

**POTENSI ANTIBIOFILM *CELL FREE SUPERNATANT* (CFS)  
*Lactobacillus plantarum* TERHADAP BIOFILM  
*Staphylococcus epidermidis***

**SKRIPSI**

**Oleh:  
AHMAD ZAKARIA  
NIM. 210602110118**



**PROGRAM STUDI BIOLOGI  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM  
MALANG  
2025**

**POTENSI ANTIBIOFILM *CELL FREE SUPERNATANT* (CFS)  
*Lactobacillus plantarum* TERHADAP BIOFILM  
*Staphylococcus epidermidis***

**SKRIPSI**

**Oleh:  
AHMAD ZAKARIA  
NIM. 210602110118**

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

**PROGRAM STUDI BIOLOGI  
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI  
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM  
MALANG  
2025**

**POTENSI ANTIBIOFILM CELL FREE SUPERNATANT (CFS)  
*Lactobacillus plantarum* TERHADAP BIOFILM  
*Staphylococcus epidermidis***

**SKRIPSI**

**Oleh:  
AHMAD ZAKARIA  
NIM. 210602110118**

**Telah diperiksa dan disetujui untuk diuji  
tanggal:**

**Pembimbing I**



**Prof. Dr. Hj. Ulfah Utami, M.Si  
NIP. 19650509 199930 2 002**

**Pembimbing II**



**Dr. H. Eko Budi Minarno, M.Pd  
NIP. 19630114 199903 1 001**

**Mengetahui,  
Ketua Program Studi Biologi**



**Prof. Dr. Evika Sandi Savitri, M.P  
NIP. 19741018 200312 2002**

**POTENSI ANTIBIOFILM *CELL FREE SUPERNATANT* (CFS) *Lactobacillus plantarum* TERHADAP BIOFILM *Staphylococcus epidermidis***

**SKRIPSI**

Oleh:  
**AHMAD ZAKARIA**  
NIM. 210602110118

telah dipertahankan di depan Dewan Penguji Skripsi dan dinyatakan diterima sebagai salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains (S.Si.) Tanggal: 12 Juni 2025

**Ketua Penguji** : Tyas Nyonita Punjungsari, M.Sc.  
NIP. 19920507 201903 2 026  
**Anggota Penguji 1** : Prilya Dewi Fitriasari, M.Sc.  
NIP. 19900428 2016080 1 2062  
**Anggota Penguji 2** : Prof. Dr. Hj. Ulfah Utami, M.Si.  
NIP. 19650509 199930 2 002  
**Anggota Penguji 3** : Dr. H. Eko Budi Minarno, M.Pd.  
NIP. 19630114 199903 1 001

  
.....  
  
.....  
  
.....  
  
.....



Mengesahkan,  
Ketua Program Studi Biologi

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

## HALAMAN PERSEMBAHAN

Dengan segala kerendahan hati dan rasa syukur yang mendalam kepada Allah SWT, karya tulis ini penulis persembahkan kepada:

1. Allah SWT, Dzat Yang Maha Kuasa, Maha Pengasih dan Maha Penyayang. Atas segala nikmat yang tak terhingga, taufik serta hidayah-Nya yang senantiasa menyertai setiap langkah penulis. Tanpa izin dan ridha-Nya, tak mungkin penulis mampu menyelesaikan tugas akhir ini. Segala pencapaian ini hanyalah bagian kecil dari rahmat-Nya yang begitu luas.
2. Kedua orang tua tercinta, yang dengan cinta, doa, dan pengorbanannya telah mengiringi setiap perjuangan penulis. Ayah dan Ibu, terima kasih atas kerja keras, kasih sayang, dan restu yang tak pernah putus. Setiap tetes peluh dan doa kalian adalah semangat utama dalam menyelesaikan karya ini. Semoga Allah SWT membalas semua kebaikan dan keikhlasan kalian dengan pahala yang berlipat ganda dan surga-Nya.
3. Para dosen dan pembimbing, khususnya dosen pembimbing skripsi, yang telah membimbing dengan sabar, memberikan ilmu, masukan, dan arahan yang sangat berharga selama proses penulisan ini.
4. Sahabat-sahabat dan rekan seperjuangan, yang telah memberikan semangat, kebersamaan, dan kenangan indah selama menempuh perjalanan akademik ini.
5. Diriku sendiri, yang telah bertahan, berjuang, dan tidak menyerah dalam menghadapi setiap tantangan selama proses penulisan skripsi ini.
6. Almarhumah kakak saya dan adik saya yang selalu ada di dalam lubuk hati saya walaupun kehadirannya sudah tidak bisa lagi ada di dunia ini.

## PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Ahmad Zakaria  
NIM : 210602110118  
Program Studi : Biologi  
Fakultas : Sains dan Teknologi  
Judul Penelitian : Potensi Antibiofilm *Cell-Free Supernatant* (CFS)  
*Lactobacillus plantarum* Terhadap Biofilm  
*Staphylococcus epidermidis*

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 akademik maupun hukum atas perbuatan tersebut.

Malang, 19 Juni 2025

Yang membuat pernyataan:



Ahmad Zakaria

NIM. 210602110118

## **PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI**

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

**POTENSI ANTIBIOFILM *CELL FREE SUPERNATANT* (CFS) *Lactobacillus plantarum* TERHADAP BIOFILM *Staphylococcus epidermidis***

Ahmad Zakaria, Ulfah Utami, Eko Budi Minarno

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

**ABSTRAK**

Infeksi yang disebabkan oleh mikroba, khususnya bakteri, merupakan tantangan signifikan dalam dunia kesehatan dengan tingkat morbiditas dan mortalitas yang tinggi. *Staphylococcus epidermidis*, memiliki kemampuan membentuk biofilm yang dapat meningkatkan resistensi terhadap antibiotik dan menghambat pengobatan. Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian terkait dengan antibiofilm terhadap biofilm yang dihasilkan oleh bakteri *S. epidermidis* menggunakan *Cell free supernatant* (CFS) yang dihasilkan oleh *L. plantarum* yang mengandung berbagai senyawa aktif seperti eksopolisakarida, biosurfaktan, asam organik, dan bakteriosin sebagai senyawa antibiofilm. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis potensi CFS dari *Lactobacillus plantarum* dalam mengatasi biofilm *S. epidermidis*. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental. Uji deteksi biofilm menggunakan metode *Congo Red Agar* dan *Microtiter Plate Assay*. Uji aktivitas antibiofilm meliputi uji pencegahan penempelan biofilm, uji penghambatan pembentukan biofilm, dan uji penghancuran biofilm dilakukan dengan metode *Microtiter Plate Assay*. Konsentrasi CFS yang digunakan yaitu 12,5%, 25%, dan 50%. Hasil uji kemudian dianalisis dengan menggunakan SPSS. Penelitian ini menunjukkan bahwa CFS *L. plantarum* memiliki potensi antibiofilm terhadap bakteri *S. epidermidis* melalui aktivitas pencegahan penempelan, penghambatan pertumbuhan, dan degradasi biofilm.

Kata kunci: *Antibiofilm*, *Biofilm*, *cell free supernatant*, *Staphylococcus epidermidis*, *Lactobacillus plantarum*.

**THE ANTIBIOFILM POTENTIAL OF *Lactobacillus plantarum* CELL-FREE SUPERNATANT AGAINST BIOFILM FORMATION BY *Staphylococcus epidermidis***

