

**UJI AKTIVITAS ANTIBIOFILM *Aspergillus oryzae*
TERHADAP BIOFILM *Pseudomonas aeruginosa***

SKRIPSI

Oleh:

RIZKA MAR'ATHUS SHOLIHAH

17910012



PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER

FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU-ILMU KESEHATAN

UIN MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG

2021

HALAMAN JUDUL
UJI AKTIVITAS ANTIBIOFILM *Aspergillus oryzae*
TERHADAP BIOFILM *Pseudomonas aeruginosa*

SKRIPSI

Diajukan Kepada:

Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan

Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang

Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan dalam Memperoleh Gelar Sarjana

Kedokteran (S.Ked)

Oleh:

RIZKA MAR'ATHUS SHOLIHAH

17910012

PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER
FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU-ILMU KESEHATAN
UIN MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG

2021

LEMBAR PERSETUJUAN
UJI AKTIVITAS ANTIBIOFILM *Aspergillus oryzae*
TERHADAP BIOFILM *Pseudomonas aeruginosa*

SKRIPSI

Oleh:

RIZKA MAR'ATHUS SHOLIHAH

NIM. 17910012

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji
Tanggal 27 Januari 2021

Pembimbing I



dr. Alvi Milliana, M. Biomed
NIP. 198204042011012011

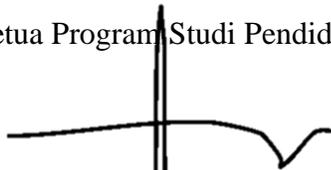
Pembimbing II



Yossi Indra Kusuma, M. Med. Ed
NIP. 19810102 201701011120

Mengetahui,

Ketua Program Studi Pendidikan Dokter



dr. Ana Rahmawati, M. Biomed
NIP. 1974120320091220

LEMBAR PENGESAHAN
UJI AKTIVITAS ANTIBIOFILM *Aspergillus oryzae*
TERHADAP BIOFILM *Pseudomonas aeruginosa*

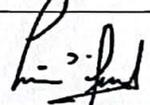
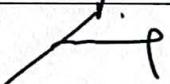
SKRIPSI

Oleh :

RIZKA MAR'ATHUS SHOLIAH
17910012

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

Tanggal :

Penguji Utama	<u>dr. Tyas Pramesti Griana, M.Biomed</u> NIP. 198105182011012011	
Ketua Penguji	<u>dr. Alvi Milliana, M.Biomed</u> NIP. 198204042011012011	
Sekretaris Penguji	<u>Yossi Indra Kusuma, M.Med.Ed</u> NIP. 19810102201701011120	

Mengesahkan,

Ketua Program Studi Pendidikan Dokter


dr. Ana Rachmawati, M.Biomed
NIP. 197412032009122001

LEMBAR PERSEMBAHAN

Dengan rasa syukur kepada Allah SWT, karena telah menyelesaikan skripsi ini, tulisan ini saya persembahkan kepada :

1. Kedua orang tua saya yang senantiasa menemani dan menyokong dalam semangat menyelesaikan tulisan ini.
2. Kepada adik-adik saya Alfian, Najwa, dan Sultan yang senantiasa menemani dalam suka dan duka penulisan naskah skripsi.
3. Segenap dosen dan civitas akademika Fakultas Kedokteran dan Ilmu-ilmu Kesehatan Universitas Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah membantu dalam menyelesaikan tulisan ini dengan baik dan benar.
4. Kepada Rian Febry Pamungkas, Nadya Dharmayanti, Luthfia Asyda Almas, Hanun Shafira Qatrunnada, serta seluruh teman satu proyek penelitian saya yang senantiasa memberikan dukungan moril dalam proses penulisan skripsi ini.

LEMBAR PERNYATAAN

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Rizka Mar'athus Sholihah

NIM : 17910012

Program Studi : Pendidikan Dokter

Fakultas : Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan

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

Malang, 18 Juni 2021

Yang Membuat Pernyataan



RIZKA MAR'ATHUS SHOLIHAH
NIM. 17910012

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Wr. Wb

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan Rahmat, Hidayah, dan Bimbingan-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan proposal skripsi yang berjudul “Uji Aktivitas Antibiofilm *Aspergillus oryzae* terhadap Biofilm *Pseudomonas aeruginosa*”. Ini untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan studi serta dalam rangka memperoleh gelar Sarjana Kedokteran pada Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan.

Terselesaikannya proposal skripsi ini tidak terlepas dari bantuan banyak pihak, sehingga pada kesempatan ini penulis haturkan ucapan terima kasih atas semua do'a, dukungan, dan bimbingannya dalam menyelesaikan proposal skripsi ini. Penulis berharap semoga Allah membalas kebaikan semua pihak dengan balasan yang baik. Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada:

1. Ayah, Ibu, Kakak, dan Keluarga yang senantiasa memberika doa, nasihat, dan dukungan kepada penulis selama menuntut ilmu di UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Prof. Dr. dr. Yuyun Yueniwati Prabowowati Wadjib, M.Kes, Sp.Rad (K), selaku dekan Program Studi Pendidikan Dokter FKIK UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. dr. Ana Rahmawati, M.Biomed, selaku ketua Program Studi Pendidikan Dokter FKIK UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.

4. dr. Alvi Milliana, M. Biomed, selaku dosen pembimbing skripsi I yang telah memberikan arahan dan dukungan, serta kesabaran dalam membimbing penulisan skripsi ini.
5. Bapak Yossi Indra Kusuma, M. Med. Ed, selaku dosen pembimbing skripsi II dan dosen pembimbing akademik yang telah memberikan arahan dan dukungan.
6. dr. Tias Pramesti Griana, M, Biomed, selaku penguji skripsi yang telah memberikan kritikan dan saran yang membangun.
7. dr. Lailia Nur Rachma M. Biomed, selaku pendamping dalam melakukan penelitian di laboratorium atas arahnya dan motivasinya dalam melakukan percobaan.
8. Segenap sivitas akademika Program Studi Pendidikan Dokter, terutama seluruh dosen atas bimbingannya
9. H.M. Zainul Abidin, dr. Martini Husni beserta adik-adik saya yang telah memberikan do'a dan harapan yang besar kepada saya dalam menyelesaikan naskah skripsi ini.
10. Rian Febry Pamungkas, Dwiana Galuh Chandra Kirana, Hanun Shafira Qatrunnada, Nadya Dharmayanti, Luthfia Asyda Almas, dan Awwalatur Nur Khoiriah yang telah mendukung dan menyelesaikan skripsi ini.
11. Semua pihak yang ikut membantu dalam menyelesaikan skripsi ini baik berupa materiil maupun moril.

Akhirnya, Penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak dan apabila ada yang tidak disebutkan penulis mohon maaf. Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini masih terdapat kekurangan dan perlu masukan dari berbagai

pihak. Penulis berharap semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat khususnya bagi penulis sendiri dan umumnya bagi pembaca. *Aamiin Yaa Rabbal 'Aalamiin.*

Wassalamu'alaikum Wr. Wb

Malang, 24 Juni 2021

Penulis,

Rizka Mar'athus Sholihah

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
LEMBAR PERSETUJUAN	iii
LEMBAR PENGESAHAN	iv
LEMBAR PERSEMBAHAN	v
LEMBAR PERNYATAAN	vi
PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR GAMBAR.....	xv
BAB I.....	1
PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah.....	4
1.3. Tujuan Penelitian	5
1.4. Manfaat Penelitian	5
BAB II	7
TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1. Infeksi Nosokomial.....	7
2.1.1. Definisi dan epidemiologi infeksi nosokomial.....	7
2.1.2. Patogenesis Infeksi Nosokomial	9
2.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11
2.2.1. Manifestasi <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11

2.2.2.	Taksonomi <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
2.2.3.	Morfologi <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
2.2.4.	Faktor virulensi <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14
2.2.5.	Identifikasi <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15
2.2.5.3.	Biakan pada medium diferensial	19
2.3.	<i>Biofilm</i>	20
2.3.1.	Definisi Biofilm	20
2.3.2.	Struktur Biofilm	21
2.3.3.	Pembentukan biofilm pada <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22
2.3.4.	Quorum sensing <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
2.3.5.	Resistensi terhadap antibiotik.....	28
2.3.6.	Uji pembentukan biofilm.....	30
2.4.	<i>Aspergillus oryzae</i>	32
2.4.1.	Taksonomi <i>Aspergillus oryzae</i>	32
2.4.2.	Morfologi <i>Aspergillus oryzae</i>	33
2.4.3.	Identifikasi <i>Aspergillus oryzae</i>	34
2.4.4.	<i>Aspergillus oryzae</i> sebagai antibiofilm.....	36
2.5.	<i>Kerangka Teori</i>	40
BAB III.....		43
KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS		43
3.1.	<i>Kerangka Konsep</i>	43
3.2.	<i>Hipotesis</i>	45
BAB IV		46
METODE PENELITIAN		46
4.1.	<i>Rancangan Penelitian</i>	46
4.2.	<i>Lokasi dan Waktu Penelitian</i>	46
4.3.	<i>Populasi dan Sampel</i>	46
4.4.	<i>Variabel Penelitian</i>	47
4.4.1.	Variabel Bebas.....	47

4.4.2.	Variabel Tergantung.....	47
4.5.	<i>Kriteria Inklusi dan Eksklusi</i>	48
4.5.1.	Kriteria Inklusi.....	48
4.5.2.	Kriteria Eksklusi.....	49
4.6.	<i>Definisi Operasional</i>	50
4.7.	<i>Alat dan Bahan Penelitian</i>	53
4.7.1.	Alat Penelitian.....	53
4.7.2.	Bahan Penelitian.....	53
4.8.	<i>Prosedur Penelitian</i>	54
4.8.1.	Persiapan Jamur.....	54
4.8.2.	Kurva Pertumbuhan.....	55
4.8.3.	Pembuatan CFS.....	55
4.8.4.	Penyiapan bakteri.....	56
4.8.5.	<i>Pembuatan kelompok kontrol</i>	60
4.8.6.	<i>Uji Biofilm</i>	61
4.9.	<i>Alur Penelitian</i>	68
4.10.	<i>Analisis Data Penelitian</i>	69
BAB V		70
HASIL		70
5.1.	<i>Identifikasi Aspergillus oryzae</i>	70
5.2.	<i>Pembuatan Cell-Free Supernatant (CFS) Jamur Aspergillus oryzae</i>	70
5.3.	<i>Identifikasi bakteri Pseudomonas aeruginosa</i>	71
5.4.	<i>Hasil Uji Pertumbuhan Biofilm P. aeruginosa</i>	74
5.5.	<i>Uji Pencegahan Perlekatan Biofilm P. aeruginosa</i>	76
5.6.	<i>Uji Penghambatan Pertumbuhan Biofilm P. aeruginosa</i>	78
5.7.	<i>Uji Penghancuran Biofilm P. aeruginosa</i>	80
5.8.	<i>Hasil Analisis Data</i>	82
5.8.1.	Uji normalitas dan Homogenitas.....	83
5.8.2.	<i>Uji One Way Anova dan Kruskal-Wallis</i>	85
5.8.3.	Uji Post Hoc Tukey HSD.....	85

5.8.4. Uji Korelasi <i>Pearson</i> dan <i>Spearman</i>	89
BAB VI	92
PEMBAHASAN	92
6.1. <i>Identifikasi Aspergillus oryzae</i>	92
6.2. <i>Pembuatan Cell Free Supernatan (CFS) Aspergillus oryzae</i>	92
6.3. <i>Identifikasi Pseudomonas aeruginosa</i>	92
6.4. <i>Uji Pembentukan Biofilm Pseudomonas aeruginosa</i>	93
6.5. <i>Uji Antibiofilm Aspergillus oryzae terhadap biofilm P. aeruginosa</i> ...	94
6.5.1. Uji Pencegahan Perlekatan Biofilm <i>P.aeruginosa</i>	98
6.5.2. Uji Penghambatan Pertumbuhan Biofilm <i>P.aeruginosa</i>	101
6.5.3. Uji Penghancuran Biofilm <i>P.aeruginosa</i>	104
6.6. <i>Kajian Integrasi Islam mengenai Aktivitas Antibiofilm A. oryzae terhadap Biofilm P. Aeruginosa.</i>	108
BAB VII	113
KESIMPULAN DAN SARAN	113
7.1. <i>Kesimpulan</i>	113
7.2. <i>Saran</i>	114
DAFTAR PUSTAKA	115
LAMPIRAN-LAMPIRAN	120

DAFTAR TABEL

Tabel 2. 1 Mikroorganismen penyebab infeksi nosokomial di rumah sakit.....	8
Tabel 2. 2 Acuan kekuatan bakteri dalam pembentukan biofilm	32
Tabel 4. 1 Interpretasi hasil kekuatan pembentukan biofilm.....	62
Tabel 5. 1 Hasil uji biokimia TSI, <i>Indole</i> , <i>Voges-Proskauer</i> , <i>Citrate</i> , dan Urease bakteri <i>P. aeruginosa</i>	74
Tabel 5. 2 Hasil uji deteksi pembentukan biofilm <i>P. aeruginosa</i> pada inkubasi 24 jam	75
Tabel 5. 3 Hasil uji deteksi pembentukan biofilm <i>P. aeruginosa</i> pada inkubasi 48 jam	76
Tabel 5. 4 Hasil uji deteksi pembentukan biofilm <i>P. aeruginosa</i> pada inkubasi 72 jam	Kesalahan! Bookmark tidak ditentukan.
Tabel 5. 5 Hasil Uji Normalitas dan Homogenitas	84
Tabel 5. 6 Hasil Uji Post Hoc Tukey HSD Pencegahan Perlekatan Biofilm <i>P. aeruginosa</i> ..	86
Tabel 5. 7 Hasil Uji Post Hoc Tukey HSD Penghambatan Pertumbuhan Biofilm <i>P. aeruginosa</i>	87
Tabel 5. 8 Hasil Uji Post Hoc Tukey HSD Penghancuran Biofilm <i>P. aeruginosa</i>	88
Tabel 5. 9 Interpretasi nilai dari uji korelasi	89

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2. 1 Rantai penularan infeksi nosokomial (Nasution, 2012)	10
Gambar 2. 2 Koloni <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pada agar Mueller-Hinton (Jawetz, 2010)...	13
Gambar 2. 3 Mekanisme virulensi yang terdapat pada infeksi oleh <i>P. aeruginosa</i> (Lee J., 2015).	14
Gambar 2. 4 Hasil pengamatan <i>Pseudomonas aeruginosa</i> secara mikroskopis (Jawetsz, 2010).	16
Gambar 2. 5 Hasil Uji TSIA (Maza, et all, 1997).	17
Gambar 2. 6 Hasil Uji Gula-gula (Maza et al, 1997).	19
Gambar 2. 7 Biakan <i>P.aeruginosa</i> pada agar Mac-Conkey (Lipincotts, 2008).	20
Gambar 2. 8 Matriks ekstraseluler pada <i>P.aeruginosa</i> pada pengamatan mikroskop elektron (Stewart, 2001).....	22
Gambar 2. 9 Tahap Pembentukan Biofilm: (i) perlekatan bakteri planktonik, (ii) perlekatan irreversible, (iii) pembentukan mikrokoloni, (iv) maturasi biofilm (v) pelepasan bakteri biofilm. (Gunardi, 2017).	23
Gambar 2. 10 Model yang diusulkan tentang efek dari 3OC12-HSL pada host selama masa infeksi <i>P. aeruginosa</i> . Bakteri tumbuh dengan biofilm sebagai pelindung, dimana mereka memproduksi banyak molekul QS 3OC12-HSL yang berinteraksi dengan sel-sel host untuk merangsang produksi berbagai macam mediator inflamasi. Induksi IL-8 dan sitokin lainnya memicu migrasi banyak sel menuju tempat infeksi, namun faktor-faktor yang dihasilkan oleh sel seperti neutrofil tidak mampu membunuh agen infeksi sehingga menimbulkan kerusakan jaringan. Induksi pada PGE2 semakin meningkatkan proses peradangan. 3OC12-HSL dapat bertindak sebagai imunomodulator dengan mengubah produksi dari beberapa sitokin seperti IL-12 dan IFN- γ , yang dapat mempengaruhi jenis respon imun yang ditimbulkan selama infeksi. MPEGS (<i>microsomal prostaglandin E syntase</i>) (Smith, 2003).	28
Gambar 2. 11 Hasil uji tabung (Utami, 2020).	31
Gambar 2. 12 Metode Microtiter Plate (Abidah, 2020).	32
Gambar 2. 13 Morfologi kapang <i>A. oryzae</i> (a) Konidiofor (b) Vesikel (c) Metula (d) Fialid (e) Konidia (Rohman, 2019).	34
Gambar 2. 14 Gambaran <i>Aspergillus oryzae</i> pada pengamatan mikroskopis. A (1) Konidium, (2) Fialid, (3) Mentula, (4) Fisikel, (5) Konidiofor. B Konidium (Oramahi, 2006).	35
Gambar 2. 15 Pertumbuhan <i>A. oryzae</i> pada Potato Dextrose Agar (PDA) (Ezeonu, 2018). 36	
Gambar 2. 16 Kerangka Teori	40
Gambar 3. 1 Kerangka Konsep Penelitian	43
Gambar 4. 1 Proses pewarnaan Gram. (a) pemberian kristal violet (b) pemberian iodine (c) pembilasan dengan alkohol (d) ditetesi dengan safranin (Olivia, 2017).	57
Gambar 4. 2 Alur Penelitian.....	68

Gambar 5. 1 Identifikasi <i>Aspergillus oryzae</i> . a) <i>A. oryzae</i> pada media PDA dan b) <i>A. oryzae</i> pada pewarnaan methylen blue dengan pembesaran 1000x.	70
Gambar 5. 2 Cell-Free Supernatant <i>A. oryzae</i> . Tampak berwarna kuning bening pada hasil penyaringan CFS <i>A. oryzae</i>	71
Gambar 5. 3 Hasil identifikasi <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . a) Koloni <i>P. aeruginosa</i> pada media Mueller Hinton Agar (MHA) dan b) Pewarnaan Gram <i>P. aeruginosa</i> pada perbesaran 100x.	72
Gambar 5. 4 Hasil uji biokimia TSI dan Indole, Voges-Proskauer, Citrate pada <i>P. aeruginosa</i> . a.) <i>Lysine, ornithine, H₂S</i> , b.) <i>Glucose, mannitole, xylose</i> , c.) ONPG, <i>indole, urease</i> , d.) VP, <i>citrate, TDA</i> , e.) Gelatin, <i>malonate, inositol</i> , f.) Sorbitol, <i>rhamnose, sucrose</i> , g.) <i>Lactose, arabinose, adonitol</i> , h.) <i>Raffinose, salicin, arginine</i>	73
Gambar 5. 5 Hasil Rata- Rata OD Uji Pencegahan Perlekatan Biofilm <i>P. aeruginosa</i> . Terjadi penurunan <i>optical density</i> (OD) pada masing-masing konsentrasi dengan perbandingan terhadap kontrol negatif.	77
Gambar 5. 6 Persentase Uji Pencegahan Perlekatan Biofilm <i>P. aeruginosa</i>	78
Gambar 5. 7 Hasil Rata- Rata OD Uji Penghambatan Pertumbuhan Biofilm <i>P. aeruginosa</i> . Terjadi penurunan <i>optical density</i> (OD) pada masing-masing konsentrasi dengan perbandingan terhadap kontrol negatif.	79
Gambar 5. 8 Persentase Uji Penghambatan Pertumbuhan Biofilm <i>P. aeruginosa</i>	80
Gambar 5. 9 Hasil Rata- Rata OD Uji Penghancuran Biofilm <i>P. aeruginosa</i> . Terjadi penurunan <i>optical density</i> (OD) pada masing-masing konsentrasi dengan perbandingan terhadap kontrol negatif.	81
Gambar 5. 10 Persentase Uji Penghancuran Biofilm <i>P. aeruginosa</i>	82
Gambar 6. 1 Hasil Optical Density (OD) uji antibiofilm <i>A. oryzae</i> terhadap <i>P. aeruginosa</i>	111

ABSTRAK

Sholihah, Rizka Mar'athus. 2021. AKTIVITAS ANTIBIOFILM *Aspergillus oryzae* TERHADAP BIOFILM *Pseudomonas aeruginosa*. Skripsi. Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing: (I) dr. Alvi Milliana, M.Biomed (II) Yossi Indra Kusuma, M.Med.Ed.

Kata kunci : Antibiofilm *Aspergillus oryzae*; Biofilm *Pseudomonas aeruginosa*; Aktivitas Antibiofilm

Infeksi nosokomial adalah infeksi yang terjadi dan berasal dari rumah sakit. Infeksi nosokomial terjadi hampir di seluruh dunia dan merupakan penyebab utama morbiditas dan mortalitas pada pasien di rumah sakit, salah satu penyebabnya adalah *Pseudomonas aeruginosa*. *P. aeruginosa* merupakan bakteri Gram negatif dan merupakan flora normal pada tubuh manusia, namun bakteri ini juga dapat bersifat patogen yang menyebabkan berbagai manifestasi klinis dan infeksi dari ringan sampai berat seperti bakterimia, infeksi kulit, endokarditis, infeksi paru-paru, osteomyelitis, infeksi jaringan lunak, *toxic shock syndrome* hingga dapat menyebabkan kematian. *P. aeruginosa* mampu membentuk biofilm yang mampu memperkuat faktor virulensinya. Senyawa antibiofilm yang digunakan pada penelitian ini adalah *Cell-free Supernatant* (CFS) *Aspergillus oryzae* dengan konsentrasi yang diujikan yaitu 100%; 50%; 25%; 12,5% dan 6,25%. Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah Metode *Microtiter Plate* (MtP) dengan melakukan uji pencegahan perlekatan biofilm, uji penghambatan pertumbuhan biofilm dan uji penghancuran biofilm. Hasil penelitian selanjutnya diuji menggunakan SPSS. Hasil tertinggi pada uji pencegahan perlekatan biofilm terlihat pada konsentrasi 12,5% dengan persentase 79,10%; pada uji penghambatan pertumbuhan biofilm pada konsentrasi 100% dengan persentase 32,93%; dan pada uji penghancuran biofilm pada konsentrasi 25% sebesar 72,23%.

ABSTRACT

Sholihah, Rizka Mar'athus. 2021. ANTIBIOFILM ACTIVITY TEST OF *Aspergillus oryzae* AGAINST BIOFILM OF *Pseudomonas aeruginosa*. Thesis. Medical Study Program for the Faculty of Medicine and Health Sciences, Maulana Malik Ibrahim State Islamic University of Malang. Supervisors: (I) dr. Alvi Milliana, M.Biomed (II) Yossi Indra Kusuma, M.Med.Ed.

Keyword : Antibiofilm *Aspergillus oryzae*; Biofilm *Pseudomonas aeruginosa*; Antibiofilm Activity

A nosokomial infection is a viral infection that originated in the hospital. Nosokomial infections occur almost worldwide and are a cause of utams morbidity and mortality in patients in hospitals, one of the causes is *Pseudomonas aeruginosa*. *P. aeruginosa* is a Gram negative bacterium and is a normal flora in the human body, but this bacterium can also be pathogenic causing various clinical manifestations and infections from mild to severe such as bacteremia, skin infections, endocarditis, lung infections, osteomyelitis, soft tissue infection, toxic shock syndrome and can cause death. *P. aeruginosa* is able to form biofilms that can amplify its virulence factors. The antibiofilm compounds used in this study were Cell-free Supernatant (CFS) *Aspergillus oryzae* with the tested concentrations of 100%; 50%; 25%; 12.5% and 6.25%. The method used in this study is Microtiter Plate (MtP) method by conducting biofilm adhesion prevention tests, biofilm growth inhibition tests and biofilm destruction tests. The results of the next study were tested using SPSS. The highest results in the biofilm adhesion prevention test were seen at a concentration of 12,5% with a percentage of 79,10%; in the biofilm growth inhibition test at a concentration of 100% with a percentage of 32,93%; and in the biofilm destruction test at 25% concentration of 72,23%.

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Infeksi nosokomial adalah infeksi yang terjadi dan berasal dari rumah sakit. Infeksi nosokomial terjadi hampir di seluruh dunia dan merupakan penyebab utama morbiditas dan mortalitas pada pasien di rumah sakit (Nasution, 2012). Salah satu bakteri penyebab infeksi nosokomial adalah *Pseudomonas aeruginosa* yang sering dikaitkan dengan kejadian mortalitas yang tinggi. *P. aeruginosa* merupakan bakteri Gram negatif berbentuk batang, tampak dalam bentuk tunggal, berpasangan, kadang berbentuk rantai pendek dan dapat bergerak dengan satu flagela. *P. aeruginosa* merupakan flora normal yang terdapat pada usus dan kulit manusia serta biasanya terdapat dalam lingkungan yang lembab di rumah sakit. *P. aeruginosa* dapat menjadi patogenik apabila berada di daerah yang pertahanannya menurun atau tidak normal, seperti luka akibat cedera jaringan langsung, pemasangan kateter urin, infus dan neutropenia (Jawetz, 2010). Berdasarkan data dari *National Nosocomial Infection Surveillance System* (NNISS) *P. aeruginosa* merupakan patogen dominan yang menyebabkan infeksi sistem pernafasan bawah yang terhitung rata-rata tahun 1999-2001 sebesar 12,3%, tahun 2002-2004 sebesar 12,8% dan tahun 2005-2007 sebesar 13,4% (Biol, 2020). Di negara Amerika terdapat 51.000 kasus infeksi *P. aeruginosa* setiap tahun dengan 6.700 kasus akibat *multidrug resistant pseudomonas aeruginosa* (MRPA) dan 440 diantaranya merupakan kasus kematian (Dharmayanti, 2019). Data yang didapatkan dari Rumah Sakit Pemerintah Indonesia yaitu *P. aeruginosa*

menyebabkan infeksi luka operasi sebanyak 55,1% kasus (Sulviana, 2017). Kejadian infeksi oleh *P. aeruginosa* di rumah sakit Jawa Timur mencapai 4,2% (Riskesdas, 2013).

Bakteri *P. aeruginosa* memiliki kemampuan untuk menghasilkan biofilm, yang berguna sebagai pelindung bakteri dari lingkungan eksternal seperti antibiotik, sehingga bakteri yang menghasilkan biofilm lebih resisten terhadap antibiotik, (Abidah, 2020). Data yang didapatkan dari Pakistan, yakni *P.aeruginosa* resisten terhadap ampisilin 86,4%, gentamisin 78,6%, seftazidim 71,6% dan amikasin 22,3%, sementara data yang didapatkan dari RSAM Bandar Lampung yaitu *P. aeruginosa* resisten terhadap beberapa antibiotik seperti ampisilin 84,6% dan gentamisin 71,2%, seftazidim 32,7% dan amikasin 23,1%, meropenem (gol imipenem) sebanyak 19,2% (Rukmono, 2013). Biofilm merupakan kumpulan sel mikroorganisme, khususnya bakteri, yang melekat di suatu permukaan dan diselimuti oleh pelekat karbohidrat yang dikeluarkan oleh bakteri, tersusun atas matriks eksopolisakarida dan mikroorganisme penyusun lainnya (Lee, 2017). Matriks biofilm pada *P. aeruginosa* ini terdiri dari berbagai macam substansi yakni, ekstraseluler DNA (eDNA), protein, eksopolisakarida dan bahan lainnya seperti fimbriae, type IV pili (T4P), dan flagella. Sedangkan eksopolisakarida pada matriks biofilm *P. aeruginosa* tersusun atas alginat, *Polysaccharide Encoding Locus* (PEL), dan *Polysaccharide Synthesis Locus* (PSL) (Wei Q, 2013).

Dalam proses pembentukan biofilm, terjadi suatu proses *Quorum Sensing* (komunikasi sel) yang berperan dalam proses pembentukan biofilm. *Quorum Sensing* mengatur aktivitas pada sekelompok bakteri seperti pembentukan biofilm,

bioluminescence, sporulasi, kompetensi, produksi antibiotik, dan sekresi faktor virulensi. Quorum Sensing menghasilkan 2 molekul sinyal berupa AHLs dan AI-2 sebagai pengatur aktivasi dan transkripsi gen tertentu, misalnya biofilm, faktor virulensi dan aktivitas bakteri lainnya (Rutherford, 2012).

Antibiofilm merupakan suatu aktivitas yang memungkinkan mencegah proses pembentukan biofilm, untuk mencegah terbentuknya biofilm diperlukan suatu antibiofilm yang salah satunya dapat diproduksi oleh *Aspergillus oryzae*. *A. oryzae* merupakan jamur yang hidup sebagai parasit berbentuk filamen, bercabang dan tidak memiliki klorofil, juga sebagai bahan fermentasi untuk pengolahan makanan sehingga mudah didapatkan, *A. oryzae* dapat dijadikan sebagai bahan antibiofilm. *A. oryzae* digunakan dalam penelitian ini sebagai antibiofilm karena kandungannya yang diduga dapat menghasilkan antibiofilm dan sudah ada penelitian yang meneliti *A. oryzae* memiliki kandungan sebagai antibiofilm terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* (Suwaryono dan ismeini, 1988; Leonard, 2013). *A. oryzae* juga dikenal sebagai penghasil enzim β -glukosidase dan *Pyranose Dehidrogenase* (PDH). β -glukosidase yang merupakan enzim ekstraseluler punya *GH3 family* golongan bakteri, jamur dan tumbuhan (Ahmed,2017). Senyawa β -glukosidase mempunyai manfaat yang luas dalam bidang kesehatan salah satu contohnya sebagai agen terapeutik, alat diagnostik serta promotor pertumbuhan bakteri sebagai probiotik. Pada sistem *Quorum Sensing* bakteri *P. aeruginosa* lewat proses katalisis antara *Acyl Carrier Protein* (ACP) dan *S-adenosylmethionine* (SAM) menghasilkan *Acyl Homoserine Lactone* (AHL) dimana β -glukosidase yang terkandung dalam *Aspergillus oryzae* mampu memecah ikatan pada

rantai glukosa tersebut (Ahmed,2017; Rutherford, 2012). Selanjutnya Senyawa *Pyranose Dehidrogenase* (PDH) pada *A. oryzae* mampu melakukan oksidasi laktosa pada rantai C1-C4 secara efisien yang dapat mengoksidasi senyawa laktosa dalam matriks EPS pada proses pembentukan biofilm (Pisanelli, 2010).

Segala sesuatu yang telah diciptakan oleh Allah memiliki manfaat. Jamur *A. Oryzae* selain bermanfaat sebagai bahan fermentasi makanan di masyarakat luas, jamur ini diduga dapat berfungsi sebagai antibiofilm untuk infeksi *P. aeruginosa*. Sebagaimana firman-Nya dalam surah As shad ayat 27 sebagai berikut.

وَمَا خَلَقْنَا السَّمَاءَ وَالْأَرْضَ وَمَا بَيْنَهُمَا بَطْلًا ۚ ذَلِكَ ظَنَّ الَّذِينَ كَفَرُوا ۚ فَوَيْلٌ لِلَّذِينَ كَفَرُوا مِنْ النَّارِ

Artinya : “ dan kami tidak menciptakan langit dan bumi dan apa yang ada di antara keduanya dengan sia-sia. Itu anggapan orang-orang kafir, maka celakalah orang-orang yang kafir itu karena mereka akan masuk neraka.

Berdasarkan ayat di atas, Allah telah berfirman bahwa tidak ada yang diciptakan di dunia ini tidak ada yang sia-sia. Peneliti tertarik untuk melakukan penelitian mengenai aktivitas jamur *A. oryzae* sebagai antibiofilm yaitu pencegahan, perlekatan, penghambat pembentukan dan penghancur biofilm *P. aeruginosa*.

1.2. Rumusan Masalah

1.2.1 Rumusan Masalah Umum

Apakah Jamur *Aspergillus oryzae* memiliki aktivitas antibiofilm terhadap *Pseudomonas aeruginosa*?

1.2.2 Rumusan Masalah Khusus

1. Apakah jamur *Aspergillus oryzae* memiliki aktivitas pencegahan perlekatan bakteri dalam pembentukan biofilm *Pseudomonas aeruginosa*?
2. Apakah jamur *Aspergillus oryzae* memiliki aktivitas penghambatan pertumbuhan biofilm *Pseudomonas aeruginosa*?
3. Apakah jamur *Aspergillus oryzae* memiliki aktivitas penghancuran biofilm bakteri *Pseudomonas aeruginosa*?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui aktivitas jamur *Aspergillus oryzae* sebagai antibiofilm *Pseudomonas aeruginosa*.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengetahui aktivitas jamur *Aspergillus oryzae* terhadap pencegahan perlekatan biofilm *Pseudomonas aeruginosa*.
2. Mengetahui aktivitas jamur *Aspergillus oryzae* terhadap penghambatan pertumbuhan biofilm *Pseudomonas aeruginosa*.
3. Mengetahui aktivitas jamur *Aspergillus oryzae* terhadap terapi, penghancuran biofilm *Pseudomonas aeruginosa*.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

Memberikan suatu kajian informasi dalam rangka pengembangan ilmu kesehatan mengenai manfaat jamur *Aspergillus oryzae* sebagai antibiofilm *Pseudomonas aeruginosa*.

1.4.2 Manfaat Aplikatif

1. Penelitian ini mampu dijadikan pertimbangan dalam pengolahan dan penggunaan jamur *Aspergillus oryzae* sebagai pengobatan terhadap infeksi *Pseudomonas aeruginosa*.
2. Penelitian ini dapat menjadi sumber informasi mengenai pemanfaatan jamur *Aspergillus oryzae* sebagai antibiofilm bakteri.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Infeksi Nosokomial

2.1.1. Definisi dan epidemiologi infeksi nosokomial

Pada perawatan gawat darurat di sebuah rumah sakit Amerika Serikat tahun 1976, diperkirakan sekitar 2,1 juta infeksi nosokomial (dari data rumah sakit yang diperoleh) dan sebagai komplikasi infeksi pada 37,7 juta pasien yang dirawat. Rata-rata pada infeksi nasional terdapat 5,7 yang mengalami infeksi nosokomial dari 100 pasien yang dirawat. Berdasarkan perkiraan konservatif bahwa penambahan jumlah hari perawatan di rumah sakit dan biaya yang dikeluarkan karena infeksi ini sekitar 7,5 juta *extra* hari perawatan dan lebih dari satu miliar dolar untuk biaya perawatan rumah sakit (Halley, 1985).

