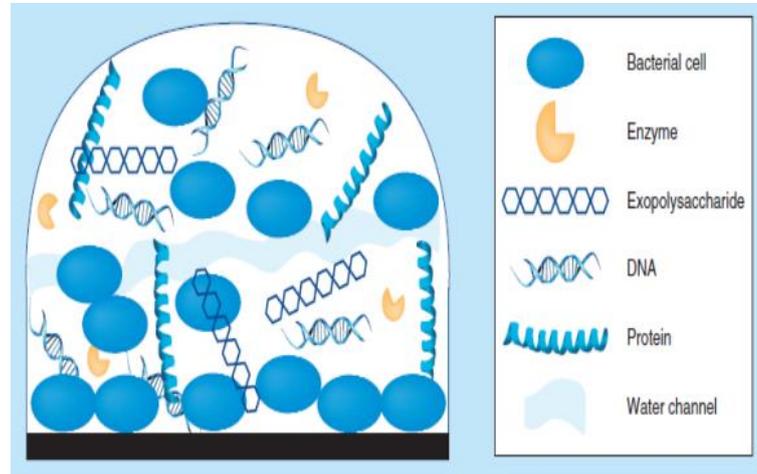
Bakteri yang terdapat pada matriks eksopolisakarida menyebabkan bakteri tersebut terlindungi dari imun penjamu. Matriks juga berfungsi sebagai sawar untuk antimikroba, sehingga memicu antibiotik sulit untuk eradikasi bakteri. Bakteri yang memiliki biofilm menunjukkan resistensi terhadap antibiotik. Hal tersebut menjelaskan mengapa infeksi bakteri yang disebabkan oleh biofilm sukar diobati (Jawetz *et al.*, 2004).

2.2.2 Struktur Pembentuk Biofilm

Struktur biofilm memiliki Substansi Polimerik Ekstraseluler (SPE) yang dibentuk oleh eksopolisakarida, asam nukleat (DNA), dan protein. Substansi tersebut mengandung bahan matriks yang disekresi bakteri ke lingkungan. Jumlah SPE yang membentuk biofilm adalah 50% - 90% (Homenta, 2016; Hidayati & Liuwan, 2019).

Struktur yang membentuk biofilm terdiri dari enzim, sel bakteri, eksopolisakarida, DNA, dan protein. Eksopolisakarida pada mikroskop elektron terlihat untaian panjang yang melekat dan bercabang pada permukaan sel. EPS tersebut berfungsi untuk

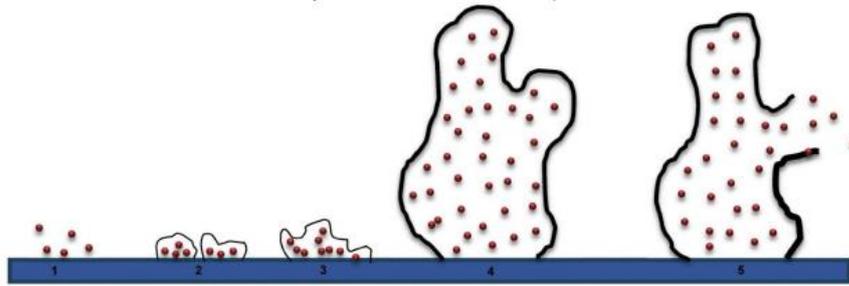
menyangga karbohidrat, asam nukleat, protein, dan lipid yang melekat menjadi satu.



Gambar 2.10 Struktur Pembentuk Biofilm. Biofilm dibentuk oleh enzim, sel bakteri, DNA, EPS, protein dan *water channel*. (Hidayati & Liuwan, 2019).

2.2.3 Mekanisme Pembentukan Biofilm

Tujuan dibentuknya biofilm bakteri adalah untuk melindungi mikroba dari lingkungan yang merugikan dan menampung nutrisi. Mekanisme biofilm merupakan proses yang kompleks dimana melewati beberapa tahap, diantaranya penempelan sel, adhesi sel ke sel, proliferasi dan perkembangan sel, maturasi, serta pelepasan (Samal & Das, 2018).



Gambar 2.11 Tahap Pembentukan Biofilm secara Umum. Berbagai tahap pembentukan biofilm: (1) Penempelan sel (2) Adhesi sel ke sel (3) Proliferasi dan perkembangan sel (4) Maturasi sel (5) Pelepasan sel (Samal & Das, 2018).

Pada langkah awal adalah penempelan atau perlekatan sel. Tahap ini sel bakteri hadir dan menempel pada mikroorganisme lain. Perlekatan bakteri tersebut melakukan interaksi lemah yang disebut dengan gaya *van der Waals*. Hal itu dapat mengakibatkan interaksi dapat berpisah dan menyatu lagi (*reversible*). Setelah itu, terjadi interaksi hidrofilik atau hidrofobik yang mengalami proses adhesi spesifik antara organel perlekatan dengan permukaan. Interaksi itu menyebabkan perlekatan bakteri menjadi *irreversible* (Abida, 2020). Nutrisi, struktur alat gerak, suhu yang menguntungkan, karbohidrat dan protein dapat mempengaruhi kecepatan perlekatan (Samal & Das, 2018).

Selepas perlekatan/penempelan sel, terjadi tahapan adhesi sel ke sel. Pada tahap tersebut, sel bakteri individu saling menempel satu sama lain. Dengan menempel satu sama lain, sel bakteri dapat membentuk mikrokoloni yang solid (Samal & Das, 2018).

Selanjutnya, bakteri memasuki ke tahapan proliferasi dan perkembangan. Pada tahap ini, sel-sel bakteri dalam mikrokoloni tadi

mulai berkembang. Perkembangan tersebut diinduksi dari hasil sinyal berupa bahan kimia. Sinyal kimia ini ketika melewati ambang batas tertentu, mengaktifkan produksi eksopolisakarida. Sel-sel bakteri akan terus membelah di dalam matriks eksopolisakarida yang tertanam (Samal & Das, 2018).

Tahap berikutnya adalah maturasi sel atau yang disebut dengan kematangan sel. Pada tahap ini, terbentuk ekspresi gen tertentu untuk pembentukan biofilm yang bersamaan dengan pembentukan saluran berisi air. Saluran ini berfungsi untuk transportasi nutrisi ke dalam biofilm. Saluran air tersebut tidak hanya menyebarkan nutrisi, tetapi juga mempunyai kemampuan untuk menghilangkan bahan yang membahayakan untuk bakteri (Samal & Das, 2018).

Tahap akhir pada proses pembentukan biofilm adalah pelepasan sel. Tahap ini bakteri menghentikan produksi EPS yang menimbulkan bakteri melepaskan diri dan menyebar. Bakteri akan tinggal di lingkungan baru dan memiliki biofilm. Biofilm tetap mempertahankan karakteristik tertentu untuk menjadi resistensi terhadap antibiotik (Samal & Das, 2018).

2.2.4 *Quorum Sensing*

Quorum sensing (QS) adalah jenis komunikasi kimia dimana populasi bakteri dapat berkomunikasi satu dengan yang lainnya dalam membentuk biofilm. Mekanisme yang termaktub membantu komunikasi antara intraspecies dengan interspecies dalam pembentukan biofilm. Selain

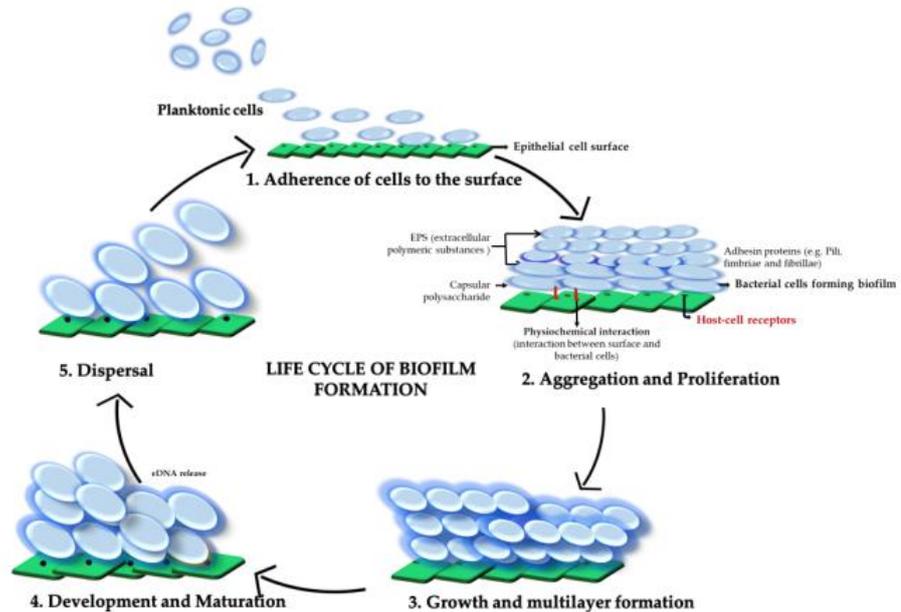
itu, komunikasi ini dipicu oleh kondisi lingkungan stres seperti kekurangan nutrisi, antibiotik dan lain-lain. QS menstimulasi ekspresi gen dengan sel lain untuk berkoordinasi. Molekul sinyal yang dimiliki sel bakteri akan menempel pada reseptor bakteri lain. Molekul yang menempel tersebut membantu transkripsi gen pada bakteri, baik spesies yang sama atau spesies yang berbeda. Pada saat proses penyebaran sinyal kimia, bakteri lain dapat mengenali dan satu sama lain berkumpul untuk membentuk struktur biofilm yang kompleks (Samal & Das, 2018).

Bakteri akan berikatan dengan *acyl-homoserine* lakton (AHL) sehingga memicu QS. Terdapat beberapa tipe dari AHL tergantung fungsi dan panjang rantai asil. *Peptide* kecil mengatur ekspresi gen QS yang terjadi pada bakteri gram positif. Sedangkan *autoinducer-2* (AI-2) mengatur QS yang terjadi pada gram positif dan negatif (Hidayati & Liuwan, 2019).

2.2.5 Biofilm dan *Quorum Sensing Streptococcus pneumoniae*

Selama pembentukan biofilm, sel-sel bakteri berubah dari kehidupan planktonik menjadi bentuk *imotile*. Pembentukan biofilm dimulai dengan adhesi bakteri planktonik ke permukaan biotik atau abiotik, kemudian dilanjutkan perkembangan mikrokoloni. Pembentukan biofilm akan terus-menerus memproduksi matriks ekstraseluler yang terdiri dari zat polimer seperti protein, polisakarida, dan DNA ekstraseluler. Biofilm terbentuk saat sel mikroba mengalami gangguan difusi nutrisi dengan ketersediaan yang lebih sedikit. Selain itu, terjadi peningkatan stres oksidatif endogen, sehingga sel mikroba mengalami

mutasi spontan. Variasi genetik kemudian memunculkan subpopulasi mikroba yang secara fisiologis beraneka ragam (Yadav, 2020).



Gambar 2.12 Siklus Hidup Pembentukan Biofilm pada *Streptococci*.

1) Diawali dengan plankton bakteri menempel pada permukaan; 2) proses terkumpul dan proliferasi bakteri membentuk EPS, adesi protein (pili, *fimbrae* dan *fibrillae*), kapsul polisakarida, *physiochemical interaction* dan *host-cell receptors*; 3) bakteri tumbuh dan membentuk lapisan-lapisan; 4) bakteri berkembang dan maturasi; 5) plankton berpecah menginvasi permukaan yang baru (Yadav, 2020).

Matriks biofilm sangat penting untuk perlindungan bakteri dari pengaruh lingkungan dan terdiri dari zat polimer ekstraseluler (EPS). Ekspresi gen diferensial berperan penting untuk produksi EPS. Ekspresi gen diferensial ini menyediakan kohesi sel bakteri dan menentukan struktur biofilm. Tiga komponen utama ditemukan dalam matriks biofilm dalam jumlah yang bervariasi meliputi polisakarida ekstraseluler, asam nukleat ekstraseluler, dan protein yang memiliki persentase air yang tinggi (Yadav *et al*, 2020).

Selama pembentukan biofilm, bakteri membentuk mekanisme yang disebut quorum sensing (QS). Quorum sensing pada *S. pneumoniae* dimediasi oleh molekul *auto-inducers* (AIs), salah satunya *furanosyl borate diester* (AI-2). AI-2 adalah produk tambahan metabolik dari sintase yang dikodekan gen *LuxS* (*S-ribosylhomocysteine lyase*). *LuxS* merubah *ribosyl-homocysteine* menjadi *homocysteine* dan *4,5-dihydroxy-2,3-pentanedione* (DPD), yang merupakan prekursor AI-2 (Yadav *et al*, 2018).

2.2.6 Uji Pembentukan Biofilm

2.2.6.1 Metode Congo Red Agar (CRA)

Metode CRA menggunakan metode kualitatif sederhana untuk mendeteksi produksi biofilm dengan media yang dinamakan *Congo Red Agar* (CRA). Media tersebut mengandung *brain heart infusion broth* 37 g/L, agar nomor 1 10 g/L, sukrosa 50 g/L, pewarna *Congo Red* 8 g/L dan aquades yang telah disterilkan pada autoklaf. Selanjutnya, bakteri uji diinokulasikan pada media CRA dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 ° C (Ruchi *et al*, 2018; Surekha, J. K. & Madhuri, 2018). Hasil interpretasi ditandai dengan skala warna sebagai berikut:

Tabel 2.1 Interpretasi dari metode *Congo Red Agar* (CRA) (Ruchi *et al*, 2018).

Warna	Interpretasi
Hitam, kering dan <i>crystalline colonies</i>	Membentuk biofilm
Merah/pink/ <i>Bordeaux colonies</i>	Tidak membentuk biofilm



Gambar 2.13 Plate CRA. Sebelah kiri menunjukkan Kristal hitam kering yang memproduksi biofilm, sedangkan plate CRA kanan menunjukkan koloni berwarna pink yang tidak memproduksi biofilm (Ruchi *et al*, 2018).

2.2.6.2 Metode Tabung

Metode tabung adalah metode kualitatif untuk mengetahui biofilm pada bakteri. Pada metode ini, bakteri uji dikultur semalaman dan diinokulasikan kedalam tabung gelas barosilikat yang berisi media *Trypticase Soy Broth* (TSB) 10 ml dengan glukosa 1%. Tabung gelas kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C secara aerobik. Setelah terinkubasi, tabung dituang dan dicuci dengan larutan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) pada pH 7,3 dan setelah itu dikeringkan. Tabung dilanjutkan dengan pewarnaan 0,1% kristal violet selama 15 menit (Ruchi *et al*, 2018). Interpretasi biofilm yang terbentuk dinilai sebagai berikut:

Tabel 2.2 Interpretasi Metode Tabung (Ruchi *et al*, 2018).

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



Gambar 2.14 Interpretasi Metode Tabung. Tabung kanan memperlihatkan *none biofilm producer*, tabung tengah menunjukkan *weak producer*, sedangkan tabung kiri menunjukkan *strong biofilm producer* (Ruchi *et al*, 2018).

2.2.6.3 Metode *Tissue Culture Plate* (TCP) / *Microtiter Plate* (MtP)

Metode *Tissue Culture Plate* (TCP) atau metode pada *microtiter plate* adalah metode kuantitatif sebagai *gold standard* uji biofilm dan metode yang paling sering digunakan. Biofilm bakteri ditumbuhkan pada *well microplate* dan diukur melalui *microplate reader*. Selain pengukuran uji biofilm, metode TCP dapat digunakan untuk menilai aktivitas antibiofilm terhadap biofilm bakteri. Cara kerja metode ini membutuhkan alat dan bahan yang meliputi *well*

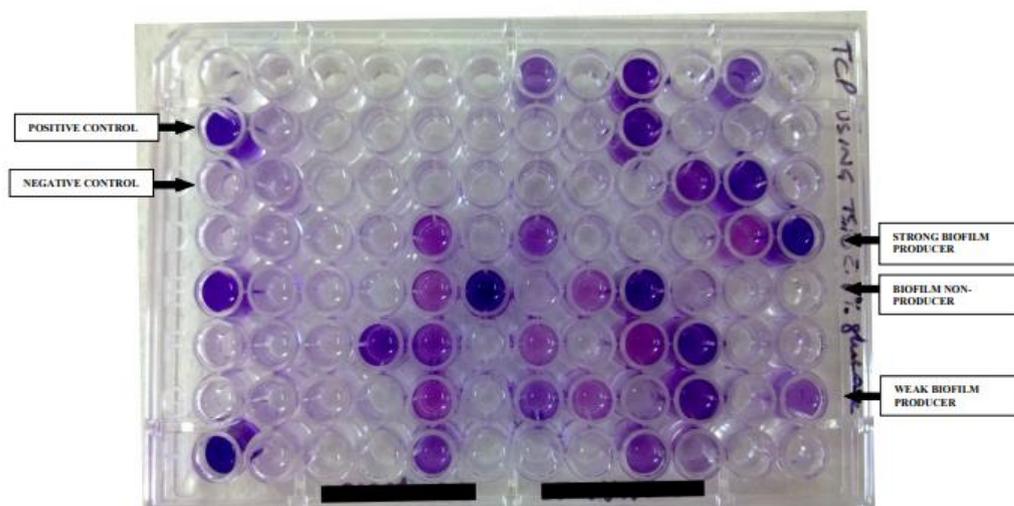
microplate, ELISA *plate reader*, *Trypticase Soy Broth* (TSB) yang telah mengandung 1% glukosa, larutan saline, dan *crystal violet* (Surekha, J. K. & Madhuri, 2018).

Pada metode ini, bakteri uji diinokulasikan pada 10 ml media TSB dan glukosa 1% kedalam *microplate*. Perlakuan tersebut selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam didalam inkubator. Setelah diinkubasi, isi dari masing-masing sumur dikeluarkan secara perlahan dan biofilm disisakan pada bagian dasar. Setelah itu mencuci sumuran *microplate* dengan larutan saline sebanyak tiga kali. Tahapan selanjutnya adalah penambahan 150 µl *crystal violet* (2%) kedalam sumuran. Setelah 15 menit, buang *crystal violet* dan boleh dicuci dengan air. *Microplate* dikeringkan agar tidak ada sisa air didalam sumuran. Kemudian masing-masing sumuran diberikan 150 µl ethanol (95%) selama 30 menit. Biofilm dibaca dengan menggunakan *Optical Density* (OD) melalui ELISA *plate reader* dengan panjang gelombang 600 nm (Ruchi *et al*, 2018). Interpretasi hasil OD dibagi kedalam kategori berikut:

Tabel 2.3 Interpretasi bakteri pembentuk biofilm pada metode *Tissue Culture Plate* (TCP) (Ruchi *et al*, 2018).