Ahmad Zakaria, Ulfah Utami, Eko Budi Minarno

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

**ABSTRACT**

Infections caused by microbes, particularly bacteria, represent a significant challenge in the healthcare field due to their high morbidity and mortality rates. *Staphylococcus epidermidis* has the ability to form biofilms, which can increase resistance to antibiotics and hinder treatment. Therefore, research is needed on antibiofilm strategies against biofilms produced by *S. epidermidis* using cell-free supernatant (CFS) derived from *Lactobacillus plantarum*, which contains various active compounds such as exopolysaccharides, biosurfactants, organic acids, and bacteriocins as antibiofilm agents. This study aims to analyze the potential of CFS from *L. plantarum* in combating *S. epidermidis* biofilms. This research is experimental in nature. Biofilm detection was carried out using the Congo Red Agar method and the Microtiter Plate Assay. Antibiofilm activity tests included assays for the prevention of biofilm adhesion, inhibition of biofilm formation, and degradation of preformed biofilms, all conducted using the Microtiter Plate Assay method. The CFS concentrations used were 12.5%, 25%, and 50%. The results were analyzed using SPSS. This study indicates that *L. plantarum* CFS has antibiofilm potential against *S. epidermidis* through adhesion prevention, growth inhibition, and biofilm degradation activities.

Keywords: *Antibiofilm, Biofilm, Cell Free Supernatant, Staphylococcus epidermidis, Lactobacillus plantarum.*

## ضد *Lactobacillus plantarum* القدرة المضادة للتشكل الحيوي للمستخلص الخالي من الخلايا لـ *Staphylococcus epidermidis* تكوين الغشاء الحيوي بواسطة

أحمد زكريا، ألفة أوتامي، إكو بودي مينارنو

قسم الأحياء، كلية العلوم والتكنولوجيا، جامعة مولانا مالك إبراهيم الإسلامية الحكومية مالانج

### الملخص

تُعدّ العدوى التي تسببها الميكروبات، وخصوصًا البكتيريا، تحدّيًا كبيرًا في المجال الصحي لما لها من معدلات قدرة على تكوين الأغشية الحيوية، *Staphylococcus epidermidis* مراضة ووفيات عالية. تُظهر بكتيريا مما يزيد من مقاومتها للمضادات الحيوية ويُعيق العلاج. لذلك، من الضروري إجراء أبحاث حول العوامل الذي (CFS) باستخدام المُستخلص الخالي من الخلايا *S. epidermidis* المضادة للأغشية الحيوية الناتجة عن ، لاحتوائه على مركبات نشطة متعددة مثل *Lactobacillus plantarum* تنتج بكتيريا الإكسوبوليسكاريدات، والنيوسورفاكتانت، والأحماض العضوية، والبكتريوسينات التي تُعدّ عوامل مضادة في مكافحة *L. plantarum* المأخوذ من CFS لتكوّن الأغشية الحيوية. تهدف هذه الدراسة إلى تحليل قدرة تُعدّ هذه الدراسة دراسة تجريبية. تمّ الكشف عن تكوّن الأغشية *S. epidermidis* الأغشية الحيوية لبكتيريا اشتملت اختبارات *Microtiter Plate Assay* وطريقة Congo Red Agar الحيوية باستخدام طريقة النشاط المضاد للأغشية الحيوية على اختبار منع التصاق الأغشية، واختبار تثبيط تكوّن الأغشية الحيوية، تم استخدام تراكيز *Microtiter Plate Assay* واختبار تدمير الأغشية المتكوّنة سابقًا، باستخدام طريقة تُشير نتائج SPSS وهي 12.5%، 25%، و50%. ثم تم تحليل النتائج باستخدام برنامج CFS مختلفة من *S. epidermidis* يمتلك قدرة مضادة للأغشية الحيوية ضد بكتيريا *L. plantarum* المستخلص من CFS الدراسة إلى أن من خلال نشاطه في منع الالتصاق، وتثبيط النمو، وتفكيك الأغشية الحيوية *epidermidis*

الكلمات المفتاحية: مضاد لتكوين الأغشية الحيوية، الغشاء الحيوي، الراشح الخالي من الخلايا، المكورات *Lactobacillus plantarum*، *Staphylococcus epidermidis* العنقودية البشرية