Infeksi nosokomial merupakan infeksi yang terjadi saat seseorang berada lama di rumah sakit dan mengalami suatu gejala tertentu. Infeksi nosokomial adalah salah satu penyebab tingginya tingkat morbiditas dan mortalitas di dalam rumah sakit. Pada penelitian oleh *National Nosokomial Infections Surveillance* (NNIS) dan *Centers of Disease Control and Prevention's* (CDC's) di tahun 2002 terdapat sekitar 5 kasus infeksi pada 100 kunjungan dan diperkirakan sekitar 2 juta infeksi nosokomial yang terjadi di Amerika Serikat setiap tahunnya. Berdasarkan data yang didapatkan oleh universitas yang berada di Amerika Serikat bahwa pasien yang berada di *Intensive Care Unit* (ICU) memiliki sampai 8 kali lebih besar risiko untuk

terjangkit infeksi nosokomial dibandingkan dengan pasien yang berada di ruang inap biasa. Beberapa tindakan di ICU seperti pemasangan kateter, pemasangan infus yang tidak sesuai prosedur yang menjadi penyebab terjadinya infeksi nosokomial di lingkup ICU (Salawati, 2012).

Infeksi nasokomial adalah masalah besar bagi seluruh rumah sakit karena kerugian yang disebabkan. Semua pasien yang dirawat di rumah sakit memiliki resiko terinfeksi sebesar 20% begitu juga dengan para staf rumah sakit maupun pengunjung (Nurseeha, 2013).

Data yang diambil dari Rumah Sakit Hasan Sadikin Bandung di tahun 2012, didapatkan infeksi oleh *P. aeruginosa* sebanyak 13,29% pada isolat darah pasien infeksi nosokomial (Taslim, 2016).

Tabel 2. 1 Mikroorganisme penyebab infeksi nosokomial di rumah sakit

Lokasi	Jenis Mikroorganisme	Persentase
Saluran kemih	Gram-negative enteric	50%
	Jamur	25%
	<i>Enterococci</i>	10%
Luka operasi	<i>Staphylococcus aureus</i>	20%
	<i>Pseudomonas</i>	16%
	<i>Coagulase-negative Staphylococci</i>	15%
	<i>Enterococci</i> , jamur, <i>Enterobacter</i> , dan <i>Escherichia coli</i> .	< 10%

Darah	<i>Coagulase-negative</i>	40%
	<i>Staphylococci, Enterococci</i>	11,2%
	Jamur	9,65%
	<i>Staphylococcus aureus</i>	9,3%
	<i>Enterobacter species</i>	6,2%
	<i>Pseudomonas</i>	4,9%

Sumber : Nasution, 2012

2.1.2. Patogenesis Infeksi Nosokomial

Infeksi nosokomial dapat diperoleh dari paparan oleh virus, jamur dan parasit. Bakteri adalah patogen tersering penyebab infeksi nosokomial. Patogen wajib diperiksakan kepada seluruh pasien dengan demam yang sebelum dirawat di rumah sakit tidak ada gejala demam. Faktor pemicu infeksi nosokomial pada pasien yaitu (Nasution, 2012):

- a. Status imuno defisiensi (lansia dan bayi prematur).
- b. Tindakan menggunakan alat, misalnya intubasi endotrakea, pipa saluran bedah, pemasangan kateter, dan trakeostomi.
- c. Pemakaian obat immunosupresan dan antibiotik.
- d. Transfusi darah secara berulang.

Ada beberapa cara penularan pada pasien di rumah sakit sehingga terjangkit infeksi nosokomial, diantaranya :

- a. Penularan lewat kontak

Ada 3 bentuk penularan yaitu kontak secara langsung antar tubuh yang mudah terinfeksi dan yang sudah terinfeksi, kontak secara tidak

langsung yaitu antara pasien rentan dengan alat yang terkontaminasi dan penularan melalui *droplet*, apabila pasien terinfeksi batuk, bersin atau lain sebagainya.

b. Penularan lewat udara

Udara yang mengandung mikroorganisme yang dapat berevaporasi atau debu yang mengandung organisme infeksius. Mikroorganisme yang terbawa melalui udara dapat terhirup pejamu yang rentan dengan jarak yang dekat pada pasien terinfeksi, misalnya mikroorganisme *Legionella*, virus varisela, Rubeola, dan *Mycobacterium tuberculosis*.

c. Penularan lewat makanan, obat-obatan dan lingkungan

d. Penularan lewat vektor, sebagai contoh lalat, kutu, tikus, dan nyamuk (Nasution, 2012).



Gambar 2. 1 Rantai penularan infeksi nosokomial (Nasution, 2012)

2.2. *Pseudomonas aeruginosa*

2.2.1. Manifestasi *Pseudomonas aeruginosa*

Pada kebanyakan infeksi oleh *P. aeruginosa*, gejala dan tanda-tanda yang terlihat tidak spesifik dan berhubungan dengan organ yang terinfeksi. Salah satunya pada nekrosis hemoragik kulit oleh *P. aeruginosa* menyebabkan *ecthyma gangrenosum* dengan gambaran eritema (kemerahan) di sekitar luka dan disertai pus (nanah) (Jawetz, 2007).

Pseudomonas aeruginosa dapat menyebabkan infeksi pada beberapa organ seperti pada kornea yang dapat secara progresif memperburuk infeksi telinga yaitu *Pseudomonas otitis eksterna*. Luka bakar yang terinfeksi oleh *P.aeruginosa* dapat berkembang menjadi septikemia yang menyebabkan mortalitas yang berkaitan dengan pasien neutropenia. Apabila terjadi kerusakan pada kulit yang terinfeksi *P. aeruginosa* dapat menyebabkan *ecthyma gangrenosum*. Selain itu *P. aeruginosa* dapat menyebabkan *osteomyelitis*, *septic arthritis* dan meningitis pasca operasi saraf. Infeksi kronis pada *cystic fibrosis* akibat *P. aeruginosa* mampu mengakibatkan perburukan secara progresif dari fungsi paru (Gillespie, 2000).

Bakteri *P. aeruginosa* merupakan bakteri oportunistik yang menyebabkan community atau hospital acquired infection. *Community aquired infection* yang disebabkan oleh *P. aeruginosa* antara lain: folikulitis, otitis eksternal, mata, endokarditis akibat penyalahgunaan obat secara IV. *Hospital acquired infection* seperti, saluran pernafasan, saluran kemih, luka, darah (bakterimia), dan sistem saraf pusat (Forbes, 2007).

2.2.2. Taksonomi *Pseudomonas aeruginosa*

Taksonomi *Pseudomonas aeruginosa* adalah sebagai berikut (Rahmadani, 2015).

Kingdom : *Bacteria*

Filum : *Proteobacteria*

Kelas : *Gamma proteobacteria*

Ordo : *Pseudomonadales*

Famili : *Pseudomonadaceae*

Genus : *Pseudomonas*

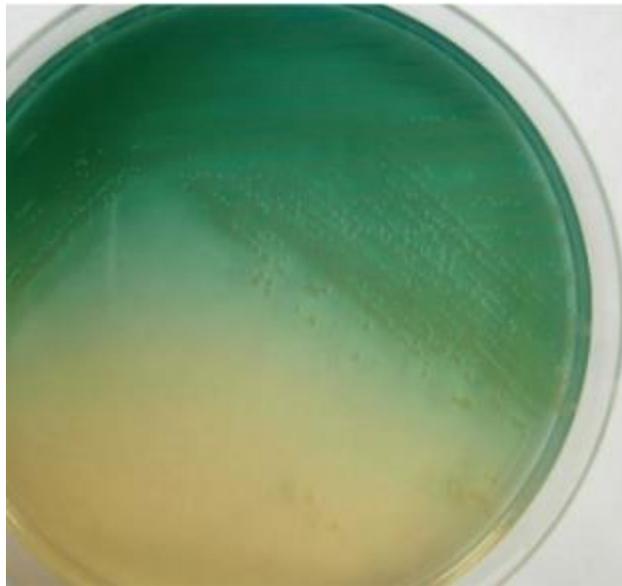
Spesies : *aeruginosa*

2.2.3. Morfologi *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa memiliki bentuk seperti batang dengan besar sekitar $0,6 \times 2\mu\text{m}$. Bakteri *P. aeruginosa* ini terlihat dengan ciri khasnya yaitu tunggal, berpasangan atau bahkan terlihat membentuk rantai pendek, tidak memiliki pelapis (*sheath*) dan memiliki flagel tunggal diujungnya (Jawetz, 2007). Digolongkan sebagai bakteri gram negatif dan dapat tumbuh maksimal pada suhu $37-42^{\circ}\text{C}$. Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ini banyak dijumpai pada lingkungan yang stabilitasnya rendah seperti luka bakar, luka pasca operasi dan infeksi telinga (Rahmadani, 2015).

P. aeruginosa merupakan bakteri aerob obligat yang tumbuh pada berbagai jenis media, dikarenakan *P. aeruginosa* ini memiliki kebutuhan nutrisi yang sederhana, contohnya yang dapat ditemukan di laboratorium

seperti asetat dan ammonium sulfat untuk kebutuhan karbon dan nitrogen. Dalam pertumbuhannya, *P. aeruginosa* dapat menghasilkan berbagai tipe koloni, setiap tipenya memiliki aktivitas biokimia dan enzimatis yang berbeda, bahkan *P. aeruginosa* terkadang menghasilkan bau seperti anggur atau jagung. Beberapa membentuk koloni bulat halus dengan warna hijau neon yang mampu menghasilkan pigmen pyocyanin (Jawetz, 2007). Isolat *P. aeruginosa* yang berasal dari tanah maupun air memiliki bentuk koloni yang kecil dan kasar. Pada sampel dari klinik dihasilkan tipe koloni halus, yaitu yang pertama koloni yang besar dan halus memiliki permukaan rata dan menonjol dan kedua, koloni halus yang menghasilkan mukoid yaitu produksi berlebih oleh alginat (Yuliandri, 2015).



Gambar 2. 2 Koloni *Pseudomonas aeruginosa* pada agar *Mueller-Hinton* (Jawetz, 2010).

Alginat merupakan eksopolisakarida yang berbentuk lendir disekitar bakteri dan alginat juga membantu *P. aeruginosa* dalam membentuk biofilm

sebagai perlindungan terhadap limfosit, fagosit, silia, antibodi, komplemen serta antibiotik (Yuliandri, 2015).

2.2.4. Faktor virulensi *Pseudomonas aeruginosa*

Faktor virulensi dari bakteri *P. aeruginosa* dibagi menjadi beberapa kegunaan, ada faktor virulensi yang berasal dari sekresi sel seperti eksotoksin A, alginat, hemolisin, eksoenzim S, siderofor, alkalik protease, fosfolipase C, dan elastase. Ada juga faktor virulensi dengan kemampuan terkait pembentukan biofilm pada *P. aeruginosa* seperti alginat, lipopolisakarida (LPS), pilus dengan fungsi adhesi, dan flagel.

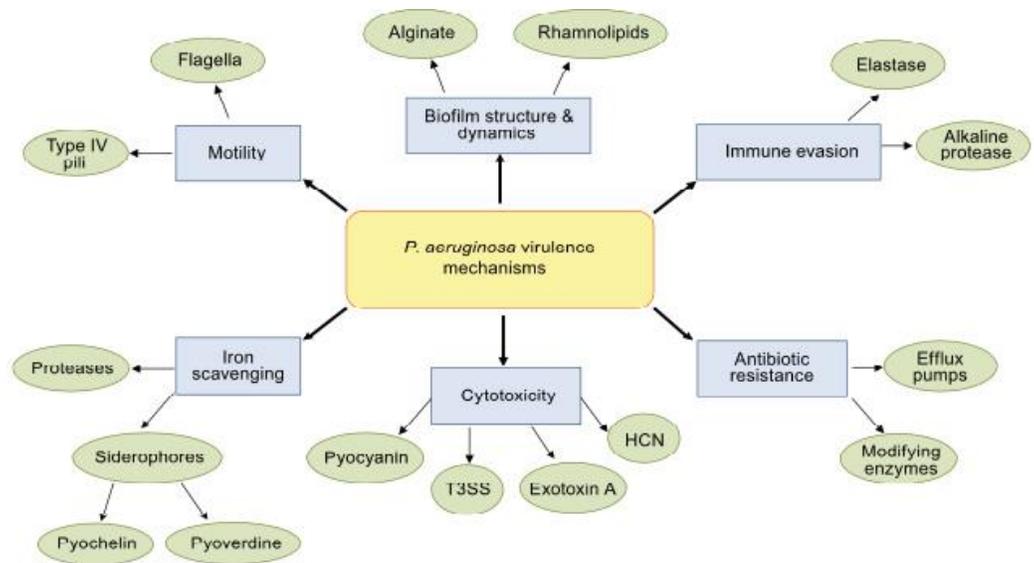


Figure 1. Virulence mechanisms employed during *P. aeruginosa* infections.

Gambar 2. 3 Mekanisme virulensi yang terdapat pada infeksi oleh *P. aeruginosa* (Lee J., 2015).

Faktor virulensi pilus sebagai pembentukan biofilm terdapat senyawa Pil A dan Pil B yang pada tahap awal, yakni perlekatan pada permukaan jaringan terhadap alginat, *Polysaccharide synthesis locus* (Psl), *Pellicle formation* (Pel) untuk pematangan biofilm. *P. aeruginosa* yang menghasilkan

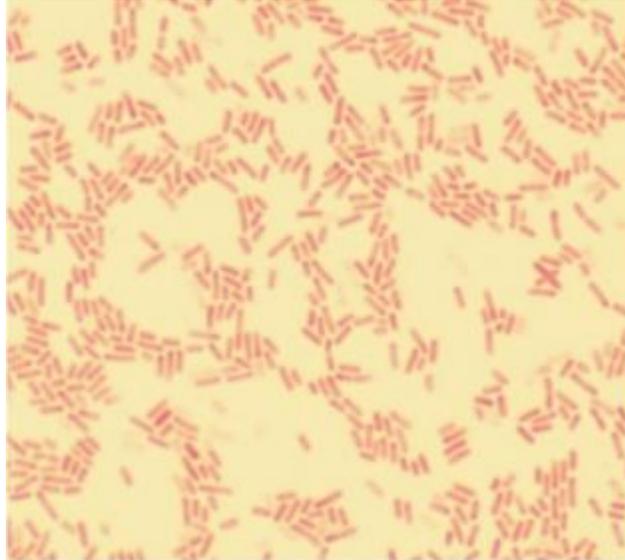
eksopolisakarida biofilm yaitu alginat (bermuatan negatif), Psl yang mengandung mannanosa netral serta Pel terkandung banyak glukosa, yang ketiganya berperan sebagai penentu fenotip mukoid dari *P. aeruginosa*. Alginat yang merupakan komponen *Extracellular Polymeric Substances* (EPS) pada sampel pasien *Cystic Fibrosis* (CF) dan lebih banyak terdapat pada respon sistem imun. Psl dan Pel memiliki fungsi umum dalam tahap pematangan biofilm serta resistensi terhadap antibiotik. *Polysaccharide synthetis locus* (Psl) memiliki fungsi untuk membentuk bagan biofilm dari planktonik bebas yang berada di bagian perifer matriks biofilm (EPS), sementara *Pellicle formation* (Pel) berfungsi sebagai reseptor dari enzim *diguanilat siklase* untuk mengatur pembentukan c-di-GMP sebagai *second messenger* bagi maturasi biofilm. Setiap faktor virulensi memiliki tingkatan produksi yang berbeda berdasarkan keadaan lingkungannya (Gunardi, 2016).

2.2.5. Identifikasi *Pseudomonas aeruginosa*

2.2.5.1. Mikroskopis

Pengamatan mikroorganisme seperti bakteri secara mikroskopis dengan pewarnaan gram. Pewarnaan ini digunakan untuk mengamati bakteri dari segi bentuk, susunan dan ukurannya. Pewarnaan gram pada bakteri *P. aeruginosa* ditemui bakterinya berwarna merah dengan bentuk seperti batang berukuran pendek, dikarenakan *P. aeruginosa* termasuk ke dalam golongan bakteri gram negatif yang mempunyai peptidoglikan tipis, sehingga di saat pemberian alkohol, kompleks kristal violet dari pewarnaan sebelumnya mudah terurai dan menyebabkan bakteri tidak berwarna.

Bakteri gram negatif seperti *P. aeruginosa* hanya menyerap pewarnaan lain yaitu safranin yang membuat bakteri terlihat berwarna merah muda (Abidah, 2020).



Gambar 2. 4 Hasil pengamatan *Pseudomonas aeruginosa* secara mikroskopis (Jawetsz, 2010).

2.2.5.2. Uji biokimia

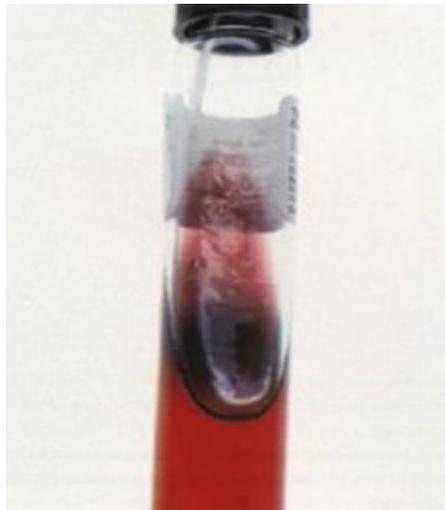
Untuk mengidentifikasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dapat dilakukan uji biokimia berupa uji IMViC yang meliputi uji indol, *Sulfid Indol Motility* (SIM), Uji gula (glukosa, sukrosa, laktosa, dan mannitol), *Methyl Red* (MR), *Voges-Proskauer* (MR-VP), *Simmon's Citrate Agar* (SCA), selanjutnya di inkubasi pada suhu 37°C dengan lama inkubasi 24 jam dan diamati perubahannya.

1. Uji Indol

Uji indol pada bakteri *P. aeruginosa* didapatkan hasil negatif, ditandai dengan tidak terbentuknya cincin ungu pada tabung reaksi yang mengindikasikan bahwa bakteri tidak menghasilkan enzim triptophanase yang dapat memecah triptophan menjadi indol (Lipincotts, 2008).

2. Uji TSIA

Uji TSIA digunakan untuk mengidentifikasi bakteri dengan kemampuan mengurai dextrosa, laktosa, sukrosa, dan gas sulfida, selain itu uji ini juga berguna untuk mengidentifikasi gas H₂S yang dihasilkan oleh bakteri. Pada uji terhadap *P. aeruginosa*, ditemukan hasil hijau kebiruan dan permukaan yang mengkilat.



Gambar 2. 5 Hasil Uji TSIA (Maza, et all, 1997).

3. Methyl Red (MR)

Uji MR dilakukan untuk mengetahui apakah terdapat fermentasi asam campuran, yaitu bakteri mampu memfermentasi glukosa yang menyebabkan perubahan pH media pertumbuhan menjadi asam atau lebih rendah. Pada uji terhadap *P. aeruginosa* didapatkan hasil uji MR negatif yaitu tidak ada perubahan cairan methyl red menjadi kuning.

4. Uji *Sulfid Indol Motility* (SIM)

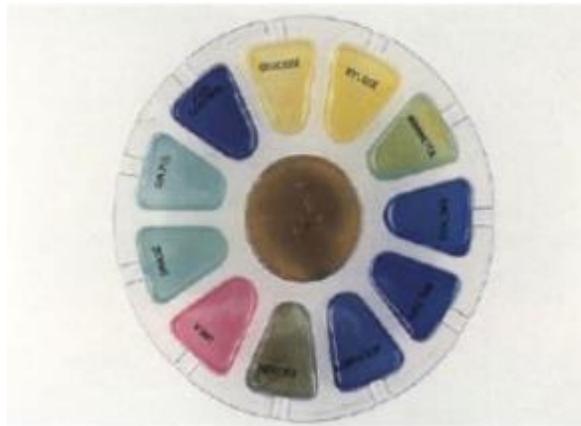
Uji SIM berfungsi untuk mengetahui motilitas suatu bakteri, pada pengujian *P. aeruginosa* didapatkan hasil positif dimana terlihat penyebaran pertumbuhan di garis tusukan yang telah dibuat pada media.

5. Uji *Simmon's Citrate Agar* (SCA)

Uji sitrat ini digunakan untuk mengetahui adanya sitrat yang menjadi sumber karbon yang menciptakan sifat basa. Pada uji dengan *P. aeruginosa* adalah positif dimana terjadi perubahan warna menjadi biru.

6. Uji Gula-gula (glukosa, laktosa, xylosa, maltosa, manitol)

Uji gula-gula pada *P. aeruginosa* didapatkan hasil glukosa (+) dimana ada perubahan dari warna biru menjadi kuning , xylosa (+), Maltosa (-), laktosa (+), dan manitol (+).



Gambar 2. 6 Hasil Uji Gula-gula (Maza *et al*, 1997).

Berdasarkan hasil dari uji biokimia, dapat disimpulkan bahwa bakteri *P. aeruginosa* bersifat non fermentatif, motil, memanfaatkan gula sebagai bahan untuk metabolisme oksidase, memakai glukosa untuk menghasilkan asam dan bakteri ini tidak menghasilkan indol dan methyl red (Rahmadian, 2018).

2.2.5.3. Biakan pada medium diferensial

Biakan pada medium diferensial bertujuan untuk mengidentifikasi pertumbuhan bakteri. Medium diferensial sendiri memiliki banyak jenis seperti agar *Eosin Methylene Blue* (EMB), agar *MacConkey* dan agar *Desoxycholate* yang mengandung warna serta glukosa dengan tujuan

membedakan antara koloni bakteri yang memfermentasikan laktosa dan tidak memfermentasi laktosa (Abidah, 2020). Pada medium agar darah pertumbuhan *P. aeruginosa* terlihat penyebarannya datar, bergerigi, tampak berkilau (*metallic sheen*), terdapat pigmentasi hijau-kebiruan, berlendir, bau seperti buah-buahan. Dan pada agar *Mac-Conkey* *Pseudomonas aeruginosa* mengakibatkan agar tampak berwarna hijau kebiruan karena pigmen piosianin yang berdifusi ke dalam media, selain agar *Mac-Conkey* medium diferensial yang sering digunakan untuk *P.aeruginosa* adalah EMB agar (Badal, 2018).



Gambar 2. 7 Biakan *P.aeruginosa* pada agar *Mac-Conkey* (Lipincotts, 2008).

2.3. Biofilm

2.3.1. Definisi Biofilm

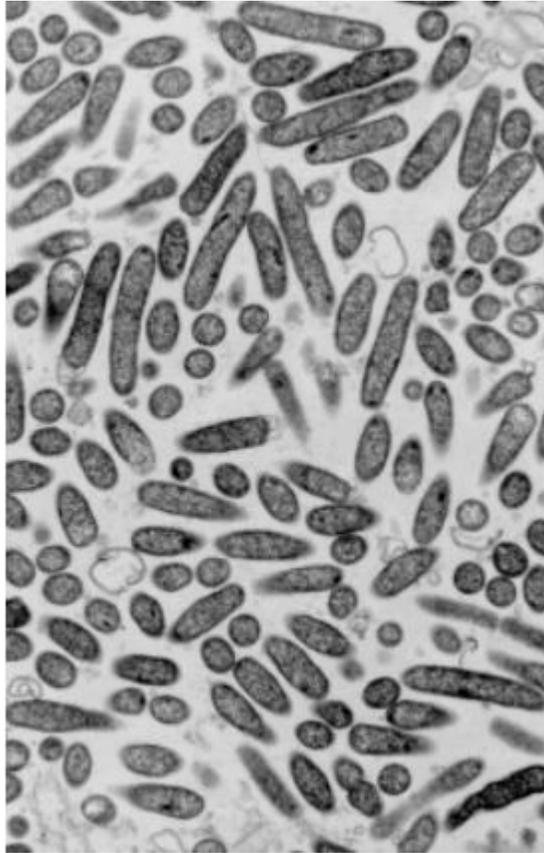
Biofilm adalah komunitas sesil turunan dari mikroba dengan ciri-ciri yaitu sel-sel yang melekat secara permanen pada substrat satu sama lain, dan menempel di dalam matriks zat polimer ekstraseluler yang diproduksi oleh bakteri tersebut, serta menunjukkan fenotipe yang berubah sehubungan dengan laju pertumbuhan dan transkripsi gen (Costerton, 2005).

Biofilm merupakan matriks *Ekstraselular Polimeric Substances* (EPS) yang terbentuk dari kumpulan sel mikroba yang menempel secara *irreversible* pada permukaan epitel bakteri. Biofilm mampu diproduksi oleh semua jenis bakteri yang membedakan kekuatan pertahanan antar bakteri adalah jenis dan morfologi bakteri serta produksi substansi biofilm (Permanasari, 2015).

2.3.2. Struktur Biofilm

Struktur biofilm merupakan pondasi dari terbentuknya biofilm yang menyebabkan terjadi mekanisme-mekanisme pertahanan seperti *quorum sensing*, resistensi mikroba dan membantu interaksi fisiologis mikrokoloni biofilm yang matang. Suatu biofilm bakteri tersusun atas matriks (85% dari seluruh volume) dan sel-sel bakteri sebanyak 15% sisanya.

Ekstracelluler Polymere Substance (EPS) merupakan materi utama biofilm yaitu memberi porsi sebesar 50-90% dari karbon organik biofilm. Struktur utama EPS yaitu polisakarida dan memiliki sifat hidrofilik yang mampu menyerap air dengan jumlah tinggi dan kelarutan yang berbeda (Permanasari, 2015).



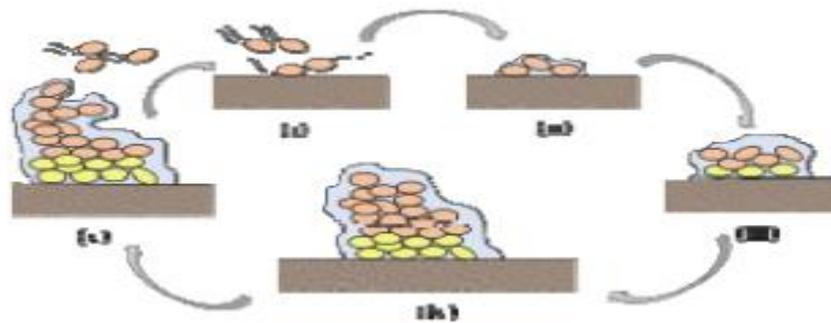
Gambar 2. 8 Matriks ekstraseluler pada *P.aeruginosa* pada pengamatan mikroskop elektron (Stewart, 2001).

2.3.3. Pembentukan biofilm pada *Pseudomonas aeruginosa*

Biofilm umumnya terbentuk melalui 5 tahapan, yang pertama perlekatan sel planktonik, dilanjutkan dengan perlekatan *irreversible* dimana *P. aeruginosa* dibantu oleh protein SadB. Pada tahapan yang ketiga dimulai pembentukan *Extracellular Polymeric Substances* (EPS) dan lapisan kompleks biomolekul untuk membentuk suatu mikrokoloni. Tahap keempat merupakan maturasi dari biofilm dan terakhir adalah proses pelepasan bakteri biofilm kembali agar dapat membentuk lapisan biofilm yang baru (Gunardi, 2017).

Dalam tahapan pembentukan biofilm, sel-sel planktonik dalam EPS akan menghasilkan sinyal, molekul sinyal tersebut berfungsi pada terciptanya

maturasi karakter dari biofilm dan pengaturan aktivitas biofilm. kerja dari molekul ini adalah bagian dari proses *quorum sensing*, serta aksinya bergantung terhadap konsentrasi sinyal di lingkungannya. Kandungan biofilm yang matur dapat terdiri dari berbagai jenis bakteri, selain itu juga dapat mengandung organisme lain seperti alga, jamur, protozoa, produk karosi serta jaringan debris. Pada pembentukan biofilm bergantung pada konsentrasi nutrisi yang ada dan dikontrol oleh zat kimia kompleks yang diproduksi oleh sel sebagai alat komunikasi (Gunardi, 2014).



Gambar 2. 9 Tahap Pembentukan Biofilm: (i) perlekatan bakteri planktonik, (ii) perlekatan irreversible, (iii) pembentukan mikrokoloni, (iv) maturasi biofilm (v) pelepasan bakteri biofilm. (Gunardi, 2017).

Pada pembentukan biofilm oleh *P. aeruginosa* memerlukan 3 komponen yaitu *Psl*, *Pel* dan alginat. Beberapa studi memperlihatkan alur pembentukan biofilm pada bakteri *P. aeruginosa* di media glukosa minimal terjadi pada 2 jam pertama di saat sel planktonik mulai menempel. Delapan jam setelahnya, membentuk ikatan *irreversible* dengan jaringan maupun lingkungan abiotiknya. Perlekatan *irreversible* ini akan bertahan sampai tahapan *Quorum Sensing*, membentuk mikrokoloni dan mulai produksi EPS dalam waktu 14 jam,

lalu terjadi proses maturasi selama 1-4 hari setelah perlekatan. Bakteri dengan biofilm yang sudah mature sewaktu-waktu akan terdispersi kembali menjadi bakteri planktonik dan menjadi siklus secara berulang yang bisa menyebabkan infeksi akibat pertumbuhan koloni yang semakin banyak (Gunardi, 2017).

Ada beberapa faktor yang mempengaruhi perlekatan sel-sel planktonik pada pembentukan biofilm seperti yang dideskripsikan pada gambar 2.9.

a. Efek permukaan (Substratum)

Kondisi permukaan dimana menempelnya sel planktonik lebih baik yaitu diatas permukaan yang kasar, karena dapat mengurangi kekuatan arus yang mampu melepaskan biofilm dan memiliki permukaan yang luas.

b. *Conditioning film*

Merupakan suatu permukaan yang terkena zat cair, dimana cairan itu akan diselimuti oleh polimer-polimer yang dapat menyebabkan modifikasi kimia sehingga memberi efek pada pertumbuhan dan penyebaran pembentukan biofilm.

c. Hidrodinamik

Hidrodinamik seperti contoh, apabila kecepatan aliran semakin besar, maka akan semakin mempercepat proses menempelnya mikroorganisme di permukaan bakteri.

d. Karakteristik media cairan

Kandungan yang ada di dalam media seperti nutrisi, kation, suhu dan pH dari media tersebut.

e. Keadaan permukaan

Keadaan permukaan yang dimaksud yaitu seperti permukaan yang bersifat hidrofobik, terdapat flagel, fimbriae, lapisan polisakarida yang memudahkan proses perlekatan mikroorganisme (Gunardi, 2014).

2.3.4. Quorum sensing *Pseudomonas aeruginosa*

Infeksi oleh *P. aeruginosa* mengandung transkripsi mRNA untuk gen *Quorum Sensing* yaitu lasR, lasI, RhIR, RhIL. Akumulasi dari mRNA tersebut pada sampel infeksi berhubungan dengan level transkripsi pada variasi gen regulasi *quorum sensing*. Gen regulasi *Quorum Sensing* sangat penting untuk proses metabolisme, sintesis protein dan virulensi dari *P. aeruginosa*. AHLs pada *P.aeruginosa* dideteksi sebagai C4-HSL, 3OC12-HSL yang berperan pada infeksi *P. aeruginosa* akut ataupun kronis (Rutherford, 2012).

Regulasi pada *Quorum Sensing* (QS) yang digunakan oleh *P. aeruginosa* meliputi 3 sistem yaitu Rhl, Las dan QSC yang membentuk rantai *Quorum Sensing*. *Quorum Sensing* adalah regulator positif perluasan biofilm (Gunardi, 2016). Pada sistem Rhl yang mengandung gen RhIR dan RhIL yang berfungsi untuk menghasilkan autoinduser PAI-2, serta sistem ini juga mengontrol ekspresi rhII dan rhIAB yang berfungsi mengkode *rhamnosyltransferase* pada produksi rhamnolipid, dimana rhamnolipid merupakan faktor virulensi *P. aeruginosa* yang dikendalikan oleh sistem quorum sensing. Sistem Las memiliki gen LasR dan LasL dimana kedua ini berfungsi untuk menghasilkan autoinduser PAI-1 (N-3oxododecanoyl, L-

homoserine lactose), serta mengontrol aktivasi gen *lasI*, *lasB*, *lasA*, *apr* dan *tox A* (Pesci, 1997).

Suatu *quorum sensing* pada bakteri bergantung pada jaringan autoinduser, sintase autoinduser, reseptor autoinduser dan komponen transduksi sinyal yang mengubah informasi yang terkandung dalam penginduksi otomatis menjadi perubahan ekspresi gen (Mukherjee, 2019). Pada bakteri Gram negatif seperti *P. aeruginosa* memproduksi molekul lakton homoserine N-asil (AHLs) yang dihasilkan oleh LuxI dari AHL sintase dan Turunan *S-adenosyl methionine* (SAM) atau bisa disebut sebagai autoinducer-2 (AI-2) (Toyofuku et al., 2015). Produksi AHL bergantung pada kondisi lingkungannya, pada konsentrasi rendah AHL diproduksi oleh AHL sintase dan melakukan transpor ke dalam sel menggunakan ATP, pada konsentrasi tinggi AHL akan berdifusi secara pasif ke dalam sel hingga mencapai quorum state dan selanjutnya akan berikatan dengan reseptor R dan membentuk ikatan R-AHL yang berfungsi pada proses transkripsi gen terhadap virulensi dari *P. aeruginosa* (Smith, 2003).