Rata-rata nilai OD	Kekuatan pembentuk biofilm	Interpretasi
$OD_{\text{isolate}} \leq OD_c$	<i>Non biofilm producer</i> / Tidak menghasilkan biofilm	0
$OD_c < OD_{\text{isolate}} \leq 2 \times OD_c$	<i>Weak biofilm producer</i> / Membentuk biofilm lemah	+ atau 1
$2 \times OD_c < OD_{\text{isolate}} \leq 4 \times OD_c$	<i>Moderate biofilm producer</i> / Membentuk biofilm sedang	++ atau 2
$4 \times OD_c < OD_{\text{isolate}}$	<i>Strong biofilm producer</i> / Membentuk biofilm kuat	+++ atau 3

$OD_c = \text{Optical Density Cut-off Value}$



Gambar 2.15 Uji Biofilm dengan Metode *Tissue Culture Plate* (TCP). Bagian kiri contoh kontrol positif yang berisi bakteri. Kontrol positif menunjukkan warna ungu yang berarti memiliki biofilm. Sedangkan kontrol negatif berisi antibiotik. Kontrol negatif menunjukkan warna putih yang berarti tidak memiliki biofilm. Bagian kanan menunjukkan warna ungu pekat yang berarti memiliki produksi biofilm kuat. Bagian berwarna putih menunjukkan tidak memproduksi biofilm. Sedangkan bagian berwarna ungu muda menunjukkan memproduksi biofilm sedang (Ruchi *et al*, 2018).

2.3 *Aspergillus terreus*

2.3.1 Taksonomi *Aspergillus terreus*

Aspergillus terreus tergolong bagian genus *Aspergillus*. *Aspergillus* adalah jamur yang mempunyai filamen-filamen panjang bercabang. Pada media biakan, jamur ini membentuk miselia dan konidiofora (Hasanah, 2017). Berikut taksonomi dari *A. terreus*:

Kingdom	: <i>Fungus</i>
Subkingdom	: <i>Dikaryon</i>
Phylum	: <i>Ascomycota</i>
Subphylum	: <i>Pezizomycotina</i>
Class	: <i>Eurotiomycetes</i>
Subclass	: <i>Eurotiomycetidae</i>
Order	: <i>Eurotiales</i>
Family	: <i>Aspergillaceae</i>
Genus	: <i>Aspergillus</i>
Spesies	: <i>Aspergillus</i> sp. (Zulkifli, 2015).

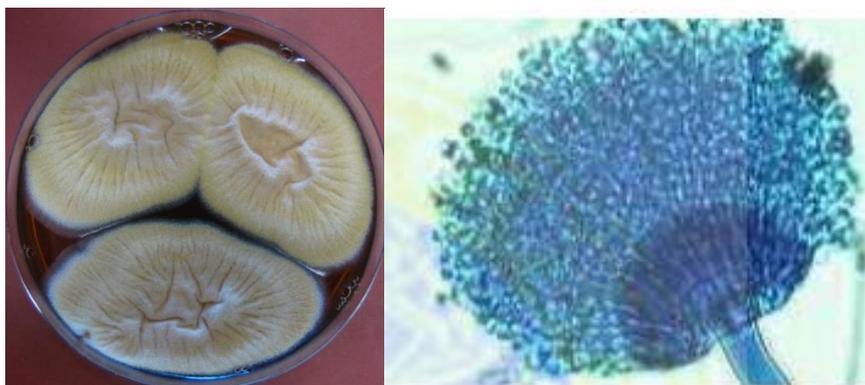
2.3.2 Karakteristik *Aspergillus terreus*

Aspergillus merupakan makhluk hidup berukuran kecil yang bersifat eukariotik. Saat ini telah diakui sebagai salah satu jamur diantara beberapa jamur lainnya yang memiliki daerah penyebaran berlimbah dan paling luas di alam. Jamur jenis kapang ini hidup pada berbagai substrat di daerah tropis dan subtropis (Andriani, 2019).

Aspergillus terreus merupakan jamur yang bersifat saprofit dan hidup di tanah yang subur, terutamanya pada daerah tropis.

Aspergillus terreus menunjukkan pertumbuhan koloni ketika dalam suhu 37°C pada media agar. Koloni *A. terreus* dapat tumbuh dalam 7 hari dengan diameter 1-2,5 cm (Setiawan, 2010; Lass-Flörl, 2018).

Aspergillus terreus memiliki konidiofora berding halus berwarna coklat muda kekuningan. Semakin bertambahnya umur, jamur ini dapat berubah menjadi warna yang gelap. Ciri lain dari konidiofora *A. terreus* adalah vesikel semibulat, halus, berbentuk globusa hingga elips (Nazip, 2006; Setiawan, 2010; Pujiati *et al*, 2018).



Gambar 2. 16 Makroskopis dan Mikroskopis *A. terreus*. Sebelah kiri terlihat secara makroskopis menunjukkan koloni jamur berwarna coklat muda kekuningan. Sebelah kanan terlihat secara mikroskopis menunjukkan bagian kepala (vesikel) dan konidiospora (Lass-Flörl, 2018; Setiawan, 2010).

2.3.3 Kandungan Fungi *Aspergillus terreus*

Aspergillus terreus termasuk jamur selulolitik yang menghasilkan enzim selulase. *Aspergillus terreus* menghasilkan dua unit enzim selulase yang terdiri dari endo 1,4 β -glukanase dan ekso 1,4 β -glukanase. Endo 1,4 β -glukanase berfungsi sebagai hidrolisis serat selulosa menjadi rantai pendek, sedangkan ekso 1,4 β -glukanase berperan memecah rantai pendek tersebut menjadi senyawa sederhana

terlarut. Selain itu, *A. terreus* juga dapat memproduksi enzim protease. Enzim ini mengubah protein menjadi peptida sederhana. Peptide sederhana ini selanjutnya akan dirombak menjadi asam amino (Setiawan, 2010).

2.3.4 *Aspergillus terreus* sebagai Antibakteri dan Antibiofilm

Senyawa metabolit sekunder yang dihasilkan oleh jamur termasuk senyawa bioaktif yang memiliki manfaat sebagai antibiotik, antikanker, antimikroba dan antioksidan. *Aspergillus terreus* juga menghasilkan *terreic acid*, *terreulactone A*, *terreineol*, *sulochrin* dan *terrain*, *terrelactone A*, *terremides A* dan *B* yang berfungsi sebagai antibakteri (El-Halim *et al.*, 2014).

Berdasarkan hasil studi ditemukan bahwa terjadi aktivitas antibiofilm *A. Coli* dan *A. terreus*. Kandungan *terreic acid* yang dihasilkan *A. terreus* terdapat efek penghambatan biofilm oleh *E. coli*. Penelitian ini juga menyatakan terdapat hubungan penghambat GlmU nonspesifik seperti *iodoacetamide*, *N-ethyl maleimide* (NEM), dan analog NEM yang dibuktikan efektif melawan pembentukan biofilm bakteri Gram positif dan Gram negatif (Sharma *et al.*, 2016).

Berdasarkan sifat kimiawi, *terreic acid* merupakan kuinon epoksida. Penelitian terdahulu menyatakan bahwa epoksida memiliki kandungan produk alami seperti fosfomisin yang berasal dari spesies *Streptomyces* yang menunjukkan aktivitas antimikroba. Secara kimiawi struktur ini stabil serta mampu menunjukkan stabilitas di bawah kondisi pengujian biologis. Hal tersebut dapat bermanfaat

sebagai peluang pembuatan obat untuk optimalisasi aktivitas biologis (Sharma *et al.*, 2016).

2.4 Antibiofilm

2.4.1. Definisi Antibiofilm

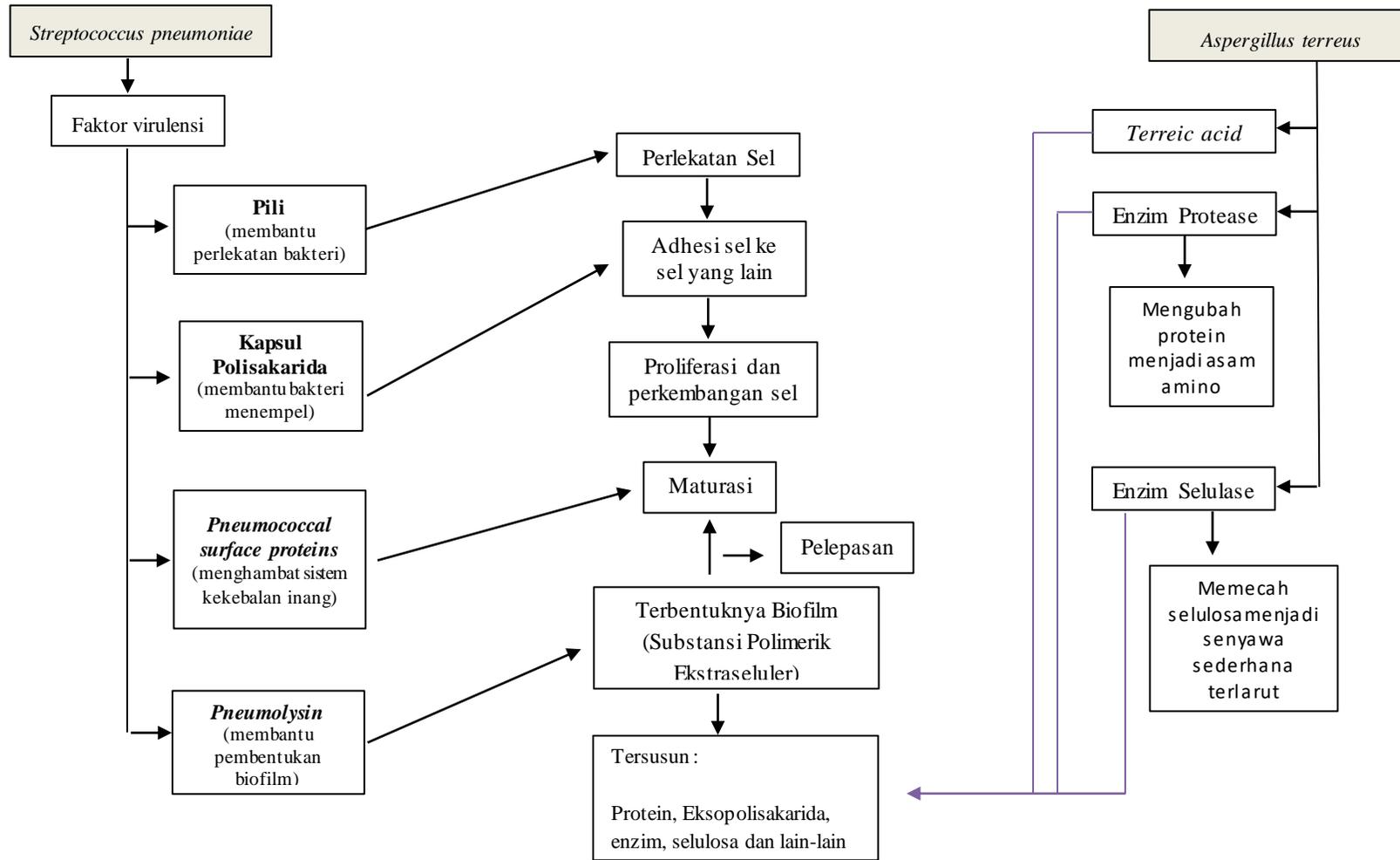
Antibiofilm merupakan senyawa yang dapat berfungsi sebagai pereduksi biomassa bakteri melalui cara kerjanya yaitu merubah kualitas atau keutuhan biofilm. Senyawa bakterisida dan non bakterisida merupakan bagian dari senyawa antibiofilm. Secara umum, pengelompokan senyawa antibiofilm dibagi menjadi dua, yaitu senyawa sintetik dan alami. Substansi *photodynamic*, *non-thermal plasma*, *nanoparticles*, modifikasi dari permukaan *topographic*, dan peptida atau molekul lain merupakan bagian dari 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 menggunakan mekanisme penghambatan dari perlekatan bakteri dan juga mengacaukan biofilm matur merupakan cara kerja antibiofilm. Adanya gangguan dari komunikasi antar bakteri sehingga terjadi 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



Bagan 2.1 Kerangka Teori

Streptococcus pneumoniae memiliki berbagai faktor virulensi yang dapat mempermudah proses pembentukan biofilm. Faktor virulensi yang paling berpengaruh antara lain pili, kapsul polisakarida, *Pneumococcal surface proteins*, dan *pneumolysin*. Pili bakteri *S. pneumoniae* akan membantu perlekatan serta kolonisasi ke sel epitel. Kapsul polisakarida mendukung bakteri menempel pada inang yang menyebabkan terlindung dari sistem imun. *Pneumococcal surface proteins* bertindak menghambat sistem kekebalan inang. *Pneumolysin* berfungsi membantu dalam pembentukan biofilm. Faktor virulensi tersebut mendukung *S. pneumoniae* untuk membentuk biofilm melalui mekanisme perlekatan sel, adhesi sel ke sel lain, proliferasi dan perkembangan sel, pematangan dan pelepasan. Biofilm yang terbentuk dari dukungan faktor virulensi tersebut tersusun atas Substansi Polimerik Ekstraseluler (SPE). SPE terdiri dari eksopolisakarida, asam nukleat (DNA), protein dan komponen lain.

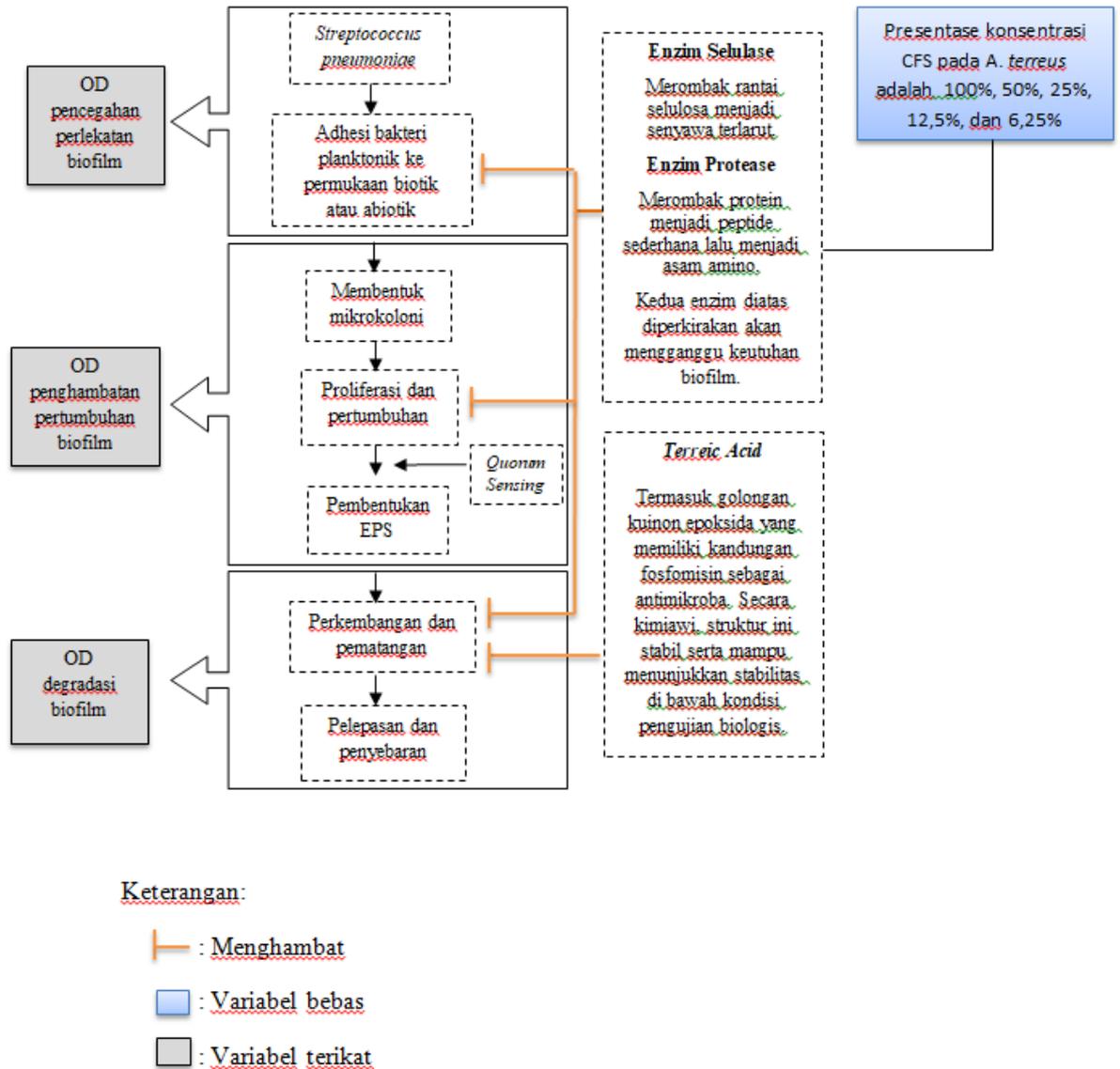
Aspergillus terreus mempunyai kandungan enzim selulase, enzim protease dan senyawa metabolit sekunder yaitu *terreic acid*. Enzim selulase memecah selulosa menjadi senyawa sederhana yang terlarut, sedangkan enzim protease memecah protein menjadi asam amino. Hal tersebut diharapkan mengganggu Substansi Polimerik Ekstraseluler (SPE). Selain itu, *A. terreus* juga menghasilkan metabolit sekunder, salah satunya *terreic acid*. Senyawa metabolit tersebut memiliki sifat seperti fosfomisin yang bekerja sebagai antibiofilm. *Terreic acid* tersusun dari kuinon epoksida yang menyebabkan struktur ini tetap stabil secara kimiawi bahkan di bawah

kondisi lingkungan yang merugikan. Kandungan ini diharapkan bisa digunakan sebagai antibiofilm terhadap *S. pneumoniae*.

BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Bagan 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Streptococcus pneumoniae termasuk bakteri yang dapat menghasilkan biofilm. Pembentukan biofilm dapat melalui beberapa tahap. Tahapan awal yang dilakukan adalah adhesi bakteri planktonik ke permukaan biotik atau abiotik. Setelah terjadi perlekatan, dilanjutkan pembentukan mikrokoloni

bakteri. Selanjutnya, mikrokoloni berproliferasi dan mengalami pertumbuhan. Kemudian, 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 adalah tahapan perkembangan dan pematangan bakteri. Tahapan yang terakhir ialah pelepasan dan penyebaran. Pada tahapan pelepasan dan penyebaran, terjadi penghentian produksi EPS yang menyebabkan terjadinya pelepasan dan penyebaran bakteri.

Aspergillus terreus menghasilkan beberapa metabolit sekunder, seperti *terreic acid*, selulase, dan protease. Enzim selulase dan protease diharapkan dapat mencegah pembentukan biofilm dan mengganggu keutuhan EPS biofilm *S. pneumoniae*. Enzim yang menghidrolisis selulosa menjadi rantai pendek yang larut dikenal sebagai enzim selulase. Enzim protease dapat memecah protein menjadi peptida sederhana, yang selanjutnya dapat dihidrolisis untuk menghasilkan asam amino. Di sisi lain, *terreic acid* dapat bertindak seperti fosfomisin yang memiliki efek antimikroba dan antibiofilm. Diketahui juga bahwa senyawa ini termasuk dalam kuinon epoksida yang memiliki struktur kimia yang stabil dan dalam kondisi pengujian biologis. Kandungan tersebut akan digunakan sebagai bahan penelitian dari *A. terreus* dalam bentuk Cell Free Supernathan (CFS).

Kandungan *A. terreus* diduga menghambat perlekatan, pertumbuhan, dan kerusakan/penghancuran biofilm *S. pneumoniae*. Penilaian dapat

dilakukan dengan membaca nilai *Optical Density* (OD) dari setiap pengujian dengan pembacaan ELISA *plate reader* untuk menentukannya. OD yang dihasilkan menunjukkan hasil konsentrasi biofilm *S. pneumoniae* yang terbentuk setelah ditambahkan CFS jamur *A. terreus*.

3.2 Hipotesis Penelitian

1. H₀: CFS *A. terreus* tidak mampu mencegah perlekatan biofilm *S. pneumoniae*.
H₁: CFS *A. terreus* mampu mencegah perlekatan biofilm *S. pneumoniae*.
2. H₀: CFS *A. terreus* tidak mampu menghambat pertumbuhan biofilm *S. pneumoniae*.
H₁: CFS *A. terreus* mampu menghambat pertumbuhan biofilm *S. pneumoniae*.
3. H₀: CFS *A. terreus* tidak mampu menghancurkan biofilm *S. pneumoniae*.
H₁: CFS *A. terreus* mampu menghancurkan biofilm *S. pneumoniae*.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini dilakukan menggunakan desain eksperimental murni secara *in vitro* di Laboratorium Mikrobiologi FKIK UIN Maulana Malik Ibrahim Malang. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk melihat apakah *A. terreus* memiliki aktivitas antibiofilm terhadap *S. 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. Metode ini menggunakan pengukuran nilai *Optic Density* (OD) dari setiap kelompok uji melalui penggunaan *ELISA plate reader*.

4.2 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian uji aktivitas antibiofilm *A. terreus* terhadap biofilm *S. pneumoniae* dilaksanakan di tempat Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan (FKIK) UIN Maulana Malik Ibrahim Malang. Penelitian ini dilakukan selama rentang waktu Juni – Juli tahun 2022.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel bebas

Variabel bebas dari penelitian ini ialah nilai konsentrasi supernatan CFS *A. terreus*. Penelitian tersebut menggunakan 5 kelompok konsentrasi, yakni 50%, 25%, 12,5%, 6,25% dan 3,12%.

4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dari penelitian ini ialah nilai *Optical Density* (OD) dari antibiofilm. Nilai tersebut menggunakan alat berupa ELISA *plate reader*. *Optical Density* (OD) yang akan diukur adalah OD pencegahan perlekatan biofilm, OD penghambatan pertumbuhan biofilm, dan OD destruksi/penghancuran biofilm *S. pneumoniae*.

4.4 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi penelitian ini menggunakan biakan bakteri dari spesies *S. pneumoniae*. Koloni tersebut didapatkan dari Laboratorium Wiyasa Mandiri Malang.

4.5 Jumlah Pengulangan

Jumlah perlakuan yang akan dilaksanakan pada penelitian ini sebanyak 8 perlakuan. Penentuan rentang minimal pengulangan menggunakan perhitungan rumus Federer. Perhitungan jumlah perlakuan adalah sebagai berikut (Dawley, 2014).

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

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

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

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

$$7n-7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 3,14$$

Keterangan :

n = jumlah pengulangan tiap perlakuan

t = jumlah perlakuan

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

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Alat Penelitian

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

4.6.2 Bahan Penelitian

4.6.2.1 Jamur *Aspergillus terreus*

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

4.6.2.2 Bakteri *Streptococcus pneumoniae*

Koloni bakteri *Streptococcus pneumoniae* yang diperoleh dari Laboratorium Wiyasa Mandiri Malang merupakan bakteri yang akan diujikan. Bakteri tersebut dikirim dan dikerjakan di

Laboratorium Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan (FKIK)
UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.

4.6.2.3 Bahan Lainnya

Medium agar Mac Conkey, *Potato Dextrose Broth* (PDB), *Trypticase Soy Broth* (TSB), *Blood Agar Plate* (BAP), *Phosphate-Buffered Saline* (PBS), *erythromycin*, alkohol, larutan glukosa, asam asetat, aquades, kristal violet dan safranin.

4.7 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

4.7.1 Kriteria Inklusi

Kriteria inklusi dari penelitian ini yaitu:

- a. *Aspergillus terreus*
 - 1) Koloni *A. terreus* pada media PDB yang berwarna coklat kekuningan hingga gelap.
 - 2) Koloni *A. terreus* yang telah diinkubasi selama 3 hari pada suhu 28°C.
 - 3) CFS *A. terreus* yang sudah dilakukan penyaringan dengan kertas whatmann, sentrifugasi dingin dan *filter paper* 0,22 µm.
 - 4) CFS *A. terreus* yang sudah dilakukan serial delusi pada konsentrasi 50%, 25%, 12,5%, 6,25% dan 3,12%
- b. *Streptococcus pneumoniae*
 - 1) Koloni *S. pneumoniae* yang telah diinkubasi selama 24 jam pada suhu 28°C.
 - 2) Koloni *S. pneumoniae* berwarna ungu pada uji pewarnaan Gram.

- 3) Koloni *S. pneumoniae* berbentuk kokus pada uji pewarnaan Gram.
- 4) Koloni *S. pneumoniae* terlihat koloni kecil yang bewarna abu-abu dan menghasilkan zona hemolisis alfa (hijau) pada media agar darah.
- 5) Koloni *S. pneumoniae* yang menunjukkan hasil sesuai sifat-sifat bakteri tersebut pada uji biokimia menggunakan Uji Katalase.

4.7.2 Kriteria Eksklusi

Kriteria eksklusi dari penelitian ini yaitu:

a. *Aspergillus terreus*

- 1) CFS *A. terreus* yang telah terkontaminasi oleh mikroorganisme lain, seperti bakteri, virus, dan jamur.
- 2) CFS *A. terreus* yang tidak menyaring miselium sepenuhnya.

b. *Streptococcus pneumoniae*

- 1) Bakteri *S. pneumoniae* yang terkontaminasi mikroorganisme lain, seperti bakteri, virus, dan jamur.
- 2) Koloni *S. pneumoniae* tidak terlihat koloni kecil yang bewarna abu-abu dan tidak menghasilkan zona hemolisis alfa (hijau) pada media agar darah.
- 3) Tidak menunjukkan sifat *S. pneumoniae* berdasarkan uji Uji Katalase.

4.8 Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Satuan	Skala
1.	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Bakteri Gram positif yang mampu membentuk biofilm. <i>S. pneumoniae</i> yang dipakai diambil dari Laboratorium Wiyasa Mandiri Malang. Bakteri yang digunakan adalah inokulum yang dibentuk dalam media TSB.	<i>Micropipet</i>	μL	Interval
2.	CFS <i>Aspergillus terreus</i>	Jamur <i>Aspergillus</i> diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Maulana Marik Ibrahim, Malang. CFS <i>A. terreus</i> yang akan digunakan adalah presentase 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, dan 3,12%.	<i>Micropipet</i>	μL	Interval
3.	Aktivitas Pencegahan Perlekatan Biofilm	Hasil kuantitatif menunjukkan pengaruh setelah dilakukan uji kerusakan biofilm pada bakteri <i>S. pneumoniae</i> terhadap densitas biofilm.	ELISA <i>Plate Reader</i>	Nilai <i>Optical Density: Absorbance (A)</i>	Rasio
4.	Aktivitas Penghambatan Pembentukan Biofilm	Hasil kuantitatif menunjukkan pengaruh setelah dilakukan uji kerusakan biofilm pada bakteri <i>S.</i>	ELISA <i>Plate Reader</i>	<i>Optical Density:</i>	Rasio

		<i>pneumoniae</i> terhadap densitas biofilm.		<i>Absorbance</i> (A)	
5.	Aktivitas Destruksi/Penghancuran Perlekatan Biofilm	Hasil kuantitatif menunjukkan pengaruh setelah dilakukan uji kerusakan biofilm pada bakteri <i>S. pneumoniae</i> terhadap densitas biofilm.	ELISA <i>Plate</i> <i>Reader</i>	<i>Optical</i> <i>Density:</i> <i>Absorbance</i> (A)	Rasio

4.9 Prosedur Penelitian

4.9.1 Penyiapan Jamur

4.9.1.1 Identifikasi *Aspergillus terreus*

Uji mikroskopis dapat dilakukan dengan mempersiapkan preparat di *object glass*, kemudian ditetesi aquades dengan menggunakan pipet. Tempatkan koloni jamur pada *object glass* dan tutup dengan kaca penutup. Setelah preparat dibuat, preparat dapat diamati di bawah mikroskop (Shofiana, Sulistyowati and Muhibuddin, 2015).

Pengamatan makroskopik dapat dilakukan dengan menginokulasikan media PDA ke dalam cawan petri menggunakan ose atau swab steril. Kemudian inkubasi cawan petri dalam inkubator pada suhu 25-30°C selama 5-7 hari (Shofiana, Sulistyowati and Muhibuddin, 2015).

4.9.1.2 Pembuatan Media Petumbuhan *Aspergillus terreus*

Pembuatan media pertumbuhan *A. terreus* menggunakan media PDB. Media dibuat dari bubuk PDB yang telah ditambahkan aquades dengan takaran 24 gr: 1000mL. Selanjutnya, PDB disterilisasi selama 15 menit dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C. Kemudian, media tersebut ditambahkan glukosa 2% (Modifikasi Safitri, Fauzana and Fauziah, 2011).

4.9.1.3 Pembuatan CFS / Supernatan *Aspergillus terreus*

Pembuatan supernatan membutuhkan inokulum jamur yang dibuat dari 5 mL suspensi *A. terreus*, 45 mL PDB steril dan telah diberi 1 mL

larutan glukosa 2%. Selanjutnya dapat dimasukkan ke dalam *shaker incubator* dengan suhu 28°C selama 3 hari. Hasil inokulum disaring menggunakan *Whatman* no. 2 dan ditampung pada falcon. Hasil dari saringan tersebut dipindahkan ke tabung *ependorf*. Kemudian dimasukkan kedalam *freezer* untuk mengurangi terjadinya kerusakan protein jamur. Langkah selanjutnya adalah sentrifugasi agar memisahkan supernatan dengan peletnya. Alat sentrifugasi yang dipakai haruslah dingin agar protein jamur tidak rusak selama proses pemutaran. Kemudian, dilakukan penyaringan supernatan menggunakan *filter paper* 0,22 µm. Selanjutnya, supernatan dapat digunakan dan harus tetap dingin untuk menghindari pemecahan protein (Hasiani, Ahmad and Rijai, 2015; Prateeksha *et al.*, 2020).

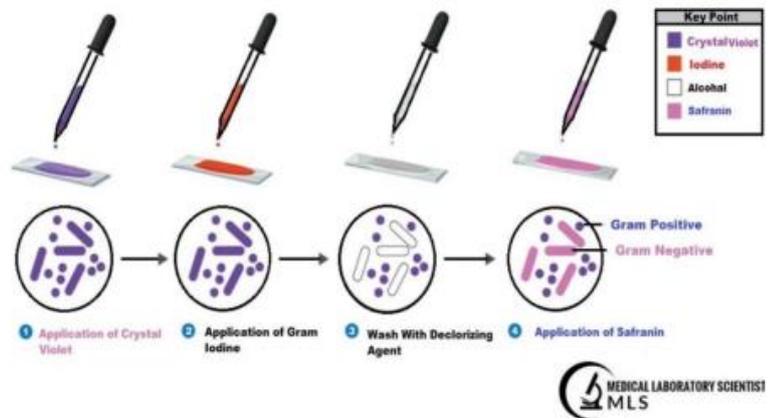
4.9.2 Penyiapan Bakteri

4.9.2.1 Identifikasi *Streptococcus pneumoniae*

a. Pewarnaan Gram

Langkah pertama yang dapat dilakukan pewarnaan gram adalah mempersiapkan dan membersihkan *cover glass* dan *object glass* dengan alkohol. Selanjutnya difiksasi dengan cara dipanaskan diatas lampu bunsen. Langkah selanjutnya adalah ambil 1 ose bakteri dengan NaCl fisiologis yang telah ditetaskan pada gelas objek, kemudian dibuat apus tipis pada area *object glass*. Setelah itu preparat dikeringkan dan difiksasi dengan cara memanaskan diatas lampu bunsen. Preparat apus ditetaskan pewarna pertama sebanyak satu atau dua tetes larutan kristal violet

dan dibiarkan selama 1-2 menit. Langkah selanjutnya, warna dibuang dan preparat dicuci dengan aquades. Kemudian diberikan 5 tetes iodine/lugol selama 2 menit. Sesudah diberi iodine/lugol, larutan dibuang dan dibilas dengan aquades. Meneteskan alkohol 95% selama 30 detik yang kemudian diberi aquades sebagai pembilas. Setelah mengering, preparat diberi larutan safranin dan ditunggu hingga 20 detik. Setelah itu safranin dibuang dan bilas dengan aquades. Setelah mengering, preparat dapat diamati melalui mikroskop. Bakteri gram positif akan mempertahankan warna kristal violet yaitu berwarna ungu. *S. pneumoniae* akan terlihat berwarna ungu dan berbentuk kokus berantai. (Modifikasi Putri, Sukini and Yodong, 2017; Abida, 2020).



Gambar 4.1 Metode Pewarnaan Gram. 1) Aplikasi dari kristal violet, 2) Aplikasi dari larutan iodin, 3) Pembilasan menggunakan *decolorizing agent* menggunakan alkohol, 4) Pemberian Safranin (Abida, 2020).

b. Uji Katalase

Langkah untuk uji katalase meliputi:

- 1) Lakukan kultur murni bakteri selama 18-24 jam untuk diidentifikasi.
- 2) Setelah kultur tersebut, siapkan ose dan *object glass* yang akan digunakan.
- 3) Ambil beberapa koloni organisme uji dengan menggunakan ose dan tempatkan ke permukaan *object glass* steril.
- 4) Teteskan H₂O₂ 3% pada *object glass* tersebut. Amati apakah terdapat gelembung oksigen.

4.9.2.2 Pembuatan Media Pertumbuhan

Untuk berkembang biak dari *S. pneumoniae* diperlukan media *Trypticase Soy Broth* (TSB). Media TSB dibuat melalui pencampuran serbuk TSB dan aquades dengan dosis 30 gr : 1000 mL. Langkah selanjutnya adalah mensterilkan media melalui autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah itu, ditambahkan dengan glukosa 5% pada media.

4.9.2.3 Pembuatan Suspensi Bakteri *Streptococcus pneumoniae*

Dalam pembuatan suspensi bakteri, diperlukan inokulasi *S. pneumoniae* dalam tabung reaksi dengan takaran satu ose. Tabung reaksi sebelumnya berisi 3 mL media TSB yang telah dicampur dengan 60 µL glukosa 5%. Media tersebut dihomogenkan menggunakan *vortex*. Kemudian, media dimasukkan ke dalam inkubator pada suhu 37°C selama 18 jam. Setelah itu, diberikan lagi 2 mL TSB dan 40 µL glukosa 1% yang kemudian dihomogenkan sekali lagi menggunakan *vortex* dan

ditempatkan ke dalam inkubator dengan suhu dan rentang waktu yang sama seperti sebelumnya. Selanjutnya, mengukur nilai OD melalui alat spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm. Hasil OD menunjukkan nilai berkisar 0,4-0,6.

4.9.2.4 Penyiapan Kelompok Kontrol

Kelompok kontrol yang digunakan pada penelitian ini adalah kelompok kontrol positif, kontrol negatif, dan kontrol media. Antibiotik *erythromycin* 0,5% dengan suspensi *S. pneumoniae* merupakan kontrol positif. Kontrol negatif menggunakan suspensi bakteri *S. pneumoniae* dengan campuran TSB dan 1% glukosa. Media TSB ditambah 1% glukosa merupakan kontrol media.