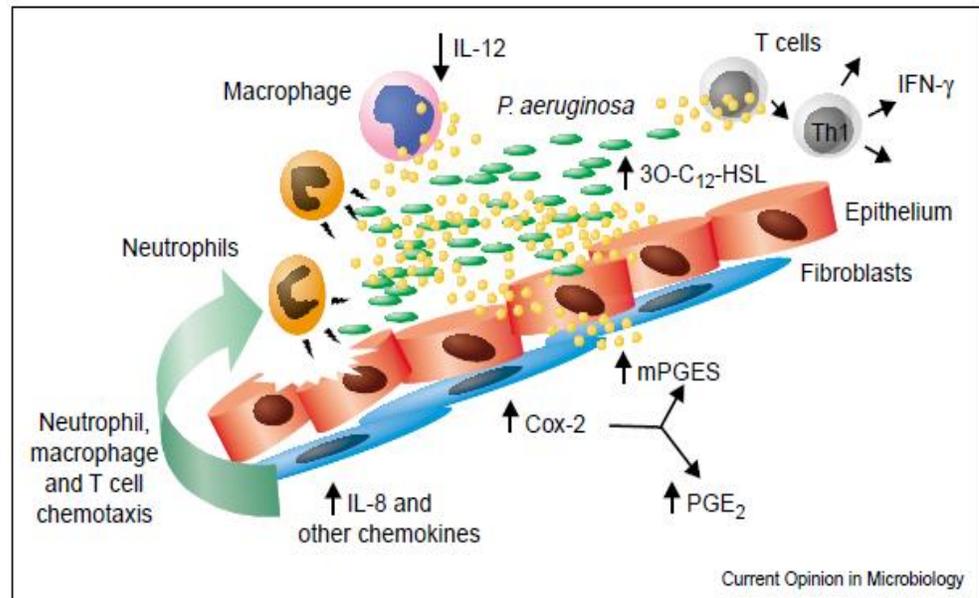
Beberapa ciri-ciri *quorum sensing* bakteri gram negatif yakni (Abidah, 2020) :

- a) Autoinducer yang dapat berdifusi bebas melewati membran sel, seperti AHL dan molekul lain hasil produksi dari SAM.
- b) Autoinducer yang terikat dengan reseptor spesifik yang berada pada membran dalam maupun sitoplasma.

- c) Quorum Sensing dapat mengatur hingga ribuan ekspresi gen biologis suatu bakteri (Mukherjee, 2019).
- d) Saat tahapan autoinduksi, produksi autoinducer akan bertambah sehingga memicu terjadinya ekspresi gen sinkronisasi.

Pada tubuh manusia, proses quorum sensing memiliki efek virulensi berupa reaksi peradangan yang meningkat. Sel host (eukariotik) dapat berkomunikasi antar sel melalui hormon dan prostaglandin yang memiliki struktur serupa dengan AHLs sehingga sel host dapat merespon sinyal quorum sensing yang ada. Pada beberapa studi menyebutkan AHLs memiliki peran dalam induksi inflamasi pada sel eukariotik, misalnya apabila gen AHLs yang mengandung lasR dihapuskan akan menurunkan jumlah produksi IL-8 sehingga menurunkan reaksi inflamasi pada sel (Rutherford, 2012).

Molekul 3OC12-HSL mengaktifkan *Extracellular signal Regulated Kinase* (ERKs) yang kemudian memicu pengaktifan faktor NFkB, dimana NFkB ini penting untuk produksi maksimal dari IL-8 dengan stimulasi 3OC12-HSL. Molekul 3OC12-HSL juga diketahui dapat menginduksi ekspresi dari beberapa kemokin lainnya seperti migrasi monosit, neutrofil dan sel T. Selain itu, 3OC12-HSL dapat meningkatkan regulasi sekresi dari cyclooxygenase-2 (Cox-2), suatu enzim yang penting untuk produksi dari prostaglandin. Induksi Cox-2 dan pengaktifan dari prostaglandin E2 (PGE2) menghasilkan peningkatan produksi dari PGE2 itu sendiri (Smith, 2003).



Gambar 2. 10 Model yang diusulkan tentang efek dari 3OC12-HSL pada host selama masa infeksi *P. aeruginosa*. Bakteri tumbuh dengan biofilm sebagai pelindung, dimana mereka memproduksi banyak molekul QS 3OC12-HSL yang berinteraksi dengan sel-sel host untuk merangsang produksi berbagai macam mediator inflamasi. Induksi IL-8 dan sitokin lainnya memicu migrasi banyak sel menuju tempat infeksi, namun faktor-faktor yang dihasilkan oleh sel seperti neutrofil tidak mampu membunuh agen infeksi sehingga menimbulkan kerusakan jaringan. Induksi pada PGE2 semakin meningkatkan proses peradangan. 3OC12-HSL dapat bertindak sebagai imunomodulator dengan mengubah produksi dari beberapa sitokin seperti IL-12 dan IFN- γ , yang dapat mempengaruhi jenis respon imun yang ditimbulkan selama infeksi. MPEGS (*microsomal prostaglandin E syntase*) (Smith, 2003).

2.3.5. Resistensi terhadap antibiotik

Struktur serta fungsi fisiologis dari biofilm menyebabkan biofilm mengalami resistensi kepada antibiotik maupun antimikroba lainnya seperti germisida dan desinfektan. Resistensi biofilm dapat diukur pada pengamatan konsentrasi hambat minimum (MIC) oleh antibiotik. Ada beberapa faktor yang memegang peran dalam terjadinya resistensi biofilm terhadap antibiotik yaitu (Gunardi, 2014) :

a. Menurunnya kemampuan difusi dari antibiotik

Biofilm memiliki lapisan ekso polimer yang mampu memperlambat difusi dan mengikat antibiotik dan dapat dihancurkan oleh enzim β -*laktamase* contohnya pada *P. aeruginosa*.

b. Menurunnya laju pertumbuhan mikroorganisme pada biofilm

Anti mikroba sangat efektif penggunaannya apabila bekerja pada tempat yang sel-sel yang pertumbuhannya cepat dibandingkan yang sel-selnya tidak tumbuh atau laju pertumbuhannya menurun.

c. Adanya gen resistensi spesifik pada biofilm

Sebagai contoh, pada *P. aeruginosa* terdapat MDR *pump* yang mengakibatkan konsentrasi antibiotik menjadi rendah dan β -*galaktosidase* menyebabkan resistensi terhadap imipenem dan piperacilin.

Selain dari faktor- faktor di atas, resistensi biofilm terhadap anti mikroba juga dipengaruhi oleh fungsinya sebagai pertahanan bakteri. Ada 4 fungsi dasar biofilm yaitu (Permanasari, 2018):

a. Pelindung

Biofilm meningkatkan resistensi sehingga dapat mengurangi perkembangan mikroorganisme yang tidak melekat, mengurangi fagositosis yang dilakukan sel imun dan mengurangi penetrasi anti mikroba ke dalam bakteri. Bakteri yang memiliki biofilm cenderung 10-1.000 kali lebih resisten dibanding yang lainnya.

b. Perlekatan

Biofilm membantu bakteri lebih mudah menempel pada permukaan yang mengandung banyak nutrisi, seperti jaringan pada makhluk hidup.

c. Kolonisasi

Biofilm mempermudah bakteri dalam pembentukan koloni sehingga dapat lebih mudah dalam komunikasi antar sel bahkan pertukaran genetik.

d. Cara hidup alami bakteri

Biofilm adalah cara hidup alami dari bakteri, terutama apabila terbatasnya nutrisi yang diperoleh karna tidak dapat melakukan adhesi.

2.3.6. Uji pembentukan biofilm

2.3.6.1. Uji tabung

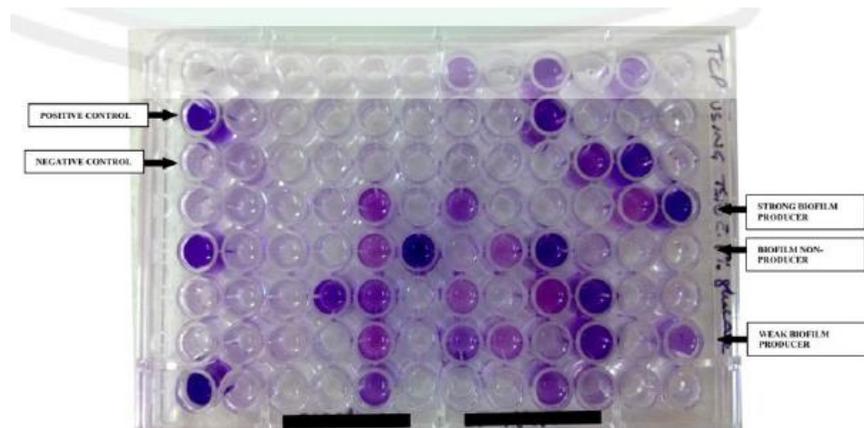
Uji tabung adalah metode secara kualitatif sebagai pendeteksi biofilm dengan cara melihat garis biofilm pada dasar maupun dinding tabung. Hasil dinyatakan positif apabila terbentuk garis pada dasar atau dinding tabung reaksi yang digunakan. Kekuatan biofilm yang terbentuk dinilai berdasarkan 3 poin yaitu, poin 1 jika lemah atau biofilm tidak terbentuk, poin 2 sedang dan poin 3 jika kuat atau tinggi (Kirmusaoglu, 2019).



Gambar 2. 11 Hasil uji tabung (Utami, 2020).

2.3.6.2. Uji mikrotiter plate (MtP)

Uji *Microtiter Plate* merupakan metode yang bersifat kuantitatif dan termasuk *gold standart* pendeteksi biofilm. Biofilm yang terbentuk di hitung dengan menggunakan *microplate reader* (microELISA). Metode MtP ini juga digunakan untuk mengetahui aktivitas agen antibiofilm terhadap pembentukan biofilm oleh bakteri. Pada uji ini terdapat kontrol negatif sebagai *blank* yang berisikan media. Nilai OD pada *blank* atau kontrol negatif berguna sebagai acuan apakah sampai memproduksi biofilm atau tidak, jika didapatkan OD sampel \geq OD *blank* maka dapat disimpulkan bakteri pada sampel merupakan bakteri pembentuk biofilm (Kirmusaoglu, 2019).



Gambar 2. 12 Metode Microtiter Plate (Abidah, 2020).

Tabel 2. 2 Acuan kekuatan bakteri dalam pembentukan biofilm

Rata-rata nilai OD	Kekuatan pembentuk biofilm
OD sampel \leq OD cut	<i>Non-biofilm producer</i>
OD cut < OD sampel \leq 2x OD cut	<i>Weak-biofilm producer</i>
2x OD cut < OD sampel \leq 4x OD cut	<i>Moderate-biofilm producer</i>
4x OD cut < OD sampel	<i>Strong-biofilm producer</i>

OD cut = rata-rata OD kontrol negatif + 3x standar deviasi (SD) kontrol negatif
 Sumber : Abidah, 2020.

2.4. *Aspergillus oryzae*

2.4.1. Taksonomi *Aspergillus oryzae*

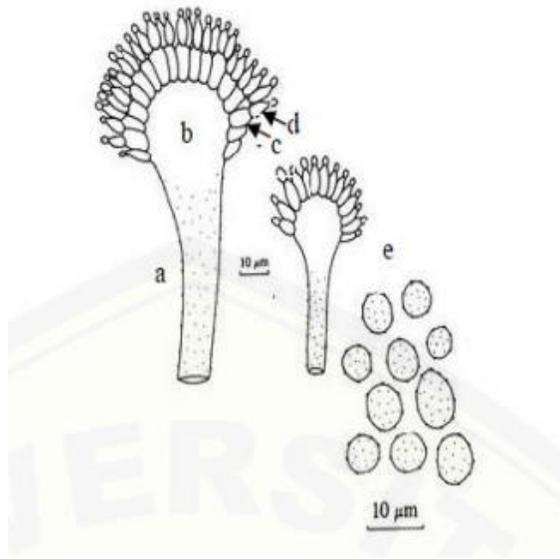
Taksonomi dari *Aspergillus oryzae* sebagai berikut (Rohman, 2019):

Domain : Eukariot
 Kingdom : Fungi
 Subkingdom : Dikarya

Filum	: Ascomycota
Subfilum	: Pezizomycotina
Kelas	: Eurotiomycetes
Subkelas	: Eurotiomycetidae
Ordo	: Eurotiales
Famili	: Aspergillaceae
Genus	: Aspergillus
Spesies	: <i>Aspergillus oryzae</i>

2.4.2. Morfologi *Aspergillus oryzae*

Aspergillus oryzae adalah salah satu anggota kelompok *A. flavus*. *A. oryzae* mempunyai kepala konidia berwujud bulat, berwarna hijau kekuningan dan saat tua akan berubah menjadi warna coklat. Jamur *Aspergillus oryzae* melakukan perkembangbiakan vegetatif menggunakan konidia, sementara untuk perkembangbiakan generatif menggunakan spora yang berada dalam askus. Selain itu, *A. oryzae* memiliki suhu optimal untuk tumbuh sekitar 32-36°C dalam kondisi aerobik (Rohman, 2019). Pada pengamatan secara makroskopis *A. oryzae* memiliki ciri-ciri yaitu koloni berwarna hijau dan miselium berwarna putih dengan diameter 65 mm, sedangkan pada pengamatan mikroskopis didapatkan *biseriate*, bentuk fisikel *sub globose* dengan diameter 35µm, panjang metula dan fialid 21,4µm, bentuk kondium *globose* dengan diameter 6,5µm, permukaan halus dan kasar (Oramahi, 2006).

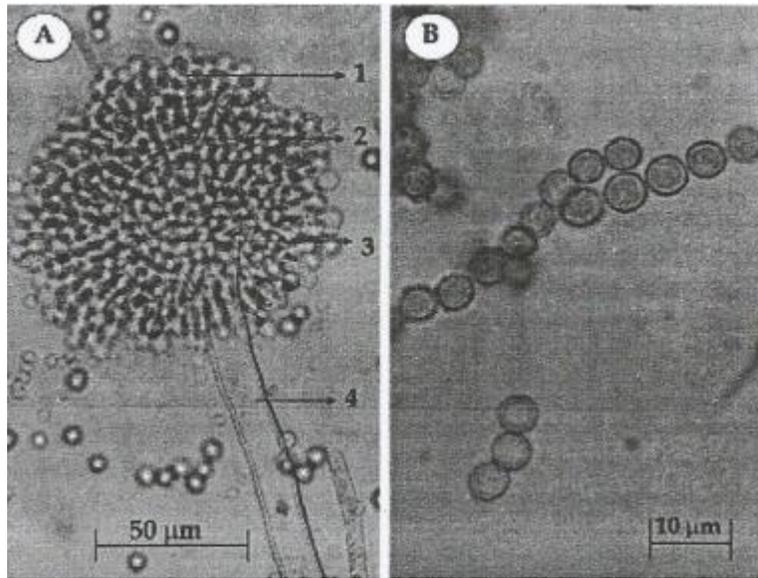


Gambar 2. 13 Morfologi kapang *A. oryzae* (a) Konidiofor (b) Vesikel (c) Metula (d) Fialid (e) Konidia (Rohman, 2019).

2.4.3. Identifikasi *Aspergillus oryzae*

2.4.3.1. Mikroskopis

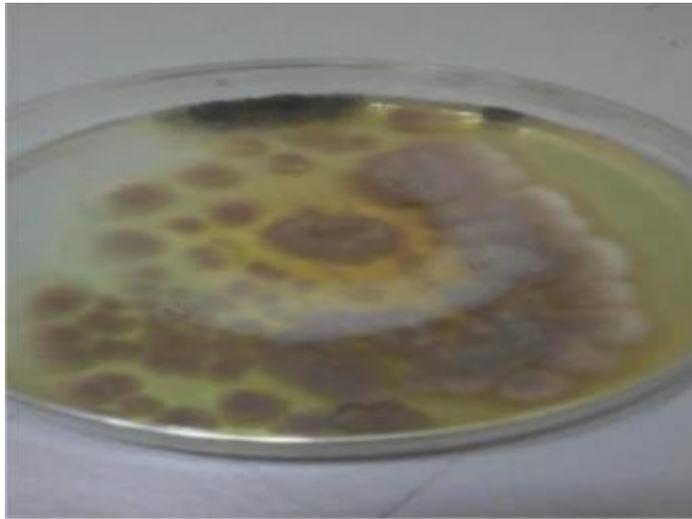
Terdapat hifa yang mengandung konidia dengan ciri-ciri konidophores panjang dengan vesikal terminal yang mengandung rantai konidia basipetal (Jawetz, 2010).



Gambar 2. 14 Gambaran *Aspergillus oryzae* pada pengamatan mikroskopis. A (1) Konidium, (2) Fialid, (3) Mentula, (4) Fisikel, (5) Konidiofor. B Konidium (Oramahi, 2006).

2.4.3.2. Biakan pada medium diferensial

Potato Dextrose Agar (PDA) adalah medium yang dapat digunakan untuk jamur *Aspergillus sp.* Medium PDA umum digunakan untuk pertumbuhan jamur. Hal ini disebabkan pH PDA yang rendah, yakni mencapai 4,5 sampai 5,6. Medium yang memiliki pH rendah dapat menekan pertumbuhan bakteri yang umumnya tumbuh pada medium dengan pH netral. Pertumbuhan jamur dengan menggunakan medium ini juga dapat optimal dengan suhu 25-30°C (Aini, 2015).



Gambar 2.15 Pertumbuhan *A. oryzae* pada *Potato Dextrose Agar* (PDA) (Ezeonu, 2018).

2.4.4. *Aspergillus oryzae* sebagai antibiofilm

Aspergillus oryzae merupakan jamur berfilamen yang digunakan dalam industri makanan fermentasi. Menurut (Leonard, 2013), *A. oryzae* diberi terapi berupa *Ethyl Methanesulfonate* (EMS) dengan konsentrasi antara 50 to 6400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ untuk membentuk mutasi pada DNA *Aspergillus oryzae*. Selanjutnya, *A. oryzae* mutan ini dilakukan kultur dan diuji kandungan anti mikroba terhadap *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA), hasil dari subkulturnya ditanam pada media agar LB dan didapatkan bahwa tidak ada pertumbuhan bakteri yang memaknai bahwa supernatan oleh *A. oryzae* dapat membunuh MRSA. Pada pengulangan selanjutnya didapatkan bahwa isolat *A. oryzae* mengandung senyawa antibakteri yang peka terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* (Methicillin-sensitive), MRSA dan *Pseudomonas aeruginosa*, akan tetapi tidak pada *Klebsiella pneumonia* atau *Proteus vulgaris*.

Aspergillus oryzae memproduksi senyawa Pyranose Dehydrogenase (PDH) dan enzim β -glukosidase (Riou et al, 1998; Pisanelli, 2010). Glukosidase merupakan enzim yang mengkatalisasi rantai pengikat *glycosidic* pada *oligosacharides* atau *glycoconjugate*. Beberapa glukosidase spesifik untuk penurunan celah glikogen obligasi bergantung pada jumlah, posisi atau konfigurasi dari kelompok-kelompok *hidroxylic* dalam molekul gula. Oleh sebab itu, α dan β -glukosidase dapat mengkatalisasi celah glikogen obligasi yang melibatkan terminal glukosa pada celah tersebut, masing-masing melalui rantai α atau β -glukosidase di pusat anomeric. Transisi struktur untuk substrat enzim glukosidase memiliki bentuk pseudoaxial ikatan C=O dan seperti pesawat tempur, yang menunjukkan bahwa perbedaan utama antara rantai α dan β -glukosidase adalah pada posisi dari katalisator nukleofil dan katalisator proton donor yang diwakili oleh dua molekul asam *carboxylic*.

Aktivitas glukosidase sangat penting dalam beberapa proses biokimia seperti, degradasi pada polisakarida menjadi monosakarida yang kemudian dapat diserap secara metabolisme dan digunakan oleh organisme, katabolisme dari *lysosomal glycoconjugate* dan pemrosesan glikoprotein dan biosintesis unit oligosakarida dalam glikoprotein maupun glikolipid (Melo, 2006). Fungsi lain dari glukosidase dalam tubuh yaitu berpotensi sebagai inhibitor terapeutik untuk diaplikasikan dalam pengobatan diabetes, obesitas, penyakit penyimpanan *glycosphingolipid lysosomal*, infeksi HIV dan tumor (Melo, 2006).

β-glukosidase berperan antara pada proses sintesis dan degradasi ikatan glukosa (oligosakarida) (Rahmawati, 2018). *β-glukosidase* memiliki peran penting karena dapat mengurangi sellulobiase (dua unit glukosa) atau rantai pendek cello-oligosakarida pada glukosa. *β-glukosidase* merupakan enzim yang menghidrolisis ikatan glycosid yang bertujuan untuk melepaskan sisa-sisa glycosil terminal dari glikogen dan oligosakarida (Liew, 2018). Proses katalitik *β-glukosidase* melibatkan 2 langkah tertentu yaitu glycosylation dan deglycosylation, dan terjadi juga penggantian ganda pada 2 molekul -COOH yang berperan pada situs aktif enzim sebagai nukleofil dan asam murni (Sigh, 2016; Li, 2001). Tahap glikosilasi oleh *β-glukosidase*, salah satu kelompok -COOH aktif berperan sebagai nukleofil pada rantai anomeric karbon sehingga membentuk enzim pencegah glukosa (Litzinger, 2010). Kelompok carboxylic (-COOH) lainnya berperan sebagai donor proton yang memotong pita glikogen dengan melepas molekul H⁺ ke oksigen dalam ikatan O-Glikogen yang mengarah pada pembentukan enzim glikogen tingkat sedang dan liberat aglycone (Jose, 2018; Sigh,2016). Deglycosilasi melibatkan -COOH sebagai (asam) yaitu pemberi proton sebelumnya, dan sebagai penerima proton yang menjadi molekul air, monosakarida, disakarida, dan monoterpealcohol (Srivastava, 2019).

Pyranose Dehydrogenase (PDH) dapat melakukan oksidasi laktosa pada rantai C1-C4 secara efisien yang dapat mengoksidasi senyawa laktosa

dalam matriks EPS pada proses pembentukan biofilm (Pisanelli, 2010). *Pyranose Dehydrogenase* termasuk dalam anggota famili dari GMC oxidoreductase yang di klasifikasikan ke dalam sub famili AA3-2 of Auxiliary Activities, yang mengandung flavine-adenine dinucleotida (FAD). *Pyranose Dehydrogenase* (PDH) melakukan katalisi atau monooksidasi pada rantai C1,C2,C3 atau dioksidasi pada rantai C2,C3 dan C4 pada ikatan glukosa (Peterbauer, 2019).

P. aeruginosa merupakan salah satu bakteri yang mampu membentuk biofilm. struktur biofilmnya mengandung matriks EPS sebanyak 85% (diproduksi saat pembentukan mikrokoloni) dan sel bakteri 15%. Matriks EPS terdiri dari lipopolisakarida dan bersifat hidrofilik. Tahapan pembentukan biofilm dimulai dari sel planktonik yang melakukan perlekatan pada permukaan biotik maupun abiotik yang sesuai secara *reversible*, dengan bantuan protein *SadB* perlekatan sel planktonik menjadi *irreversible*. Selanjutnya sel mengalami proliferasi dan membentuk mikrokoloni. Pada saat pematangan biofilm *Quorum Sensing* berperan. Setelah biofilm tersebut matur dapat terjadi dispersi dikarenakan kondisi lingkungan maupun nutrisinya yang buruk. Biofilm yang terbentuk dapat diuji dengan beberapa metode, salah satunya adalah uji tabung dan uji mikrotiter plate yang merupakan *gold standart* identifikasi biofilm pada bakteri.

Quorum Sensing oleh *P. aeruginosa* memiliki Regulasi yang digunakan meliputi 3 sistem yaitu Rhl, Las dan QSC yang membentuk rantai *Quorum Sensing*. Pada sistem Rhl yang mengandung gen RhlR dan RhlL yang berfungsi untuk menghasilkan autoinduser PAI-2, serta sistem ini juga mengontrol ekspresi *rhlI* dan *rhlAB* yang berfungsi mengkode *rhamnolipid* pada produksi *rhamnolipid*, dimana *rhamnolipid* merupakan faktor virulensi *P. aeruginosa* yang dikendalikan oleh sistem quorum sensing. Sistem Las memiliki gen LasR dan LasI dimana kedua ini berfungsi untuk menghasilkan autoinduser PAI-1 (*N-3-oxododecanoyl, L-homoserine lactose*), serta mengontrol aktivasi gen *lasI*, *lasB*, *lasA*, *apr* dan *tox A*. Proses *Quorum Sensing* menghasilkan dua molekul sinyal

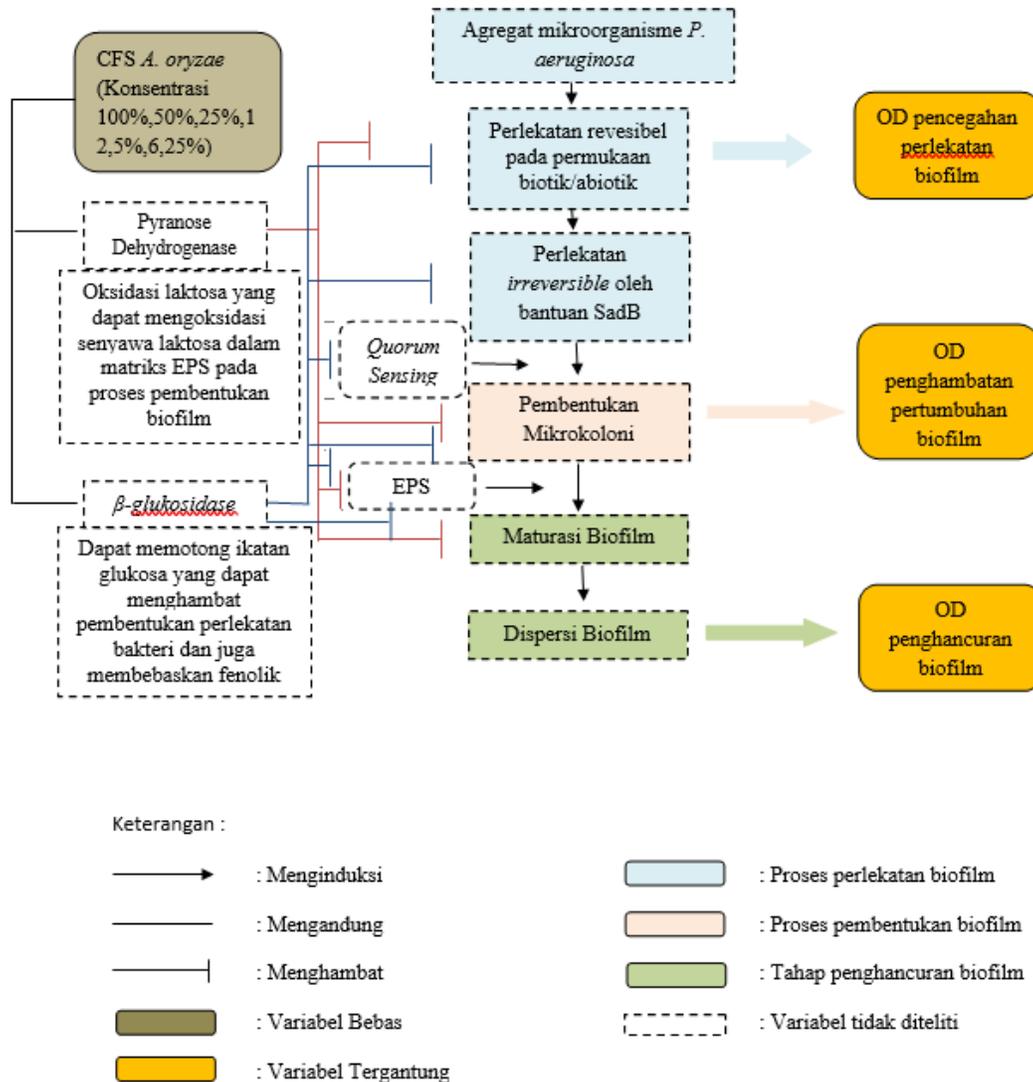
yaitu AI-2/SAM dan AHLs, pada konsentrasi rendah, disintesis oleh AHL *sintase* yang kemudian melakukan transport dengan ATP ke dalam sel, sementara pada konsentrasi tinggi akan terjadi difusi pasif AHL ke dalam sel sampai mencapai *quorum state* maka AHL akan berikatan dengan regulator R dan membentuk R-AHL, selanjutnya akan melakukan transkripsi yang pada bakteri *P. aeruginosa* akan digunakan untuk menginduksi mediator inflamasi seperti IL-8, PGE2, dan IL-12 dan menyebabkan peningkatan reaksi peradangan pada sel yang terinfeksi.

Aspergillus Oryzae memiliki morfologi berupa konidia yang berbentuk bulat dan berwarna hijau-kekuningan. *A. oryzae* melakukan perkembangbiakan secara vegetatif dengan konidia dan secara generatif dengan spora. Pertumbuhan *A. oryzae* optimal pada suhu 32-36°C. *A. oryzae* juga menghasilkan senyawa anti biofilm yakni senyawa *Pyranose Dehydrogenase* (PDH) dan *β-glukosidase*. *Pyranose Dehydrogenase* (PDH) mampu melakukan monooksidasi dan dioksidasi laktosa pada rantai C1-C4 secara efisien, yang dapat mengoksidasi senyawa laktosa dalam matriks EPS pada proses pembentukan biofilm. Sementara, *β-glukosidase* berfungsi sebagai nukleofil pada rantai anomeric karbon sehingga membentuk enzim pencegah glukosa, serta berperan sebagai donor proton yang memotong pita glikogen dengan melepas molekul H⁺ ke oksigen dalam ikatan O-Glikogen yang menghambat proses komunikasi antar sel (*Quorum Sensing*) dan pembentukan biofilm. berkurangnya nutrisi yang jatuh pada tidak adanya nutrisi dapat menyebabkan suatu biofilm terdispersi menjadi sel planktonik lagi.

BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1. Kerangka Konsep



Gambar 3. 1 Kerangka Konsep Penelitian

Proses pembentukan biofilm dimulai dari agregat mikroorganisme (sel planktonik) berupa bakteri, alga, jamur, maupun protozoa *P. aeruginosa* menempel pada permukaan biotik atau abiotik yang sesuai secara renggang dan dapat terurai

(reversible) kembali menjadi sel planktonik. Saat sel planktonik *P. aeruginosa* dibantu oleh protein SadB maka perlekatan yang sebelumnya reversible menjadi *irreversible*. Kumpulan sel yang telah melekat akan melakukan komunikasi antar sel yang disebut *Quorum Sensing* yang selanjutnya terjadi proses pembentukan biofilm hingga terbentuknya mikrokoloni.

Di dalam biofilm sel-sel mulai memproduksi matriks *Extracellular Polymeric Substances* (EPS). Mikrokoloni yang tumbuh akan menjadi biofilm yang matang dan tampak seperti bentuk tiga dimensi. Pada keadaan tertentu yang tidak memungkinkan terbentuknya suatu biofilm, maka biofilm akan mengurai (dispersi) menjadi sel planktonik.

Aspergillus Oryzae memiliki senyawa Pyranose Dehydrogenase (PDH) dan enzim β -glukosidase yang diduga mampu memberikan efek antibiofilm pada pertumbuhan bakteri. Senyawa Pyranose Dehydrogenase (PDH) mampu melakukan Oksidasi laktosa pada rantai C1 sampai C4 secara efisien yang dapat mengoksidasi senyawa laktosa dalam matriks EPS pada proses pembentukan biofilm. Kemudian enzim β -glukosidase mampu menghambat proses komunikasi antar sel (*Quorum Sensing*), pembentukan matriks EPS dan maturasi biofilm. β -glukosidase berfungsi memecah ikatan rantai oligosakarida dan glikokonjugat sehingga terjadi penurunan glikogen yang menyebabkan lingkungan bakteri akan kekurangan nutrisi dan mengacaukan proses pembentukan biofilm serta menyebabkan bakteri terdispersi.

3.2. Hipotesis

Ho : *Aspergillus oryzae* tidak memiliki aktivitas antibiofilm terhadap biofilm *Pseudomonas aeruginosa*.

H₁ : *Aspergillus oryzae* memiliki aktivitas antibiofilm terhadap biofilm *Pseudomonas aeruginosa*.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini memakai metode eksperimental murni (*trueexperimental design*), dengan pendekatan berupa *posttest only control grup design*. Untuk menguji aktifitas antibiofilm pada *Aspergillus oryzae* menggunakan metode *tissue culture plate/microtiter plate bifilm assay*. Metode microtiter ini dilakukan untuk mendapatkan hasil nilai OD (*Optical Density*) pada masing-masing konsentrasi yang diukur lewat *microplate reader*. Terdapat 8 kelompok yang terdiri dari 3 kelompok kontrol dan 5 kelompok uji.

4.2. Lokasi dan Waktu Penelitian

Ekstraksi pada inokulum *Aspergillus oryzae* berada di laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Maulana Malik Ibrahim Malang. Pada penelitian uji aktivitas antibiofilm pada *Aspergillus oryzae* terhadap *Pseudomonas aeruginosa* dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi dan Patologi Klinik Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Maulana Malik Ibrahim Malang. Waktu pelaksanaan dari bulan Januari hingga Maret 2021.

4.3. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah menggunakan bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. jumlah pengulangan pada penelitian dihitung dengan rumus frederer, yakni :

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

Keterangan :

t = kelompok perlakuan

n = total pengulangan pada tiap kelompok perlakuan

Terdapat 8 kelompok perlakuan yang terdiri dari 3 kelompok kontrol yaitu kontrol positif, negatif dan media, serta 5 kelompok uji (yaitu konsentrasi *Cell Free Supernatan A. oryzae* 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%.

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

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

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

$$7n - 7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 3,14$$

Dari hasil penghitungan total pengulangan pada tiap kelompok perlakuan dilakukan sebanyak 3 kali.

4.4. Variabel Penelitian

4.4.1. Variabel Bebas

Pada penelitian ini menggunakan variable bebas berupa konsentrasi *Cell Free Supernatant (CFS) Aspergillus oryzae*, yaitu 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%.

4.4.2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung menggunakan konsentrasi dari *Optical Density (OD)* dari pencegahan perlekatan, penghambatan pertumbuhan dan pencegahan perlekatan biofilm pada *Pseudomonas aeruginosa*.

4.5. Kriteria Inklusi dan Eksklusi

4.5.1. Kriteria Inklusi

Yang menjadi kriteria inklusi pada penelitian ini adalah :

- a. Jamur *Aspergillus oryzae*
 - 1) *Aspergillus oryzae* yang berasal dari Universitas Brawijaya.
 - 2) *Aspergillus oryzae* yang ditanam pada 50 ml media PDB, diinkubasi selama 3 hari pada suhu 28°C.
 - 3) *Aspergillus oryzae* yang dilakukan penyaringan CFS sebanyak 5 ml.
- b. *Pseudomonas aeruginosa*
 - 1) Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang berasal dari Universitas Brawijaya
 - 2) Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* setelah inkubasi 24 jam
 - 3) Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang berbentuk batang dan menghasilkan warna merah dari uji pewarnaan Gram.
 - 4) Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang tumbuh mengubah warna agar menjadi kehijauan pada *Mueller Hilton* agar setelah inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
 - 5) Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang menunjukkan hasil sesuai sifat-sifat bakteri tersebut pada uji biokimia berupa indol (-), motilitas (+), glukosa (+), laktosa (+).

- 6) Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang dapat membentuk biofilm sesuai hasil uji *microtiter plate* (MtP), dengan gambaran terbentuk lingkaran berwarna ungu pada dinding *microplate*.

4.5.2. Kriteria Ekslusi

Kriteria ekslusi pada penelitian ini adalah :

- a. Jamur *Aspergillus oryzae*
 - 1) *Aspergillus oryzae* yang tidak berasal dari Universitas Brawijaya.
 - 2) *Aspergillus oryzae* yang tidak ditanam pada 50 ml media PDB, diinkubasi selama 3 hari pada suhu 28°C.
 - 3) *Aspergillus oryzae* yang tidak dilakukan penyaringan CFS sebanyak 5 ml.
- b. *Pseudomonas aeruginosa*
 - 1) Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* yang tidak berasal dari Universitas Brawijaya.
 - 2) Koloni *Pseudomonas aeruginosa* yang masa inkubasinya kurang atau melebihi 24 jam.
 - 3) Koloni *Pseudomonas aeruginosa* yang tidak berbentuk batang dan tidak menghasilkan warna merah dari uji pewarnaan Gram.
 - 4) Koloni *Pseudomonas aeruginosa* yang tumbuh tidak mengubah warna agar menjadi kehijauan pada *Mueller Hilton* agar setelah inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
 - 5) Koloni *Pseudomonas aeruginosa* yang tidak memiliki hasil uji biokimia berupa indol (-), motilitas (+), glukosa (+), laktosa (+).

- 6) Koloni *Pseudomonas aeruginosa* yang tidak dapat membentuk biofilm sesuai hasil uji *microtiter plate* (MtP), dengan gambaran terbentuk lingkaran berwarna ungu pada dinding *microplate*.

4.6. Definisi Operasional

a. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa merupakan bakteri Gram negatif yang berkemampuan membentuk suatu biofilm dan merupakan isolat yang diperoleh dari Universitas Brawijaya.

b. *Aspergillus oryzae*

Aspergillus oryzae merupakan jenis jamur dalam genus *Aspergillus*.

c. Biofilm *Pseudomonas aeruginosa*

Biofilm yang terbentuk pada *Pseudomonas aeruginosa* adalah agregat mikroorganisme *P. aeruginosa* yang dibungkus oleh matriks *extracellular polymer substance* (EPS).

d. *Cell Free Supernatant* (CFS) *Aspergillus oryzae*

Cell Free Supernatant merupakan produk yang didapatkan dari hasil sentrifugasi dan penyaringan pada inokulum jamur *Aspergillus oryzae* dalam media PDB

e. Metode *microtiter plate biofilm assay*

Metode ini merupakan metode mikrodilusi berbahan cair memakai *microplate* sehingga didapatkan hasil kuantitatif dari aktivitas *Aspergillus oryzae* sebagai antibiofilm.

f. Kelompok kontrol

Kelompok kontrol merupakan kelompok tanpa pemberian *Cell Free Supernatant* (CFS). Terdiri dari 3 kelompok yaitu kontrol negatif, media dan kontrol positif. Kelompok kontrol negatif terdiri dari suspensi bakteri. Kelompok kontrol media terdiri dari campuran TSB, PDB dan glukosa 5%. Kelompok kontrol positif terdiri suspensi bakteri yang ditambahkan dengan antibiotik (Gentamicin).

g. Kelompok uji

Kelompok uji merupakan kelompok yang diberikan *Cell Free Supernatant* (CFS) di dalamnya dan dilakukan metode mikrodilusi. Terdiri dari 5 konsentrasi yang berbeda yaitu 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%.

h. Uji deteksi biofilm

Uji yang dilakukan untuk mengetahui *Pseudomonas aeruginosa* mampu membentuk suatu biofilm menggunakan metode *microtiter plate* (MtP) dengan hasil sebagai *strong-biofilm producer*, *moderate-biofilm producer*, *weak-biofilm producer*, atau *non-biofilm producer*.

i. Uji penghambatan pertumbuhan biofilm

Merupakan uji yang bertujuan untuk mengetahui kemampuan *Aspergillus oryzae* menghambat proses pembentukan biofilm dari *P. aeruginosa* dengan cara memberikan CFS *A. oryzae* bersamaan dengan pemberian suspensi bakteri.

j. Uji degradasi biofilm

Merupakan uji yang bertujuan menguji kemampuan *Aspergillus oryzae* dalam mendegradasi biofilm dari *P. aeruginosa* yang sudah terbentuk

dengan cara memberikan CFS *A. oryzae* setelah terbentuk biofilm *P. aeruginosa*.

k. Uji pencegahan perlekatan biofilm

Merupakan uji yang bertujuan menguji abilitas *Aspergillus oryzae* dalam pencegahan perlekatan biofilm dari *P. aeruginosa* dengan cara memberikan CFS *A. oryzae* sebelum pemberian suspensi bakteri.

l. *Optical Density* (OD) degradasi biofilm

Merupakan data kuantitatif untuk menunjukkan kepadatan biofilm *P. aeruginosa* setelah melakukan uji penghancuran pada biofilm *P. aeruginosa*.

m. *Optical Density* (OD) pencegahan perlekatan biofilm

Merupakan data kuantitatif untuk menunjukkan kepadatan biofilm *P. aeruginosa* setelah melakukan uji pencegahan perlekatan pada biofilm *P. aeruginosa*.

n. *Optical Density* (OD) penghambatan pertumbuhan biofilm

Merupakan data kuantitatif untuk menunjukkan kepadatan biofilm *P. aeruginosa* setelah melakukan uji penghambatan pertumbuhan pada biofilm *P. aeruginosa*.

4.7. Alat dan Bahan Penelitian

4.7.1. Alat Penelitian

Beberapa alat yang digunakan pada penelitian ini, antara lain *microplate reader*, *ultrasonic cleaning bath*, *microplate flat-bottom 96 wells*, *Laminary Air Flow (LAF)*, *rotary vacuum evaporator*, autoklaf, destrose, oven, timbangan analitik, mikroskop, spektrofotometer, gelas ukur, enlemeyer, kuvet, tabung reaksi, cawan petri, ose, bunsen, gelas ukur, object glass, timer, mikropipet, gunting, kain lap, corong, falcon.

4.7.2. Bahan Penelitian

- a. Bahan uji, berupa *Aspergillus oryzae* yang berasal dari inokulum selama 3 hari
- b. Bakteri uji, berupa *Pseudomonas aeruginosa* yang di dapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Brawijaya Malang.
- c. Bahan lain, berupa alkohol 96%, aquades, asam asetat 30%, kristal violet 0,1%, safranin, PBS, media uji biokimia IMViC, reagen uji biokimia IMViC, medium agar Mac-Conkey, media *Trypticase Soy Broth (TSB)*, antibiotik Gentamicin, glukosa, kertas saring, aluminium foil, kapas, kassa, *blue disposal tip*, *yellow disposal tip*, *Potato Dextrose Broth (PDB)*, dan serbuk agar.

4.8. Prosedur Penelitian

4.8.1. Persiapan Jamur

4.8.1.1. Identifikasi jamur

a. Uji Mikroskopis dan Makroskopis

Aspergillus oryzae adalah salah satu anggota kelompok *A. flavus*. *A. oryzae* mempunyai kepala konidia berwujud bulat, berwarna hijau kekuningan dan saat tua akan berubah menjadi warna coklat. Pada pengamatan secara makroskopis *A. oryzae* memiliki ciri-ciri yaitu koloni berwarna hijau dan miselium berwarna putih dengan diameter 65 mm, sedangkan pada pengamatan mikroskopis didapatkan *biseriate*, bentuk fisikel *sub globose* dengan diameter 35 μ m, panjang metula dan fialid 21,4 μ m, bentuk kondium *globose* dengan diameter 6,5 μ m, permukaan halus dan kasar (Oramahi, 2006; Rohman, 2019).

b. Biakan pada Medium Diferensial

Potato Dextrose Agar (PDA) adalah medium yang dapat digunakan untuk jamur *Aspergillus sp.* Medium PDA umum digunakan untuk pertumbuhan jamur. Hal ini disebabkan pH PDA yang rendah, yakni mencapai 4,5 sampai 5,6. Medium yang memiliki pH rendah dapat menekan pertumbuhan bakteri yang umumnya tumbuh pada medium dengan pH netral. Pertumbuhan jamur dengan menggunakan medium ini juga dapat optimal dengan suhu 25-30°C (Aini, 2015).

4.8.2. Kurva Pertumbuhan

Pembuatan kurva pertumbuhan dilakukan dengan pengambilan inokulum jamur sebesar 8 mm yang kemudian ditanamkan ke dalam media *Potato Dextrose Broth* (PDB) sebanyak 3 ml lalu di *vortex* dan diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator *shaker*. Setelah inkubasi mengambil 1,5 ml lalu diletakkan ke dalam kuvet dan dilakukan pengenceran menggunakan media PDB hingga diperoleh nilai $OD_{600nm} = \leq 0.005$. kuvet yang sudah berisi pengenceran dengan nilai $OD \leq 0,005$ ditutup aluminium foil dan wrap palstik lalu diinkubasi pada inkubator *shaker*. Nilai OD dihitung setiap 5 jam sekali selama 7 hari.

4.8.3. Pembuatan CFS

4.8.3.1. Membuat inokulum jamur sesuai kurva

Pembuatan inokulum jamur *Aspergillus oryzae* yang sesuai dengan kurva pertumbuhan yaitu diinkubasi selama 3 hari. Menyiapkan enlemeyer 50 ml diisi dengan media *Potato Dextrose Broth* (PDB) sebanyak 5 ml ditambah 5 ml jamur dari stok inokulum dan 1 ml glukosa 2% yang semuanya dilakukan di dalam LAF. Kemudian diinkubasi selama 3 hari pada suhu 28°C dalam inkubator *shaker* bergantian.

4.8.3.2. Penyaringan CFS

Setelah inkubasi selama 3 hari, inokulum *Aspergillus oryzae* disaring menggunakan kertas *whatman* no. 42 steril ditampung di dalam falcon steril disertai dengan es batu yang melingkupi daerah falcon untuk mencegah protein yang dihasilkan tidak hilang. Setelah disaring cairan

ersebut dipindahkan ke dalam tabung *apendorf* dan dimasukkan ke dalam *freezer* selama 10-15 menit hingga membentuk pengkristalan. Kemudian dilakukan kultur sentrifugasi pada 10.000 g, selama 15 menit. Setelah tampak adanya pengendapan pada hasil kultur sentrifugasi kemudian kembali dilakukan penyaringan dengan filter paper 0,22 µm steril dan ditampung di dalam falcon yang dilingkupi ice pack dan dihasilkannya CFS yang akan ditanam ke dalam *microplate*.

4.8.4. Penyiapan bakteri

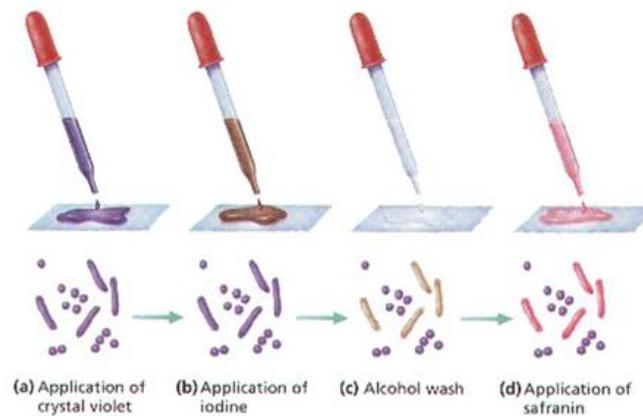
4.8.4.1. Identifikasi bakteri

Identifikasi bakteri *P. aeruginosa* menggunakan 3 uji yaitu pewarnaan Gram (mikroskopis), kultur pada medium agar dan uji biokimia.

a. Uji Pewarnaan Gram (mikroskopis)

Uji mikroskopis untuk identifikasi bakteri *P. aeruginosa* dapat dilakukan dengan pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram dilakukan untuk mengidentifikasi ukuran, bentuk dan susunan bakteri. Langkah pertama dalam pewarnaan Gram yaitu dengan menyiapkan *object glass* yang akan digunakan. *Object glass* dibersihkan terlebih dahulu dengan menggunakan kapas, selanjutnya *object glass* dilewatkan di atas api bunsen. Hapusan bakteri *P. aeruginosa* dibuat dengan menggunakan ose dan menyesuaikan ketebalan yang dibutuhkan. Hapusan ditunggu sampai mengering. Hapusan difiksasi dengan melewati *object glass* di atas api bunsen. Selanjutnya hapusan diberi 5 tetes kristal violet dan dibiarkan selama 1 menit. Hapusan

dibilas dengan menggunakan PBS. Setelah itu, hapusan diberi 5 tetes larutan iodine/lugol dan dibiarkan selama 30 detik. Hapusan dibilas kembali dengan PBS. Hapusan diberi 5 tetes alkohol 96% dan dibiarkan selama 5 detik dan larutan alkohol dibuang. Hapusan dibilas dengan PBS. Selanjutnya meneteskan larutan safranin sebanyak 5 tetes dan dibiarkan selama 20 detik dan larutan dibuang. Hapusan dibilas dengan PBS. Setelah mengering, hapusan dapat diamati dengan menggunakan mikroskop dan warna bakteri akan berwarna merah.



Gambar 4. 1 Proses pewarnaan Gram. (a) pemberian kristal violet (b) pemberian iodine (c) pembilasan dengan alkohol (d) ditetesi dengan safranin (Olivia, 2017).

b. Uji kultur pada medium agar (makroskopis)

Uji kultur pada medium agar untuk mengembang biakan bakteri *P. aeruginosa* dapat dilakukan pada media MHA. Pembuatan media MHA yaitu dengan mencampurkan *Mueller Hinton Agar* dan agar ke dalam 1L aquades. Tindakan kultur bakteri pada media agar MHA yaitu menggunakan ose untuk mengambil bakteri *Pseudomonas*

aeruginosa, lalu menginokulasikan pada agar MHA dengan teknik *quadrant streak*. Media yang telah diinokulasi dimasukkan ke dalam inkubator suhu 37°C selama 24 jam (Abidah, 2020 dengan modifikasi). Setelah 24 jam dilakukan pengamatan koloni yang terbentuk, koloni *P. aeruginosa* menunjukkan perubahan warna hijau kebiruan dikarenakan bakteri *P. aeruginosa* menghasilkan pigmen pyoverdine yang mengubah warna agar menjadi kehijauan (Jawetz, 2010).

c. Uji biokimia

Uji biokimia yang dilakukan untuk identifikasi bakteri *P. aeruginosa* yaitu uji TSI (*Triple Sugar Iron*), uji indol, uji *Voges-Proskauer*, *Citrate*, dan uji urease (Sulviana, 2017).

1) Uji TSI (*Triple Sugar Iron*)

Melakukan inokulasi koloni bakteri pada sumbu yang berisi media cair kemudian diinkubasi 24 jam pada suhu 37°C. Hasil yang diperoleh setelah inkubasi berupa perubahan media menjadi warna kuning pada uji glukosa (+), sukrosa (-) dan laktosa (-) (Jawetz, 2010).

2) Uji Indol

Inokulasi koloni bakteri *P. aeruginosa* ke dalam media yang berisi reagen Kovacs menggunakan ose, kemudian inkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dalam inkubator. Didapatkan hasil indol (-). Hasil pada uji indol dinyatakan negatif karena cincin ungu tidak

terbentuk dikarenakan bakteri tidak menggunakan triptophan sebagai sumber kebutuhan carbon (Kayser, *et al*, 2005).

3) Uji *Voges-Proskauer*

Inokulasi koloni bakteri *P. aeruginosa* ke dalam sumur berisi media dengan penambahan KOH 40% dan reagen barrit's menggunakan jarum ose dan diinkubasi pada suhu 37°C selama kurang lebih 24 jam. Setelah inkubasi didapatkan hasil V-P (-) dengan penampakan media tidak berubah warna menjadi merah. Hasil negatif pada V-P menunjukkan *P. aeruginosa* tidak mampu memfermentasikan glukosa menjadi acetoin (Kayser, *et al*, 2005).

4) Uji *Citrate*

Inokulasi koloni bakteri ke dalam media sitrat. Dari hasil pengamatan hasil uji positif dimana terdapat pertumbuhan bakteri serta perubahan warna media dari hijau menjadi biru karena peningkatan pH diatas 7,6 pada media.

5) Uji *Urease*

Inokulasi koloni bakteri ke dalam sumur berisi media yang ditambahkan phenol red, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 35 derajat celcius. Didapatkan hasil urease (-), karena tidak ada perubahan warna media menjadi merah muda akibat *P. aeruginosa* tidak mampu menghidrolisis urea menjadi amonia, air dan CO₂.

4.8.4.2. Pembuatan media pertumbuhan

Media pertumbuhan dibuat dengan mencampurkan media *Triptycase Soy Broth* (TSB) 100 ml dengan glukosa 5%. Media TSB akan disterilkan di dalam autoklaf selama 30 menit pada suhu 121°C yang kemudian ditambah dengan glukosa 5% dilakukan agar proses pembentukan biofilm *Pseudomonas aeruginosa* meningkat.

4.8.4.3. Persiapan suspensi

Hasil peremajaan bakteri *P. aeruginosa* diinokulasi ke dalam tabung reaksi berisi media TSB 3 ml dan glukosa 5% sebanyak satu ose kemudian di homogenkan menggunakan *vortex*. Diinkubasi selama 18 jam pada suhu 37°C, ditambahkan kembali 2 ml TSB (berisi glukosa 5%) di homogenkan dengan *vortex* lalu inkubasi kembali selama 18 jam. Setelah inkubasi, *Optical Density* pertumbuhan bakteri diukur dengan spektrofotometer panjang gelombang 600nm sampai didapatkan kepadatan senilai $\leq 0,5$.

4.8.5. Pembuatan kelompok kontrol

Kelompok kontrol terdiri dari kontrol positif, kontrol negatif dan kontrol media. Pada penelitian ini kontrol positif menggunakan Gentamicin.. Kontrol negatif berisi suspensi bakteri *P. aeruginosa* dan kontrol media terdiri dari campuran media jamur dan bakteri yang digunakan, yaitu PDB dan TSB.

4.8.6. Uji Biofilm

4.8.6.1. Uji Deteksi Pembentukan Biofilm (Abidah, 2020 dengan modifikasi)

Uji deteksi pembentukan biofilm *P. aeruginosa* pada penelitian ini menggunakan metode *microtiter plate biofilm assay*. Tujuan penggunaan uji ini untuk mengetahui apabila isolat *P. aeruginosa* dapat membentuk biofilm dan kekuatan *P. aeruginosa* dalam membentuk biofilm. Kelompok uji terdiri dari suspensi bakteri *P. aeruginosa* sebanyak 200µL yang dimasukkan pada *wells* di *microplate 96 wells*. Kelompok kontrol terdiri dari media TSB yang dicampur dengan glukosa 2% sebanyak 200µL yang dimasukkan pada *wells* di *microplate 96 wells*. *Microplate* yang telah terisi kelompok uji dan kelompok kontrol diinkubasi tanpa diaduk selama 72 jam pada suhu 37°C.

Microplate yang telah diinkubasi, dikeluarkan dan dicuci dengan menggunakan PBS. Pencucian tersebut bertujuan untuk menghilangkan sel-sel *planktonik* yang tidak menempel. Selanjutnya *microplate* dikeringkan pada suhu ruang. *Microplate* yang telah mengering diberi larutan pewarna kristal violet 0,1% sebanyak 200µL pada masing-masing *well*. Pewarnaan bertujuan untuk mewarnai biomassa biofilm yang menempel pada *well*. *Microplate* diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang. Setelah itu, *microplate* kembali dicuci menggunakan PBS sebanyak tiga kali. Pencucian tersebut berfungsi untuk menghilangkan sel sel yang tidak menempel pada *microplate*. *Microplate* dibiarkan mengering pada

suhu ruang. Setelah mengering, *microplate* diberikan dengan asam asetat 30% sebanyak 200µL pada masing-masing *well*. *Microplate* kembali diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit. Selanjutnya melakukan pengukuran OD bakteri uji dan kontrol dengan menggunakan *microplate reader* dengan panjang gelombang 595 nm.

Kekuatan biofilm bakteri uji ditentukan dengan membandingkan nilai OD_{isolat} dengan OD_{cut} . Nilai rata-rata OD_{isolat} dikurangi dengan OD_{cut} untuk mendapatkan nilai OD. OD_{cut} merupakan rata-rata OD kontrol ditambah dengan tiga kali standar deviasi OD kontrol. Rumus untuk menentukan OD_{cut} adalah sebagai berikut:

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

Keterangan :

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

OD_c = *Optical Density* kontrol

$SD \text{ } OD_c$ = Standar deviasi *Optical Density* kontrol

Kekuatan dari pembentukan biofilm dapat dilihat pada Tabel 4.1

Tabel 4. 1 Interpretasi hasil kekuatan pembentukan biofilm

Rata-rata nilai OD	Kekuatan pembentukan biofilm
$OD_{isolat} \leq OD_{cut}$	Bukan pembentuk biofilm
$OD_{cut} < OD_{isolat} \leq 2 \times OD_{cut}$	Pembentuk biofilm lemah
$2 \times OD_{cut} < OD_{isolat} \leq 4 \times OD_{cut}$	Pembentuk biofilm sedang
$4 \times OD_{cut} < OD_{isolate}$	Pembentuk biofilm kuat

OD_{cut} = rata-rata OD kontrol negatif + 3x standar deviasi (SD) kontrol negatif

Sumber : (Abidah, 2020)

4.8.6.2. Uji Pencegahan Perlekatan Biofilm (Abidah, 2020 dengan modifikasi)

Pengujian pencegahan perlekatan biofilm pada penelitian ini menggunakan CFS *A. oryzae* dengan variasi persentase 100%, 50%, 25%, 12,5% dan 6,25%. Sebanyak 200 μ L CFS dengan variasi persentase dimasukkan ke dalam *well* pada *microplate* sebagai kelompok uji. Antibiotik *Gentamicin* sebanyak 200 μ L dimasukkan pada *well* sebagai kontrol positif. Campuran media TSB, glukosa 2% dan PDB dimasukkan pada *well* kontrol media. *Microplate* yang telah terisi, kemudian diinkubasi selama 60 menit pada suhu 37°C. *Microplate* selanjutnya dikeluarkan dan dicuci menggunakan PBS steril sebanyak tiga kali. Kemudian *microplate* dikeringkan pada suhu ruang. Selanjutnya 200 μ L *suspense* bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dimasukkan ke dalam *well* kelompok uji, *well* kontrol negatif, dan *well* kontrol positif. *Well* kontrol media diisi dengan 200 μ L campuran media TSB, glukosa 2% dan PDB. *Microplate* diinkubasi selama 72 jam pada suhu 37°C. *Microplate* yang telah diinkubasi selanjutnya dikeluarkan dan dicuci menggunakan PBS steril sebanyak tiga kali dan dikeringkan.

Setelah dipastikan kering, *microplate* diberi kristal violet 0,1% pada masing-masing *well*. Pemberian kristal violet 0,1% bertujuan untuk mewarnai biomassa biofilm yang terbentuk oleh bakteri *P. aeruginosa*. Pewarnaan kristal violet diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang. Setelah 15 menit, larutan pewarna dibuang dan *microplate* dicuci dengan

menggunakan akuades sebanyak tiga kali dan biarkan mengering pada suhu ruang. *Microplate* yang telah mengering selanjutnya diberi 200 μ L larutan asam asetat 30% pada *well* dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang. Larutan asam asetat 30% digunakan untuk melarutkan biofilm yang terbentuk. *Microplate* diamati menggunakan *Microplate Reader* dengan panjang gelombang 595 nm. Pencegahan perlekatan biofilm bakteri ditentukan dengan menggunakan rumus:

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

Keterangan:

OD_{kn} = Optical Density kontrol negatif (K-)

OD_{uji} = Optical Density kelompok uji

4.8.6.3. Uji Penghambatan Pertumbuhan Biofilm *Pseudomonas aeruginosa* (Abidah, 2020 dengan modifikasi)

Pada uji ini menggunakan CFS dari *A. oryzae* dengan variasi persentase 100%, 50%, 25%, 12,5% dan 6,25%. Uji penghancuran biofilm bakteri *P. aeruginosa* dilakukan dengan pemberian sebanyak 200 μ L suspensi bakteri *P. aeruginosa* yang di masukan dalam *well* pada *microplate* sebagai kelompok uji. Pada *well* kontrol media diisi dengan 200 μ L campuran media TSB, media PDB, dan glukosa 2%. Selanjutnya *microplate* diinkubasi selama 72 jam pada suhu 37°C. *Microplate* yang dikeluarkan dan dicuci dengan PBS steril sebanyak tiga kali dan dikeringkan. Selanjutnya Sebanyak 200 μ L Gentamicin dimasukkan pada *well* kontrol positif dan 200 μ L CFS dengan berbagai variasi konsentrasi

dimasukkan pada *well* kelompok uji. Campuran media TSB, glukosa 2% dan PDB sebanyak 200 μ L dimasukkan pada *well* kontrol media. *Microplate* yang telah terisi, kemudian diinkubasi selama 60 menit pada suhu 37°C. *Microplate* selanjutnya dikeluarkan dan dicuci menggunakan PBS steril sebanyak tiga kali. Setelah itu *microplate* dikeringkan pada suhu ruang.

Setelah dipastikan kering, *microplate* diberi pewarna kristal violet 0,1% pada masing-masing *well*. Pemberian pewarna bertujuan untuk mewarnai biomassa biofilm yang terbentuk oleh bakteri *P. aeruginosa*. Pewarnaan kristal violet diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang. Setelah 15 menit, larutan pewarna dibuang dan *microplate* dicuci dengan menggunakan akuades sebanyak tiga kali dan biarkan mengering pada suhu ruang. *Microplate* yang telah mengering selanjutnya diberi 200 μ L larutan asam asetat 30% pada *well* dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang. *Microplate* diamati menggunakan *Microplate Reader* dengan panjang gelombang 595 nm. Pencegahan penghancuran biofilm ditentukan dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ Penghancuran perlekatan biofilm} = \frac{\text{ODkn} - \text{ODuji}}{\text{ODkn}} \times 100\%$$

Keterangan:

ODkn = Optical Density kontrol negatif (K-)

ODuji = Optical Density kelompok uji

4.8.6.4. Uji Penghancuran Biofilm *Pseudomonas aeruginosa* (Abidah, 2020 dengan modifikasi)

Pada penelitian ini menggunakan CFS dari *A. oryzae* dengan variasi persentase 100%, 50%, 25%, 12,5% dan 6,25%. Uji penghancuran biofilm bakteri *P. aeruginosa* dilakukan dengan pemberian sebanyak 200 μ L suspensi bakteri *P. aeruginosa* yang di masukan dalam *well* pada *microplate* sebagai kelompok uji. Pada *well* kontrol media diisi dengan 200 μ L campuran media TSB, media PDB, dan glukosa 2%. Selanjutnya *microplate* diinkubasi selama 72 jam pada suhu 37°C. *Microplate* yang dikeluarkan dan dicuci dengan PBS steril sebanyak tiga kali dan dikeringkan. Kemudian antibiotik *Gentamicin* sebanyak 200 μ L dimasukkan ke dalam *well* kontrol positif dan 200 μ L CFS dengan berbagai variasi konsentrasi dimasukkan pada *well* kelompok uji. Campuran media TSB, glukosa 2% dan PDB sebanyak 200 μ L dimasukkan pada *well* kontrol media. *Microplate* yang telah terisi, kemudian diinkubasi selama 60 menit pada suhu 37°C. *Microplate* selanjutnya dikeluarkan lalu dibuang isinya dan dicuci menggunakan PBS steril sebanyak tiga kali. Setelah itu *microplate* dikeringkan pada suhu ruang.

Setelah dipastikan kering, *microplate* diberi pewarna kristal violet 0,1% pada masing-masing *well*. Pemberian kristal violet 0,1% bertujuan untuk mewarnai biomassa biofilm yang terbentuk oleh bakteri *P. aeruginosa*. Pewarnaan kristal violet diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang. Setelah 15 menit, larutan pewarna dibuang dan *microplate* dicuci

dengan menggunakan akuades sebanyak tiga kali dan biarkan mengering pada suhu ruang. *Microplate* yang telah mengering selanjutnya diberi 200µL larutan asam asetat 30% pada *well* dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang. *Microplate* diamati menggunakan *Microplate Reader* dengan panjang gelombang 595 nm. Pencegahan penghancuran biofilm ditentukan dengan menggunakan rumus:

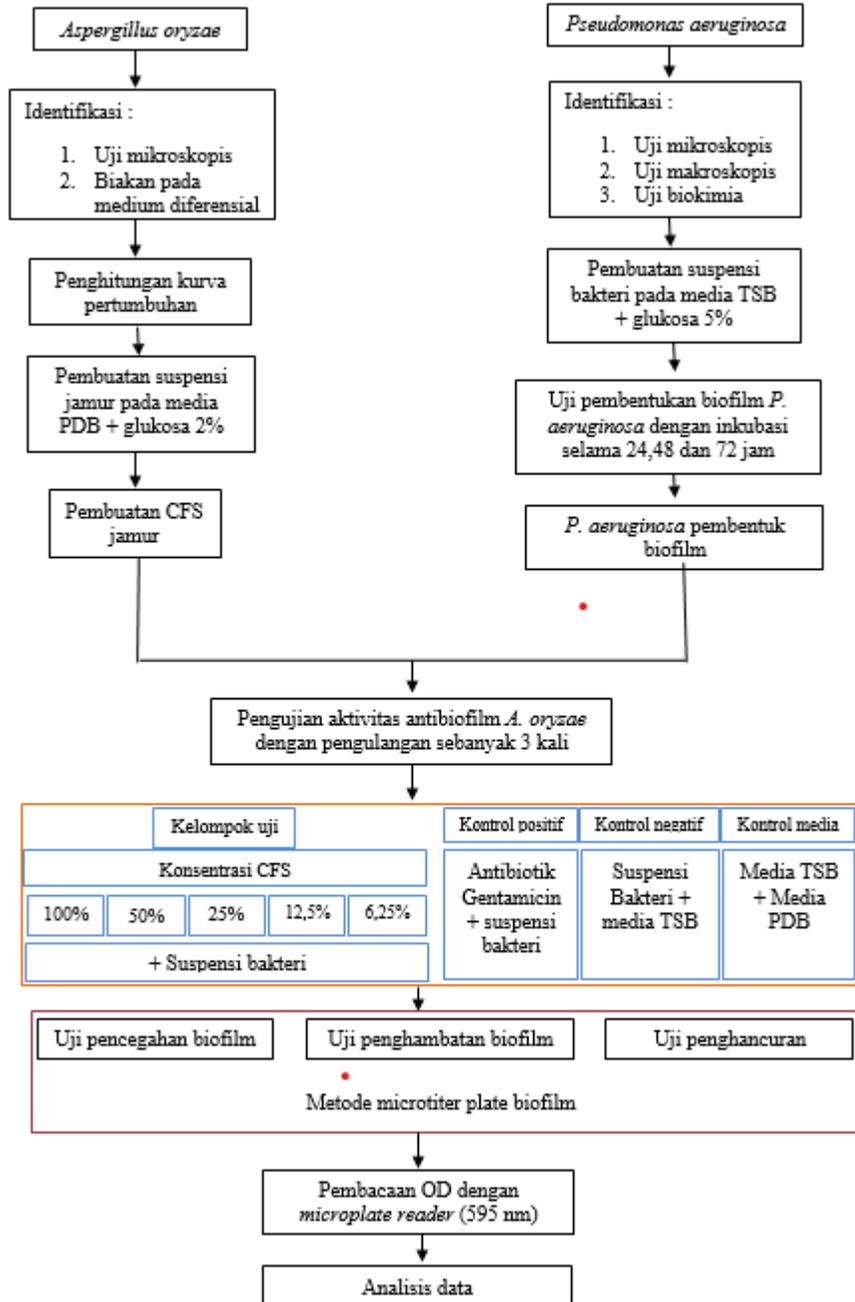
$$\% \text{ Penghancuran perlekatan biofilm} = \frac{\text{ODkn} - \text{ODuji}}{\text{ODkn}} \times 100\%$$

Keterangan:

ODkn = Optical Density kontrol negatif (K-)

ODuji = Optical Density kelompok uji

4.9. Alur Penelitian



Gambar 4. 2 Alur Penelitian

4.10. Analisis Data Penelitian

Pada penelitian ini, analisis data menggunakan aplikasi *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS). Uji yang digunakan untuk analisis data pada penelitian bergantung pada nilai normalitas dan homogenitas data yang didapatkan. Uji *One-Way Analysis of Variance* (ANOVA) dapat digunakan apabila uji normalitas pada penelitian ini terdistribusi normal atau taraf signifikansi lebih dari 0,05 dan homogen. Apabila data yang diperoleh tidak terdistribusi normal atau tidak bersifat homogen, maka uji yang dapat dilakukan untuk analisis data penelitian ini menggunakan uji *Kruskal Wallis*.