4.9.2.5 Uji Pertumbuhan Biofilm

Langkah awal dalam uji pertumbuhan biofilm ini adalah memasukkan kelompok uji, yaitu suspensi *S. pneumoniae* ditempatkan pada *wells* sebesar 200 μ L. Kelompok media diisi dengan TSB dan 1% glukosa sebesar 200 μ L. Kemudian, *microplate* ditutup yang dilindungi *aluminium foil* dan *plastic wrap*. *Microplate* tersebut selanjutnya diinkubasi selama 24 jam dalam suhu 37 °C. Setelah itu, *microplate* dapat dikeluarkan dan dibuka didalam LAF. Kemudian, *microplate* dicuci dengan PBS steril sebanyak 3 kali dan memasukkan 0,1% kristal violet sebanyak 200 μ L. Lalu dilanjutkan proses inkubasi kembali selama 15 menit dengan suhu ruang. Setelah 15 menit, kristal violet dikeluarkan dan dilanjutkan mencuci dengan aquades sebanyak tiga kali. Selanjutnya, asam asetat 30% dimasukkan ke semua *wells* sebanyak 200 μ L dan dilanjutkan

proses inkubasi dengan suhu kamar selama 15 menit. Langkah akhir yaitu menghitung nilai OD menggunakan ELISA *plate reader*. Panjang gelombang yang dipakai adalah 595 nm.

Diperlukan perhitungan rumus dalam menentukan kekuatan biofilm dari bakteri uji, nilai OD_{isolat} dibandingkan dengan nilai Optical Density cut-off (ODcut). Nilai OD diperoleh dari pengurangan rata-rata nilai OD_{isolat} dan 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/hasil Kekuatan Bakteri yang Membentuk Biofilm (Ruchi, Sujata & Anuradha, 2018).

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)

4.9.3 Uji Aktifitas Biofilm *Aspergillus terreus* terhadap *Streptococcus pneumoniae*

4.9.3.1 Uji Pencegahan Perlekatan Biofilm *Streptococcus pneumoniae*

Pada pengujian pencegahan perlekatan biofilm ini memiliki berbagai macam konsentrasi supenatan yang dibutuhkan sebagai kelompok uji, yaitu konsentrasi 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, dan 3,12%. Konsentrasi tersebut dimasukkan pada masing-masing 100 µL pada *well* kelompok uji. *Well*/sumuran pada kontrol positif diisi dengan

erythromycin 0,5% sebanyak 200 μL . dilanjutkan dengan penutupan *microplate* dan diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37 °C. Selanjutnya, masukkan suspensi *S. pneumoniae* pada kelompok uji, kelompok kontrol positif dan kelompok kontrol negatif sebanyak masing-masing 100 μL . Kemudian, kontrol media diisi dengan larutan glukosa 1% ditambah TSB dan PDB yang sebelumnya telah dicampurkan. Setelah itu, tutup *microplate* dan tambahkan lapisan penutup di atasnya menggunakan *aluminium foil* dan *plastic wrap*. Setelah tertutup rapat, *microplate* dapat ditempatkan dalam inkubator selama 72 jam pada suhu 37°C.

Setelah waktu yang ditentukan, *microplate* dapat dikeluarkan dan dibuang isi dari semua *wells*, kemudian dilanjutkan pencucian menggunakan larutan PBS sebanyak tiga kali. Setelah kering, dilanjutkan dengan pengisian 200 μL pewarna kristal violet 0,1% pada semua *well-plate* dan didiamkan selama 15 menit pada suhu kamar. Kemudian, kristal violet dapat dibuang dan dicuci oleh aquades steril sebanyak tiga kali dan ditunggu hingga mengering. Langkah selanjutnya ialah memasukkan 30% asam asetat sebanyak 200 μL pada semua *well-plate* dan dilanjutkan inkubasi selama 15 menit dengan suhu ruang. Kemudian, nilai OD dapat diukur dengan ELISA *plate reader* pada panjang gelombang 595 nm (Modifikasi Abida, 2020). Perhitungan perlekatan biofilm dapat dilakukan dengan menggunakan rumus berikut:

$$\% \text{ Pencegahan Perlekatan Biofilm} = \frac{\text{ODkn} - \text{ODuji}}{\text{ODkn}} \times 100\%$$

Keterangan:

- a. ODkn : Nilai OD kontrol negatif
- b. ODuji : Nilai OD kelompok uji

4.9.3.2 Uji Penghambatan Pembentukan Biofilm *Streptococcus pneumoniae*

Pada pengujian penghambatan pembentukan biofilm ini memiliki berbagai macam konsentrasi supenatan yang dibutuhkan sebagai kelompok uji, yaitu konsentrasi 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, dan 3,12%. Konsentrasi tersebut dimasukkan pada masing-masing 100 μL pada *well* kelompok uji. *Well*/sumuran pada kontrol positif diisi dengan *erythromycin* 0,5% sebanyak 200 μL . Suspensi bakteri *S. pneumoniae* dimasukkan ke kontrol negatif, kelompok kontrol positif dan kelompok uji sebanyak 100 μL . Kemudian, kontrol media dimasukkan larutan glukosa 1% dengan TSB dan PDB. Setelah itu, *microplate* ditutup dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Langkah selanjutnya adalah membuang isi dan dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali dan menunggu hingga kering selama 24 jam.

Setelah semalaman, masukkan 200 μL pewarna kristal violet 0,1% pada *wells*. Lalu diamkan selama 15 menit pada suhu ruang. Setelah diberi kristal violet, dapat dilakukan pencucian sebanyak 3 kali dengan aquades steril dan tunggu hingga mengering. Langkah selanjutnya adalah memasukkan 200 μL 30% asam asetat pada semua *well-plate* dan dilanjutkan inkubasi selama 15 menit pada suhu ruang. Kemudian,

nilai OD dapat diukur dengan ELISA *plate reader* pada panjang gelombang 595 nm (Modifikasi Abida, 2020). Perhitungan penghambatan biofilm dapat dilakukan menggunakan rumus seperti berikut:

$$\% \text{ Pencegahan Penghambatan Pembentukan Biofilm} = \frac{\text{ODkn} - \text{ODuji}}{\text{ODkn}} \times 100\%$$

Keterangan:

- a. ODkn : Nilai OD kontrol negatif
- b. ODuji : Nilai OD kelompok uji

4.9.3.3 Uji Destruksi/Penghancuran Biofilm *Streptococcus pneumoniae*

Pada pengujian destruksi/penghancuran biofilm ini, diawali dengan pemberian 200 μL suspensi *S. pneumoniae* pada kontrol negatif, kontrol positif dan kelompok uji. Kemudian, kontrol media diisi dengan larutan glukosa 1% TSB dan PDB. Selanjutnya, *microplate* diinkubasi pada suhu 37°C selama 72 jam. Lalu isi *microplate* dikeluarkan dan dibilas 3 kali dengan PBS dan dibalik hingga kering.

Langkah selanjutnya, dibutuhkan berbagai macam konsentrasi CFS jamur *A. terreus* sebagai kelompok uji, yaitu konsentrasi 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, dan 3,12%. Konsentrasi tersebut dimasukkan pada masing-masing 100 μL pada *well* kelompok uji. *Erythromycin* 0,5% sebanyak 100 μL dimasukkan ke *well* kontrol positif. Kontrol negatif diisi suspensi bakteri *S. pneumoniae* sebanyak 200 μL . Kontrol media diisi dengan 200 μL glukosa 1%, TSB dan PDB. Lalu dilanjutkan

dengan menutup *microplate* dan menempatkannya didalam inkubator pada suhu 37 °C selama 1 jam. Selanjutnya, buang isi *microplate* dan cuci 3 kali dengan PBS dan tunggu hingga kering.

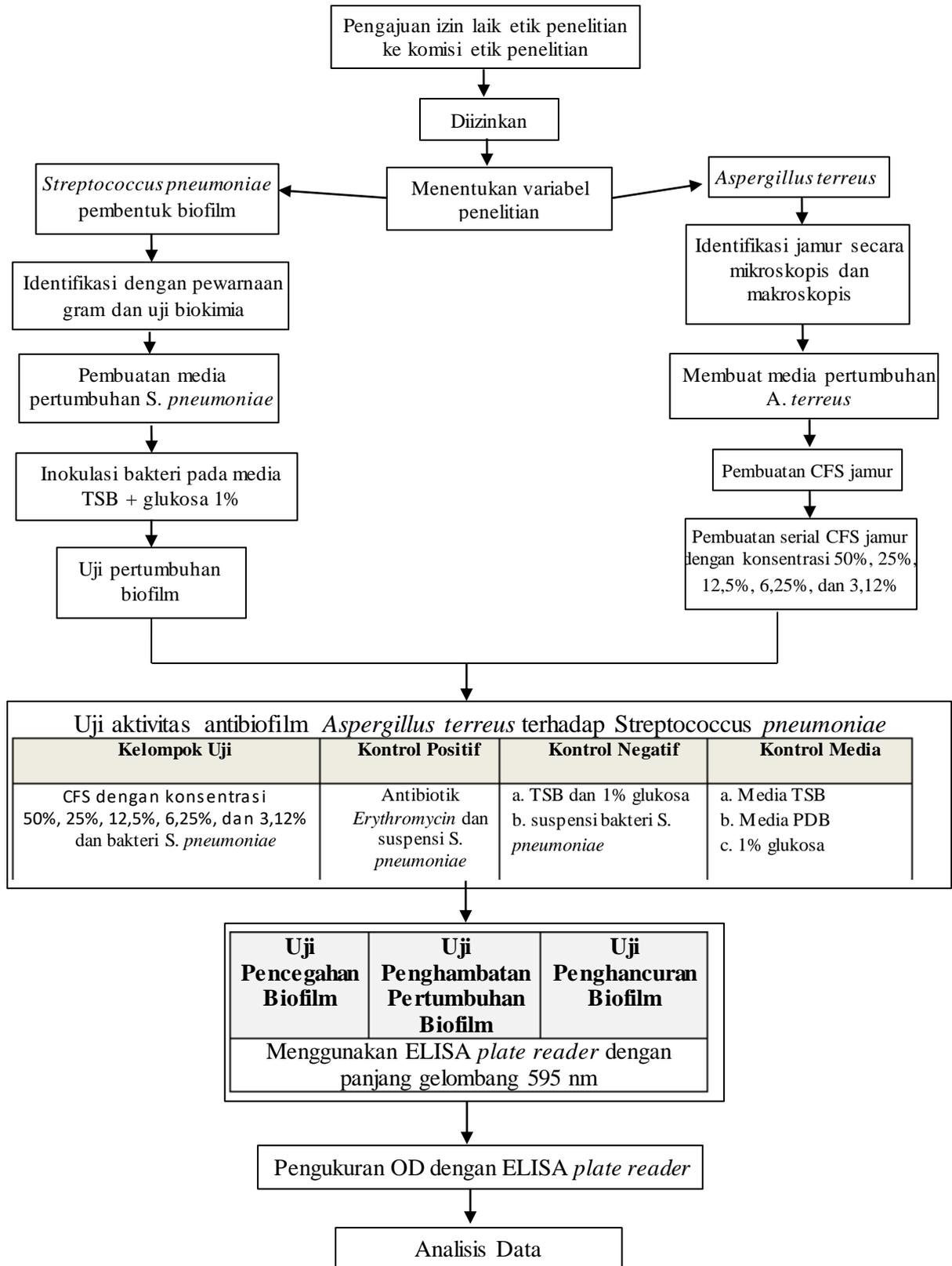
Setelah mengering, masukkan 200 µL pewarna kristal violet 0,1% pada *wells*. Lalu diamkan selama 15 menit pada suhu ruang. Setelah diberi kristal violet, dapat dilakukan pencucian sebanyak 3 kali dengan aquades steril dan tunggu hingga mengering. Langkah selanjutnya adalah memasukkan 200 µL asam asetat 30% pada semua *well-plate* dan dilanjutkan inkubasi selama 15 menit pada suhu ruang. Kemudian, nilai OD dapat diukur dengan ELISA *plate reader* pada panjang gelombang 595 nm (Modifikasi Abida, 2020). Perhitungan destruksi/penghancuran biofilm dapat dilakukan menggunakan rumus seperti berikut:

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

Keterangan:

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

4.10 Alur Penelitian



4.11 Analisis Data

Analisis data yang digunakan pada penelitian ini menggunakan aplikasi analisis *IBM SPSS Statistic*. Langkah awal yang dapat dilakukan yaitu uji normalitas dan uji homogenitas. Melalui aplikasi analisis *IBM SPSS Statistic*, peneliti mengidentifikasi uji normalitas dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk*. Jika ditemukan nilai $> 0,05$ dari sig. atau nilai signifikansi atau probabilitas, maka dapat diketahui sebaran data berdistribusi normal. Setelah itu, pengujian homogenitas dapat dilakukan melalui uji *Lavenne*. Jika diperoleh nilai $> 0,05$ maka varians data dapat dikatakan tidak berbeda secara signifikan atau varians homogen (Nuryadi *et al.*, 2017).

Selanjutnya, peneliti melakukan uji parametrik berupa *One Way ANOVA*. Jika hasilnya tidak terdistribusi normal dan tidak homogen, uji non parametrik yaitu *Kruskall Wallis* dapat dilakukan. Apabila hasil uji *One Way ANOVA* menunjukkan Sig. $< 0,05$ maka dapat diketahui adanya perbedaan yang signifikan. Sedangkan sebaliknya, Sig. $> 0,05$ artinya tidak terdapat perbedaan yang signifikan. Setelah diperoleh perbedaan signifikan (Sig. $< 0,05$), maka dilanjutkan Uji *Post Hoc* untuk mengetahui perbedaan nilai yang signifikan diantara kelompok perlakuan. Setelah itu, dilakukan uji *Pearson* untuk mengetahui adanya hubungan/korelasi antara konsentrasi supernatan (CFS jamur) yang berefek pada perlekatan biofilm, penghambatan pertumbuhan biofilm, dan destruksi/penghancuran biofilm melalui pengukuran nilai *Optical Density* (OD) (Abida, 2020).

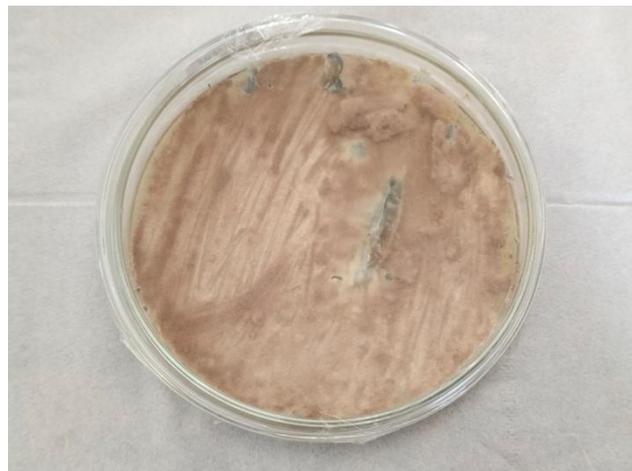
BAB V

HASIL

5.1 Hasil Uji Karakteristik *Aspergillus terreus*

5.1.1 Hasil Uji Makroskopis *Aspergillus terreus*

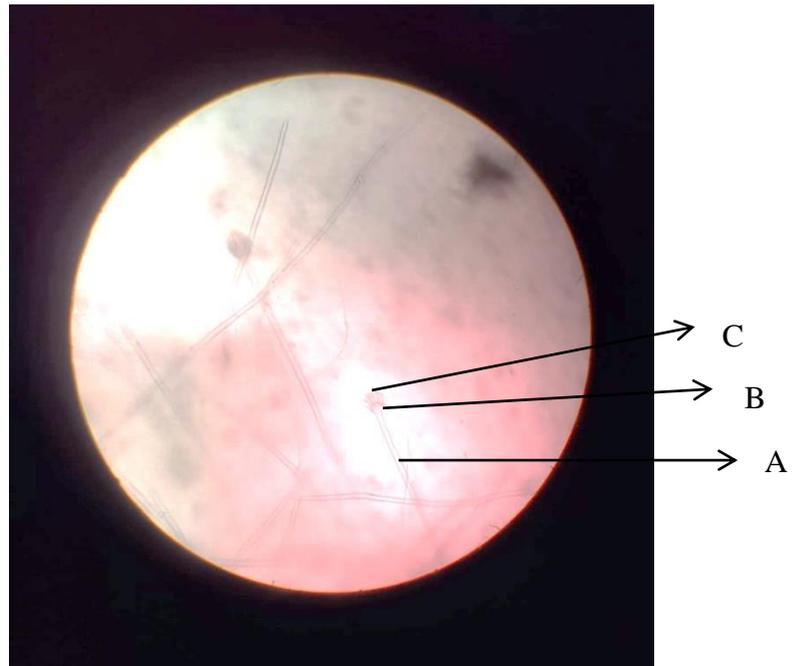
Hasil Identifikasi jamur *A. terreus* menggunakan media PDA menunjukkan pertumbuhan koloni jamur berwarna coklat muda kekuningan. Hal tersebut menunjukkan ciri dari koloni jamur *A. terreus*. Hasil identifikasi dapat dilihat **Gambar 5.1**.



Gambar 5.1 Hasil Identifikasi Makroskopis *A. terreus*. Terlihat pada gambar koloni jamur halus berwarna coklat muda kekuningan. Hal tersebut merupakan ciri makroskopis jamur *A. terreus*.

5.1.2 Hasil Uji Mikroskopis *Aspergillus terreus*

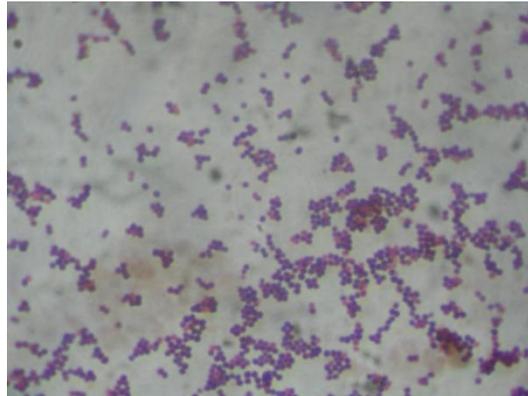
Identifikasi jamur *A. terreus* secara mikroskopis dapat dilihat menggunakan mikroskop. Pada hasil ini didapatkan stipes, vesikel dan konidiospora. Hasil identifikasi dapat dilihat **Gambar 5.2**.



Gambar 5. 2 Perbesaran 400x. Tanda panah A menunjukkan stipes, B menunjukkan vesikel dan C menunjukkan konidiospora.

5.1.3 Hasil Uji Karakteristik *Streptococcus pneumoniae*

Hasil uji mikroskopis bakteri *S. pneumoniae* menggunakan pewarnaan Gram. Hasil tersebut menunjukkan bahwa bakteri uji berwarna ungu dan berbentuk kokus. Bakteri ini termasuk kelompok Gram positif. Hasil pewarnaan bakteri dapat dilihat pada **Gambar 5.3**.



Gambar 5.3 Hasil uji pewarnaan Gram *S. pneumoniae*. Hasil tersebut menunjukkan bakteri berbentuk kokus berantai dan berwarna ungu. Hal tersebut menunjukkan bakteri *S. pneumoniae* Gram positif.

5.2 Hasil Uji Pertumbuhan Biofilm *Streptococcus pneumoniae*

Uji Pertumbuhan biofilm *S. pneumoniae* dilakukan menggunakan metode *microtiter plate biofilm assay*. Setelah dilakukan metode tersebut maka diukur nilai OD. Hasil uji pertumbuhan biofilm dapat dilihat pada **Tabel 5.1**.

Tabel 5.1 Hasil uji pertumbuhan biofilm *S. pneumoniae*

Kelompok Perlakuan	Optical Density (OD)					OD _{cut}
	Pengulangan			Rata-rata	SD	
	1	2	3			
Kelompok uji: Bakteri <i>S. pneumoniae</i>	1,459	1,677	1,856	1,664	0,198	0,524
Kelompok kontrol: Media TSB dan glukosa 2%	0,373	0,422	0,446	0,413	0,0372	

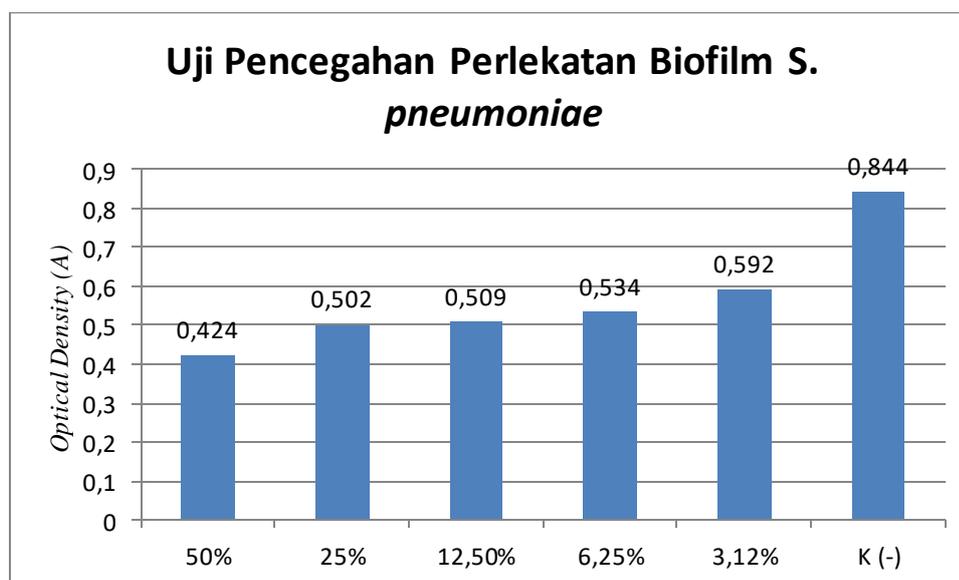
Dari tabel diatas dapat ditentukan hasil pertumbuhan biofilm *S. pneumoniae* dengan membandingkan nilai rata rata OD_{isolate} dan OD_{cut}. Nilai OD_{cut} didapatkan dengan rumus $OD_{kontrol} + (3 \times SD \ OD_{kontrol})$. OD_{kontrol} ditemukan nilai 0,413 dan SD_{kontrol} dengan nilai 0,0372. Kemudian dimasukkan kedalam rumus tersebut menghasilkan nilai 0,524. Dapat disimpulkan bahwa bakteri *S. pneumoniae* membentuk biofilm sedang atau *Moderate biofilm producer*. Hal

tersebut memenuhi kriteria hasil $2x \text{OD}_{\text{cut}} < \text{OD}_{\text{isolate}} \leq 4x$ yaitu $1,048 < 1,664 \leq 2,096$.

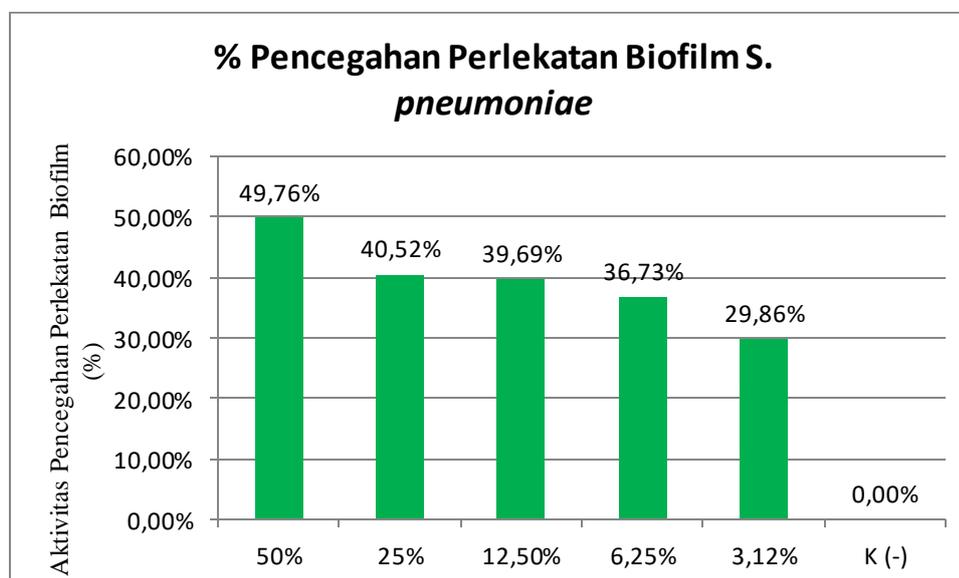
5.3 Hasil Uji Pencegahan Perlekatan Biofilm *Streptococcus pneumoniae*

Hasil *Optical Density* (OD) uji pencegahan perlekatan biofilm *S. pneumoniae* ditampilkan pada **Gambar 5.4**. Gambar tersebut membandingkan nilai OD antara kelompok uji dan kontrol negatif. **Gambar 5.4** didapatkan hasil dengan nilai absorbansi OD K- yaitu 0,844. Pada OD kelompok uji tertinggi dimiliki oleh CFS *A. terreus* 3,12% dengan nilai 0,592. OD terendah dimiliki CFS *A. terreus* 50% dengan nilai 0,424. Kemudian OD kelompok uji dimasukkan ke rumus persentase aktivitas antibiofilm *A. terreus* terhadap pencegahan perlekatan biofilm *S. pneumoniae*. Hasil persentase dapat dilihat seperti pada **Gambar 5.5**.

Berdasarkan **Gambar 5.5**, didapatkan hasil Presentase Aktivitas Antibiofilm *A. terreus* pada Pencegahan Perlekatan Biofilm *S. pneumoniae*. Kelompok uji didapatkan nilai tertinggi pada konsentrasi CFS *A. terreus* 50% dengan nilai 49,76% dan yang terendah pada CFS *A. terreus* 3,12% dengan nilai 29,86%. Sedangkan kontrol negatif didapatkan nilai konsentrasi 0,00%.



Gambar 5.4 Hasil Uji Pencegahan Perlekatan Biofilm *S. pneumoniae*. Kontrol negatif (K-) memiliki OD paling tinggi yaitu sebesar 0,844 A. CFS *A. terreus* dengan konsentrasi 50% memiliki OD yang paling rendah yaitu sebesar 0,424 A. Nilai OD CFS akan semakin meningkat seiring dengan konsentrasi CFS yang semakin kecil.

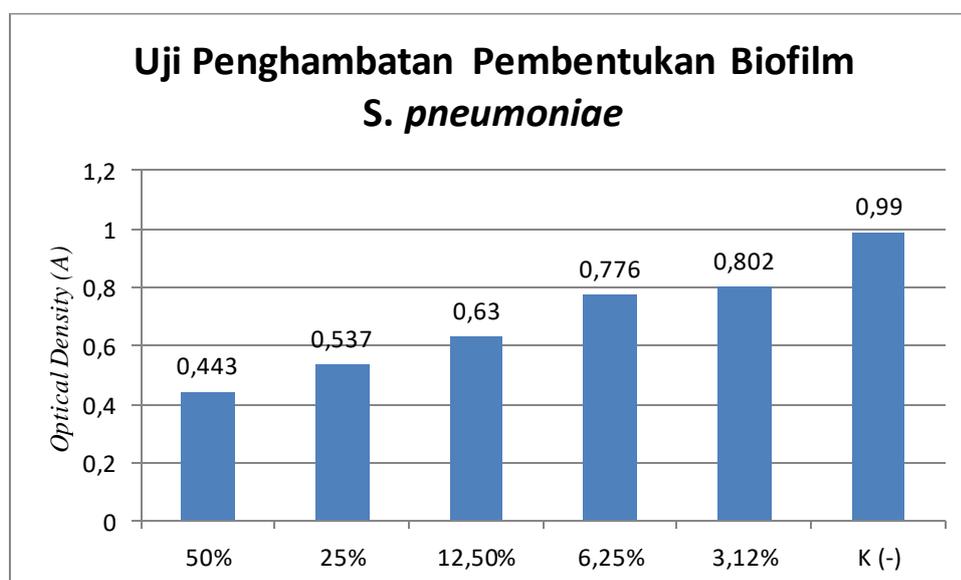


Gambar 5.5 Hasil Presentase Aktivitas Pencegahan Perlekatan Biofilm *S. pneumoniae*. Kontrol negatif (K-) memiliki presentase paling rendah yaitu sebesar 0,00%. CFS *A. terreus* dengan konsentrasi 50% memiliki presentase paling tinggi yaitu sebesar 49,76%. Nilai presentase CFS akan semakin menurun seiring dengan konsentrasi CFS yang semakin kecil.

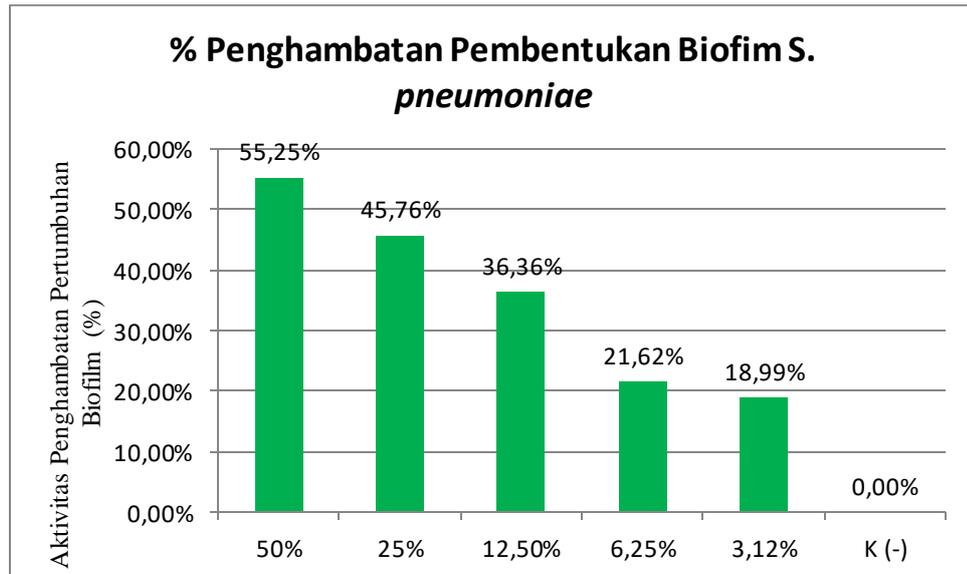
5.4 Hasil Uji Penghambatan Pembentukan Biofilm *Streptococcus pneumoniae*

Hasil perbandingan nilai OD kelompok uji dan kontrol negatif pada uji penghambatan pembentukan biofilm *S. pneumoniae* dapat dilihat pada **Gambar 5.6**. Berdasarkan grafik tersebut, didapatkan nilai absorbansi dari OD K- yaitu 0,99. Pada OD kelompok uji tertinggi dimiliki oleh CFS *A. terreus* 3,12% dengan nilai 0,802. OD terendah dimiliki oleh CFS *A. terreus* 50% dengan nilai 0,443. Selanjutnya OD kelompok uji dimasukkan ke rumus presentase aktivitas antibiofilm *A. terreus* terhadap penghambatan pembentukan biofilm *S. pneumoniae*. Hasil persentase dapat dilihat seperti pada **Gambar 5.6**.

Berdasarkan **Gambar 5.7** didapatkan hasil Presentase Aktivitas Antibiofilm *A. terreus* terhadap Penghambatan Pembentukan Biofilm *S. pneumoniae*. Kelompok uji didapatkan nilai tertinggi pada konsentrasi CFS *A. terreus* 50% dengan nilai 55,25% dan yang terendah pada CFS *A. terreus* 3,12% dengan nilai 18,99%. Sedangkan kontrol negatif didapatkan nilai konsentrasi 0,00%.



Gambar 5.6 Hasil Uji Penghambatan Pembentukan Biofilm *S. pneumoniae*. Kontrol negatif (K-) memiliki OD paling tinggi yaitu sebesar 0,99 A. CFS *A. terreus* dengan konsentrasi 50% memiliki OD yang paling rendah yaitu sebesar 0,443 A. Nilai OD CFS akan semakin meningkat seiring dengan konsentrasi CFS yang semakin kecil.



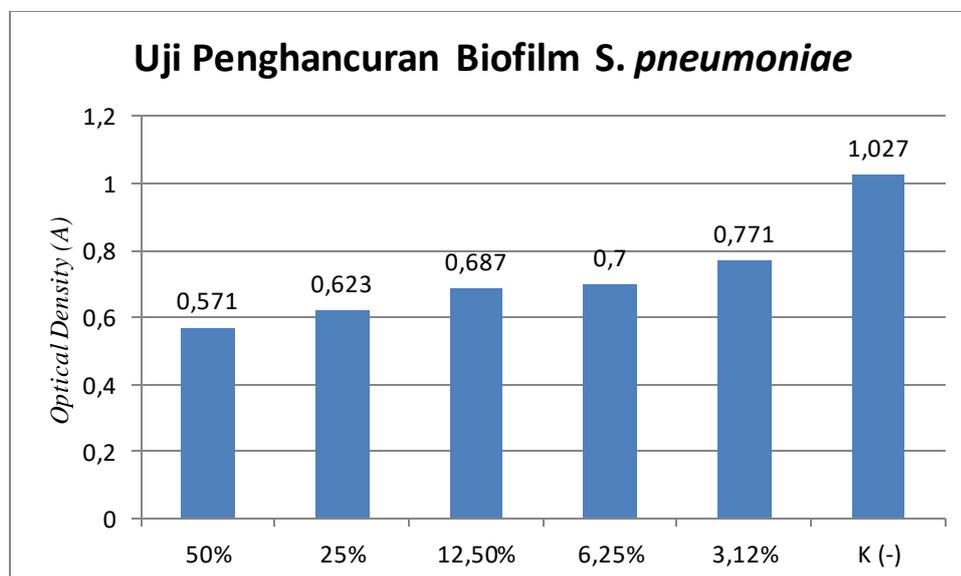
Gambar 5.7 Hasil Persentase Aktivitas Penghambatan Pembentukan Biofilm *S. pneumoniae*. Kontrol negatif (K-) memiliki presentase paling rendah yaitu sebesar 0,00%. CFS *A. terreus* dengan konsentrasi 50% memiliki presentase paling tinggi yaitu sebesar 55,25%. Nilai presentase CFS akan semakin menurun seiring dengan konsentrasi CFS yang semakin kecil.

5.5 Hasil Uji Penghancuran Biofilm *Streptococcus pneumoniae*

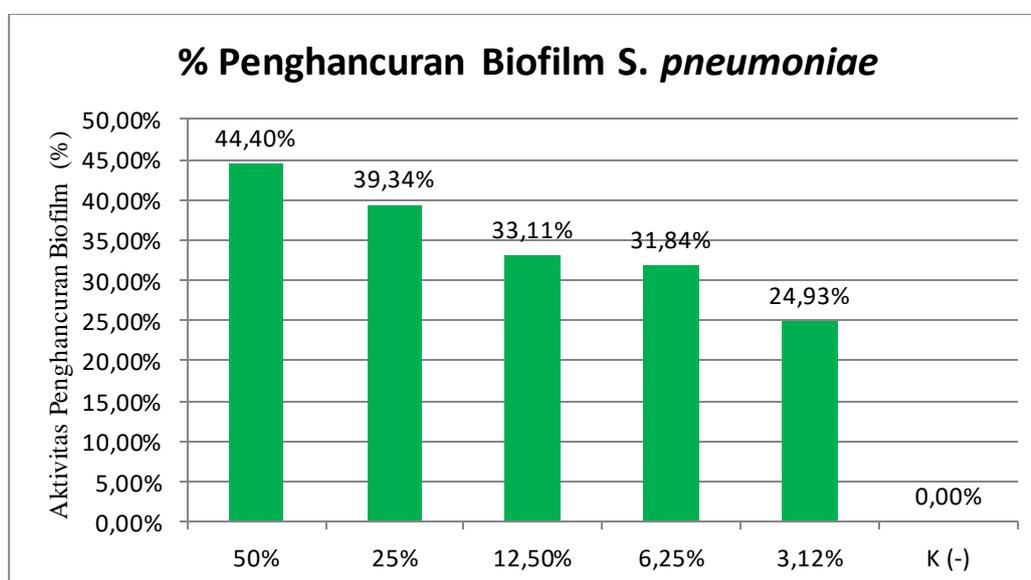
Hasil perbandingan nilai OD kelompok uji dan kontrol negatif pada uji penghancuran biofilm *S. pneumoniae* dapat dilihat pada **Gambar 5.8**. Berdasarkan **Gambar 5.8**, didapatkan nilai absorbansi OD K- yaitu 1,027. Pada OD kelompok uji tertinggi dimiliki oleh CFS *A. terreus* 3,12% dengan nilai 0,771. OD terendah dimiliki oleh CFS *A. terreus* 50% dengan nilai 0,571. Selanjutnya OD kelompok uji dimasukkan ke rumus presentase aktivitas antibiofilm *A. terreus* terhadap penghancuran biofilm *S. pneumoniae*. Hasil persentase dapat dilihat seperti pada **Gambar 5.9**.