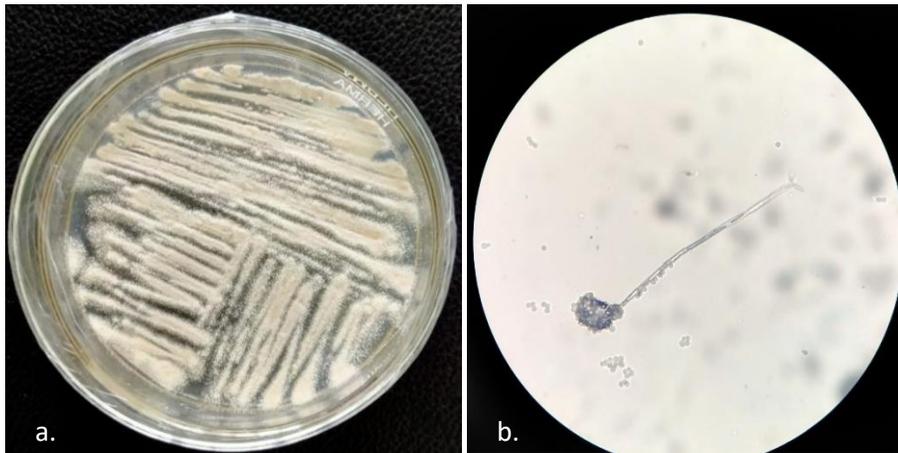
Apabila didapatkan hasil yang bermakna, maka harus dilakukan uji yang selanjutnya yaitu uji *Post Hoc*. Uji *Post Hoc* digunakan untuk menentukan kelompok perlakuan yang berbeda secara signifikan. Uji selanjutnya yaitu uji korelasi *Pearson* untuk mengetahui hubungan (korelasi) antara konsentrasi CFS dengan nilai OD uji.

BAB V

HASIL

5.1. Identifikasi *Aspergillus oryzae*

Identifikasi *A. oryzae*, pada pengamatan secara makroskopis dengan menumbuhkan jamur dengan inkubasi selama 7 hari pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA) dengan suhu 28°C, yang terlihat pada Gambar 5.1.



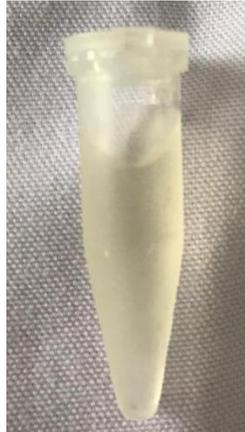
Gambar 5. 1 Identifikasi *Aspergillus oryzae*. a) *A. oryzae* pada media PDA dan b) *A. oryzae* pada pewarnaan methylen blue dengan pembesaran 1000x.

Dari pengamatan pada media PDA (*Potato Dextrose Agar*) tampak spora berwarna putih sedikit kuning kecoklatan. Pengamatan secara mikroskopik tampak hifa dan vesikel yang dikelilingi konidium disekitarnya.

5.2. Pembuatan Cell-Free Supernatant (CFS) Jamur *Aspergillus oryzae*

CFS *A. oryzae* diperoleh dengan mencampurkan inokulum *A. oryzae* dengan diameter 8mm pada 100ml *Potato Dextrose Broth* (PDB). Campuran inokulum dan PDB diinkubasi pada inkubator *shaker* dengan suhu 28°C hingga hari keempat. Campuran inokulum dan PDB diletakkan pada *incubator shaker* agar

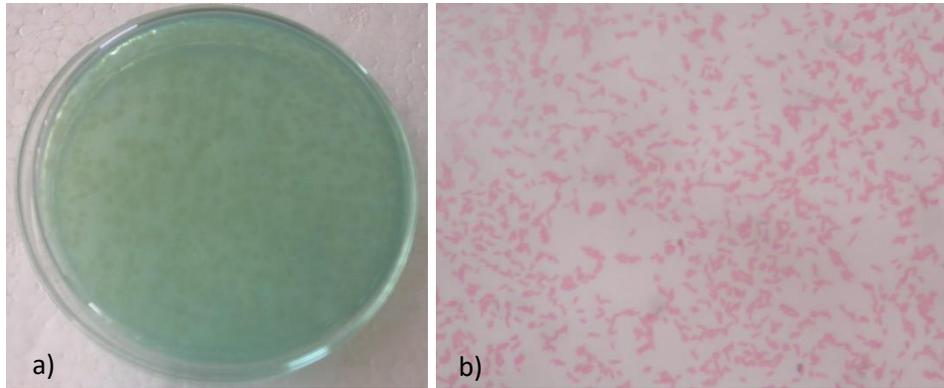
homogen. Setelah itu Inokulum disaring menggunakan kertas saring whatmann no. 42 dan kertas saring nylon sebanyak dua kali untuk mendapatkan CFS. CFS yang dihasilkan akan berwarna kuning bening seperti yang tampak pada Gambar 5.2.



Gambar 5. 2 *Cell-Free Supernatant A. oryzae*. Tampak berwarna kuning bening pada hasil penyaringan CFS *A. oryzae*.

5.3. Identifikasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

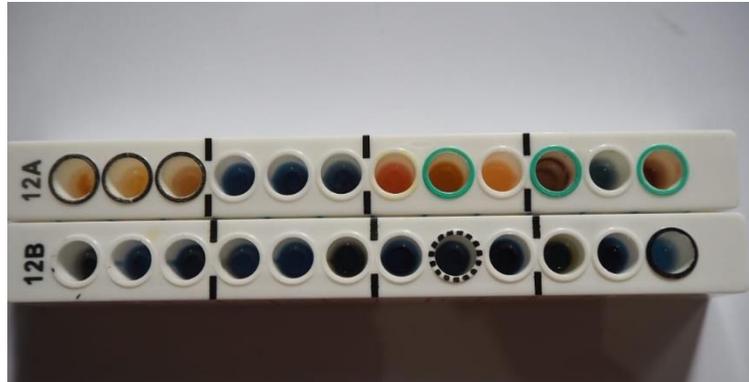
Identifikasi bakteri *P. aeruginosa* dilakukan di Laboratorium Wiyasa Mandiri Malang dengan melakukan uji secara makroskopis, mikroskopis dan biokimia. Uji biokimia yang dilakukan yaitu uji *Triple Sugar Iron* (TSI), uji *Indole*, uji *Voges-Proskauer*, uji *Citrate*, dan uji urease.



Gambar 5.3 Hasil identifikasi *Pseudomonas aeruginosa*. a) Koloni *P. aeruginosa* pada media *Mueller Hinton Agar* (MHA) dan b) Pewarnaan Gram *P. aeruginosa* pada perbesaran 100x.

Pada pengamatan media *Mueller Hinton Agar* (MHA) yang ditunjukkan pada Gambar 5.3 terlihat secara makroskopis koloni *P. aeruginosa* tampak berwarna kuning atau bening, bentuk cembung, bulat dan memiliki tepi rata, serta terlihat gambaran pigmen hijau kebiruan di sekitar koloni. Secara mikroskopis identifikasi bakteri menggunakan pewarnaan Gram. Hasil dari pengamatan mikroskopis didapatkan bakteri berwarna merah yang menunjukkan *P. aeruginosa* merupakan bakteri Gram negatif.

Hasil uji biokimia terhadap bakteri *P. aeruginosa* pada uji *Indole*, *Voges-Proskaurer*, and *Citrate* dan TSI dapat dilihat pada gambar 5.4 dan tabel 5.1.



Gambar 5. 4 Hasil uji biokimia TSI dan Indole, Voges-Proskaurer, Citrate pada *P. aeruginosa*.
a.) *Lysine, ornithine, H₂S*, b.) *Glucose, mannitole, xylose*, c.) *ONPG, indole, urease*, d.) *VP, citrate, TDA*, e.) *Gelatin, malonate, inositol*, f.) *Sorbitol, rhamnose, sucrose*, g.) *Lactose, arabinose, adonitol*, h.) *Raffinose, salicin, arginine*.

Pada gambar 5.4 uji TSI, *Indole*, *Voges-Proskaurer*, *Citrate* dan Urease , didapatkan hasil negatif sulfid yang ditandai tidak adanya perubahan warna menjadi hitam, uji glukosa positif . Pada uji *Indole*, *Voges-Proskaurer*, and *Citrate* uji indol didapatkan hasil negatif, uji VP negatif tidak didapatkannya acetoin, dan uji sitrat didapatkan hasil positif yang ditandai adanya perubahan warna medium SCA menjadi biru. Uji urease menunjukkan hasil negatif, tidak ada perubahan warna menjadi merah muda dikarenakan tidak ditemukannya amoniak.

Tabel 5. 1 Hasil uji biokimia TSI, *Indole*, *Voges-Proskauer*, *Citrate*, dan Urease bakteri *P. aeruginosa*.

No	Uji Biokimia	Hasil
1.	Indol	Negatif
2.	VP	Negatif
3.	Sitrat	Positif
4.	Urease	Negatif
TSI		
1.	H ₂ S	Negatif
2.	Glucose	Positif
3.	Lactose	Negatif
4.	Sukrose	Negatif

5.4. Hasil Uji Pertumbuhan Biofilm *P. aeruginosa*

Pertumbuhan biofilm *P. aeruginosa* dilakukan dengan menginkubasi suspensi bakteri *P. aeruginosa* yang memiliki optical density (OD) 0,5 selama 24 jam, 48 jam dan 72 jam. Suspensi diinkubasi dalam *microplate* dengan suhu 37°C. Pengukuran OD dilakukan pada panjang gelombang 595 nm. Hasil pertumbuhan biofilm bakteri *P. aeruginosa* sebagai OD_{suspensi} kemudian dibandingkan dengan OD_{cut} yang diperoleh dari hasil hitung. Kemudian dapat diklasifikasikan jenis biofilm yang dihasilkan oleh bakteri *P. aeruginosa*.

Tabel 5. 2 Hasil uji deteksi pembentukan biofilm *P. aeruginosa* pada inkubasi 24 jam

Kelompok Perlakuan	<i>Optical density</i>					
	Pengulangan			Rata-Rata	SD	ODcut
	1	2	3			
Kelompok Uji : Bakteri <i>P. aeruginosa</i>	1,768	3.363	3.243	2.791	0.725	0.804
Kelompok Kontrol: Media TSB dan glukosa 2%	0.616	0.725	0.622	0.654	0.050	

Keterangan: rumus OD_{cut} didapatkan dari OD_{kontrol} + (3x SD OD_{kontrol}).

Dari tabel diatas dapat ditentukan hasil pertumbuhan biofilm *P. aeruginosa* dengan membandingkan nilai ODisolat dengan ODcut. Nilai ODcut didapatkan dengan menghitung ODkontrol + (3x SD ODkontrol) sebesar 0,804. Kemudian dapat disimpulkan bahwa bakteri pembentuk biofilm sedang karena memenuhi kriteria hasil $2x OD_{cut} < OD_{isolat} \leq 4xOD_{cut}$ yaitu $1,608 < 2,791 < 3,216$. Hal tersebut menunjukan bakteri *P. aeruginosa* termasuk dalam kelompok *moderate biofilm producer*.

Tabel 5. 3 Hasil uji deteksi pembentukan biofilm *P. aeruginosa* pada inkubasi 48 jam

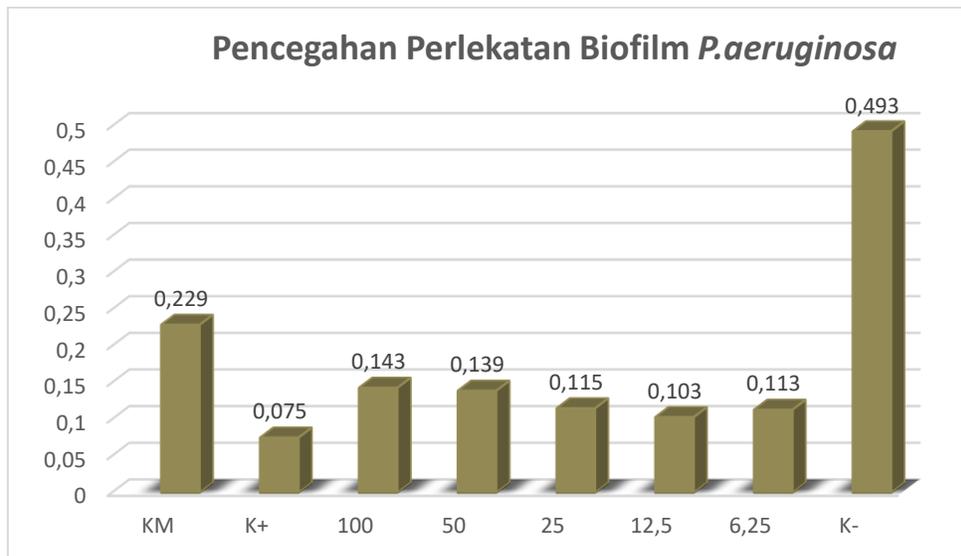
Kelompok Perlakuan	<i>Optical density</i>					
	Pengulangan			Rata-Rata	SD	ODcut
	1	2	3			
Kelompok Uji : Bakteri <i>P. aeruginosa</i>	2.124	3.306	3.482	2.970	0.602	0.202
Kelompok Kontrol: Media TSB dan glukosa 2%	0.125	0.152	0.169	0.148	0.018	

Keterangan: rumus ODcut didapatkan dari $OD_{kontrol} + (3 \times SD \ OD_{kontrol})$.

Dari tabel diatas dapat ditentukan hasil pertumbuhan biofilm *P. aeruginosa* dengan membandingkan nilai ODisolat dengan ODcut. Nilai ODcut didapatkan dengan menghitung $OD_{kontrol} + (3 \times SD \ OD_{kontrol})$. Kemudian dapat disimpulkan bahwa bakteri pembentuk biofilm kuat apabila memenuhi kriteria hasil $4 \times OD_{cut} < ODisolat$ yaitu $0,808 < 2,970$. Hal tersebut menunjukkan bakteri *P. aeruginosa* termasuk dalam kelompok *strong biofim producer*.

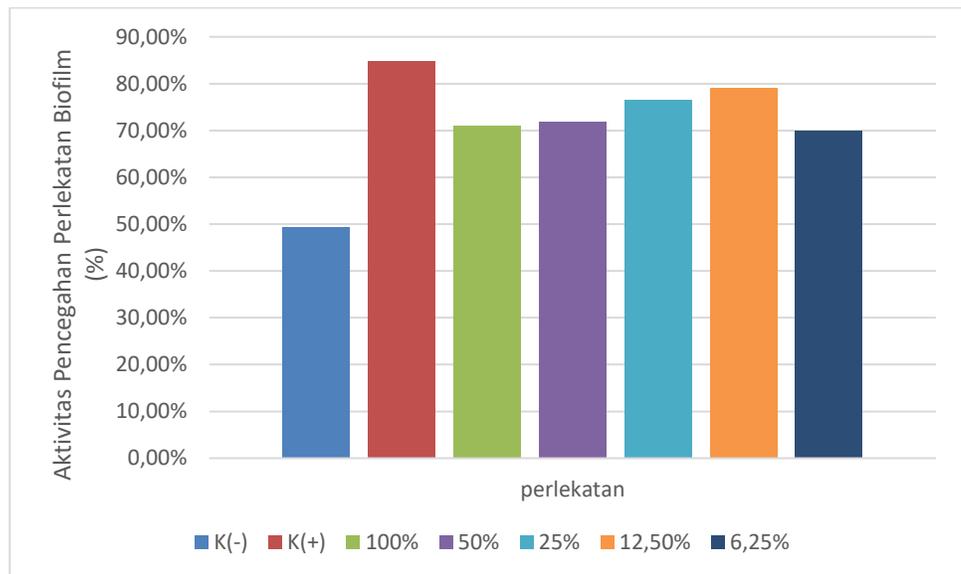
5.5. Uji Pencegahan Perlekatan Biofilm *P. aeruginosa*

Hasil uji pencegahan perlekatan antibiofilm *A. oryzae* terhadap biofilm *P. aeruginosa* berdasarkan *optical density* (OD) kelompok uji dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif, kontrol positif dan kontrol media. Data dapat dilihat pada grafik pada gambar 5.6 berikut.



Gambar 5. 5 Hasil Rata- Rata OD Uji Pencegahan Perlekatan Biofilm *P. aeruginosa*. Terjadi penurunan *optical density* (OD) pada masing-masing konsentrasi dengan perbandingan terhadap kontrol negatif.

Gambar 5.5 menunjukkan rata-rata OD pada masing-masing kelompok uji dan kontrol dari tiga pengulangan yang dilakukan. Pada grafik K- yang berisi 200µl suspensi bakteri memiliki rata-rata OD yaitu 0,493 sebagai indikator pertumbuhan bakteri. Konsentrasi 100% sebesar 0,143, konsentrasi 50% sebesar 0,139, konsentrasi 25% sebesar 0,115, konsentrasi 12,5% sebesar 0,103, dan konsentrasi 6,25% sebesar 0,113. Pada setiap kenaikan konsentrasi CFS diharapkan terjadi penurunan rata-rata OD karena semakin tinggi konsentrasi agen antibiofilm *A. oryzae*.



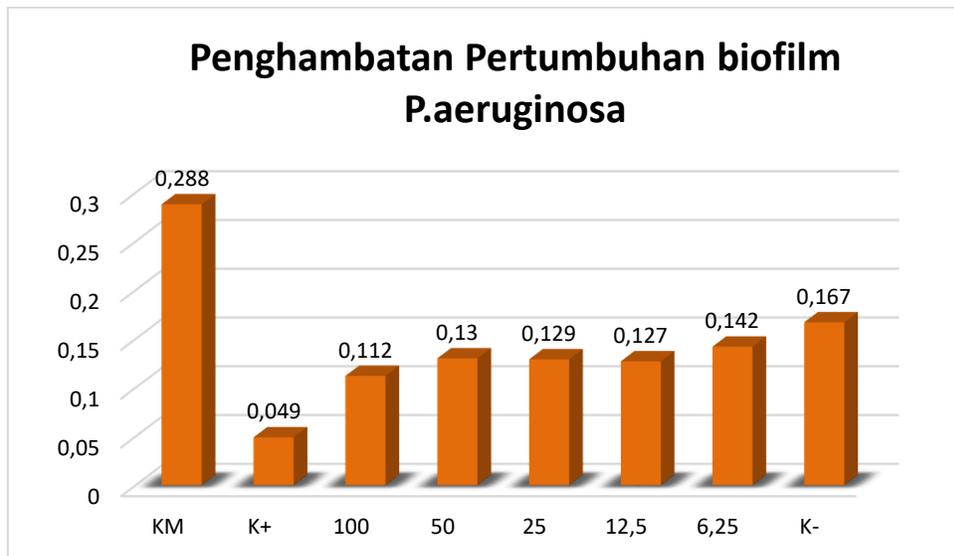
Gambar 5. 6 Persentase Uji Pencegahan Perlekatan Biofilm *P.aeruginosa*.

Hasil persentase uji pencegahan perlekatan tertinggi didapatkan pada konsentrasi 12,5% yaitu 79,10% dan terendah pada konsentrasi 6,25% sebesar 70,07%. Persentase didapatkan dari :

$$\begin{aligned} \% \text{ Pencegahan perlekatan biofilm} &= \frac{\text{OD}_{\text{kn}} - \text{OD}_{\text{uji}}}{\text{OD}_{\text{kn}}} \times 100\% \\ \% &= \frac{0,493 - \text{OD per konsentrasi}}{0,493} \times 100\% \end{aligned}$$

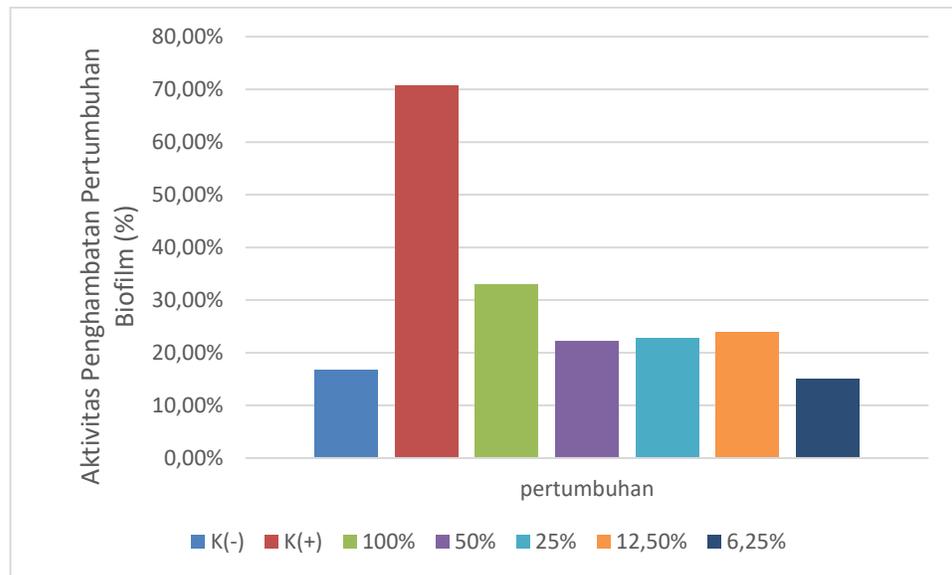
5.6. Uji Penghambatan Pertumbuhan Biofilm *P. aeruginosa*

Hasil uji penghambatan pertumbuhan antibiofilm *A. oryzae* terhadap biofilm *P. aeruginosa* berdasarkan *optical density* (OD) kelompok uji dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif, kontrol positif dan kontrol media. Data dapat dilihat pada grafik berikut.



Gambar 5. 7 Hasil Rata- Rata OD Uji Penghambatan Pertumbuhan Biofilm *P. aeruginosa*. Terjadi penurunan *optical density* (OD) pada masing-masing konsentrasi dengan perbandingan terhadap kontrol negatif.

Grafik rata-rata OD penghambatan pertumbuhan pada gambar 5.7 menunjukkan grafik KM lebih tinggi dibandingkan K-, hal ini menunjukkan adanya kontaminasi media oleh bakteri pada kontrol media. Grafik K- lebih tinggi dibandingkan semua konsentrasi, menunjukkan bahwa setiap konsentrasi memiliki efektivitas dalam penghambatan pertumbuhan biofilm *P. aeruginosa*. Pada setiap konsentrasi yaitu 100%, 50%, 25%, 12,5%, dan 6,25% didapatkan hasil OD rata-rata secara berurutan 0,112; 0,130; 0,129; 0,127; dan 0,142. Pada data tersebut terlihat kenaikan OD pada konsentrasi yang lebih rendah, terjadi sedikit penurunan pada konsentrasi 25% dan 12,5%, namun tidak terlalu signifikan.



Gambar 5. 8 Persentase Uji Penghambatan Pertumbuhan Biofilm *P. aeruginosa*.

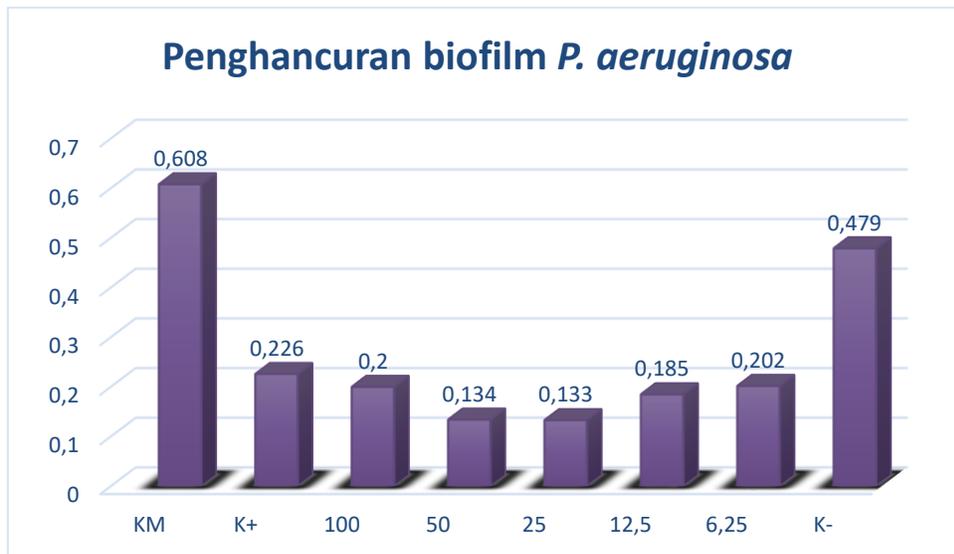
Hasil persentase uji penghambatan pertumbuhan tertinggi didapatkan pada konsentrasi 100% yaitu 32,93% dan terendah pada konsentrasi 6,25% sebesar 15%. Persentase didapatkan dari

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

$$\% = \frac{0,167 - \text{OD per konsentrasi}}{0,167} \times 100\%$$

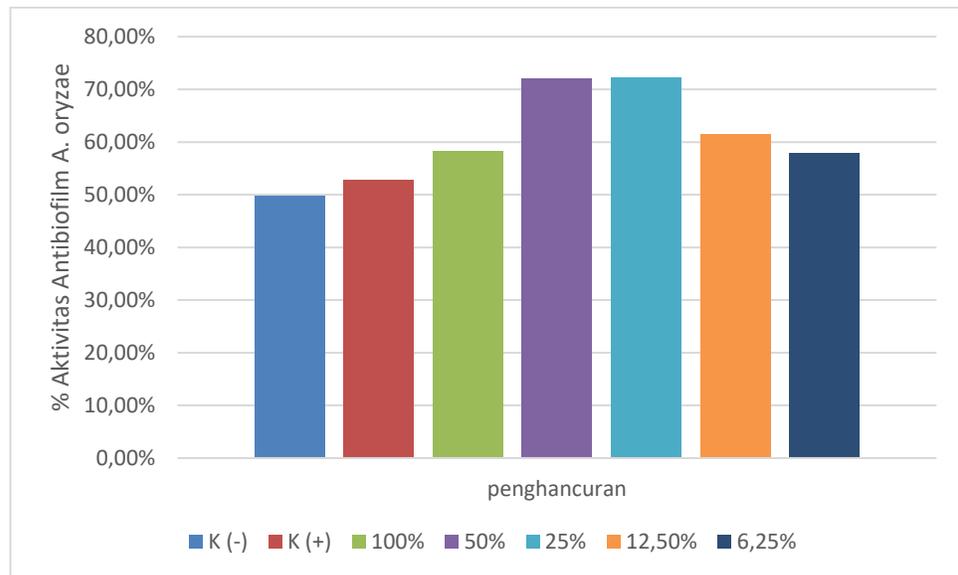
5.7. Uji Penghancuran Biofilm *P. aeruginosa*

Hasil uji penghancuran antibiofilm *A. oryzae* terhadap biofilm *P. aeruginosa* berdasarkan *optical density* (OD) kelompok uji dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif, kontrol positif dan kontrol media. Data dapat dilihat pada grafik berikut.



Gambar 5. 9 Hasil Rata- Rata OD Uji Penghancuran Biofilm *P. aeruginosa*. Terjadi penurunan *optical density* (OD) pada masing-masing konsentrasi dengan perbandingan terhadap kontrol negatif.

Pada gambar 5.9 grafik pada KM rata-rata OD penghancuran biofilm lebih tinggi dibandingkan dengan K- dikarenakan terjadi kontaminasi media oleh bakteri. Nilai OD rata-rata yang didapatkan pada konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, dan 6,25% secara berurutan yaitu 0,200; 0,134; 0,133; 0,185; dan 0,202. Dari data tersebut menunjukkan adanya efektifitas antibiofilm *A. oryzae* terhadap penghancuran biofilm *P. aeruginosa*, namun tidak sesuai dengan pemberian tingkatan konsentrasi yaitu semakin besar konsentrasi maka semakin kecil nilai OD yang didapatkan.



Gambar 5. 10 Persentase Uji Penghancuran Biofilm *P. aeruginosa*.

Hasil persentase uji penghambatan pertumbuhan tertinggi didapatkan pada konsentrasi 25% yaitu 72,23% dan terendah pada konsentrasi 6,25% sebesar 57,82%. Persentase didapatkan dari

$$\begin{aligned} \% \text{ Penghambatan pertumbuhan biofilm} &= \frac{OD_{kn} - OD_{uji}}{OD_{kn}} \times 100\% \\ \% &= \frac{0,479 - OD \text{ per konsentrasi}}{0,479} \times 100\% \end{aligned}$$

5.8. Hasil Analisis Data

Analisis data pada hasil penelitian ini menggunakan aplikasi *IBM SPSS Statistics* versi 26. Analisis dilakukan pada setiap uji antibiofilm, yaitu uji pencegahan perlekatan biofilm, uji penghambatan pertumbuhan biofilm dan uji penghancuran biofilm. Pada analisis data penelitian ini, dilakukan uji normalitas dan homogenitas pada hasil OD setiap uji antibiofilm pada kelompok uji serta kelompok kontrol. Apabila

didapatkan hasil uji yang normal dan homogen selanjutnya menggunakan analisis *One Way Anova* untuk mengetahui adanya perbedaan yang signifikan dalam suatu data. Jika terdapat data yang tidak normal dan/atau tidak homogen, analisis data selanjutnya menggunakan *Kruskall Wallis*. Uji selanjutnya yang dilakukan yaitu uji *Post Hoc Tukey HSD* untuk mengetahui data yang signifikan terhadap kelompok satu dan lainnya. Kemudian uji yang dilakukan yaitu uji korelasi *pearson* untuk mengetahui arah dan tingkat hubungan pada masing-masing uji antibiofilm.

5.8.1. Uji normalitas dan Homogenitas

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

Tabel 5. 4 Hasil Uji Normalitas dan Homogenitas

Kelompok	Uji Pencegahan Perlekatan		Uji Penghambatan Pertumbuhan		Uji Penghancuran	
	Normalitas	Homogenitas	Normalitas	Homogenitas	Normalitas	Homogenitas
Konsentrasi 100%	0,157	0,102	0,363	0,006	0,209	0,026
Konsentrasi 50%	0,751		1,000		0,826	
Konsentrasi 25%	0,490		1,000		0,312	
Konsentrasi 12,5%	0,537		0,363		0,881	
Konsentrasi 6,25%	0,107		0,122		0,537	
Kontrol Positif	0,900		0,194		0,051	
Kontrol Negatif	0,756		0,561		0,637	
Kontrol Media	0,298		0,853		0,309	

Keterangan: $p\text{-value} \geq 0,05$, menunjukkan data yang diperoleh normal dan homogen.

Hasil uji normalitas pada tabel tersebut menunjukkan bahwa ketiga uji yang dilakukan yaitu uji pencegahan perlekatan biofilm, uji penghambatan pertumbuhan biofilm dan uji penghancuran biofilm *P. aeruginosa* memiliki nilai $p\text{-value}$ lebih dari 0,05 yang menunjukkan bahwa data diatas terdistribusi normal. Pada hasil uji homogenitas terlihat bahwa hasil $p\text{-value}$ pada uji penghambatan pertumbuhan biofilm *P. aeruginosa* dan penghancuran biofilm *P. aeruginosa* menunjukkan hasil kurang dari

0,05 yang menunjukkan bahwa data tidak homogen, namun pada uji pencegahan perlekatan biofilm *P. aeruginosa* menunjukkan hasil lebih dari 0,05 yang berarti data homogen.

5.8.2. Uji One Way Anova dan Kruskal-Wallis

Uji *One Way Anova* dan *Kruskall-Wallis* digunakan untuk mengetahui adanya perbedaan yang signifikan dalam suatu data. Data memiliki perbedaan yang signifikan apabila dari hasil uji *One Way Anova* dan *Kruskall-Wallis* menunjukkan nilai *p-value* kurang dari 0,05 dan data tidak memiliki perbedaan signifikan ditunjukkan dengan hasil *p-value* lebih dari 0,05. Dari hasil uji pencegahan perlekatan biofilm *P. aeruginosa* menggunakan uji *One Way Anova* yang didapatkan hasil 0,000. Uji penghambatan pertumbuhan biofilm dan uji penghancuran biofilm *P. aeruginosa* menggunakan *Kruskall-Wallis* yang masing-masing menunjukkan hasil 0,010 dan 0,004. Ketiga uji tersebut menunjukkan hasil *p-value* kurang dari 0,05 yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan.

5.8.3. Uji Post Hoc Tukey HSD

Uji *Post Hoc* digunakan untuk mengetahui perbedaan signifikan dari masing-masing kelompok data. Uji *Post Hoc* yang digunakan yaitu *Tukey HSD* dan data yang memiliki perbedaan signifikan ditunjukkan pada *p-value* kurang dari 0,05.

a. Uji Pencegahan Perlekatan Biofilm *P. aeruginosa*

Tabel 5. 5 Hasil Uji Post Hoc *Tukey HSD* Pencegahan Perlekatan Biofilm *P. aeruginosa*

Kelompok	Kon 100%	Kon 50%	Kon 25%	Kon 12,5%	Kon 6,25%	K+	K-	KM
Kon 100%		1,000	0,693	0,298	0,634	0,015	0,000	0,002
Kon 50%	1,000		0,802	0,393	0,750	0,022	0,000	0,001
Kon 25%	0,693	0,802		0,995	1,000	0,298	0,000	0,000
Kon 12,5%	0,298	0,393	0,995		0,998	0,693	0,000	0,000
Kon 6,25%	0,634	0,750	1,000	0,998		0,343	0,000	0,000
K+	0,015	0,022	0,298	0,693	0,343		0,000	0,000
K-	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000
KM	0,002	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	

Keterangan : Kon (konsentrasi); K+ (kontrol positif); K- (kontrol negatif), KM (kontrol media). Warna latar biru menandakan data signifikan (*p-value* kurang dari 0,05).

Pada hasil uji *Post Hoc Tukey HSD* yang terlihat pada Tabel 5.6 uji pencegahan perlekatan biofilm *P. aeruginosa* didapatkan perbedaan yang signifikan pada OD kontrol media terhadap konsentrasi 100%, 50%, 25%,12,5%, 6,25%, kontrol positif dan kontrol negative. Perbedaan ang signifikan juga terlihat pada OD kontrol negatif terhadap terhadap konsentrasi 100%, 50%, 25%,12,5%, 6,25%, kontrol positif dan kontrol negative.

b. Uji Penghambatan Pertumbuhan Biofilm *P. aeruginosa*

Tabel 5. 6 Hasil Uji Post Hoc Mann-Whitney U Penghambatan Pertumbuhan Biofilm *P. aeruginosa*.

Kelompok	Kon 100%	Kon 50%	Kon 25%	Kon 12,5%	Kon 6,25%	K+	K-	KM
Kon 100%		0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050
Kon 50%	0,050		0,658	0,261	0,127	0,050	0,513	0,050
Kon 25%	0,050	0,658		0,376	0,050	0,050	0,513	0,050
Kon 12,5%	0,050	0,261	0,376		0,050	0,050	0,513	0,050
Kon 6,25%	0,050	0,127	0,050	0,050		0,050	0,513	0,275
K+	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050		0,050	0,050
K-	0,050	0,513	0,513	0,513	0,513	0,050		0,275
KM	0,050	0,050	0,050	0,050	0,275	0,050	0,275	

Keterangan : Kon (konsentrasi); K+ (kontrol positif); K- (kontrol negatif), KM (kontrol media). Warna latar biru menandakan data signifikan (*p-value* kurang dari 0,05)

Berdasarkan hasil uji *Post Hoc Mann-Whitney U* pada Tabel 5.6 uji penghambatan pertumbuhan biofilm *P. aeruginosa* terdapat signifikan berbeda antara OD pada kontrol media terhadap 4 konsentrasi uji yaitu konsentrasi 100%, konsentrasi 50%, Konsentrasi 25%, konsentrasi 12,5%. Pada kontrol positif terdapat signifikan berbeda terhadap semua konsentrasi, sementara pada kontrol negatif data signifikan berbeda terhadap konsentrasi 100% saja.

c. Uji Penghancuran Biofilm *P. aeruginosa*

Tabel 5. 7 Hasil Uji Post Hoc Mann-Whitney U Penghancuran Biofilm *P. aeruginosa*.

Kelompok	Kon 100%	Kon 50%	Kon 25%	Kon 12,5%	Kon 6,25%	K+	K-	KM
Kon 100%		0,050	0,050	0,513	0,513	0,275	0,050	0,050
Kon 50%	0,050		0,827	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050
Kon 25%	0,050	0,827		0,050	0,050	0,050	0,050	0,050
Kon 12,5%	0,513	0,050	0,050		0,513	0,127	0,050	0,050
Kon 6,25%	0,513	0,050	0,050	0,513		0,127	0,050	0,050
K+	0,275	0,050	0,050	0,127	0,127		0,050	0,050
K-	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050		0,050
KM	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	

Keterangan : Kon (konsentrasi); K+ (kontrol positif); K- (kontrol negatif), KM (kontrol media). Warna latar biru menandakan data signifikan (*p-value* kurang dari 0,05)

Pada Tabel 5.7 menunjukkan hasil uji *Post Hoc Mann-Whitney U* uji penghancuran biofilm *P. aeruginosa* terdapat signifikan berbeda pada OD kontrol media dan kontrol negatif terhadap konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%. Pada kontrol positif didapatkan hasil signifikan berbeda terhadap konsentrasi 50% dan 25%.

5.8.4. Uji Korelasi *Pearson* dan *Spearman*

Uji Korelasi digunakan untuk mengetahui arah dan tingkat kekuatan hubungan antara konsentrasi CFS *A. oryzae* terhadap besar OD masing-masing kelompok uji antibiofilm *P. aeruginosa*. Adanya hubungan yang signifikan dapat dilihat dari hasil *p-value* pada uji korelasi *Pearson* dan *Spearman*. Hasil signifikan apabila *p-value* kurang dari 0,05, apabila hasil *p-value* menunjukkan lebih dari 0,05 berarti tidak terdapat hubungan yang signifikan. Tingkat kekuatan hubungan dapat ditentukan dari hasil uji dengan kategori dalam tabel berikut.

Tabel 5. 8 Intrepretasi nilai dari uji korelasi

Nilai Uji Korelasi	Interpretasi
0	Tidak ada korelasi
0 – 0,25	Korelasi sangat lemah
0,26 – 0,5	Korelasi cukup
0,51 – 0,75	Korelasi kuat
0,76 – 0,99	Korelasi sangat kuat
1	Korelasi sempurna

Keterangan: rentang nilai interpretasi nilai dari uji korelasi suatu data (Lestari et al., 2017).

Hasil uji korelasi juga dapat memiliki tanda positif maupun negatif. Masing-masing tanda memiliki interpretasi yang berbeda, apabila bertanda positif menunjukkan arah hubungan searah antar variabel, sedangkan tanda negatif menunjukkan arah hubungan yang berlawanan arah antar variabel.

a. Uji Pencegahan Perlekatan Biofilm *P. aeruginosa*

Hasil uji korelasi pada uji pencegahan perlekatan biofilm *P. aeruginosa* menggunakan *Spearman* dan didapatkan hasil *p-value* 0,031 yang berarti data signifikan. Hasil korelasi menunjukkan angka -0,568 yang berarti terdapat hubungan yang kuat antara konsentrasi CFS *A. oryzae* dengan hasil OD pencegahan perlekatan biofilm *P. aeruginosa*. Arah hubungan ditunjukkan pada nilai korelasi *Spearman* yang menunjukkan tanda negatif yang berarti semakin besar tingkat konsentrasi CFS *A. oryzae* maka semakin kecil nilai OD pencegahan perlekatan biofilm *P. aeruginosa*. Menurut hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa besar nilai OD pencegahan perlekatan biofilm *P. aeruginosa* dipengaruhi secara signifikan dan derajat korelasi yang kuat oleh besar konsentrasi CFS *A. oryzae*.

b. Uji Penghambatan Pertumbuhan Biofilm *P. aeruginosa*

Hasil uji korelasi pada uji penghambatan pertumbuhan biofilm *P. aeruginosa* menggunakan *Pearson* dan didapatkan hasil *p-value* 0,001 yang berarti data signifikan. Nilai korelasi *Spearman* menunjukkan angka 0,669 yang berarti hubungan korelasi antara konsentrasi CFS *A. oryzae* dengan hasil OD terdapat korelasi kuat. Arah korelasi ditunjukkan dari tanda nilai korelasi yaitu positif yang berarti arah korelasi searah yang dapat diartikan bahwa semakin besar tingkat konsentrasi CFS *A. oryzae* maka semakin besar hasil OD penghambatan pertumbuhan biofilm *P. aeruginosa*. Sehingga dapat disimpulkan bahwa besar nilai OD penghambatan pertumbuhan biofilm *P. aeruginosa*

dipengaruhi secara signifikan dengan derajat korelasi kuat oleh konsentrasi CFS *A. oryzae*.

c. Uji Penghancuran Biofilm *P. aeruginosa*

Hasil uji korelasi pada uji pencegahan perlekatan biofilm *P. aeruginosa* menggunakan *Pearson* dan didapatkan hasil *p-value* 0,468 yang berarti data tidak signifikan. Hasil korelasi menunjukkan angka 0,142 yang menunjukkan derajat hubungan korelasi sangat lemah antara OD penghancuran biofilm *P. aeruginosa* dengan konsentrasi CFS *A. oryzae*. Arah hubungan ditunjukkan dari tanda pada nilai korelasi *Pearson* yaitu positif yang menunjukkan arah hubungan searah dan berarti semakin besar konsentrasi CFS *A. oryzae* maka semakin besar OD penghancuran biofilm *P. aeruginosa*. Pada hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa besar nilai OD penghancuran biofilm *P. aeruginosa* tidak dipengaruhi secara signifikan oleh derajat korelasi yang sangat lemah oleh besar konsentrasi CFS *A. oryzae*.

BAB VI

PEMBAHASAN

6.1. Identifikasi *Aspergillus oryzae*

Identifikasi *A. oryzae* secara mikroskopik umumnya terdapat hifa yang mengandung konidia dengan ciri-ciri konidophores panjang dengan vesikal terminal yang mengandung rantai konidia basipetal (Jawetz, 2010). Pada pengamatan terlihat gambaran hifa, vesikel serta konidium di sekitarnya. Sementara pada pengamatan secara makroskopis *A. oryzae* memiliki ciri-ciri yaitu koloni berwarna hijau dan misselium berwarna putih dengan diameter 65 mm (Oramahi, 2006).

6.2. Pembuatan *Cell Free Supernatan (CFS) Aspergillus oryzae*

Cell-free Supernatant (CFS) Aspergillus oryzae (A. oryzae) didapatkan dari penyaringan inokulasi *A. oryzae*. Penyaringan dilakukan sebanyak dua kali dan dilakukan pada suhu dingin. Metode penyaringan pada suhu dingin dipilih untuk mempertahankan kandungan enzim *A. oryzae*. Jumlah penyaringan dipilih untuk memastikan hanya tersisa enzim pada media.

Pemilihan konsentrasi CFS *A. oryzae* dipilih berdasarkan studi pendahuluan yang dilakukan terlebih dahulu oleh peneliti untuk mengetahui konsentrasi ekstrak yang sesuai. Pembuatan konsentrasi CFS *A. oryzae* dilakukan dengan metode dilusi serial pada *well* yang ada di *microplate*. Dilusi serial dilakukan dengan mengencerkan CFS pada *Potato Dextrose Broth (PDB)* yang ditambah glukosa 2%.

6.3. Identifikasi *Pseudomonas aeruginosa*

Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* didapatkan dari Universitas Brawijaya Yang telah diuji pada Laboratorium Wiyasa Mandiri Malang menggunakan metode *Mueller*

Hilton Agar (MHA), uji pewarnaan Gram dan uji TSI, *Indole*, *Voges-Proskauere*, *Citrate*, dan urease. Pada uji MHA bakteri berbentuk bulat cembung dan warna bakteri bening serta tampak pigmen hijau kebiruan disekitar koloni. Pada pewarnaan Gram didapatkan hasil bahwa *P. aeruginosa* merupakan bakteri Gram negative dengan warna yang didapatkan berwarna merah (Jawetz, 2010). Pada pewarnaan Gram juga diamati secara mikroskopis dan didapatkan hasil bahwa bakteri *P. aeruginosa* berbentuk tabung atau basil dan beberapa bakteri mengumpul menjadi satu membentuk seperti rantai dan tepi bakteri *P. aeruginosa* rata.

Uji TSI pada *P. aeruginosa* dilakukan untuk menguji adanya Glukosa, sukrosa dan laktosa didapatkan hasil positif dengan ditunjukkan perubahan warna menjadi biru pada pengujian. Selain uji TSI juga dilakukan uji indole (-) tidak terdapat indol karena *P. aeruginosa* tidak memiliki enzim triptopanase, *Voges-Proskauere* (-) menunjukkan bakteri tidak dapat memfermentasikan glukosa menjadi acetoin, uji *Citrate* (+) menunjukkan bakteri *P. aeruginosa* menggunakan sitrat sebagai sumber karbon untuk menghasilkan energi, dan uji urease (-) menunjukkan tidak terdapat ammonia akibat bakteri *P. aeruginosa* tidak memiliki enzim urease (Lipincotts, 2008; Maza, *et all*, 1997).

6.4. Uji Pembentukan Biofilm *Pseudomonas aeruginosa*

Uji pertumbuhan biofilm dilakukan untuk mengetahui kekuatan bakteri *P. aeruginosa* dalam membentuk biofilm. Pada pembuatan suspensi *P. aeruginosa* optical density (OD) diukur pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 595nm. Pada perhitungan ODcut (48 jam) didapatkan hasil 0,202 sehingga 4xODcut yaitu 0,808. ODSuspensi *P. aeruginosa* didapatkan hasil 2,970 (48 jam). Bakteri *P. aeruginosa*

masuk ke dalam kelompok penghasil biofilm kuat karena hasil menunjukkan $4 \times \text{OD}_{\text{cut}} \leq \text{OD}_{\text{suspensi}}$. Pada perhitungan OD_{cut} (24 jam) didapatkan hasil 0,804 sehingga $4 \times \text{OD}_{\text{cut}}$ yaitu 3,216. $\text{OD}_{\text{suspensi}}$ *P. aeruginosa* didapatkan hasil 2,791 (24 jam). Bakteri *P. aeruginosa* masuk ke dalam kelompok penghasil biofilm sedang karena hasil menunjukkan $2 \times \text{OD}_{\text{cut}} \leq \text{OD}_{\text{suspensi}} \leq 4 \times \text{OD}_{\text{cut}}$. Pada inkubasi ke 72 jam dapat diamati suspensi sangat kental berbentuk seperti lendir dan hasil tidak dapat terbaca oleh *microplate reader* sehingga OD tidak dapat dihitung. Berdasarkan hasil identifikasi pertumbuhan biofilm, peneliti memilih waktu 48 jam untuk tahap penelitian berikutnya karena pada waktu inkubasi 48 jam didapatkan hasil *Strong biofilm producers* dan OD dapat terbaca.

6.5. Uji Antibiofilm *Aspergillus oryzae* terhadap biofilm *P. aeruginosa*

Penelitian uji aktivitas antibiofilm *A. oryzae* terhadap biofilm *P. aeruginosa* yang dilakukan merujuk pada penelitian mengenai biofilm sebelumnya dengan modifikasi. Pembuatan CFS *A. oryzae* dilakukan pertama kali dengan metode yang dilakukan oleh Prateeksha *et al* (2020) dengan modifikasi. Pembuatan CFS dilakukan selama 4 hari dengan diinkubasi pada suhu 28°C. Berdasarkan Prateeksha *et al* (2020) suhu tersebut merupakan suhu paling optimal untuk pertumbuhan jamur *Aspergillus*. Selanjutnya jamur yang telah diinkubasi disaring sebanyak dua kali, hal ini untuk menyisakan enzim ekstraseluler yang dihasilkan oleh jamur *A. oryzae*.

Penelitian ini merujuk pada penelitian mengenai antibiofilm oleh Abidah (2020) dengan sedikit modifikasi. Pembuatan suspensi kemudian dilakukan pada penelitian dengan mengikubasi bakteri *P. aeruginosa* pada suhu 37°C. berdasarkan studi pendahuluan dan penelitian sebelumnya, suhu 25°C dan 37°C merupakan suhu yang

dapat membuat bakteri tumbuh dengan baik. Setelah itu prosedur penelitian antibiofilm dilakukan pada *microplate* dan diinkubasi dengan suhu 37°C.

Masing-masing *well* yang telah berisi kelompok uji dan kelompok kontrol kemudian dicuci menggunakan *Phosphate-Buffered Saline* (PBS). PBS digunakan untuk membuang sel planktonik yang tidak menempel pada dinding *well microplate*. Pemilihan PBS berdasarkan sifat larutan yang isotonik dan *non-toxic* serta membuat sel bakteri tetap terjaga keutuhannya. PBS tidak mempengaruhi proses difusi dan osmosis dalam sel, hal ini dikarenakan PBS mampu mempertahankan pH buffer tetap netral. PBS tidak merusak biofilm yang dihasilkan oleh bakteri, karena dengan PBS sel normal mampu bermetabolisme (Khotimah, 2020).

Pewarnaan biofilm dilakukan dengan menambahkan kristal violet 0,1 sebanyak 200µL pada masing-masing *well*. Pewarnaan dilakukan selama 20 menit dan pada suhu ruang. Pemilihan kristal violet sebagai pewarnaan karena mudah didapat, sering digunakan, dan harga terjangkau. Kekurangan penggunaan kristal violet yaitu karena bersifat karsinogen dan membekas pada pakaian serta kulit (Khotimah, 2020).

Penambahan asam asetat 30% selama 20 menit bertujuan untuk melarutkan biofilm yang telah terwarna oleh kristal violet 0,1%, sehingga OD dapat terbaca pada *microplate reader*. Penggunaan asam asetat 30% dilakukan berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Zaba (2016).

Terdapat 8 kelompok perlakuan pada penelitian ini yang terdiri dari 5 kelompok uji dan 3 kelompok kontrol. Kelompok uji terdiri dari berbagai konsentrasi CFS yaitu 100%, 50%, 25%, 12,5% dan 6,25%. Kelompok kontrol terdiri dari kontrol negatif, positif dan media. Kontrol negatif pada penelitian ini berisi suspensi bakteri yang

ditambah dengan TSB + glukosa 5%. Kontrol positif menggunakan Gentamicin 5mg/ml. Pemilihan antibiotik Gentamicin berdasarkan sifat antibiotik tersebut yang memiliki spektrum luas yang dapat mengeradikasi bakteri Gram-negatif maupun Gram-positif. Antibiotik tersebut juga dipercaya mampu menghilangkan biofilm pada bakteri (Chauhan et al., 2012).

Kontrol media yang digunakan pada penelitian ini yaitu TSB + PDB + glukosa 5%. Penambahan glukosa sebanyak 5% digunakan untuk menjang pertumbuhan bakteri dalam membentuk biofilm. Tanpa penambahan glukosa sebenarnya bakteri tetap mampu tumbuh pada media TSB karena TSB mengandung glukosa sebanyak 0,25%, namun semakin besar konsentrasi glukosa, biofilm yang terbentuk akan semakin tinggi (Khotimah, 2020). Berdasarkan studi pendahuluan sebelumnya dilakukan penambahan glukosa 5%.

Pembentukan biofilm pada bakteri *P. aeruginosa* terjadi dalam beberapa tahap yaitu perlekatan, perkembangan awal struktur biofilm, maturasi dan dispersi sel yang akan kembali ke dalam bentuk planktonik. Keterlibatan faktor permukaan sel seperti fimbriae, flagella, produksi eksopolisakarida, protein autotransfer diperlukan untuk membentuk biofilm. Produksi biofilm pada *P. aeruginosa* bergantung pada kondisi lingkungan bakteri yang tidak memungkinkan. Tahap pertama proses pembentukan biofilm *P. aeruginosa* melakukan adhesi dengan bantuan pili tipe IV yang terdiri dari protein subunit yakni pilA sebagai perekat yang diekspor keluar oleh sekretin yang akan membentuk lapisan biofilm (Lavery and Sean, 2014; Bohn et al, 2009).

Tahap kedua pembentukan biofilm yaitu perkembangan struktur biofilm proses *quorum sensing* berperan dalam tahap ini, pada *P. aeruginosa* akan mengeluarkan

sinyal berupa *Actin Homoserine Lactone* (AHL) yang akan ditangkap oleh LuxR (reseptor), ketika AHL berikatan dengan LuxR maka akan terjadi transkrip gen yang akan menyebabkan terbentuknya toxin biofilm, extrapolisakarida substrat (EPS). Tahap ketiga yaitu maturasi biofilm, lapisan biofilm akan menebal hingga dapat membentuk hingga lebih dari 100 lapisan biofilm, pada tahap ini massa biofilm bertambah padat dengan adanya *extracellular polymeric substance* yang terdiri atas polisakarida, protein dan Asam nukleat (dNA/rNA) (Lavery and Sean, 2014). Tahap keempat yaitu dispersi sel atau tahap pemecahan. Tahap ini merupakan tahap yang penting pada siklus perkembangan biofilm. Penyebaran oleh dispersi sel dapat menyeluruh atau hanya pada regio tertentu dari suatu biofilm. Setelah itu terbentuk sel planktonik yang dapat menginisiasi kembali biofilm baru di bagian yang lain (Hidayati and Liuwan, 2019). Adanya aktivitas antibiofilm dibutuhkan untuk mencegah proses perlekatan, pertumbuhan serta proses degradasi biofilm yang dapat menggunakan spesies jamur.

Pada beberapa jamur terdapat kandungan yang dapat menghasilkan antibiofilm, penghambat enzim dan antimikroba. Beberapa kandungan yang dapat berguna sebagai antibiofilm di antaranya seperti *Pyranose Dehydrogenase* (PDH) dan β -*glucosidase*. PDH dapat melakukan oksidasi laktosa pada rantai C1-C4 secara efisien yang dapat mengoksidasi senyawa laktosa dalam matriks EPS pada proses pembentukan biofilm (Pisanelli, 2010). PDH mampu mengoksidasi laktosa secara efisien sehingga dapat menjadi lakton, sehingga dengan adanya kandungan PDH diharapkan dapat mengoksidasi kandungan laktosa pada selubung eksopolisakarida bakteri yang dapat menghasilkan biofilm (Yodsing *et al.*, 2018; Rasouli *et al.*, 2020).

Kandungan lain yang dapat berperan dalam antibiofilm yaitu β -glucosidase. β -glucosidase yang memiliki efek memotong ikatan glukosa yang dapat menghambat pembentukan perlekatan bakteri dan juga menghasilkan fenolik. Substansi fenolik juga dapat menghambat proses quorum sensing. Penghambatan quorum sensing pada *P. aeruginosa* dapat menghilangkan molekul sinyal pembentukan peptida. Sehingga diharapkan dapat mengganggu pertumbuhan bakteri patogen tersebut (Damayanti, 2017; Ma'rufah, Hertiani and Anshory, 2013; Baba *et al.*, 2015; Rasouli *et al.*, 2020).

Uji aktivitas antibiofilm yang dilakukan pada penelitian ini terdiri dari uji pencegahan perlekatan, penghambatan pertumbuhan dan penghancuran biofilm *P. aeruginosa* oleh *A. oryzae*. Model grafik yang ditunjukkan pada masing-masing uji aktivitas antibiofilm *A. oryzae* terhadap *P. aeruginosa* menunjukkan perbedaan, baik pada uji pencegahan perlekatan, penghambatan pertumbuhan, maupun penghancuran biofilm.

6.5.1. Uji Pencegahan Perlekatan Biofilm *P.aeruginosa*

Pada gambar 5.6 terlihat hasil dari uji pencegahan perlekatan biofilm *P.aeruginosa* dan didapatkan bentuk grafik sigmoid. Persentase terbaik terlihat pada konsentrasi 12,5% yang menunjukkan persentase sebesar 79,10%. Persentase terendah terlihat pada konsentrasi 6,25% yaitu dengan persentase sebesar 70,07%. Persentase tertinggi menunjukkan efektifitas CFS *A. oryzae* pada konsentrasi tersebut memiliki efektifitas optimal. Pada gambar 5.5 terlihat bahwa nilai OD rata-rata pencegahan perlekatan biofilm *P.aeruginosa* dari konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25% secara berturut-turut yaitu 0,143; 0,139; 0,115; 0,103 dan 0,113. Setiap konsentrasi menunjukkan adanya penurunan *optical density*

(OD) terhadap kontrol negatif, sehingga dapat disimpulkan *A. oryzae* efektif mencegah perlekatan antar pili dari *P. aeruginosa* dalam proses pembentukan biofilm, namun hasil OD yang di dapatkan tidak sesuai dengan tingkatan konsentrasi yang diberikan, idealnya semakin tinggi konsentrasi yang diberikan maka semakin rendah nilai OD yang didapatkan. Ketidaksesuaian tersebut bisa dipengaruhi oleh nilai absorbansi, ada kemungkinan pada konsentrasi 12,5% nilai absorbansinya lebih baik dibandingkan konsentrasi 100%. Jeleknya suatu nilai absorbansi dapat dipengaruhi salah satunya oleh adanya serapan oleh pelarut, serapan oleh kuvet, kuvet dengan bahan kuarsa memiliki kualitas yang lebih baik dibandingkan dengan yang berbahan gelas, dan kesalahan fotometrik normal pada pengukuran absorbansi sangat tinggi atau rendah (Setyawan, 2015). Hal tersebut juga dapat terjadi akibat kurangnya ketelitian dalam prosedur yang dilakukan. Nilai OD dipengaruhi oleh tingkat ketebalan matriks biofilm yang dihasilkan oleh pewarnaan kristal violet. Hal ini menunjukkan bahwa *A. oryzae* memiliki aktivitas antibiofilm dalam pencegahan perlekatan biofilm *P.aeruginosa*. Nilai OD rata-rata yang rendah dibandingkan dengan kontrol negatif menunjukkan terjadi pencegahan biofilm melekat secara abiotik pada dinding *microplate reader*.

OD yang didapat selanjutnya dilakukan analisa menggunakan aplikasi *IBM SPSS Statistics* versi 26. Data yang didapat menunjukkan bahwa data terdistribusi normal dan homogen. Hal ini ditunjukkan pada hasil uji normalitas dan uji homogenitas yang didapatkan *p-value* lebih dari 0,05. Uji selanjutnya yang dilakukan yaitu menggunakan *Oneway-ANOVA* dan didapatkan hasil kurang dari 0,05 yang menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan pada hasil

pengecahan perlekatan biofilm *P.aeruginosa*. Uji *Post Hoc Tukey HSD* dilakukan untuk melihat perbedaan signifikansi nilai OD pada 5 kelompok uji dan 3 kelompok kontrol. Pada hasil uji *Post Hoc Tukey HSD* pengecahan perlekatan biofilm *P.aeruginosa* didapatkan perbedaan yang signifikan pada OD kontrol media terhadap konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25% dan kontrol positif, menunjukkan terjadi kontaminasi pada kontrol media yang seharusnya tidak terdapat signifikan berbeda antara kontrol media terhadap konsentrasi dan kontrol positif. Hal tersebut dapat diakibatkan oleh proses sterilisasi media yang kurang lama sehingga masih terdapat bakteri atau hal lain pada media yang mampu menyebabkan kontaminasi (Arikunto, 2009), selain itu ada beberapa faktor lain yang dapat menyebabkan kontaminasi pada kontrol media yaitu (1) terdapat organisme kecil yang masuk ke dalam media, (2) alat-alat yang digunakan kurang bersih maupun kurang steril, (3) lingkungan perlakuan prosedur yang kurang kondusif dan steril, (4) kecerobohan dalam perlakuan (Gunawan, 1987). Pada kontrol negatif signifikan berbeda terhadap 5 konsentrasi uji yang dapat disimpulkan bahwa setiap konsentrasi uji mampu melakukan aktivitas antibiofilm dalam pengecahan perlekatan pada biofilm *P. aeruginosa*. Tidak terdapat signifikan berbeda pada data kontrol positif dengan semua konsentrasi uji menandakan bahwa masing-masing konsentrasi memiliki efektivitas yang lebih kuat dibandingkan dengan kontrol berisi gentamisin.

Tingkat kekuatan hubungan dan arah hubungan didapatkan menggunakan uji korelasi *Spearman*. Hasil uji korelasi pada uji pengecahan perlekatan biofilm *P.aeruginosa* menggunakan *Spearman* dan didapatkan hasil *p-value* 0,031 yang

berarti data signifikan. Hasil korelasi menunjukkan angka -0,568 yang berarti terdapat hubungan yang cukup antara konsentrasi CFS *A. oryzae* dengan hasil OD pencegahan perlekatan biofilm *P.aeruginosa*. Arah hubungan ditunjukkan pada nilai korelasi *Spearman* yang menunjukkan tanda negatif yang berarti semakin besar tingkat konsentrasi CFS *A. oryzae* maka semakin kecil nilai OD pencegahan perlekatan biofilm *P.aeruginosa*. Menurut hasil yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa besar nilai OD pencegahan perlekatan biofilm *P.aeruginosa* dipengaruhi secara signifikan dan derajat korelasi yang kuat oleh besar konsentrasi CFS *A. oryzae*. Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas antibiofilm CFS *A. oryzae* tinggi, sehingga cukup efektif digunakan sebagai bahan pencegahan perlekatan biofilm *P.aeruginosa*.

Pada grafik uji pencegahan perlekatan biofilm *P. aeruginosa* membentuk grafik sigmoid terbalik, karena semakin tinggi konsentrasi yang diberikan, semakin tinggi juga OD yang didapatkan. Selain itu, kacaunya hasil yang didapatkan juga dapat dipengaruhi oleh metode yang digunakan masih kurang tepat baik dari penggunaan suspensi bakteri hingga pemilihan kadar konsentrasi yang digunakan (Megan O. *et al*, 2020).

6.5.2. Uji Penghambatan Pertumbuhan Biofilm *P.aeruginosa*

Pada gambar 5.8 terlihat hasil dari uji penghambatan pertumbuhan biofilm *P.aeruginosa* dan didapatkan bentuk grafik sigmoid. Persentase terbaik terlihat pada konsentrasi 100% yang menunjukkan presentase sebesar 32,93%. Persentase terendah terlihat pada konsentrasi 6,25% yaitu dengan presentase sebesar 15%. Konsentrasi tertinggi menunjukkan efektifitas CFS *A. oryzae* pada konsentrasi

tersebut memiliki efektifitas optimal. Pada gambar 5.7 terlihat bahwa nilai OD penghambatan pertumbuhan biofilm *P.aeruginosa* dari konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25% secara berturut-turut yaitu 0,112; 0,130; 0,129; 0,127 dan 0,142. Setiap konsentrasi menunjukkan adanya penurunan *optical density* (OD) terhadap kontrol negatif, sehingga dapat disimpulkan *Aspergillus oryzae* efektif menghambat *quorum sensing* *P. aeruginosa* dalam proses pembentukan biofilm. Hal ini sesuai dengan tingkatan konsentrasi yang diberikan, semakin rendah konsentrasi yang diberikan maka semakin tinggi nilai OD yang didapatkan. OD terendah pada kelompok uji penghambatan pertumbuhan terlihat pada konsentrasi 100%. Hasil uji kelompok uji dengan konsentrasi 100% memiliki hasil yang lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol negatif yang memiliki nilai OD 0,116. Nilai OD dipengaruhi oleh tingkat ketebalan matriks biofilm yang dihasilkan oleh pewarnaan kristal violet. Hal ini menunjukkan bahwa *A. oryzae* memiliki aktivitas antibiofilm dalam penghambatan pertumbuhan biofilm *P.aeruginosa*. Nilai OD rata-rata terendah menunjukkan proses *quorum sensing* dalam pertumbuhan biofilm terhambat.

Uji yang dilakukan selanjutnya adalah analisis statistik. Berdasarkan uji normalitas dan homogenitas didapatkan hasil bahwa data terdistribusi normal namun tidak homogen. Hal ini ditunjukkan pada nilai *p-value* pada uji normalitas mendapatkan hasil lebih dari 0,05 sementara uji homogenitas yang mendapatkan hasil kurang dari 0,05 . pada uji homogenitas didapatkan *p-value* sebesar 0,006. Uji selanjutnya yang dilakukan yaitu menggunakan *Kruskall Walis* dan didapatkan hasil kurang dari 0,05 yang menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan pada

hasil pencegahan perlekatan biofilm *P.aeruginosa*. Uji *Post Hoc Mann-Whitney U* dilakukan untuk melihat perbedaan signifikansi nilai OD pada 5 kelompok uji dan 3 kelompok kontrol. Berdasarkan hasil uji *Post Hoc Mann-Whitney U* penghambatan pertumbuhan biofilm *P.aeruginosa* terdapat signifikan berbeda antara OD pada kontrol media terhadap 4 konsentrasi uji yaitu konsentrasi 100%, konsentrasi 50%. Konsentrasi 25%, konsentrasi 12,5%, menunjukkan bahwa terjadi kontaminasi pada kontrol media yang seharusnya tidak terdapat signifikan berbeda antara kontrol media terhadap konsentrasi dan kontrol positif. Hal tersebut dapat diakibatkan oleh proses sterilisasi media yang kurang lama sehingga masih terdapat bakteri atau hal lain pada media yang mampu menyebabkan kontaminasi (Arikunto, 2009), selain itu ada beberapa faktor lain yang dapat menyebabkan kontaminasi pada kontrol media yaitu (1) terdapat organisme kecil yang masuk ke dalam media, (2) alat-alat yang digunakan kurang bersih maupun kurang steril, (3) lingkungan perlakuan prosedur yang kurang kondusif dan steril, (4) kecerobohan dalam perlakuan (Gunawan, 1987). Signifikan berbeda juga ditunjukkan pada data kontrol positif terhadap semua konsentrasi yang menunjukkan bahwa efektivitas semua konsentrasi uji berbeda dengan kontrol positif pada uji penghambatan pertumbuhan. Pada kontrol negatif signifikan berbeda terhadap kontrol positif dan konsentrasi 100%, yang dapat disimpulkan bahwa konsentrasi seratus memiliki efektifitas terhadap penghambatan pertumbuhan biofilm *P. aeruginosa*.

Tingkat kekuatan dan arah hubungan diketahui dari uji korelasi *Pearson*. Hasil uji korelasi pada uji penghambatan pertumbuhan biofilm *P.aeruginosa* menggunakan *Pearson* dan didapatkan hasil *p-value* 0,001 yang berarti data

signifikan. Nilai korelasi *Spearman* menunjukkan angka 0,669 yang berarti hubungan korelasi antara konsentrasi CFS *A. oryzae* dengan hasil OD terdapat korelasi yang kuat. Arah korelasi ditunjukkan dari tanda nilai korelasi yaitu positif yang berarti arah korelasi searah yang dapat diartikan bahwa semakin besar tingkat konsentrasi CFS *A. oryzae* maka semakin besar hasil OD penghambatan pertumbuhan biofilm *P.aeruginosa*. Sehingga dapat disimpulkan bahwa besar nilai OD penghambatan pertumbuhan biofilm *P. aeruginosa* dipengaruhi secara signifikan dengan derajat korelasi kuat oleh konsentrasi CFS *A. oryzae*. Hal ini menunjukkan aktivitas antibiofilm CFS *A. oryzae* efektif dalam penghambatan pertumbuhan biofilm *P.aeruginosa*.

Bentuk grafik pada penghambatan pertumbuhan biofilm *P.aeruginosa* menunjukkan bentuk sigmoid yang bisa saja disebabkan oleh konsentrasi CFS *A. oryzae*. Hal ini bisa dikarenakan kadar jenuh dari CFS *A. oryzae* terhadap pertumbuhan biofilm *P.aeruginosa*. Selain alasan yang telah disebutkan, kacaunya hasil yang didapatkan juga dapat dipengaruhi oleh metode yang digunakan masih kurang tepat baik dari penggunaan suspensi bakteri hingga pemilihan kadar konsentrasi yang digunakan (Megan O. *et al*, 2020).