Berdasarkan **Gambar 5.9** didapatkan hasil Presentase Aktivitas Antibiofilm *A. terreus* pada Penghancuran Biofilm *S. pneumoniae* dengan nilai tertinggi pada CFS *A. terreus* 50% dengan nilai 44,40% dan yang terendah yaitu

CFS *A. terreus* 3,12% dengan nilai 24,93%. Sedangkan kontrol negatif didapatkan nilai konsentrasi 0,00%.



Gambar 5.8 Hasil Uji Penghancuran Biofilm *S. pneumoniae*. Kontrol negatif (K-) memiliki OD paling tinggi yaitu sebesar 1,027 A. CFS *A. terreus* dengan konsentrasi 50% memiliki OD yang paling rendah yaitu sebesar 0,571 A. Nilai OD CFS akan semakin meningkat seiring dengan konsentrasi CFS yang semakin kecil.



Gambar 5. 9 Hasil presentase Aktivitas Penghancuran Biofilm *S. pneumoniae*. Kontrol negatif (K-) memiliki presentase paling rendah yaitu sebesar 0,00%. CFS *A. terreus* dengan konsentrasi 50% memiliki presentase paling tinggi yaitu sebesar 44,40%. Nilai presentase CFS akan semakin menurun seiring dengan konsentrasi CFS yang semakin kecil.

5.6 Hasil Uji Analisis Data

5.7.1 Hasil Uji Normalitas dan Homogenitas

Uji normalitas pada penelitian ini menggunakan uji Shapiro-Wilk dan uji homogenitas Lavene. Pengambilan keputusan berdasarkan hasil *p-value*. Data dikatakan terdistribusi normal dan homogen apabila *p-value* >0,05. Data yang tidak terdistribusi normal dan tidak homogen memiliki *p-value* <0,05. Data uji normalitas dan homogenitas dapat dilihat dari tabel berikut.

Tabel 5.2 Hasil Uji Normalitas dan Homogenitas

Kelompok	Uji Pencegahan Perlekatan		Uji Penghambatan Pertumbuhan		Uji Penghancuran	
	Normalitas	Homogenitas	Normalitas	Homogenitas	Normalitas	Homogenitas
Konsentrasi 50%	0,815	0,007	0,794	0,143	0,059	0,208
Konsentrasi 25%	0,883		0,200		0,492	
Konsentrasi 12,5%	0,817		0,257		0,692	
Konsentrasi 6,25%	0,312		0,166		0,271	
Konsentrasi 3,12%	0,154		0,264		0,736	
Kontrol Negatif	0,567		0,107		0,557	

Hasil uji normalitas pada tabel tersebut menunjukkan bahwa uji pencegahan perlekatan biofilm, uji penghambatan pertumbuhan biofilm dan uji penghancuran biofilm *S. pneumoniae* memiliki nilai *p-value* >0,05. Hal ini menunjukkan bahwa data diatas terdistribusi normal. Pada hasil

uji homogenitas terlihat bahwa hasil *p-value* pada uji pencegahan perlekatan biofilm *S. pneumoniae* menunjukkan hasil $<0,05$ yang menunjukkan bahwa data tidak homogen. Pada uji penghambatan pertumbuhan biofilm dan uji penghancuran biofilm *S. pneumoniae* menunjukkan hasil $>0,05$ yang berarti data homogen.

5.7.2 Hasil Uji *One Way Anova* dan *Kruskal-Wallis*

Uji *One Way Anova* dan *Kruskal-Wallis* digunakan untuk mengetahui adanya perbedaan yang signifikan dalam suatu data. Data dikatakan adanya perbedaan signifikan apabila nilai *p-value* <0.05 . Berdasarkan **Lampiran 4 dan 5**, hasil uji *Kruskal-Wallis* pada pencegahan perlekatan biofilm *S. pneumoniae* yaitu 0,028. Uji penghambatan pembentukan biofilm dan uji penghancuran biofilm *S. pneumoniae* menggunakan *One Way Anova* yang masing-masing menunjukkan hasil 0,000 dan 0,002. Ketiga uji tersebut dapat disimpulkan nilai *p-value* <0.05 yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan.

5.7.3 Hasil Uji *Mann-Whitney U* dan *Post Hoc*

Uji *Post Hoc* digunakan untuk mengetahui perbedaan signifikansi dari masing-masing kelompok data. Uji *Tukey HSD* adalah jenis uji yang digunakan pada uji *Post Hoc* apabila data terdistribusi normal dan homogen. Data dikatakan signifikan apabila nilai *p-value* <0.05 . Pada data yang tidak normal maupun tidak homogen, maka untuk mengetahui nilai signifikansi menggunakan *Mann-Whitney U*. Interpretasi *Mann-Whitney U* apabila *p-value* <0.05 yang berarti data signifikan.

a. Uji Pencegahan Perlekatan Biofilm *Streptococcus pneumoniae*

Tabel 5.3 Hasil Uji *Mann-Whitney U* Pencegahan Perlekatan Biofilm *S. pneumoniae*

Perlakuan	Nilai Probalitas					
	50%	25%	12,5%	6,25%	3,12%	K-
50%		0,376	0,513	0,275	0,050	0,050
25%	0,376		0,127	0,827	0,050	0,050
12,5%	0,513	0,127		0,127	0,050	0,050
6,25%	0,275	0,827	0,127		0,275	0,050
3,12%	0,050	0,050	0,050	0,275		0,127
K-	0,050	0,050	0,050	0,050	0,127	

Keterangan: K- (kontrol negatif). Warna latar abu-abu menandakan data signifikan (p -value <0,05)

Pada hasil uji *Mann-Whitney U* pencegahan perlekatan biofilm *S. pneumoniae* tidak didapatkan perbedaan yang signifikan antar kelompok.

b. Uji Penghambatan Pertumbuhan Biofilm *Streptococcus pneumoniae*

Tabel 5.4 Hasil Uji *Post Hoc Tukey HSD* Penghambatan Pertumbuhan Biofilm *S. pneumoniae*

Perlakuan	Nilai Probalitas					
	50%	25%	12,5%	6,25%	3,12%	K-
50%		0,772	0,050	0,052	0,004	0,000
25%	0,772		0,374	0,383	0,035	0,000
12,5%	0,050	0,374		1,000	0,653	0,001
6,25%	0,052	0,383	1,000		0,642	0,001
3,12%	0,004	0,035	0,653	0,642		0,008
K-	0,000	0,000	0,001	0,001	0,008	

Keterangan: K- (kontrol negatif). Warna latar abu-abu menandakan data signifikan (p -value <0,05)

Berdasarkan hasil uji *Post Hoc Tukey HSD* penghambatan pertumbuhan biofilm *S. pneumoniae* terdapat perbedaan signifikan antara OD pada kontrol negatif terhadap lima konsentrasi uji yaitu konsentrasi 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, dan 3,12%. Konsentrasi 50% memiliki perbedaan yang signifikan dengan konsentrasi 3,12%.

c. Uji Penghancuran Biofilm *Streptococcus pneumoniae*

Tabel 5.5 Hasil Uji *Post Hoc Tukey HSD* Penghancuran Biofilm *S. pneumoniae*

Perlakuan	Nilai Probalitas					
	50%	25%	12,5%	6,25%	3,12%	K-
50%		0,899	0,669	0,209	0,315	0,001
25%	0,899		0,996	0,707	0,853	0,005
12,5%	0,669	0,996		0,921	0,982	0,010
6,25%	0,209	0,707	0,921		1,000	0,052
3,12%	0,315	0,853	0,982	1,000		0,032
K-	0,001	0,005	0,010	0,052	0,032	

Keterangan: K- (kontrol negatif). Warna latar abu-abu menandakan data signifikan (p -value <0,05)

Pada tabel diatas menunjukkan hasil uji *Post Hoc Tukey HSD* penghancuran biofilm *S. pneumoniae*. Hasil tersebut terdapat perbedaan signifikan pada OD kontrol negatif terhadap konsentrasi 50%, 25%, 12,5%, dan 3,12%.

5.7.4 Hasil Uji Korelasi

Uji Korelasi digunakan untuk menentukan arah dan tingkat kekuatan hubungan antara konsentrasi CFS *A. terreus* terhadap besar OD masing-masing kelompok uji. Hasil p -value pada uji korelasi Pearson dan Spearman untuk melihat adanya hubungan yang signifikan. Uji korelasi ditentukan dari nilai normalitas dan homogenitas, Jika data terdistribusi normal dan homogen dapat menggunakan uji korelasi *Pearson*. Pada hasil yang tidak memenuhi nilai normalitas atau homogenitas atau keduanya dapat menggunakan uji korelasi *Spearman*. Nilai p -value <0,05 menunjukkan data signifikan. Apabila hasil nilai p -value menunjukkan >0,05 berarti tidak terdapat hubungan yang signifikan. Tingkat kekuatan hubungan dapat ditentukan dari hasil uji kategori dalam tabel berikut.

Tabel 5.6 Derajat Hubungan Uji Korelasi

Nilai Uji Korelasi	Interpretasi
0,00 – 0,20	Tidak ada korelasi
0,21 – 0,40	Korelasi lemah
0,40 – 0,60	Korelasi sedang
0,61 – 0,80	Korelasi kuat
0,81 – 0,99	Korelasi sangat kuat
1	Korelasi sempurna

(Khotimah, 2020; Lestari *et al.*, 2017)

Hasil uji korelasi juga dapat bertanda positif atau negatif. Setiap tanda atau arah memiliki interpretasi yang berbeda. Arah positif menunjukkan hubungan yang searah antara variabel dan arah negatif menunjukkan arah hubungan yang berbanding terbalik antara variabel.

a. Uji Pencegahan Perlekatan Biofilm *Streptococcus pneumoniae*

Hasil uji korelasi pada uji pencegahan perlekatan biofilm *S. pneumoniae* menggunakan *Spearman*. Didapatkan hasil nilai *p-value* 0,014 menunjukkan data signifikan. Hasil koefisien korelasi *Spearman* menunjukkan angka -0,617 yang berarti terdapat hubungan yang kuat antara konsentrasi CFS *A. terreus* dengan pencegahan perlekatan biofilm *S. pneumoniae*. Arah hubungan ditunjukkan pada nilai korelasi *Spearman* menunjukkan tanda negatif yang berarti arah korelasi berbanding terbalik antara variabel. Menurut hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa CFS *A. terreus* memiliki korelasi yang signifikan terhadap pencegahan perlekatan biofilm *S. pneumoniae*.

b. Uji Penghambatan Pertumbuhan Biofilm *Streptococcus pneumoniae*

Hasil uji korelasi pada uji penghambatan pertumbuhan biofilm *S. pneumoniae* menggunakan *Pearson*. Didapatkan hasil nilai *p-value* 0,000 yang menunjukkan data signifikan. Nilai koefisien korelasi *Pearson* menunjukkan angka -0,800 yang berarti terdapat hubungan yang kuat antara konsentrasi CFS *A. terreus* dengan penghambatan pertumbuhan biofilm *S. pneumoniae*. Arah korelasi ditunjukkan dari tanda nilai korelasi yaitu negatif yang berarti arah korelasi berbanding terbalik antara variabel. Berdasarkan hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa CFS *A. terreus* memiliki korelasi terhadap penghambatan pertumbuhan biofilm *S. pneumoniae*.

c. Uji Penghancuran Biofilm *Streptococcus pneumoniae*

Hasil uji korelasi pada uji penghancuran biofilm *S. pneumoniae* menggunakan *Pearson*. Didapatkan hasil nilai *p-value* 0,003 yang menunjukkan data signifikan. Hasil korelasi menunjukkan angka -0,703 yang menunjukkan derajat hubungan korelasi kuat antara penghancuran biofilm *S. pneumoniae* dengan konsentrasi CFS *A. terreus*. Arah hubungan ditunjukkan dari tanda pada nilai korelasi *Pearson* yaitu negatif yang menunjukkan arah hubungan berbanding terbalik antara variabel. Pada hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa CFS *A. terreus* memiliki korelasi terhadap penghancuran biofilm *S. pneumoniae*.

BAB VI

PEMBAHASAN

6.1 Identifikasi *Aspergillus terreus*

Saat melakukan penelitian, diawali dengan identifikasi jamur terlebih dahulu. Jamur yang digunakan dalam penelitian ini adalah jamur *A. terreus*. Jamur tersebut ditumbuhkan dengan menggunakan media PDA pada cawan petri. Kemudian inkubasi cawan petri ke dalam inkubator pada suhu 25-30°C. Waktu inkubasi pada penelitian ini adalah 5 hari.

Berdasarkan identifikasi secara makroskopis dapat dilihat pada **Gambar 5.1**, diperoleh koloni halus yang berwarna coklat muda kekuningan (Pujiati, 2018). Sedangkan, secara mikroskopis **Gambar 5.2**, *A. terreus* ditemukan konidiospora halus, vesikel semibulat dan stipes (Nazip, 2006; Zulkifli, 2015; Setiawan, 2010; Pujiati *et al*, 2018).

6.2 Identifikasi *Streptococcus pneumoniae*

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *S. pneumoniae*. Bakteri tersebut dilakukan identifikasi dengan uji pewarnaan Gram. Interpretasi didapatkan bentuk bulat berwarna ungu seperti pada **Gambar 5.3**. Hal ini terjadi karena pewarnaan kristal violet diikat oleh dinding sel bakteri yang diperkuat oleh iodine. Kristal violet tersebut akan dipertahankan oleh bakteri. Ketika terjadi pewarnaan cat, cetakan tidak terpengaruh saat diberi cat yang berwarna merah (Putri *et al.*, 2017).

6.3 Uji Aktivitas Antibiofilm *Aspergillus terreus* terhadap Pencegahan Perlekatan Biofilm *Streptococcus pneumoniae*

Langkah pertama untuk membentuk biofilm adalah melalui proses perlekatan. Bakteri dapat menempel pada substrat permukaan biologis maupun benda mati (Mundiri *et al.*, 2020). Bakteri *S. pneumoniae* menempel ke permukaan dengan menggunakan pili, fimbriae dan protein membran lainnya. Hal tersebut merupakan faktor virulensi dari *S. pneumoniae* (Yadav, 2020; Lailia, 2022). Setelah proses perlekatan, bakteri mulai memproduksi EPS untuk membantu bakteri melekat secara kuat dipermukaan (Thi, Wibowo and Rehm, 2020). Kandungan *A. terreus* memiliki enzim yang dinamakan enzim selulase dan enzim protease. Enzim selulase dapat memotong ikatan $\beta(1,4)$ glikosidik yang ada pada EPS. Sedangkan enzim protease memecah protein ekstraseluler dari EPS. Kedua enzim tersebut dapat mengganggu proses perlekatan bakteri sehingga biofilm tidak terbentuk (Fleming *et al.*, 2017; Jiang Y *et al.*, 2020).

Uji pencegahan perlekatan biofilm pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan CFS *A. terreus* dalam mencegah perlekatan pada awal pembentukan biofilm. Uji diawali dengan memasukkan CFS kedalam *microplate* untuk melapisi dinding sehingga biofilm bakteri tidak melekat. Berdasarkan **Gambar 5.5**, menunjukkan nilai absorbansi dari uji pencegahan perlekatan biofilm *S. pneumoniae*. Kelompok K- yang tidak diberi perlakuan digunakan sebagai pembanding bagi kelompok uji. Pada hasil kelompok konsentrasi uji, grafik tertinggi dimiliki oleh CFS *A.*

terreus 3,12% dengan nilai 0,592. Pada konsentrasi tersebut merupakan konsentrasi terkecil dan berefek minimum pada proses pencegahan perlekatan, sehingga cairan yang dibentuk keruh dan menghasilkan OD yang tinggi. Sebaliknya, nilai absorbansi yang terendah dimiliki oleh CFS *A. terreus* 50% dengan nilai 0,424. Hal tersebut dikarenakan konsentrasi 50% adalah CFS yang tidak mengalami pengenceran bertingkat, sehingga efek untuk pencegahan perlekatan biofilm lebih besar. Cairan pada konsentrasi ini tidak terlalu keruh dan nilai OD yang dihasilkan grafiknya lebih rendah dibanding kelompok uji lainnya. Pada **Gambar 5.6**, menunjukkan presentase aktivitas antibiofilm *A. terreus* pada uji pencegahan perlekatan biofilm *S. pneumoniae*. Presentase tersebut telah dimasukkan kedalam rumus perlekatan biofilm. Hasil K- menunjukkan grafik terendah yaitu 0,00% yang berarti tidak memiliki daya hambat. Grafik kelompok uji tertinggi terletak pada CFS *A. terreus* 50% dengan nilai 49,76% dan yang terendah yaitu CFS *A. terreus* 3,12% dengan nilai 29,86%. Hal tersebut menunjukkan bahwa CFS *A. terreus* 50% berefek tinggi pada aktivitas pencegahan perlekatan biofilm *S. pneumoniae*.

Hasil OD dan presentase yang diperoleh selanjutnya di analisis menggunakan SPSS versi 25. Pertama dilakukan uji normalitas dengan shapiro-wilk menunjukkan nilai sig >0,05 yang berarti data yang diperoleh normal. Kemudian dilakukan uji homogenitas dan hasilnya menunjukkan sig <0,05 yang berarti data yang diperoleh tidak homogen. Jika tidak homogen, maka langkah selanjutnya adalah *Kruskal-Wallis* dan hasil menunjukkan sig <0,05 yang berarti ada perbedaan signifikan. Untuk

melihat perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan maka dilakukan uji *Mann-Whitney U* dengan kriteria nilai *p-value* <0,05. Selanjutnya dilakukan uji korelasi *Spearman* untuk mengetahui hubungan antara pemberian konsentrasi CFS *A. terreus* terhadap pencegahan perlekatan biofilm *S. pneumoniae* dengan melihat nilai OD yang diperoleh. Hasil uji tersebut didapatkan nilai korelasi -0,617 yang menunjukkan derajat hubungan kuat dengan arah hubungan negatif. Arah hubungan negatif diartikan antar variabel memiliki hubungan yang berbanding terbalik (Budiwanto, 2014). Sehingga semakin besar konsentrasi CFS, maka nilai OD pencegahan perlekatan biofilm *S. pneumoniae* akan semakin kecil. Hal ini terjadi dikarenakan CFS konsentrasi 50% tidak mengalami pengenceran sehingga kandungan yang ada dalam CFS lebih banyak (Utami, 2021).