6.5.3. Uji Penghancuran Biofilm *P.aeruginosa*

Pada gambar 5.10 terlihat hasil dari uji penghancuran biofilm *P.aeruginosa* dan didapatkan grafik membentuk huruf U. Persentase terbaik terlihat pada konsentrasi 25% yang menunjukkan presentase sebesar 72,23%. Persentase terendah terlihat pada konsentrasi 6,25% yaitu dengan presentase sebesar 57,82%. Persentase tertinggi menunjukkan efektifitas CFS *A. oryzae* pada konsentrasi

tersebut memiliki efektifitas optimal. Pada gambar 5.9 terlihat bahwa nilai OD penghancuran biofilm *P.aeruginosa* dari konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25% secara berturut-turut yaitu 0,200; 0,134; 0,133; 0,185 dan 0,202. Setiap konsentrasi menunjukkan adanya penurunan *optical density* (OD) terhadap kontrol negatif, sehingga dapat disimpulkan *A. oryzae* efektif mendegradasi lapisan biofilm *P. aeruginosa*. Pada uji penghancuran biofilm hasil OD yang didapatkan tidak sesuai dengan tingkatan pemberian konsentrasi. Ketidaksesuaian tersebut bisa dipengaruhi oleh nilai absorbansi, ada kemungkinan pada konsentrasi 25% nilai absorbansinya lebih baik dibandingkan konsentrasi 100%. Jeleknya suatu nilai absorbansi dapat dipengaruhi salah satunya oleh adanya serapan oleh pelarut, serapan oleh kuvet, kuvet dengan bahan kuarsa memiliki kualitas yang lebih baik dibandingkan dengan yang berbahan gelas, dan kesalahan fotometrik normal pada pengukuran absorbansi sangat tinggi atau rendah (Setyawan, 2015). Hal tersebut juga dapat terjadi akibat kurangnya ketelitian dalam prosedur yang dilakukan. OD terendah pada kelompok uji penghancuran biofilm terlihat pada konsentrasi 25%. Hasil uji kelompok uji dengan konsentrasi 25% memiliki hasil yang lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol negatif yang memiliki nilai OD 0,479 dan kelompok kontrol positif yang memiliki nilai OD 0,226. Nilai OD pada uji penghancuran biofilm juga didapatkan lebih rendah dibandingkan kontrol negatif yang menunjukkan proses penghancuran oleh senyawa antibiofilm *A. oryzae* lebih efektif dibandingkan dengan gentamicin. Mekanisme kerja dari gentamicin yaitu dengan mengikat RNA, protein, ribosom, dll yang berada disekitar bakteri sehingga bakteri tidak dapat membentuk suatu biofilm, namun pada kasus bakteri yang telah

membentuk biofilm, bakteri tersebut memiliki eDNA yang dapat mengurangi kemampuan gentamicin berdifusi ke dalam dinding bakteri, sehingga dapat terjadi resistensi terhadap gentamicin oleh bakteri yang telah membentuk biofilm (Aspe, et al, 2012; Agarwal, et al, 2005). Nilai OD dipengaruhi oleh tingkat ketebalan matriks biofilm yang dihasilkan oleh pewarnaan kristal violet. Hal ini menunjukkan bahwa *A. oryzae* memiliki aktivitas antibiofilm dalam penghancuran biofilm *P.aeruginosa*.

Uji yang dilakukan selanjutnya adalah analisis statistik. Berdasarkan uji normalitas dan homogenitas didapatkan hasil bahwa data terdistribusi normal dan homogen. Hal ini ditunjukkan pada nilai *p-value* pada uji normalitas mendapatkan hasil lebih dari 0,05 namun pada uji homogenitas yang mendapatkan hasil kurang dari 0,05 . Pada uji homogenitas didapatkan *p-value* sebesar 0,026. Uji selanjutnya yang dilakukan yaitu menggunakan *Kruskall Wallis* dan didapatkan hasil kurang dari 0,05 yang menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan pada hasil penghancuran biofilm *P.aeruginosa*. Uji *Post Hoc Tukey HSD* dilakukan untuk melihat perbedaan signifikansi nilai OD pada 5 kelompok uji dan 3 kelompok kontrol. Hasil uji *Post Hoc Mann-Whitney U* penghancuran biofilm *P.aeruginosa* terdapat signifikan berbeda pada OD kontrol media terhadap 5 konsentrasi yaitu konsentrasi 100%, konsentrasi 50%, konsentrasi 25%, konsentrasi 12,5%, konsentrasi 6,25%, menunjukkan bahwa terjadi kontaminasi pada media yang digunakan, diduga kontaminasi terjadi akibat proses sterilisasi media yang kurang lama sehingga masih terdapat bakteri atau hal lain pada media yang mampu menyebabkan kontaminasi (Arikunto, 2009), selain itu ada beberapa faktor lain yang dapat menyebabkan kontaminasi pada kontrol media yaitu (1) terdapat

organisme kecil yang masuk ke dalam media, (2) alat-alat yang digunakan kurang bersih maupun kurang steril, (3) lingkungan perlakuan prosedur yang kurang kondusif dan steril, (4) kecerobohan dalam perlakuan (Gunawan, 1987). Signifikan berbeda juga ditunjukkan antara kontrol positif terhadap konsentrasi 50% dan 25% yang dapat disimpulkan pada konsentrasi tersebut efektifitas antibiofilm dalam penghancuran biofilm oleh *A. oryzae* lebih rendah dibandingkan yang berisi gentamisin. Kontrol negatif terhadap 5 konsentrasi didapatkan signifikan berbeda yang menunjukkan pada setiap konsentrasi mampu atau efektif dalam proses penghancuran biofilm *P. aeruginosa*.

Hasil uji korelasi pada uji penghancuran biofilm *P.aeruginosa* menggunakan *Pearson* dan didapatkan hasil *p-value* 0,468 yang berarti data tidak signifikan. Hasil korelasi menunjukkan angka 0,142 yang menunjukkan derajat hubungan korelasi sangat lemah antara OD penghancuran biofilm *P.aeruginosa* dengan konsentrasi CFS *A. oryzae*. Arah hubungan ditunjukkan dari tanda pada nilai korelasi *Pearson* yaitu positif yang menunjukkan arah hubungan searah yang berarti semakin besar konsentrasi CFS *A. oryzae* maka semakin besar OD penghancuran biofilm *P.aeruginosa*. Pada hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa besar nilai OD penghancuran biofilm *P.aeruginosa* dipengaruhi secara tidak signifikan oleh derajat korelasi yang sangat lemah oleh besar konsentrasi CFS *A. oryzae*. Hal ini menunjukkan bahwa CFS *A. oryzae* memiliki aktivitas dalam penghancuran biofilm *P.aeruginosa*.

Pada uji penghancuran biofilm data yang didapatkan tidak sesuai dengan tujuan pemberian konsentrasi dimana didapatkan signifikan berbeda antara

konsentrasi 50% dan 25% terhadap kontrol positif, yang dibandingkan dengan konsentrasi lebih kecil jauh lebih efektif dibandingkan konsentrasi yang lebih besar, hal ini dapat disebabkan kemungkinan ada suatu metabolit pada konsentrasi 25% dan 50% yang menyebabkan nilai OD yang terbaca menjadi lebih tinggi atau pada konsentrasi rendah memiliki suatu metabolit juga yang mampu lebih efektif dalam penghancuran biofilm (Arikunto, 2009; Fatmawati, T. A, Nurhidayati, T dan Jadid, N, 2011). Selain itu, kacaunya hasil yang didapatkan juga dapat dipengaruhi oleh metode yang digunakan masih kurang tepat baik dari penggunaan suspensi bakteri hingga pemilihan kadar konsentrasi yang digunakan (Megan O. *et al*, 2020)

6.6. Kajian Integrasi Islam mengenai Aktivitas Antibiofilm *A. oryzae* terhadap Biofilm *P. Aeruginosa*.

P. aeruginosa merupakan bakteri yang sering menyebabkan penyakit bagi manusia. Beberapa penyakit yang disebabkan oleh *P. aeruginosa* mampu menyebabkan penyakit tersebut semakin lama penyembuhannya, hal ini dikarenakan bakteri *P. aeruginosa* memiliki kemampuan membentuk biofilm. Karena adanya pembentukan biofilm oleh *P. aeruginosa*, menyebabkan pengobatan antibiotic kurang efektif ataupun terjadi resistensi. Antibiotik merupakan satu-satunya pengobatan untuk penyakit yang disebabkan oleh bakteri. Resistensi pada antibiotik membuat tingkat mortalitas dan morbiditas meningkat, terutama bagi orang yang imunitasnya rendah.

Sebagai seorang manusia dan hamba kita diperintahkan untuk beribadah dan selalu berusaha, sebagai contoh yaitu berusaha mengobati suatu penyakit seperti yang disebutkan dalam hadist yang diriwayatkan oleh Ahmad, Al-Bukhari dalam Al-Adabul Mufrad, Abu Dawud, Ibnu Majah, dan At-Tirmidzi :

فَقَالَ أَنْتَدَا؟ اللَّهُ، رَسُولُ يَا : فَقَالَ الْأَعْرَابُ، وَجَاءَتْ وَسَلَّم، عَلَيْهِ اللَّهُ صَلَّى النَّبِيُّ َعِنْدَ كُنْتُ : اسامة عن

: قَالَ هُوَ؟ مَا : قَالُوا بِدِوَانٍ دَاءٍ غَيْرَ فَاءٍ شِئْ لَهُ وَضَعِ إِلَّا دَاءً يَضَعُ لَمْ وَجَلَّ عَزَّ اللَّهُ نَّ فَإِن تَدَاوُوا، اللَّهُ، عِبَادَ يَا نَعَمْ :

وَيِ الْهَرَمِ

Artinya:

“Aku pernah berada di samping Rasulullah Shallallahu ‘alaihi wasallam. Lalu datanglah serombongan Arab dusun. Mereka bertanya, “Wahai Rasulullah, bolehkah kami berobat?” Beliau menjawab: “Iya, wahai para hamba Allah, berobatlah. Sebab Allah Subhanahu wa Ta’ala tidaklah meletakkan sebuah penyakit melainkan meletakkan pula obatnya, kecuali satu penyakit.” Mereka bertanya: “Penyakit apa itu?” Beliau menjawab: “Penyakit tua.” (HR. Ahmad, Al-Bukhari dalam Al-Adabul Mufrad, Abu Dawud, Ibnu Majah, dan At-Tirmidzi, beliau berkata bahwa hadits ini hasan shahih).

Dari hadist tersebut dapat ditafsirkan bahwa seluruh penyakit memiliki obat kecuali penyakit tua dan kesembuhan suatu penyakit bergantung ketepatan dari obatnya. Sebagai hamba-Nya dan sebagai mahasiswa bidang kedokteran senantiasa berusaha dalam meneliti dan menemukan obat yang tepat pada suatu gangguan atau penyakit, seperti kasus resistensi terhadap antibiotik, sehingga kasus tersebut dapat diatasi.

Dalam Al-Qur’an disebutkan pada surat Yunus ayat 57 sebagai berikut:

يَا أَيُّهَا النَّاسُ قَدْ جَاءَكُمْ مَوْعِظَةٌ مِّن رَّبِّكُمْ وَشِفَاءٌ لِّمَا فِي الصُّدُورِ وَهُدًى وَرَحْمَةٌ
لِّلْمُؤْمِنِينَ

“Wahai manusia, sesungguhnya telah datang kepadamu suatu pelajaran dari Tuhanmu, dan penyembuh segala penyakit yang ada didalam dada, dan petunjuk serta rahmat bagi orang-orang yang beriman.”

Pada ayat tersebut juga dijelaskan mengenai obat atau penawar penyakit, surat

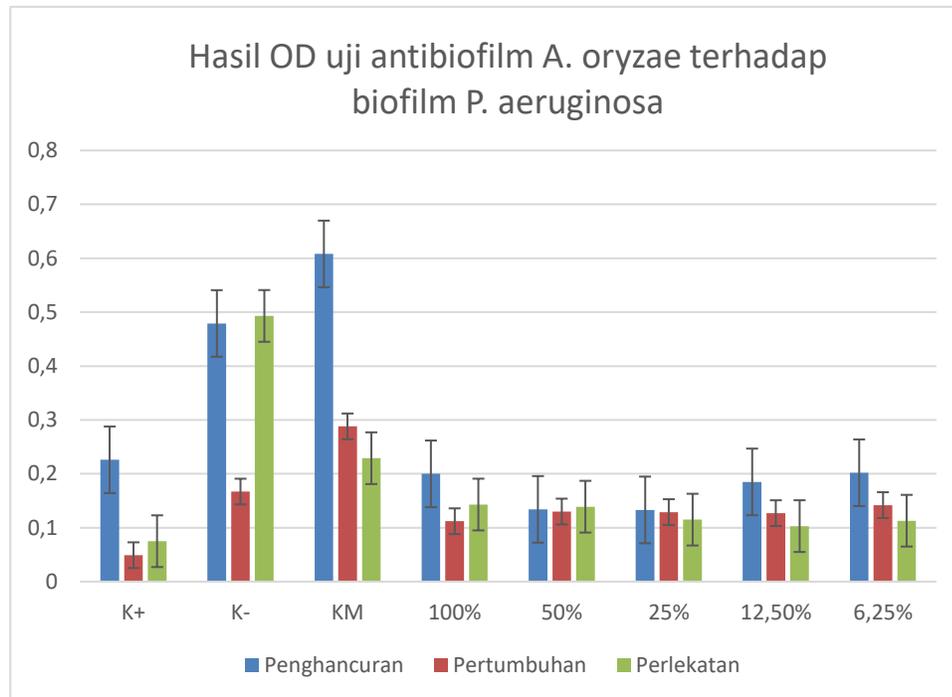
Yunus ayat 57 ini juga dapat dikorelasikan dengan surat Al-Isra’ ayat 82:

وَنُنزِّلُ مِنَ الْقُرْآنِ مَا هُوَ شِفَاءٌ وَرَحْمَةٌ لِّلْمُؤْمِنِينَ

”Dan kami menurunkan sebagian dari Al-Qur’an sebagai penawar dan rahmat bagi orang-orang yang beriman.”

Dari dua ayat diatas dapat ditafsirkan bahwa Allah SWT menurunkan segala penawar dan rahmat bagi orang-orang yang beriman berupa Al-Qur’an, serta sebagian dari AL-Qur’an menjelaskan seperti lebah madu yang dapat dijadikan sebagai pengobatan. Dua ayat Al-Qur’an tersebut juga sangat berkolerasi dengan HR. Tirmidzi yang menyebutkan bahwa rasulullah tidak melarang seseorang untuk berobat meskipun ada Al-Qur’an sebagai segala penawar penyakit. Dapat disimpulkan bahwa sebagai seorang hamba dan seorang yang berpendidikan kita dianjurkan untuk mengobati penyakit serta menemukan obat untuk menyembuhkan penyakit baik dari tanaman ataupun hewan yang tidak diharamkan dan tidak banyak mudhorotnya.

Pengembangan agen antibiofilm yang dapat mengatasi biofilm yang dibentuk oleh *P. aeruginosa* dilakukan dengan bahan dasar tumbuhan. Jamur tergolong dalam tumbuhan eukariota. Jamur *A. oryzae* memiliki senyawa seperti *Pyranose Dehidrogenase* (PDH) dan β -glucosidase yang pada penelitian sebelumnya mampu untuk menghasilkan senyawa antibiofilm. Jamur *A. oryzae* diduga memiliki potensi untuk menjadi senyawa antibiofilm terhadap biofilm yang dihasilkan oleh *P. aeruginosa*. Pada hasil penelitian aktivitas antibiofilm *A. oryzae* terhadap biofilm *P. aeruginosa* didapatkan hasil seperti pada gambar dibawah ini.



Gambar 6. 1 Hasil Optical Density (OD) uji antibiofilm *A. oryzae* terhadap *P. aeruginosa*.

Pada hasil tersebut terlihat bahwa *A. oryzae* memiliki aktivitas sebagai bahan antibiofilm terhadap biofilm *P. aeruginosa*. Aktivitas uji antibiofilm secara berturut turut dari yang tertinggi yaitu uji penghancuran biofilm, uji pencegahan perlekatan biofilm dan uji penghambatan pertumbuhan biofilm.

Penelitian ini diharapkan dapat dikembangkan kembali untuk menemukan bahan antibiofilm yang tepat dan efektif untuk suatu bakteri atau penghasil biofilm lainnya. Penelitian ini diharapkan mampu menambah semangat pada peneliti muslim untuk terus mengembangkan antibiofilm, sehingga dapat membantu dalam mengatasi tingkat morbiditas dan mortalitas oleh agen yang dapat menghasilkan biofilm seperti bakteri *P. aeruginosa*. Penelitian ini diharapkan juga dapat digunakan sebagai

tambahan wawasan dan digunakan sebagai dasar untuk mengembangkan agen antibiofilm selanjutnya terlebih yang memiliki bahan *A. oryzae*.

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

1. *Aspergillus oryzae* memiliki aktivitas antibiofilm terhadap biofilm bakteri *Pseudomonas aeruginosa*
2. *Aspergillus oryzae* memiliki persentase tertinggi aktivitas pencegahan perlekatan terhadap biofilm bakteri *Pseudomonas aeruginosa* pada konsentrasi 12,5% yaitu sebesar 79,10%, data pada semua konsentrasi tidak signifikan berbeda dengan kontrol positif pada uji pencegahan perlekatan.
3. *Aspergillus oryzae* memiliki persentase tertinggi aktivitas penghambatan pertumbuhan terhadap biofilm bakteri *Pseudomonas aeruginosa* pada konsentrasi 100% yaitu sebesar 32,93%, data pada setiap konsentrasi menunjukkan signifikan berbeda dengan kontrol positif dan tidak signifikan dengan kontrol negatif pada uji penghambatan pertumbuhan biofilm *P. aeruginosa*.
4. *Aspergillus oryzae* memiliki persentase tertinggi aktivitas penghancuran terhadap biofilm bakteri *Pseudomonas aeruginosa* pada konsentrasi 25% yaitu sebesar 72,23%, data konsentrasi 50% dan 25% signifikan berbeda dengan kontrol positif, konsentrasi tersebut kurang efektif pada proses penghancuran biofilm *P. aeruginosa*.

7.2. Saran

1. Diperlukan adanya penelitian lanjutan mengenai senyawa aktif yang spesifik pada *Aspergillus oryzae* dan mekanisme kerja senyawa tersebut sebagai agen antibiofilm.
2. Diperlukan adanya uji lanjutan untuk menentukan variasi dari konsentrasi CFS pada *Aspergillus oryzae* sebagai agen antibiofilm.
3. Bagi peneliti selanjutnya dapat melakukan pengujian aktivitas antibiofilm pada bakteri yang berbeda dan dapat menggunakan pengembangan metode yang lebih tepat.

DAFTAR PUSTAKA

Abidah, Hafshah Y. 2020. Uji Aktivitas Antibiofilm Ekstrak Daun Murbei Hitam (*Morus Nigra L.*) terhadap Biofilm *Esherichia coli*. *Central Library of Maulana Malik Ibrahim State Islamic University of Malang*: 11-12.

Agarwal, G., Kapil, A., Kabra, SK., Das BK., Dwivedi, SN, 2005. In vitro efficacy of ciprofloxacin an gentamicin against biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* and its free-living forms. *THE NATIONAL MEDICAL JOURNAL OF INDI VOI. 18, No.4 2005*
Ahmed, Amer, Faiz ul-Hassan Nasim, Kashfa Batool dan Aasia Bibi. 2017. Microbial β -Glucosidase: Sources, Production and Applications. *Journal of Applied & Environmental Microbiology* 5(1): 31-33.

Aini, N. 2015. Media Alternatif untuk Pertumbuhan Jamur Menggunakan Sumber Karbohidrat yang Berbeda. Skripsi. Surakarta: Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan, Universitas Muhammadiyah Surakarta.

Aini, Nurul, Triastuti, R., 2015, Media Alternatif untuk Pertumbuhan Jamur Menggunakan Sumber Karbohidrat yang Berbeda, *Seminar Nasional XII Pendidikan Biologi FKIP UNS* : 861.

Baba, Y., Sumitani, J., Tani, S., Kawaguchi, T., 2015. Characterization of *Aspergillus aculeatus* β -glucosidase 1 accelerating cellulose hydrolysis with *Trichoderma cellulase* system. *AMB Express* 5. <https://doi.org/10.1186/s13568-014-0090-3>

Badal, Marselina S. 2018. Uji Aktivitas Antibakteri Getah Batang Kamboja Putih (*Plumeria Acuminata W. T. Ait*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Pseudomonas Aeruginosa*. *Politeknik Kesehatan Kemenkes Kupang Program Studi Farmasi Kupang*: 10.

Biol, Braz J. 2020. Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from lower respiratory tract of ICU patients. *Brazilian Journal of Biology*: 1519.

Chauhan, A., Lebeaux, D., Ghigo, J.-M., Beloin, C., 2012. Full and Broad-Spectrum In Vivo Eradication of Catheter-Associated Biofilms Using Gentamicin-EDTA Antibiotic Lock Therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56, 6310–6318. <https://doi.org/10.1128/AAC.01606-12>.

Costerton, J.W., L. Montanaro, C.R. Arciola, 2005. Biofilm in implant infections: Its production and regulation. *The International Journal of Artificial Organs* 28(11): 1062-1063.

Dharmayanti, I Gusti A. Mas Putri dan Dewa M. Sukrama. 2019. Karakteristik Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan Pola Kepekaannya terhadap Antibiotik di Intensive Care Unit (ICU) RSUP Sanglah pada Bulan November 2014 – Januari 2015. *E-Jurnal Medika* 8(4): 2.

Ekawati, Evy R., Siti Nur Husnul Y., Dheasy H. 2018. Identifikasi Kuman Pada Pus Dari Luka Infeksi Kulit. *Jurnal SainHealth* 2(1): 33.

Elchinger, P, H, C. Delattre, S. Faure, O. Roy, S. Badel, T. Bernardi, C. Taillefumier dan P. Michaud. 2014. Effect of Proteases Against Biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *The Society for Applied Microbiology*: 1.

Ezeonu, Chukwuma S., Chinedu I., Dawn I. Agwaranze, Asumpta I., Abraham Joseph. 2018. Antifungal Effect of Aqueous and Ethanolic Extracts of Neem Leaves, Stem Bark and Seeds on Fungal Rot Diseases of Yam and Cocoyam. *Springer link*.

Fitness. *Journal Microbiology Biotechnology* 27(6): 1053.

Gunardi, Wani D. 2014. Peranan Biofilm dalam Kaitannya dengan Penyakit Infeksi. *Universitas Kristen Ukrida Wacana*: 2-4.

Haley Robert W., David H. Culver, John W. White, W. Meade Morgan, T. Grace Emori, Van P. Munn And Thomas M. Hooton. 1985. The Efficacy of Infection Surveillance and Control Programs in Preventing Nosocomial Infections in Us Hospitals. *American Journal. of Epidemilogy* 2(121): 182-183.

Hidayati, A.N., Liuwan, C.C., 2019. Peran Biofilm terhadap Infeksi Saluran Genital yang disebabkan oleh Vaginosis Bakterial 31, 9.

Jawetz, Melnick, Adelberg's dan Geo F. Brooks. 2010. *Mikrobiologi Kedokteran Edisi 25*. Terjemahan Nugroho, A. W. Buku Kedokteran EGC. Jakarta.

Kementerian Kesehatan RI. 2013. *Riset Kesehatan Dasar*. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. Jakarta.

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.

Khotimah, Alif R. Husnul. 2020. Uji Aktivitas Ekstrak Daun Murbei Hitam (*Morus Nigra L.*) sebagai Antibiofilm *Klebsiella Pneumonia*. *Central Library of Maulana Malik Ibrahim State Islamic University of Malang*: 3-4

Kirmusaoglu, Sahra. 2019. The Method for Detection of Biofilm and Screening Antibiofilm Agent. *Antimicrobial, Antibiotic Resistence, Antibiofilm Strategies and Activity Methods*, Intechopen, p. 1-17.

Lee J, Zhang L. 2015. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein & cell*. ;6(1):26-41.

Lee, Keehoon dan Sang S. Yoon. 2017. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a Programmed Bacterial Life for

Leonard, Cory A., Stacy D. Brown, J. Russell Hayman, 2013, Random Mutagenesis of the *Aspergillus oryzae* Genome Results in Fungal Antibacterial Activity, *Hindawi Publishing Corporation International Journal of Microbiology* 2013: 1-4.

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.

Ma'rufah, T., Hertiani, T., Anshory, H., 2013. PERBANDINGAN DAYA ANTIQUORUM SENSING EKSTRAK N-HEKSAN, ETIL ASETAT DAN METANOL KULIT BATANG KRANGEAN (*Litsea cubeba* (Lour.) Pers.) TERHADAP *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Ilm. Farm.* 10, 7–17. <https://doi.org/10.20885/jif.vol10.iss1.art2>

Melo, E. Borges de, Adriane da Silveira G., Ivone Carvalho, 2006, α and β -Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity, *Elsevier Ltd* 62(773): 10277-10278.

Mukherjee, sampriti, Bonnie, L. Bassler, 2019, Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing Environments, *PMC US National library Of medicine national Of health* 17(6): 371-382.

Nasution, Lukmanul H. 2012. Infeksi Nosokomial. *FK Universitas Sumatera Utara* 39(2): 36-37.

Nurseha, Djaafar. 2013. Pengembangan Tindakan Pencegahan Infeksi Nosokomial oleh Perawat di Rumah Sakit Berbasis Health Belief Model. *Jurnal Ners* 1(8): 64-65.

Olivia, Corry K. 2017. Infeksi *Pseudomonas Aeruginosa* Dan *Klebsiella Pneumoniae Ssp Pneumoniae* Pada Ulkus Kruris Et Femoralis Pada Pasien Diabetes Melitus Type II. *Program Pendidikan Dokter Spesialis I Bagian/Smf Ilmu Kesehatan Kulit Dan Kelamin Fakultas Kedokteran Unud/Rs Sanglah Denpasar*: 8.

Oramahi, H.A., Haryadi, 2006, Identifikasi Jamur *Aspergillus* pada Gaplek di Kabupaten Gunung Kidul, *Jurnal Pelindungan Taman Indonesia* 12(1): 28.

Permanasari, Dimes A. 2015. Aktivitas Ekstrak Etanol Daun Cincau Hijau (*Cyclea barbata miers*) Sebagai Penghambat Pembentukan Biofilm Bakteri *Salmonella typhi*. *Fakultas Kedokteran Universitas Jember*: 9.

Prateeksha, Bajpai, R., Yusuf, M.A., Upreti, D.K., Gupta, V.K., Singh, B.N., 2020. Endolichenic fungus, *Aspergillus quadrinctus* of *Usnea longissima* inhibits quorum sensing and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Microb. Pathog.* 140, 103933. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103933>.

Rahmadian, Cut A., Ismail, Mahdi Abrar, Erina, Rastina, Yudha Fahrimal. 2018. Isolasi dan Identifikasi Bakteri *Pseudomonas Sp* Pada Ikan Asin di Tempat Pelelangan Ikan Labuhan haji Aceh Selatan. *JIMVET E-ISSN: 2540-9492* 2(4): 498-500.

Rasouli, R., Navidinia, M., Shams Ghahfarokhi, M., Vahabpour Roudsari, R., Adabian, S., Baghestani, A.R., 2020a. Antibiofilm Activity of Cellobiose Dehydrogenase Enzyme (CDH) Isolated from *Aspergillus niger* on Biofilm of Clinical *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* Isolates [WWW Document]. *Arch. Clin. Infect. Dis.* <https://doi.org/10.5812/archcid.90635>

Rasouli, R., Navidinia, M., Shams Ghahfarokhi, M., Vahabpour Roudsari, R., Adabian, S., Baghestani, A.R., 2020b. Antibiofilm Activity of Cellobiose Dehydrogenase Enzyme (CDH) Isolated from *Aspergillus niger* on Biofilm of Clinical *Staphylococcus epidermidis* and *Pseudomonas aeruginosa* Isolates [WWW Document]. *Arch. Clin. Infect. Dis.* <https://doi.org/10.5812/archcid.90635>

Riou, Christine, Jean Michel S., Marie Jose V., Ziya G. Nata, Pierre Barre. 1998. Purification, Characterization, and Substrate Specificity of a Novel Highly Glucose-Tolerant b-Glucosidase from *Aspergillus oryzae*. *Applied And Environmental Microbiology* 64(10): 3607-3608.

Rohman, M. Kholilur. 2019. Pengaruh Edamame (*Glycine max L. Merrill*) Terfermentasi Kombinasi *Aspergillus oryzae* dan *Rhizopus oligosporus* terhadap Kadar HDL dan LDL Tikus Terovarietomi. *Digital Repository Universitas Jember*: 11-12.

Rutherford, Steven T. dan Bonnie L. Bassler. 2012. Bacterial Quorum Sensing: Its Role in Virulence and Possibilities for Its Control. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2(11): 1-9.

Salawati, Liza. 2012. Pengendalian Infeksi Nosokomial Di Ruang Intensive Care Unit Rumah Sakit. *Jurnal Kedokteran Syiah Kuala* 1(12): 47-48.

Smith, Roger S., Barbara H. Iglewski, 2003, *P. aeruginosa* Quorum Sensing Systems and Virulence, *Current Opinion in Microbiology* 6: 56-58.

Sulviana, A. Wahyu, Nony Puspawati, Rizal M. Rukmana, 2017, Identifikasi *Pseudomonas aeruginosa* dan Uji Sensitivitas terhadap Antibiotik dari Sampel Pus Infeksi Luka Operasi di RSUD Dr. Moewardi, *BIOMEDIKA* 10(2): 19-21.

Taslim, E., Tinni T. Maskoen, 2016, Pola Kuman Terbanyak Sebagai Agen Penyebab Infeksi di *Intensive Care Unit* pada Beberapa Rumah Sakit di Indonesia, *Anesthesia & Critical Care* 34(1): 59.

Utami, Putu S. M., Noorhamdani, Masruroh Rahayu, 2020, Efek Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum sanctum*) dalam Menghambat Pembentukan Biofilm

Staphylococcus aureus secara *In Vitro*, *Journal of Agromedicine and Medical Sciences* 6(3): 170.

Yodsing, N., Lekphrom, R., Sangsopha, W., Aimi, T., Boonlue, S., 2018. Secondary Metabolites and Their Biological Activity from *Aspergillus aculeatus* KKU-CT2. *Curr. Microbiol.* 75, 513–518. <https://doi.org/10.1007/s00284-017-1411-y>

Zaba, F.H., 2016. **DAYA HAMBAT KOMBINASI EKSTRAK *Cinnamomum burmannii*, *Vigna unguiculata*, DAN PAPAIN DARI LATEKS *Carica papaya* TERHADAP BIOFILM *Candida albicans* (skripsi). UNIVERSITAS AIRLANGGA.**

LAMPIRAN-LAMPIRAN

Lampiran 1. Etik Penelitian

	<p>FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN Kampus 3 FKIK Gedung Ibnu Thufail Lantai 2 Jalan Locari, Tlekung Kota Batu E-mail: kepk.fkik@uin-malang.ac.id - Website : http://www.kepk.fkik.uin-malang.ac.id</p>
	<p>KETERANGAN KELAIKAN ETIK <i>(ETHICAL CLEARANCE)</i> No. 009/EC/KEPK-FKIK/2021</p>

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

Judul Uji Aktivitas Antibiofilm *Aspergillus* sp. Terhadap Biofilm *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klasiella pneumoniae*

Sub Judul Uji Aktivitas Antibiofilm *Aspergillus* sp. Terhadap Biofilm *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klasiella pneumoniae*

Peneliti

- Awwalatun Nur Khoiriah
- Dwiana Galuh Chandra Kirana
- Mahya Nailul 'Azizah
- Rizka Mar'athus Sholihah
- Walimatus Sya'diyah

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

Tempat Penelitian Laboratorium Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Maulana Malik Ibrahim Malang

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

Malang, 11 Februari 2021

Ketua

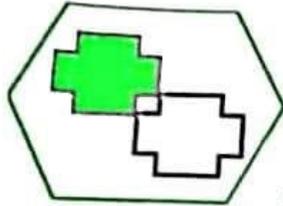


dr. Doby Indrawan ,MMRS
NIP.19781001201701011113

Keterangan :

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

Lampiran 2. Hasil Uji Identifikasi Bakteri



CV. WIYASA MANDIRI

Mitra Segitiga Laboratorium Kesehatan & Pendidikan
Perum Bumi Mendoroko Raya blok AJ97 Sangosari Malang
Email : wiyasa-mandiriAJ97@gmail.com Telp. 08125274511

LAPORAN HASIL UJI

No.017/IB /Lab Wiyasa Mandiri /III/2021

KODE SAMPEL : 017/ IB
NAMA/JENIS SAMPEL : Isolat Bakteri
NAMA PELANGGAN : Awwalatur Nur
ALAMAT : Mahasiswa FK UIN
TANGGAL PENERIMAAN : 15/03/2021
TANGGAL SELESAI ANALISA : 25/03/2021
PARAMETER ANALISA : Uji Fenotip
SPESIFIKASI METODE : Microbact System
HASIL ANALISA :

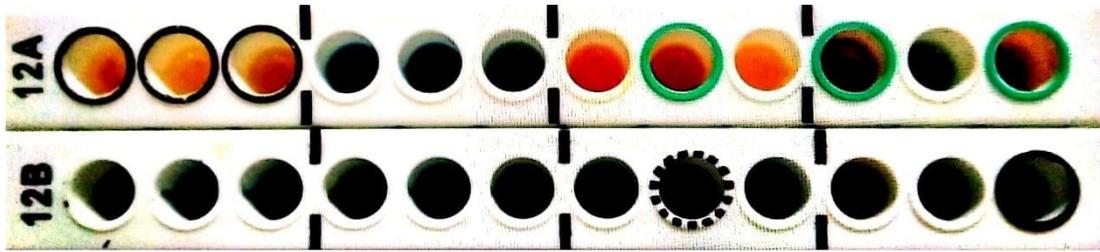
NO	KODE SAMPEL	HASIL IDENTIFIKASI
1.	017/IB	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

KESIMPULAN : Berdasarkan hasil identifikasi secara Fenotip, sampel Isolat Bakteri dengan kode sampel 017/IB, adalah spesies *Pseudomonas aeruginosa*.