6.4 Uji Aktivitas Antibiofilm *Aspergillus terreus* terhadap Penghambatan Pembentukan Biofilm *Streptococcus pneumoniae*

Biofilm mulai terbentuk setelah bakteri melekat secara kuat atau *irreversible*. Bakteri membentuk mikrokoloni yang telah berproliferasi dan tumbuh menjadi kumpulan kecil. Bakteri dalam mikrokoloni saling berinteraksi untuk memproduksi EPS yang banyak. Hal tersebut bertujuan untuk menambah ketebalan dan memperkokoh biofilm (Thi, Wibowo and Rehm, 2020; Lailia, 2022). Diketahui kandungan dari *A. terreus* dapat menghambat pembentukan biofilm melalui perombakan dari EPS. Kandungan tersebut seperti enzim selulase yang dapat menghidrolisis serat

selulosa. Sedangkan enzim protease dapat berfungsi dalam perombakan protein menjadi peptide sederhana (Setiawan, 2010).

Uji penghambatan pertumbuhan dilakukan dengan memasukkan secara bersamaan CFS *A. terreus* dengan *S. pneumoniae* kedalam masing-masing *well microplate*. Berdasarkan **Gambar 5.7**, menunjukkan nilai absorbansi dari uji penghambatan pembentukan biofilm *S. pneumoniae*. Kelompok K- yang tidak diberi perlakuan digunakan sebagai pembanding bagi kelompok uji. Pada hasil kelompok konsentrasi uji, grafik tertinggi dimiliki oleh CFS *A. terreus* 3,12% dengan nilai 0,802. Hal ini dikarenakan pada konsentrasi 3,12% merupakan konsentrasi terkecil dan berefek minimum pada proses penghambatan pembentukan, sehingga cairan yang dibentuk keruh dan menghasilkan OD yang tinggi. Sebaliknya, nilai absorbansi yang terendah dimiliki oleh CFS *A. terreus* 50% dengan nilai 0,443. Hal tersebut dikarenakan konsentrasi yang digunakan adalah CFS yang tidak mengalami pengenceran bertingkat, sehingga efek untuk penghambatan pembentukan biofilm lebih besar. Cairan pada konsentrasi 50% tidak terlalu keruh dan nilai OD yang dihasilkan grafiknya lebih rendah dibanding kelompok uji lainnya. Pada **Gambar 5.8**, menunjukkan presentase aktivitas antibiofilm *A. terreus* pada uji penghambatan pembentukan biofilm *S. pneumoniae*. Presentase tersebut telah dimasukkan kedalam rumus penghambatan pembentukan biofilm. Hasil K- menunjukkan grafik terendah yaitu 0,00% yang berarti tidak memiliki daya hambat. Grafik tertinggi terletak pada CFS *A. terreus* 50% dengan nilai 55,25% dan yang terendah yaitu CFS *A. terreus* 3,12% dengan nilai

18,99%. Hal tersebut menunjukkan bahwa CFS *A. terreus* 50% berefek tinggi pada aktivitas penghambatan pertumbuhan biofilm *S. pneumoniae*.

Hasil OD dan presentase yang diperoleh selanjutnya di analisis menggunakan SPSS versi 25. Pertama dilakukan uji normalitas dengan shapiro-wilk menunjukkan nilai *p-value* >0,05 yang berarti data yang diperoleh normal. Kemudian dilakukan uji homogenitas dan hasilnya menunjukkan *p-value* >0,05 yang berarti data yang diperoleh homogen. Selanjutnya dilakukan uji *One Way Anova* dan hasilnya menunjukkan <0,05 yang berarti ada perbedaan signifikan. Untuk melihat perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan maka dilakukan uji *Post Hoc* dengan kriteria nilai *p-value* <0,05. Selanjutnya dilakukan uji korelasi *Pearson* untuk mengetahui hubungan antara pemberian konsentrasi CFS *A. terreus* terhadap penghambatan pertumbuhan biofilm *S. pneumoniae* dengan melihat nilai OD yang diperoleh. Hasil uji tersebut didapatkan nilai korelasi -0,800 yang menunjukkan derajat hubungan kuat dengan arah hubungan negatif. Arah hubungan negatif diartikan antar variabel memiliki hubungan yang berbanding terbalik (Budiwanto, 2014). Sehingga semakin besar konsentrasi CFS, maka nilai OD penghambatan pertumbuhan biofilm *S. pneumoniae* akan semakin kecil. Hal ini terjadi dikarenakan CFS konsentrasi 50% tidak mengalami pengenceran sehingga kandungan yang ada dalam CFS lebih banyak (Utami, 2021).

6.5 Uji Aktivitas Antibiofilm *Aspergillus terreus* terhadap Penghancuran Biofilm *Streptococcus pneumoniae*

Biofilm telah mengalami maturasi membentuk makrokoloni bakteri, sehingga lapisan biofilm semakin kokoh. Peningkatan pertahanan biofilm dapat mengakibatkan situasi yang merugikan (Lailia, 2022). Kandungan *A. terreus* memiliki enzim yang dinamakan enzim selulase dan enzim protease. Enzim selulase dapat memotong ikatan $\beta(1,4)$ glikosidik. Sedangkan enzim protease dapat memecah protein menjadi peptide sederhana. Kedua enzim tersebut dapat mengganggu kestabilan biofilm dewasa sehingga menyebabkan bakteri terlepas dari biofilm ke lingkungan (Setiawan, 2010; Jiang Y *et al.*, 2020).

Berdasarkan **Gambar 5.9**, menunjukkan nilai absorbansi dari uji penghancuran biofilm *S. pneumoniae*. Kelompok K- yang tidak diberi perlakuan digunakan sebagai pembanding bagi kelompok uji. Pada hasil kelompok konsentrasi uji, grafik tertinggi dimiliki oleh CFS *A. terreus* 3,12% dengan nilai 0,771. Hal ini dikarenakan pada konsentrasi 3,12% merupakan konsentrasi terkecil dan berefek minimum pada proses penghancuran, sehingga cairan yang dibentuk keruh dan menghasilkan OD yang tinggi. Sebaliknya, nilai absorbansi yang terendah dimiliki oleh CFS *A. terreus* 50% dengan nilai 0,542. Hal tersebut dikarenakan konsentrasi yang digunakan adalah CFS yang tidak mengalami pengenceran bertingkat, sehingga efek untuk penghancuran biofilm lebih besar. Cairan pada konsentrasi 50% tidak terlalu keruh dan nilai OD yang dihasilkan grafiknya lebih rendah dibanding kelompok uji lainnya. Pada **Gambar 5.10**, menunjukkan presentase aktivitas antibiofilm *A. terreus* pada uji penghancuran biofilm *S. pneumoniae*. Presentase tersebut telah

dimasukkan kedalam rumus penghancuran biofilm. Hasil K- menunjukkan grafik terendah yaitu 0,00% yang berarti tidak memiliki daya hambat. Grafik tertinggi terletak pada CFS *A. terreus* 50% dengan nilai 44,40% dan yang terendah yaitu CFS *A. terreus* 3,12% dengan nilai 24,93%. Hal tersebut menunjukkan bahwa CFS *A. terreus* 50% berefek tinggi pada aktivitas penghancuran biofilm *S. pneumoniae*.

Hasil OD dan presentase yang diperoleh selanjutnya di analisis menggunakan SPSS versi 25. Pertama dilakukan uji normalitas dengan shapiro-wilk menunjukkan nilai *p-value* >0,05 yang berarti data yang diperoleh normal. Kemudian dilakukan uji homogenitas dan hasilnya menunjukkan *p-value* >0,05 yang berarti data yang diperoleh homogen. Selanjutnya dilakukan uji *One Way Anova* dan hasilnya menunjukkan <0,05 yang berarti ada perbedaan signifikan. Untuk melihat perbedaan signifikan antar kelompok perlakuan maka dilakukan uji *Post Hoc* dengan kriteria nilai *p-value* <0,05. Selanjutnya dilakukan uji korelasi *Pearson* untuk mengetahui hubungan antara pemberian konsentrasi CFS *A. terreus* terhadap penghancuran biofilm *S. pneumoniae* dengan melihat nilai OD yang diperoleh. Hasil uji tersebut didapatkan nilai korelasi -0,703 yang menunjukkan derajat hubungan kuat dengan arah hubungan negatif. Arah hubungan negatif diartikan antar variabel memiliki hubungan yang berbanding terbalik (Budiwanto, 2014). Sehingga semakin besar konsentrasi CFS, maka nilai OD penghancuran biofilm *S. pneumoniae* akan semakin kecil. Hal ini terjadi dikarenakan CFS konsentrasi 50% tidak

mengalami pengenceran sehingga kandungan yang ada dalam CFS lebih banyak (Utami, 2021).

6.6 Integrasi Islam

Pneumonia merupakan infeksi saluran nafas yang mengenai parenkim paru dan merupakan penyebab utama morbiditas serta mortalitas pada bayi dan anak di seluruh dunia (WHO, 2017). *Streptococcus pneumoniae* merupakan salah satu bakteri penyebab pneumonia. *S. pneumoniae* tergolong flora normal pada traktus respiratorius, Akan tetapi bakteri ini dapat menjadi patogen dimana penyebarannya melalui kontak langsung dengan sekret pernafasan. Selain itu, bakteri ini menyebar melalui autoinokulasi dari pasien (CDC, 2017; Sari *et al.*, 2020).

S. pneumoniae mempunyai berbagai faktor virulensi, salah satunya biofilm. Karena adanya pembentukan biofilm oleh bakteri *S. pneumoniae*, maka efek yang dihasilkan ialah menyebabkan terjadinya resistensi antibiotik. *S. pneumoniae* mengalami resistensi antibiotik terhadap beta-laktam, makrolida, lincosamides, fluoroquinolones, tetracyclines, dan trimethoprim- sulfamethoxazole (TMP-SMX) (Cherazard R *et al.*, 2017). Resistensi yang ditimbulkan mengakibatkan tatalaksana menjadi sulit. Oleh karena itu, banyak peneliti yang tertarik dengan bahan alam yang telah disediakan oleh Allah SWT.

Allah SWT berfirman pada Surah Taa Haa ayat 53 yang artinya “Allah 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 tumbuh-tumbuhan.”. Ayat Al-Quran ini berisi perintah kepada manusia untuk memperhatikan bahan-bahan alam yang telah Allah ciptakan. Oleh karena itu, pengembangan obat berbasis bahan alam adalah salah satu cara untuk mendapatkan obat yang berpotensi memiliki aktivitas sebagai antibiofilm.

Salah satu bahan alami sebagai pencegahan pembentukan biofilm adalah jamur golongan *Aspergillus*. Jamur tersebut memiliki enzim dan metabolit sekunder yang berfungsi sebagai faktor menghambat pembentukan biofilm. Oleh sebab itu, peneliti melakukan penelitian jenis jamur tersebut agar dapat berguna bagi manusia.

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

1. CFS *A. terreus* memiliki aktivitas dalam pencegahan perlekatan biofilm *S. pneumoniae* dengan presentase tertinggi pada konsentrasi 50% yaitu sebesar 49,76%.
2. CFS *A. terreus* memiliki aktivitas penghambatan pertumbuhan biofilm *S. pneumoniae* dengan presentase tertinggi pada konsentrasi 50% yaitu sebesar 55,25%.
3. CFS *A. terreus* memiliki aktivitas dalam penghancuran biofilm *S. pneumoniae* dengan presentase tertinggi pada konsentrasi 50% yaitu sebesar 44,40%.
4. CFS *A. terreus* mempunyai aktivitas antibiofilm terhadap biofilm *S. pneumoniae*.

7.2 Saran

1. Bagi peneliti selanjutnya dapat melakukan pengujian aktivitas antibiofilm menggunakan metode yang berbeda atau dengan bakteri yang berbeda.
2. Diperlukan adanya uji lanjutan mengenai toksisitas dan efek samping dari penggunaan CFS *A. terreus* konsentrasi tertinggi, yaitu 50%.
3. Kandungan *terreic acid* pada penelitian sebelumnya memiliki aktivitas antibakteri, namun efek spesifiknya belum diketahui. Oleh

karena itu, bagi peneliti selanjutnya dapat melakukan pengujian kandungan *terreic acid* terhadap biofilm bakteri.

DAFTAR PUSTAKA

- Abida, H. Y. (2020) 'Uji Aktivitas Antibiofilm Ekstrak Daun Murbei Hitam (*Morus Nigra* L.) terhadap Biofilm *Escherichia Coli* Skripsi'.
- Adelberg, Jawetz, & M. (2017). *Mikrobiologi Kedokteran* (27th ed.). Buku Kedokteran EGC.
- Andriani, D. (2019). *IDENTIFIKASI JAMUR Aspergillus sp PADA KACANG HIJAU*.
- Anggi Vita Shelma Siany (2016) 'Faktor Resiko Koloni *Streptococcus pneumoniae* Pada Nasofaring Balita Dengan Infeksi Saluran Pernapasan Akut (ISPA)', pp. 18–26.
- Bergenfelz, C. and Hakansson, A. P. (2017) 'Streptococcus *pneumoniae* Otitis Media Pathogenesis and How It Informs Our Understanding of Vaccine Strategies', *Current Otorhinolaryngology Reports*, 5(2), pp. 115–124. doi: 10.1007/s40136-017-0152-6.
- Britannica, The Editors of Encyclopaedia. "pneumococcus". Encyclopedia Britannica, 1 Feb. 2022. <https://www.britannica.com/science/pneumococcus>. Accessed 23 June 2022.
- Brooks, L. R. K. and Mias, G. I. (2018) 'Streptococcus *pneumoniae*'s virulence and host immunity: Aging, diagnostics, and prevention', *Frontiers in Immunology*, 9(JUN). doi: 10.3389/fimmu.2018.01366.
- Budiwanto, S. 2014. *Metode Statistika untuk Analisis Data Bidang Keolahragaan*, Malang: Universitas Negeri Malang.
- CDC. 2011. Laboratory Methods for the Diagnosis of Meningitis Caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*. CHAPTER 8 Identification and Characterization of *Streptococcus pneumoniae*.
- CDC. (2017). *Streptococcus pneumoniae* , *Invasive Pneumococcal Disease (IPD)* , *Communicable Disease Investigation Reference Manual. 1*, 1–8.
- Chao Y, Bergenfelz C, H. A. (2019). Growing and Characterizing Biofilms Formed by *Streptococcus pneumoniae*. *PubMed*.
- Chao, Y., Marks, L. R., Pettigrew, M. M., & Hakansson, A. P. (2014).

- Streptococcus pneumoniae* biofilm formation and dispersion during colonization and disease. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4(January), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00194>
- Cherazard R, Epstein M, Doan TL, Salim T, Bharti S, S. M. (2017). Antimicrobial Resistant *Streptococcus pneumoniae*: Prevalence, Mechanisms, and Clinical Implications. *PubMed*.
- Cobo, F., Cabezas-Fernández, M. T. and Cabeza-Barrera, M. I. (2012) ‘*Streptococcus pneumoniae* bacteremia: Clinical and microbiological epidemiology in a health area of Southern Spain’, *Infectious Disease Reports*, 4(2), pp. 116–119. doi: 10.4081/idr.2012.e29.
- 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 Angelis, G. *et al.* (2011) ‘The *Streptococcus pneumoniae* Pilus-1 displays a biphasic expression pattern’, *PLoS ONE*, 6(6), pp. 27–29. doi: 10.1371/journal.pone.0021269.
- 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.
- Fleming, D., Chahin, L. and Rumbaugh, K. (2017) ‘Glycoside hydrolases degrade polymicrobial bacterial biofilms in wounds’, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(2). Available at: <https://doi.org/10.1128/AAC.01998-16>.
- Hasanah, U. (2017). ‘Mengenai Aspergillosis, Infeksi Jamur Genus *Aspergillus*’, *Jurnal Keluarga Sehat Sejahtera*, 15(2), pp. 76–86. doi: 10.24114/jkss.v15i2.8777.
- 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.
- 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.
- Jamal, M. and Andleeb, S. (2015). 'Bacterial Biofilm: Its Composition , Formation and Role in Human Infections Research & Reviews: Journal of Microbiology and Bacterial Biofilm: Its Composition , Formation and Role in Human', *Research & Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology*, 4(3), pp. 1–14.
- Jawad Ahmed, Farheen Malik. 2020. *Streptococcus pneumoniae* (MS 00057), Reference Module in Biomedical Sciences, Elsevier
- Jawetz, Melnick and Aldeberg. (2004). 'Mikrobiologi Kedokteran', 23, pp. 251–257.
- Jawetz, E., Melnick, J.L. & Adelberg, E.A. 2005. Mikrobiologi Kedokteran, diterjemahkan oleh Mudihardi, E., Kuntaman, Wasito, E. B., Mertaniasih, N. M., Harsono, S., Alimsardjono, L., Edisi XXII, 327-335, 362-363, Penerbit Salemba Medika, Jakarta
- Jiang, Y., Geng, M. and Bai, L. (2020) 'Targeting biofilms therapy: Current research strategies and development hurdles', *microorganisms*, 8, p. 1222. Available at: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8081222>.
- Kementerian Kesehatan RI. (2020). *Profil Kesehatan Indonesia tahun 2019*.
- Kementerian Kesehatan RI. (2020). *Pneumonia Pada Anak bisa Dicegah dan Diobati*.
- Khotimah, A.R.H., 2020. Uji Aktivitas Ekstrak Daun Murbei Hitam (*Morus nigra* L.) sebagai Antibiofilm *Klebsiella Pneumoniae* (undergraduate). Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Lass-Flörl, C. (2018). Treatment of infections due to *Aspergillus terreus* species complex. In *Journal of Fungi* (Vol. 4, Issue 3, pp. 1–9). <https://doi.org/10.3390/jof4030083>
- Lestari, R.E., Putri, A.R., Nugraheni, I.R., 2017. Analisis Korelasi Suhu Muka Laut dan Curah Hujan di Stasiun Meteorologi Maritim Kelas II Kendari Tahun 2005 – 2014. Pros. SNFA Semin. Nas. Fis. Dan Apl. 2, 192.
- Mahato, S., Sah, H. K., & Yadav, S. (2019). *Isolation of Streptococcus*