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

Malang, 25 Maret 2021
Direktur CV. Wiyasa Mandiri

Dyah Rokhmayanti, S.Si



Uji gula-gula, H₂S, Indole, V-P, Citrate dan urease

OXOID
MICROBACT™
 IDENTIFICATION KITS

MICROBACT™ GNB 12A/B/E, 24E IB017

	GNB 24E											GNB 12B														
	GNB 12A / 12E											GNB 12B														
Oxidase	Motility	Nitrate	Lysine	Ornithine	H ₂ S	Glucose	Mannitol	Xylose	ONPG	Indole	Urease	V-P	Citrate	TDA	Gelatin	Malonate	Inositol	Sorbitol	Rhamnose	Sucrose	Lactose	Arabinose	Adonitol	Raffinose	Salicin	Arginine
+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1	4	2	1
7			4			5			0		2		0		0		0		0		0		1			

Result / Resultado / Ergebnis / Resultat / Risultato / Resultat / Resultat / Resultado / Amortališius
 Sum / Suma / Summe / Somme / Somma / Sum / Summa / Soma / Abšardus

Identification / Identificación / Identifikation / Identifikasjon / Identifikazione / Identifikasjon / Identifizierung / Identifikazio / Tautotomisin

Pseudomonas aeruginosa 90,91%

Hasil uji biokimia

Lampiran 3. Hasil Data dan Foto Uji Deteksi Biofilm *P. aeruginosa*



Kelompok kontrol positif (antibiotik gentamisin)



Biofilm yang terbentuk setelah inkubasi selama 24 jam (Kiri kelompok uji; kanan kelompok kontrol media)



Biofilm yang terbentuk setelah inkubasi selama 48 jam (Kiri kelompok uji; kanan kelompok kontrol media)



Biofilm yang terbentuk setelah inkubasi selama 72 jam (Kiri kelompok uji; kanan kelompok kontrol media)

24 JAM		48 JAM		72 JAM	
OD	K	OD	K	OD	K
1,768	0.616	2.124	0.125	***	0.543
3.363	0.725	3.306	0.152	***	0.530
3.243	0.622	3.482	0.169	***	0.596
RATA-RATA					
2.791	0.654	2.970	0.148	***	0.556
STANDAR DEVIASI					
0.725	0.050	0.602	0.018	***	0.028
OD CUT					
0.804		0.202		0.640	
PERBANDINGAN					
$2x OD_c < OD \leq 4x OD_c$ $1,608 < 2,791 \leq 3,216$ (medium biofilm)		$4x OD_c < OD \text{ isolat}$ $4x 0.202 < 2.970$ $0.808 < 2.970$ (strong biofilm)		Tidak diketahui	

*Rumus $OD_{cut} = OD_{kontrol\ negatif} + 3 (SD\ OD_{kontrol\ negatif})$

Lampiran 4. Foto Hasil Uji Antibiofilm

Uji pencegahan perlekatan biofilm



Konsentrasi
CFS 100%



Konsentrasi
CFS 50%



Konsentrasi
CFS 25%



Konsentrasi
CFS 12,5%



Konsentrasi
CFS 6,25%



Kontrol positif
(antibiotik
gentamisin)



Kontrol negatif
(bakteri *P.*
aeruginosa+media
TSB)



Kontrol media (media
TSB+PDB+glukosa)

Uji penghambatan pertumbuhan biofilm

Konsentrasi
CFS 100%

Konsentrasi
CFS 50%

Konsentrasi
CFS 25%

Konsentrasi
CFS 12,5%

Konsentrasi
CFS 6,25%

Kontrol positif
(antibiotik
gentamisin)

Kontrol negatif
(bakteri *P.*
aeruginosa+media
TSB)

Kontrol media
(media
TSB+PDB+glukosa)

Uji penghancuran biofilm



Konsentrasi
CFS 100%



Konsentrasi
CFS 50%



Konsentrasi
CFS 25%



Konsentrasi
CFS 12,5%



Konsentrasi
CFS 6,25%



Kontrol positif
(antibiotik
gentamisin)



Kontrol negatif
(bakteri *P.*
aeruginosa+media
TSB)



Kontrol media (media
TSB+PDB+glukosa)

Lampiran 5. Data Hasil Uji Antibiofilm

a. Uji pencegahan perlekatan biofilm

		K+	K(-)	100%	50%	25%	12,5%	6,25%	KM
Pengulangan	1	0,059	0.477	0.152	0.099	0.123	0.091	0.119	0.218
	2	0,074	0.491	0.155	0.133	0.118	0.106	0.118	0.233
	3	0,092	0,513	0.122	0.187	0.104	0.112	0.103	0.236
Rata-rata		0.075	0.493	0.143	0.139	0.115	0.103	0.113	0.229
SD		0.013	0.007	0.014	0.036	0.008	0.008	0.007	0.007
% pencegahan				70,99%	72%	77%	79,10%	70,07%	

b. Uji penghambatan pertumbuhan biofilm

		K+	K(-)	100%	50%	25%	12,5%	6,25%	KM
Pengulangan	1	0.046	0.230	0.108	0.134	0.128	0.130	0.133	0.424
	2	0.047	0.152	0.110	0.130	0.129	0.126	0.146	0.301
	3	0.055	0.119	0.118	0.126	0.130	0.125	0.147	0.140
Rata-rata		0.049	0.167	0.112	0.130	0.129	0.127	0.142	0.288

SD	0.004	0.046	0.004	0.003	0	0.002	0.006	0.116
% pencegahan			32,93%	22,15%	22,75%	23,95%	15%	

c. Uji Penghancuran biofilm

		K+	K(-)	100%	50%	25%	12,5%	6,25%	KM
Pengulangan	1	0.237	0.494	0.148	0.125	0.124	0.152	0.201	0.591
	2	0.205	0.476	0.222	0.133	0.128	0.188	0.206	0.615
	3	0.238	0.467	0.232	0.144	0.147	0.217	0.199	0.620
Rata-rata		0.226	0.479	0.200	0.134	0.133	0.185	0.202	0.608
SD		0.015	0.011	0.037	0.007	0.010	0.026	0.002	0.012
% pencegahan				58,24%	72,02%	72,23%	61,37%	57,82%	

Lampiran 6. Analisis Data Uji Pencegahan Perlekatan Biofilm *P. aeruginosa*

1. Uji Normalitas *Saphiro-Wilk*

		Tests of Normality					
		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	perlakuan	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
OD_pencegahan perlekatan	K+	.191	3	.	.997	3	.900
	K-	.225	3	.	.984	3	.756
	KM	.328	3	.	.871	3	.298
	100%	.356	3	.	.818	3	.157
	50%	.226	3	.	.983	3	.751
	25%	.286	3	.	.930	3	.490
	12,5%	.276	3	.	.942	3	.537
	6,25%	.365	3	.	.797	3	.107

a. Lilliefors Significance Correction

2. Uji Homogenitas *Lavenne*

		Test of Homogeneity of Variances			
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
OD_pencegahan perlekatan	Based on Mean	2.204	7	16	.090
	Based on Median	1.003	7	16	.464
	Based on Median and with adjusted df	1.003	7	6.515	.502
	Based on trimmed mean	2.112	7	16	.102

3. Uji ANOVA

ANOVA					
OD_pencegahan perlekatan					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.388	7	.055	134.671	.000
Within Groups	.007	16	.000		
Total	.395	23			

4. Uji Post-Hoc Tuckey HSD

Multiple Comparisons

Dependent Variable: OD_pencegahan perlekatan

	(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
			Difference (I-J)			Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	K+	K-	-.418667*	.016563	.000	-.47601	-.36132
		KM	-.154000*	.016563	.000	-.21134	-.09666
		100%	-.068000*	.016563	.015	-.12534	-.01066
		50%	-.064667*	.016563	.022	-.12201	-.00732
		25%	-.040000	.016563	.298	-.09734	.01734
		12,5%	-.028000	.016563	.693	-.08534	.02934
		6,25%	-.038333	.016563	.343	-.09568	.01901
		K-	K+	.418667*	.016563	.000	.36132
	KM		.264667*	.016563	.000	.20732	.32201
	100%		.350667*	.016563	.000	.29332	.40801
	50%		.354000*	.016563	.000	.29666	.41134
	25%		.378667*	.016563	.000	.32132	.43601
	12,5%		.390667*	.016563	.000	.33332	.44801
	6,25%		.380333*	.016563	.000	.32299	.43768
	KM		K+	.154000*	.016563	.000	.09666
		K-	-.264667*	.016563	.000	-.32201	-.20732
		100%	.086000*	.016563	.002	.02866	.14334
		50%	.089333*	.016563	.001	.03199	.14668
		25%	.114000*	.016563	.000	.05666	.17134
		12,5%	.126000*	.016563	.000	.06866	.18334
		6,25%	.115667*	.016563	.000	.05832	.17301
100%		K+	.068000*	.016563	.015	.01066	.12534
	K-	-.350667*	.016563	.000	-.40801	-.29332	
	KM	-.086000*	.016563	.002	-.14334	-.02866	
	50%	.003333	.016563	1.000	-.05401	.06068	
	25%	.028000	.016563	.693	-.02934	.08534	
	12,5%	.040000	.016563	.298	-.01734	.09734	
	6,25%	.029667	.016563	.634	-.02768	.08701	
	50%	K+	.064667*	.016563	.022	.00732	.12201
K-		-.354000*	.016563	.000	-.41134	-.29666	

		KM		-0.089333*	.016563	.001	-.14668	-.03199
		100%		-.003333	.016563	1.000	-.06068	.05401
		25%		.024667	.016563	.802	-.03268	.08201
		12,5%		.036667	.016563	.393	-.02068	.09401
		6,25%		.026333	.016563	.750	-.03101	.08368
	25%	K+		.040000	.016563	.298	-.01734	.09734
		K-		-.378667*	.016563	.000	-.43601	-.32132
		KM		-.114000*	.016563	.000	-.17134	-.05666
		100%		-.028000	.016563	.693	-.08534	.02934
		50%		-.024667	.016563	.802	-.08201	.03268
		12,5%		.012000	.016563	.995	-.04534	.06934
		6,25%		.001667	.016563	1.000	-.05568	.05901
	12,5%	K+		.028000	.016563	.693	-.02934	.08534
		K-		-.390667*	.016563	.000	-.44801	-.33332
		KM		-.126000*	.016563	.000	-.18334	-.06866
		100%		-.040000	.016563	.298	-.09734	.01734
		50%		-.036667	.016563	.393	-.09401	.02068
		25%		-.012000	.016563	.995	-.06934	.04534
		6,25%		-.010333	.016563	.998	-.06768	.04701
	6,25%	K+		.038333	.016563	.343	-.01901	.09568
		K-		-.380333*	.016563	.000	-.43768	-.32299
		KM		-.115667*	.016563	.000	-.17301	-.05832
		100%		-.029667	.016563	.634	-.08701	.02768
		50%		-.026333	.016563	.750	-.08368	.03101
		25%		-.001667	.016563	1.000	-.05901	.05568
		12,5%		.010333	.016563	.998	-.04701	.06768
LSD	K+	K-		-.418667*	.016563	.000	-.45378	-.38355
		KM		-.154000*	.016563	.000	-.18911	-.11889
		100%		-.068000*	.016563	.001	-.10311	-.03289
		50%		-.064667*	.016563	.001	-.09978	-.02955
		25%		-.040000*	.016563	.028	-.07511	-.00489
		12,5%		-.028000	.016563	.110	-.06311	.00711
		6,25%		-.038333*	.016563	.034	-.07345	-.00322
	K-	K+		.418667*	.016563	.000	.38355	.45378
		KM		.264667*	.016563	.000	.22955	.29978
		100%		.350667*	.016563	.000	.31555	.38578

	50%	.354000*	.016563	.000	.31889	.38911
	25%	.378667*	.016563	.000	.34355	.41378
	12,5%	.390667*	.016563	.000	.35555	.42578
	6,25%	.380333*	.016563	.000	.34522	.41545
KM	K+	.154000*	.016563	.000	.11889	.18911
	K-	-.264667*	.016563	.000	-.29978	-.22955
	100%	.086000*	.016563	.000	.05089	.12111
	50%	.089333*	.016563	.000	.05422	.12445
	25%	.114000*	.016563	.000	.07889	.14911
	12,5%	.126000*	.016563	.000	.09089	.16111
	6,25%	.115667*	.016563	.000	.08055	.15078
100%	K+	.068000*	.016563	.001	.03289	.10311
	K-	-.350667*	.016563	.000	-.38578	-.31555
	KM	-.086000*	.016563	.000	-.12111	-.05089
	50%	.003333	.016563	.843	-.03178	.03845
	25%	.028000	.016563	.110	-.00711	.06311
	12,5%	.040000*	.016563	.028	.00489	.07511
	6,25%	.029667	.016563	.092	-.00545	.06478
50%	K+	.064667*	.016563	.001	.02955	.09978
	K-	-.354000*	.016563	.000	-.38911	-.31889
	KM	-.089333*	.016563	.000	-.12445	-.05422
	100%	-.003333	.016563	.843	-.03845	.03178
	25%	.024667	.016563	.156	-.01045	.05978
	12,5%	.036667*	.016563	.042	.00155	.07178
	6,25%	.026333	.016563	.131	-.00878	.06145
25%	K+	.040000*	.016563	.028	.00489	.07511
	K-	-.378667*	.016563	.000	-.41378	-.34355
	KM	-.114000*	.016563	.000	-.14911	-.07889
	100%	-.028000	.016563	.110	-.06311	.00711
	50%	-.024667	.016563	.156	-.05978	.01045
	12,5%	.012000	.016563	.479	-.02311	.04711
	6,25%	.001667	.016563	.921	-.03345	.03678
12,5%	K+	.028000	.016563	.110	-.00711	.06311
	K-	-.390667*	.016563	.000	-.42578	-.35555
	KM	-.126000*	.016563	.000	-.16111	-.09089
	100%	-.040000*	.016563	.028	-.07511	-.00489

	50%	-.036667*	.016563	.042	-.07178	-.00155
	25%	-.012000	.016563	.479	-.04711	.02311
	6,25%	-.010333	.016563	.541	-.04545	.02478
6,25%	K+	.038333*	.016563	.034	.00322	.07345
	K-	-.380333*	.016563	.000	-.41545	-.34522
	KM	-.115667*	.016563	.000	-.15078	-.08055
	100%	-.029667	.016563	.092	-.06478	.00545
	50%	-.026333	.016563	.131	-.06145	.00878
	25%	-.001667	.016563	.921	-.03678	.03345
	12,5%	.010333	.016563	.541	-.02478	.04545

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

OD_pencegahan perlekatan

		Subset for alpha = 0.05					
	perlakuan	N	1	2	3	4	5
Tukey HSD ^a	K+	3	.07500				
	12,5%	3	.10300	.10300			
	6,25%	3	.11333	.11333			
	25%	3	.11500	.11500			
	50%	3		.13967			
	100%	3		.14300			
	KM	3			.22900		
	K-	3				.49367	
	Sig.			.298	.298	1.000	1.000
Tukey B ^a	K+	3	.07500				
	12,5%	3	.10300	.10300			
	6,25%	3	.11333	.11333			
	25%	3	.11500	.11500			
	50%	3		.13967			
	100%	3		.14300			
	KM	3			.22900		
	K-	3				.49367	
Duncan ^a	K+	3	.07500				
	12,5%	3	.10300	.10300			
	6,25%	3		.11333	.11333		
	25%	3		.11500	.11500		

50%	3		.13967	.13967		
100%	3			.14300		
KM	3				.22900	
K-	3					.49367
Sig.		.110	.057	.118	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

5. Uji Korelasi

Correlations

		perlakuan	OD_pencegahan perlekatan
perlakuan	Pearson Correlation	1	-.557*
	Sig. (2-tailed)		.031
	N	15	15
OD_pencegahan perlekatan	Pearson Correlation	-.557*	1
	Sig. (2-tailed)	.031	
	N	15	15

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

Correlations

		perlakuan	OD_pencegahan perlekatan
Spearman's rho	perlakuan	Correlation Coefficient	1.000
		Sig. (2-tailed)	.
		N	15
	OD_pencegahan perlekatan	Correlation Coefficient	-.568*
		Sig. (2-tailed)	.027
		N	15

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

Lampiran 7. Analisis Data Uji Penghambatan Pertumbuhan Biofilm *P. aeruginosa*

1. Uji Normalitas

		Tests of Normality					
		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	perlakuan	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
OD_penghambatan pertumbuhan	K+	.349	3	.	.832	3	.194
	K-	.270	3	.	.948	3	.561
	100	.314	3	.	.893	3	.363
	50	.175	3	.	1.000	3	1.000
	25	.175	3	.	1.000	3	1.000
	12,5	.314	3	.	.893	3	.363
	6,25	.362	3	.	.803	3	.122
	KM	.202	3	.	.994	3	.853

a. Lilliefors Significance Correction

2. Uji Homogenitas

		Test of Homogeneity of Variances			
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
OD_penghambatan pertumbuhan	Based on Mean	4.627	7	16	.005
	Based on Median	3.013	7	16	.032
	Based on Median and with adjusted df	3.013	7	2.892	.203
	Based on trimmed mean	4.524	7	16	.006

3. Uji Kruskal Wallis

Test Statistics^{a,b}

OD_penghambatan
tan
pertumbuhan

Kruskal-Wallis H	18.457
df	7
Asymp. Sig.	.010

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: perlakuan

4. Uji Post-Hoc Tuckey HSD

Multiple Comparisons

Dependent Variable: OD_penghambatan pertumbuhan

	(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
			Difference (I- J)			Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	K+	K-	-.117667	.044413	.208	-.27143	.03610
		100	-.062667	.044413	.840	-.21643	.09110
		50	-.080667	.044413	.619	-.23443	.07310
		25	-.079667	.044413	.632	-.23343	.07410
		12,5	-.077667	.044413	.659	-.23143	.07610
		6,25	-.092667	.044413	.462	-.24643	.06110
		KM	-.239000*	.044413	.001	-.39277	-.08523
	K-	K+	.117667	.044413	.208	-.03610	.27143
		100	.055000	.044413	.908	-.09877	.20877
		50	.037000	.044413	.988	-.11677	.19077
		25	.038000	.044413	.986	-.11577	.19177
		12,5	.040000	.044413	.982	-.11377	.19377
		6,25	.025000	.044413	.999	-.12877	.17877
		KM	-.121333	.044413	.182	-.27510	.03243
100	K+	.062667	.044413	.840	-.09110	.21643	
	K-	-.055000	.044413	.908	-.20877	.09877	
	50	-.018000	.044413	1.000	-.17177	.13577	
	25	-.017000	.044413	1.000	-.17077	.13677	

	12,5	-.015000	.044413	1.000	-.16877	.13877
	6,25	-.030000	.044413	.997	-.18377	.12377
	KM	-.176333*	.044413	.019	-.33010	-.02257
50	K+	.080667	.044413	.619	-.07310	.23443
	K-	-.037000	.044413	.988	-.19077	.11677
	100	.018000	.044413	1.000	-.13577	.17177
	25	.001000	.044413	1.000	-.15277	.15477
	12,5	.003000	.044413	1.000	-.15077	.15677
	6,25	-.012000	.044413	1.000	-.16577	.14177
	KM	-.158333*	.044413	.041	-.31210	-.00457
25	K+	.079667	.044413	.632	-.07410	.23343
	K-	-.038000	.044413	.986	-.19177	.11577
	100	.017000	.044413	1.000	-.13677	.17077
	50	-.001000	.044413	1.000	-.15477	.15277
	12,5	.002000	.044413	1.000	-.15177	.15577
	6,25	-.013000	.044413	1.000	-.16677	.14077
	KM	-.159333*	.044413	.039	-.31310	-.00557
12,5	K+	.077667	.044413	.659	-.07610	.23143
	K-	-.040000	.044413	.982	-.19377	.11377
	100	.015000	.044413	1.000	-.13877	.16877
	50	-.003000	.044413	1.000	-.15677	.15077
	25	-.002000	.044413	1.000	-.15577	.15177
	6,25	-.015000	.044413	1.000	-.16877	.13877
	KM	-.161333*	.044413	.036	-.31510	-.00757
6,25	K+	.092667	.044413	.462	-.06110	.24643
	K-	-.025000	.044413	.999	-.17877	.12877
	100	.030000	.044413	.997	-.12377	.18377
	50	.012000	.044413	1.000	-.14177	.16577
	25	.013000	.044413	1.000	-.14077	.16677
	12,5	.015000	.044413	1.000	-.13877	.16877
	KM	-.146333	.044413	.068	-.30010	.00743
KM	K+	.239000*	.044413	.001	.08523	.39277
	K-	.121333	.044413	.182	-.03243	.27510
	100	.176333*	.044413	.019	.02257	.33010
	50	.158333*	.044413	.041	.00457	.31210
	25	.159333*	.044413	.039	.00557	.31310

		12,5	.161333*	.044413	.036	.00757	.31510
		6,25	.146333	.044413	.068	-.00743	.30010
LSD	K+	K-	-.117667*	.044413	.017	-.21182	-.02351
		100	-.062667	.044413	.177	-.15682	.03149
		50	-.080667	.044413	.088	-.17482	.01349
		25	-.079667	.044413	.092	-.17382	.01449
		12,5	-.077667	.044413	.099	-.17182	.01649
		6,25	-.092667	.044413	.053	-.18682	.00149
		KM	-.239000*	.044413	.000	-.33315	-.14485
	K-	K+	.117667*	.044413	.017	.02351	.21182
		100	.055000	.044413	.233	-.03915	.14915
		50	.037000	.044413	.417	-.05715	.13115
		25	.038000	.044413	.405	-.05615	.13215
		12,5	.040000	.044413	.381	-.05415	.13415
		6,25	.025000	.044413	.581	-.06915	.11915
		KM	-.121333*	.044413	.015	-.21549	-.02718
	100	K+	.062667	.044413	.177	-.03149	.15682
		K-	-.055000	.044413	.233	-.14915	.03915
		50	-.018000	.044413	.691	-.11215	.07615
		25	-.017000	.044413	.707	-.11115	.07715
		12,5	-.015000	.044413	.740	-.10915	.07915
		6,25	-.030000	.044413	.509	-.12415	.06415
		KM	-.176333*	.044413	.001	-.27049	-.08218
	50	K+	.080667	.044413	.088	-.01349	.17482
		K-	-.037000	.044413	.417	-.13115	.05715
		100	.018000	.044413	.691	-.07615	.11215
		25	.001000	.044413	.982	-.09315	.09515
		12,5	.003000	.044413	.947	-.09115	.09715
		6,25	-.012000	.044413	.790	-.10615	.08215
		KM	-.158333*	.044413	.003	-.25249	-.06418
	25	K+	.079667	.044413	.092	-.01449	.17382
		K-	-.038000	.044413	.405	-.13215	.05615
		100	.017000	.044413	.707	-.07715	.11115
		50	-.001000	.044413	.982	-.09515	.09315
		12,5	.002000	.044413	.965	-.09215	.09615
		6,25	-.013000	.044413	.774	-.10715	.08115

12,5	KM	-.159333*	.044413	.002	-.25349	-.06518
	K+	.077667	.044413	.099	-.01649	.17182
	K-	-.040000	.044413	.381	-.13415	.05415
	100	.015000	.044413	.740	-.07915	.10915
	50	-.003000	.044413	.947	-.09715	.09115
	25	-.002000	.044413	.965	-.09615	.09215
	6,25	-.015000	.044413	.740	-.10915	.07915
6,25	KM	-.161333*	.044413	.002	-.25549	-.06718
	K+	.092667	.044413	.053	-.00149	.18682
	K-	-.025000	.044413	.581	-.11915	.06915
	100	.030000	.044413	.509	-.06415	.12415
	50	.012000	.044413	.790	-.08215	.10615
	25	.013000	.044413	.774	-.08115	.10715
	12,5	.015000	.044413	.740	-.07915	.10915
KM	KM	-.146333*	.044413	.005	-.24049	-.05218
	K+	.239000*	.044413	.000	.14485	.33315
	K-	.121333*	.044413	.015	.02718	.21549
	100	.176333*	.044413	.001	.08218	.27049
	50	.158333*	.044413	.003	.06418	.25249
	25	.159333*	.044413	.002	.06518	.25349
	12,5	.161333*	.044413	.002	.06718	.25549
	6,25	.146333*	.044413	.005	.05218	.24049

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

OD_penghambatan pertumbuhan

		Subset for alpha = 0.05			
	perlakuan	N	1	2	3
Tukey HSD ^a	K+	3	.04933		
	100	3	.11200		
	12,5	3	.12700		
	25	3	.12900		
	50	3	.13000		
	6,25	3	.14200	.14200	
	K-	3	.16700	.16700	
	KM	3		.28833	
Sig.			.208	.068	

Tukey B ^a	K+	3	.04933		
	100	3	.11200		
	12,5	3	.12700		
	25	3	.12900		
	50	3	.13000		
	6,25	3	.14200		
	K-	3	.16700	.16700	
	KM	3		.28833	
Duncan ^a	K+	3	.04933		
	100	3	.11200	.11200	
	12,5	3	.12700	.12700	
	25	3	.12900	.12900	
	50	3	.13000	.13000	
	6,25	3	.14200	.14200	
	K-	3		.16700	
	KM	3			.28833
	Sig.		.080	.284	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

5. Uji Korelasi

Correlations

		OD_penghambatan pertumbuhan	perlakuan
OD_penghambatan pertumbuhan	Pearson Correlation	1	.781**
	Sig. (2-tailed)		.001
	N	15	15
perlakuan	Pearson Correlation	.781**	1
	Sig. (2-tailed)	.001	
	N	15	15

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

Correlations

		OD_penghambatan	
		pertumbuhan	perlakuan
Spearman's rho	OD_penghambatan pertumbuhan	Correlation Coefficient	1.000
		Sig. (2-tailed)	.006
		N	15
	perlakuan	Correlation Coefficient	.669**
		Sig. (2-tailed)	.006
		N	15

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

Lampiran 8. Analisis Data Uji Penghancuran Biofilm *P. aeruginosa*

1. Uji Normalitas

		Tests of Normality						
		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk			
		perlakuan	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
OD_penghancuran biofilm	K+		.376	3	.	.773	3	.051
	K-		.253	3	.	.964	3	.637
	100		.346	3	.	.838	3	.209
	50		.208	3	.	.992	3	.826
	25		.325	3	.	.876	3	.312
	12,5		.195	3	.	.996	3	.881
	6,25		.276	3	.	.942	3	.537
	KM		.325	3	.	.875	3	.309

a. Lilliefors Significance Correction

2. Uji Homogenitas

		Test of Homogeneity of Variances			
		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
OD_penghancuran biofilm	Based on Mean	3.541	7	16	.017
	Based on Median	.650	7	16	.710

Based on Median and with adjusted df	.650	7	5.009	.709
Based on trimmed mean	3.185	7	16	.026

3. Uji Kruskal-Wallis

Test Statistics^{a,b}

OD_penghancuran biofilm

Kruskal-Wallis H	20.680
df	7
Asymp. Sig.	.004

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: perlakuan

4. Uji Post-Hoc Tuckey HSD

Multiple Comparisons

Dependent Variable: OD_penghancuran biofilm

	(I) perlakuan	(J) perlakuan	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	K+	K-	-.252333*	.018713	.000	-.31712	-.18754
		100	.026000	.018713	.849	-.03879	.09079
		50	.092667*	.018713	.003	.02788	.15746
		25	.093667*	.018713	.003	.02888	.15846
		12,5	.041000	.018713	.405	-.02379	.10579
		6,25	.024667	.018713	.879	-.04012	.08946
		KM	-.382000*	.018713	.000	-.44679	-.31721
	K-	K+	.252333*	.018713	.000	.18754	.31712
		100	.278333*	.018713	.000	.21354	.34312
		50	.345000*	.018713	.000	.28021	.40979
		25	.346000*	.018713	.000	.28121	.41079
		12,5	.293333*	.018713	.000	.22854	.35812
		6,25	.277000*	.018713	.000	.21221	.34179
		KM	-.129667*	.018713	.000	-.19446	-.06488
100	K+	-.026000	.018713	.849	-.09079	.03879	

	K-	-.278333*	.018713	.000	-.34312	-.21354
	50	.066667*	.018713	.041	.00188	.13146
	25	.067667*	.018713	.037	.00288	.13246
	12,5	.015000	.018713	.991	-.04979	.07979
	6,25	-.001333	.018713	1.000	-.06612	.06346
	KM	-.408000*	.018713	.000	-.47279	-.34321
50	K+	-.092667*	.018713	.003	-.15746	-.02788
	K-	-.345000*	.018713	.000	-.40979	-.28021
	100	-.066667*	.018713	.041	-.13146	-.00188
	25	.001000	.018713	1.000	-.06379	.06579
	12,5	-.051667	.018713	.174	-.11646	.01312
	6,25	-.068000*	.018713	.036	-.13279	-.00321
	KM	-.474667*	.018713	.000	-.53946	-.40988
25	K+	-.093667*	.018713	.003	-.15846	-.02888
	K-	-.346000*	.018713	.000	-.41079	-.28121
	100	-.067667*	.018713	.037	-.13246	-.00288
	50	-.001000	.018713	1.000	-.06579	.06379
	12,5	-.052667	.018713	.159	-.11746	.01212
	6,25	-.069000*	.018713	.033	-.13379	-.00421
	KM	-.475667*	.018713	.000	-.54046	-.41088
12,5	K+	-.041000	.018713	.405	-.10579	.02379
	K-	-.293333*	.018713	.000	-.35812	-.22854
	100	-.015000	.018713	.991	-.07979	.04979
	50	.051667	.018713	.174	-.01312	.11646
	25	.052667	.018713	.159	-.01212	.11746
	6,25	-.016333	.018713	.985	-.08112	.04846
	KM	-.423000*	.018713	.000	-.48779	-.35821
6,25	K+	-.024667	.018713	.879	-.08946	.04012
	K-	-.277000*	.018713	.000	-.34179	-.21221
	100	.001333	.018713	1.000	-.06346	.06612
	50	.068000*	.018713	.036	.00321	.13279
	25	.069000*	.018713	.033	.00421	.13379
	12,5	.016333	.018713	.985	-.04846	.08112
	KM	-.406667*	.018713	.000	-.47146	-.34188
KM	K+	.382000*	.018713	.000	.31721	.44679
	K-	.129667*	.018713	.000	.06488	.19446

		100	.408000*	.018713	.000	.34321	.47279
		50	.474667*	.018713	.000	.40988	.53946
		25	.475667*	.018713	.000	.41088	.54046
		12,5	.423000*	.018713	.000	.35821	.48779
		6,25	.406667*	.018713	.000	.34188	.47146
LSD	K+	K-	-.252333*	.018713	.000	-.29200	-.21266
		100	.026000	.018713	.184	-.01367	.06567
		50	.092667*	.018713	.000	.05300	.13234
		25	.093667*	.018713	.000	.05400	.13334
		12,5	.041000*	.018713	.044	.00133	.08067
		6,25	.024667	.018713	.206	-.01500	.06434
		KM	-.382000*	.018713	.000	-.42167	-.34233
	K-	K+	.252333*	.018713	.000	.21266	.29200
		100	.278333*	.018713	.000	.23866	.31800
		50	.345000*	.018713	.000	.30533	.38467
		25	.346000*	.018713	.000	.30633	.38567
		12,5	.293333*	.018713	.000	.25366	.33300
		6,25	.277000*	.018713	.000	.23733	.31667
		KM	-.129667*	.018713	.000	-.16934	-.09000
	100	K+	-.026000	.018713	.184	-.06567	.01367
		K-	-.278333*	.018713	.000	-.31800	-.23866
		50	.066667*	.018713	.003	.02700	.10634
		25	.067667*	.018713	.002	.02800	.10734
		12,5	.015000	.018713	.435	-.02467	.05467
		6,25	-.001333	.018713	.944	-.04100	.03834
		KM	-.408000*	.018713	.000	-.44767	-.36833
	50	K+	-.092667*	.018713	.000	-.13234	-.05300
		K-	-.345000*	.018713	.000	-.38467	-.30533
		100	-.066667*	.018713	.003	-.10634	-.02700
		25	.001000	.018713	.958	-.03867	.04067
		12,5	-.051667*	.018713	.014	-.09134	-.01200
		6,25	-.068000*	.018713	.002	-.10767	-.02833
		KM	-.474667*	.018713	.000	-.51434	-.43500
	25	K+	-.093667*	.018713	.000	-.13334	-.05400
		K-	-.346000*	.018713	.000	-.38567	-.30633
		100	-.067667*	.018713	.002	-.10734	-.02800

	50	-.001000	.018713	.958	-.04067	.03867
	12,5	-.052667*	.018713	.012	-.09234	-.01300
	6,25	-.069000*	.018713	.002	-.10867	-.02933
	KM	-.475667*	.018713	.000	-.51534	-.43600
12,5	K+	-.041000*	.018713	.044	-.08067	-.00133
	K-	-.293333*	.018713	.000	-.33300	-.25366
	100	-.015000	.018713	.435	-.05467	.02467
	50	.051667*	.018713	.014	.01200	.09134
	25	.052667*	.018713	.012	.01300	.09234
	6,25	-.016333	.018713	.396	-.05600	.02334
	KM	-.423000*	.018713	.000	-.46267	-.38333
6,25	K+	-.024667	.018713	.206	-.06434	.01500
	K-	-.277000*	.018713	.000	-.31667	-.23733
	100	.001333	.018713	.944	-.03834	.04100
	50	.068000*	.018713	.002	.02833	.10767
	25	.069000*	.018713	.002	.02933	.10867
	12,5	.016333	.018713	.396	-.02334	.05600
	KM	-.406667*	.018713	.000	-.44634	-.36700
KM	K+	.382000*	.018713	.000	.34233	.42167
	K-	.129667*	.018713	.000	.09000	.16934
	100	.408000*	.018713	.000	.36833	.44767
	50	.474667*	.018713	.000	.43500	.51434
	25	.475667*	.018713	.000	.43600	.51534
	12,5	.423000*	.018713	.000	.38333	.46267
	6,25	.406667*	.018713	.000	.36700	.44634

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

OD_penghancuran biofilm

		Subset for alpha = 0.05				
	perlakuan	N	1	2	3	4
Tukey HSD ^a	25	3	.13300			
	50	3	.13400			
	12,5	3	.18567	.18567		
	100	3		.20067		
	6,25	3		.20200		
	K+	3		.22667		

	K-	3			.47900		
	KM	3				.60867	
	Sig.		.159	.405	1.000	1.000	
Tukey B ^a	25	3	.13300				
	50	3	.13400				
	12,5	3	.18567	.18567			
	100	3		.20067			
	6,25	3		.20200			
	K+	3		.22667			
	K-	3			.47900		
	KM	3				.60867	
	Duncan ^a	25	3	.13300			
		50	3	.13400			
12,5		3		.18567			
100		3		.20067			
6,25		3		.20200			
K+		3		.22667			
K-		3			.47900		
KM		3				.60867	
Sig.			.958	.059	1.000	1.000	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

5. Uji Korelasi

Correlations

		OD_penghancuran biofilm	perlakuan
OD_penghancuran biofilm	Pearson Correlation	1	.203
	Sig. (2-tailed)		.468
	N	15	15
Perlakuan	Pearson Correlation	.203	1
	Sig. (2-tailed)	.468	
	N	15	15

Correlations

			OD_penghancuran biofilm	perlakuan
Spearman's rho	OD_penghancuran biofilm	Correlation Coefficient	1.000	.142
		Sig. (2-tailed)	.	.614
		N	15	15
	perlakuan	Correlation Coefficient	.142	1.000
		Sig. (2-tailed)	.614	.
		N	15	15