- pneumoniae* from the sputum samples and their antimicrobial resistance in. 7(6), 299–304. <https://doi.org/10.15406/jmen.2019.07.00274>
- Mańdziuk J, Kuchar EP. Streptococcal Meningitis. 2021 Apr 19. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan–. PMID: 32119335
- Maulidyna, A. *et al.* (2018) ‘Perbandingan Pertumbuhan Streptococcus pneumoniae Pada Media Agar Darah Domba Menggunakan Trypticase Soy Agar Dengan Columbia Agar’, *Diponegoro Medical Journal (Jurnal Kedokteran Diponegoro)*, 7(2), pp. 1222–1235.
- Miquel, S. *et al.* (2016). ‘Antibiofilm activity as a health issue’, *Frontiers in Microbiology*, 7(APR), pp. 1–14. doi: 10.3389/fmicb.2016.00592.
- Mufida, D. C., Fa’idha, A. F., & Febianti, Z. (2020). PERAN PROTEIN HEMAGLUTININ PILI Streptococcus pneumoniae 54 kDa SEBAGAI ADHESIN. *Journal of Health Sciences*, 13(2), 194–203. <https://doi.org/10.33086/jhS.v13i2.1442>
- Mundiri, N. A., Megantara, I., & Anggaeni, T. T. K. (2020). Kajian Pustaka: Pemanfaatan Eksopolisakarida Bakteri Asam Laktat Probiotik Asal Produk Pangan Fermentasi sebagai Imunomodulator. *Indonesia Medicus Veterinus*, 9(5), 849–859. <https://doi.org/10.19087/imv.2020.9.5.849>
- Nazip, M. (2006) ‘Production of cellulase enzyme from’, *Faculty of Chemical Engineering and Natural Resources Kolej Universiti Kejuruteraan dan Teknologi Malaysia*, (November), p. 39.
- Nuryadi *et al.* (2017) *Dasar-Dasar Statistika Penelitian*. Available at: http://lppm.mercubuana-yogya.ac.id/wp-content/uploads/2017/05/Buku-Ajar_Dasar-Dasar-Statistik-Penelitian.pdf.
- Prateeksha *et al.* (2020) ‘Endolichenic fungus, Aspergillus quadrinectus of Usnea longissima inhibits quorum sensing and biofilm formation of Pseudomonas aeruginosa PAO1’, *Microbial Patogenesis*, 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.
- Putri, M. H., Sukini and Yodong (2017) *Mikrobiologi*. Jakarta: KEMENKES.

- Ramirez, *et al.* 2020. Treatment of Community-Acquired Pneumonia in Immunocompromised Adults: A Consensus Statement Regarding Initial Strategies. *Chest*. 2020 Nov;158(5):1896-1911. doi: 10.1016/j.chest.2020.05.598. Epub 2020 Jun 16. PMID: 32561442; PMCID: PMC7297164.
- 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.
- Samal, S., & Das, P. K. (2018). Microbial Biofilms: Patogenicity and Treatment Strategies. *Pharmatutor*, 6(1), 16. <https://doi.org/10.29161/pt.v6.i1.2018.16>
- Saputro, A. *et al.* (2013) 'Perbedaan Pola Kepekaan terhadap Antibiotik pada *Streptococcus pneumoniae* yang Mengkolonisasi Nasofaring Balita.
- Sari, M., Latief, N., & Massi, M. N. (2020). ISOLASI DAN IDENTIFIKASI GEN pneumococcal surface adhesin A (psaA) SEBAGAI FAKTOR VIRULENSI *Streptococcus pneumoniae*. *Jurnal Biologi Makassar*, 5(1), 27–33.
- Setiawan, A. (2010) 'Kandungan Serat Kasar Dan Protein Kasar', *FKH UNAIR*, pp. 1–68.
- Sharma, R., Lambu, M. R., Jamwal, U., Rani, C., Chib, R., Wazir, P., Mukherjee, D., Chaubey, A., & Khan, I. A. (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), 342–353. <https://doi.org/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.
- Simbolon, Aditiya Yuda P. A. (2019). *Prevalensi Otitis Media Akut Di Provinsi Sumatera Utara*. (Program Pendidikan Magister Kedokteran Klinik Departemen Kesehatan Telinga Hidung Tenggorok, Bedah Kepala Leher Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara Medan 2019).
- Soedarto. (2015). *Mikrobiologi Kedokteran*. CV. Sagung Seto.
- Surekha, J. K. and Madhuri, D. S. (2018) 'A Study on Phenotypic Methods for the Detection of Biofilm Production in Indwelling Medical Devices Used In Intensive Care Units in a Tertiary Care Hospital', *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(10), pp. 3246–3258. doi: 10.20546/ijcmas.2018.710.376.
- Thi, M. T. T., Wibowo, D. and Rehm, B. H. A. (2020) 'Pseudomonas aeruginosa biofilms', *International Journal of Molecular Sciences*, 21, p. 8671. doi: 10.3390/ijms21228671.
- Utami, D. W. (2021) *Uji Aktifitas Antibiofilm Aspergillus niger terhadap Biofilm Klebsiella pneumoniae* (undergraduate).
- Verpoorte Robert, A.W. Alferman. 2000. *Metabolic engineering of plant secondary metabolism*. Springer page 1-3
- Waluyo, J. (2016) 'Aya Hambat Ekstrak Etanol Daun Akasia Berduri (*Acacia Nilotica* L.) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Streptococcus pneumoniae*', *Jurnal Pembelajaran Fisika Universitas Jember*, 4(5), pp. 661–672.
- WHO. (2019). *Pneumonia key fact*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/pneumonia>
- WHO. (2017). *Pneumonia health topics*. <https://www.who.int/health-topics/pneumonia>
- Yadav, M. K. *et al.* (2018) 'The LuxS/AI-2 quorum-sensing system of *Streptococcus pneumoniae* Is required to cause disease, and to regulate virulence- and metabolism-related genes in a rat model of middle ear infection', *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8(MAY), pp. 1–16. doi: 10.3389/fcimb.2018.00138.
- Yadav, P. *et al.* (2020) 'Deciphering streptococcal biofilms', *Microorganisms*,

8(11), pp. 1–31. doi: 10.3390/microorganisms8111835.

Zulkifi, N. A. (2015). *Morphological and Molecular Identification of Aspergillus species isolated from Corn Feed in Penang*. January, 44.

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Surat Etik Penelitian

	<p>FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN Kampus 3 FKIK Gedung Ibnu Thufail Lantai 2 Jalan Locari, Tlekung Kota Batu E-mail: kepk.fik@uin-malang.ac.id - Website : http://www.kepk.fik.uin-malang.ac.id</p>
	<p>KETERANGAN KELAIKAN ETIK (ETHICAL CLEARANCE) No. 129/EC/KEPK-FKIK/2022</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 Antibiofilm *Aspergillus* sp. Terhadap Biofilm *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae* dan *Staphylococcus aureus*

Sub Judul : Uji Aktivitas Antibiofilm *Aspergillus terreus* Terhadap Biofilm *Streptococcus pneumoniae*

Peneliti

- Abdurrohman Bagus Asy'ari
- Ibrahim Fadhil Senjaya
- Rizqi Ayuning Tyas
- Fikri Holly Jihadi Al Hasan

Unit / Lembaga : Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN 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.

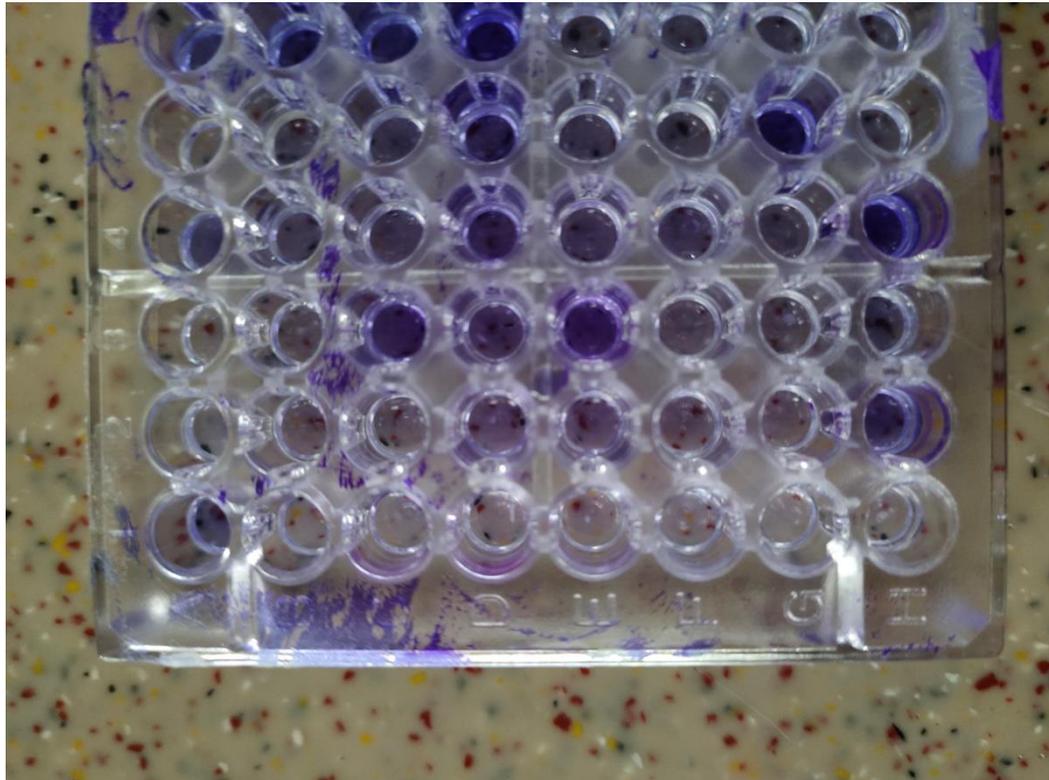
Malang, 16 September 2022

Ketua



dr. Doby Indrawan, MMRS
NIP.19781001201701011113

Lampiran 2 Mikroplate Uji Pertumbuhan Biofilm



Lampiran 3 Hasil SPSS Uji Normalitas dan Homogenitas

		Tests of Normality					
		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	OD	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Perlekatan	50%	.211	3	.	.991	3	.815
	25%	.195	3	.	.996	3	.883
	12,5%	.211	3	.	.991	3	.817
	6,25%	.325	3	.	.876	3	.312
	3,12%	.356	3	.	.816	3	.154
	K-	.269	3	.	.949	3	.567
Penghambatan	50%	.216	3	.	.988	3	.794
	25%	.347	3	.	.835	3	.200
	12,5%	.336	3	.	.856	3	.257
	6,25%	.354	3	.	.821	3	.166
	3,12%	.335	3	.	.859	3	.264
	K-	.365	3	.	.797	3	.107
Penghancuran	50%	.374	3	.	.776	3	.059
	25%	.286	3	.	.931	3	.492

	12,5%	.240	3	.	.974	3	.692
	6,25%	.333	3	.	.861	3	.271
	3,12%	.230	3	.	.981	3	.736
	K-	.271	3	.	.947	3	.557

a. Lilliefors Significance Correction

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Perlekatan	5.474	5	12	.007
Penghambatan	2.052	5	12	.143
Penghancuran	1.705	5	12	.208

Lampiran 4 Hasil SPSS Uji Kruskal Wallis

Test Statistics^{a,b}

Perlekatan	
Chi-Square	12.528
df	5
Asymp. Sig.	.028

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: OD

Lampiran 5 Hasil SPSS Uji One Way Anova

		ANOVA				
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Penghambatan	Between Groups	.417	5	.083	21.227	.000
	Within Groups	.047	12	.004		
	Total	.464	17			
Penghancuran	Between Groups	.179	5	.036	7.886	.002
	Within Groups	.054	12	.005		
	Total	.233	17			

Lampiran 6 Hasil SPSS Uji Post Hoc Tukey

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable	(I) OD	(J) OD	Mean Difference		Sig.	95% Confidence Interval	
			(I-J)	Std. Error		Lower Bound	Upper Bound
Penghambatan	50%	25%	-.06733	.05118	.772	-.2392	.1046

		12,5%	-,17200 [*]	,05118	.050	-,3439	-,0001
		6,25%	-,17100	,05118	.052	-,3429	,0009
		3,12%	-,25033 [*]	,05118	.004	-,4222	-,0784
		K-	-,47900 [*]	,05118	.000	-,6509	-,3071
	25%	50%	,06733	,05118	.772	-,1046	,2392
		12,5%	-,10467	,05118	.374	-,2766	,0672
		6,25%	-,10367	,05118	.383	-,2756	,0682
		3,12%	-,18300 [*]	,05118	.035	-,3549	-,0111
		K-	-,41167 [*]	,05118	.000	-,5836	-,2398
	12,5%	50%	,17200 [*]	,05118	.050	,0001	,3439
		25%	,10467	,05118	.374	-,0672	,2766
		6,25%	,00100	,05118	1.000	-,1709	,1729
		3,12%	-,07833	,05118	.653	-,2502	,0936
		K-	-,30700 [*]	,05118	.001	-,4789	-,1351
	6,25%	50%	,17100	,05118	.052	-,0009	,3429
		25%	,10367	,05118	.383	-,0682	,2756
		12,5%	-,00100	,05118	1.000	-,1729	,1709
		3,12%	-,07933	,05118	.642	-,2512	,0926
		K-	-,30800 [*]	,05118	.001	-,4799	-,1361
	3,12%	50%	,25033 [*]	,05118	.004	,0784	,4222
		25%	,18300 [*]	,05118	.035	,0111	,3549
		12,5%	,07833	,05118	.653	-,0936	,2502
		6,25%	,07933	,05118	.642	-,0926	,2512
		K-	-,22867 [*]	,05118	.008	-,4006	-,0568
	K-	50%	,47900 [*]	,05118	.000	,3071	,6509
		25%	,41167 [*]	,05118	.000	,2398	,5836
		12,5%	,30700 [*]	,05118	.001	,1351	,4789
		6,25%	,30800 [*]	,05118	.001	,1361	,4799
		3,12%	,22867 [*]	,05118	.008	,0568	,4006
Penghancuran	50%	25%	-,05667	,05500	.899	-,2414	,1281
		12,5%	-,08267	,05500	.669	-,2674	,1021
		6,25%	-,13567	,05500	.209	-,3204	,0491
		3,12%	-,11967	,05500	.315	-,3044	,0651
		K-	-,31900 [*]	,05500	.001	-,5038	-,1342
	25%	50%	,05667	,05500	.899	-,1281	,2414
		12,5%	-,02600	,05500	.996	-,2108	,1588
		6,25%	-,07900	,05500	.707	-,2638	,1058

	3,12%		-,06300	,05500	.853	-,2478	,1218
	K-		-,26233 [*]	,05500	.005	-,4471	-,0776
12,5%	50%		,08267	,05500	.669	-,1021	,2674
	25%		,02600	,05500	.996	-,1588	,2108
	6,25%		-,05300	,05500	.921	-,2378	,1318
	3,12%		-,03700	,05500	.982	-,2218	,1478
	K-		-,23633 [*]	,05500	.010	-,4211	-,0516
6,25%	50%		,13567	,05500	.209	-,0491	,3204
	50%		,07900	,05500	.707	-,1058	,2638
	12,5%		,05300	,05500	.921	-,1318	,2378
	3,12%		,01600	,05500	1.000	-,1688	,2008
	K-		-,18333	,05500	.052	-,3681	,0014
3,12%	50%		,11967	,05500	.315	-,0651	,3044
	25%		,06300	,05500	.853	-,1218	,2478
	12,5%		,03700	,05500	.982	-,1478	,2218
	6,25%		-,01600	,05500	1.000	-,2008	,1688
	K-		-,19933 [*]	,05500	.032	-,3841	-,0146
K-	50%		,31900 [*]	,05500	.001	,1342	,5038
	25%		,26233 [*]	,05500	.005	,0776	,4471
	12,5%		,23633 [*]	,05500	.010	,0516	,4211
	6,25%		,18333	,05500	.052	-,0014	,3681
	3,12%		,19933 [*]	,05500	.032	,0146	,3841

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

Lampiran 7 Hasil SPSS Uji Mann Whitney U

Test Statistics^a

	Perlekatan
Mann-Whitney U	1.000
Wilcoxon W	7.000
Z	-1.528
Asymp. Sig. (2-tailed)	.127
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.200 ^b

a. Grouping Variable: OD

b. Not corrected for ties.

Lampiran 8 Hasil SPSS Uji Korelasi Spearman

Correlations

		Konsentrasi_CF	
		S	OD_Perlekatan
Spearman's rho	Konsentrasi_CFS	Correlation Coefficient	1.000
		Sig. (2-tailed)	.
		N	15
	OD_Perlekatan	Correlation Coefficient	-.617*
		Sig. (2-tailed)	.014
		N	15

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

2.6 Lampiran 9 Hasil SPSS Uji Korelasi Pearson

Correlations

		Konsentrasi_CF	
		S	OD_Penghambatan
Konsentrasi_CFS	Pearson Correlation	1	-.800**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	15	15
OD_Penghambatan	Pearson Correlation	-.800**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	15	15

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

Correlations

		Konsentrasi_CF	
		S	OD_Penghancuran
Konsentrasi_CFS	Pearson Correlation	1	-.703**
	Sig. (2-tailed)		.003
	N	15	15
OD_Penghancuran	Pearson Correlation	-.703**	1
	Sig. (2-tailed)	.003	
	N	15	15

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