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Allah SWT yang telah menganugrahkan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir yang berjudul ”Potensi Antibiofilm *Cell-Free Supernatant (CFS) Lactobacillus plantarum* Terhadap Biofilm *Staphylococcus epidermidis*”. Tidak lupa shalawat dan salam disampaikan kepada junjungan Nabi besar Muhammad SAW. Yang telah menegakkan agama Islam yang terpatri hingga akhir zaman. Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada seluruh pihak yang berperan serta dalam penyelesaian studi penulis, terkhusus kepada:

1. Prof. Dr. H. M. Zainuddin, M.A selaku Rektor Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang.
2. Prof. Dr. Hj. Sri Harini, M.Si selaku Dekan Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
3. Prof. Dr. Evika Sandi Savitri, M.P selaku Ketua Program Studi Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.
4. Tyas Nyonita Punjungsari, M.Sc selaku dosen wali yang telah memberikan bimbingan kepada penulis dari awal hingga akhir studi.
5. Prof. Dr. Hj. Ulfah Utami, M.Si selaku pembimbing bidang biologi yang telah banyak meluangkan waktu, tenaga, dan pikiran untuk memberikan bimbingan dengan penuh kesabaran.
6. Dr. H. Eko Budi Minarno, M.Pd selaku dosen pembimbing bidang integrasi yang telah banyak memberikan bimbingan terkait integrasi sains dan islam.
7. Seluruh Bapak/Ibu dosen dan laboran di Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang telah memberikan ilmunya dan memfasilitasi penelitian di laboratorium.
8. Kedua orang tua Ayahanda Bapak Joko Harwanto dan Ibunda Ida Zubaidah yang selalu memberikan motivasi, semangat, serta doa untuk penulis.
- 9.

Semoga segala kebaikan yang diberikan mendapatkan balasan kebaikan dari Allah SWT. Penulis berharap semoga skripsi ini bermanfaat bagi segenap pembaca. Semoga Allah SWT. senantiasa melimpahkan rahmat dan rida-Nya kepada kita semua. Aamiin.

Malang, 20 Mei 2025

Penulis

## DAFTAR ISI

|                          |    |
|--------------------------|----|
| HALAMAN JUDUL.....       |    |
| HALAMAN PERSETUJUAN..... | i  |
| ABSTRAK .....            | ii |
| KATA PENGANTAR.....      | v  |
| DAFTAR ISI.....          | vi |
| DAFTAR TABEL.....        | ix |
| DAFTAR GAMBAR .....      | x  |
| DAFTAR SINGKATAN .....   | xi |

### BAB I. PENDAHULUAN

|                             |   |
|-----------------------------|---|
| 1.1 Latar Belakang .....    | 1 |
| 1.2 Rumusan Masalah .....   | 5 |
| 1.3 Tujuan Penelitian ..... | 6 |
| 1.4 Manfaat Penelitian..... | 6 |
| 1.5 Batasan Masalah.....    | 6 |

### BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

|   |    |
|---|----|
| 2.1 Tinjauan Bakteri Penghasil Biofilm dan Bakteri Antibiofilm dalam Perspektif Al-Qur'an.....    | 8  |
| 2.2 <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....   | 9  |
| 2.2.1 Klasifikasi <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....   | 9  |
| 2.2.2 Karakteristik <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....                                       | 9  |
| 2.2.3 Patogenitas <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....   | 10 |
| 2.3 <i>Lactobacillus plantarum</i> .....  | 12 |
| 2.3.1 Klasifikasi <i>Lactobacillus plantarum</i> .....  | 12 |
| 2.3.2 Karakteristik <i>Lactobacillus plantarum</i> .....  | 13 |
| 2.3.3 <i>Cell-Free Supernatant (CFS) Lactobacillus plantarum</i> sebagai Senyawa Antibiofilm..... | 14 |
| 2.4 Biofilm.....  | 16 |
| 2.4.1 Definisi Biofilm.....   | 16 |
| 2.4.2 Struktur Biofilm.....   | 17 |
| 2.4.3 Mekanisme Pembentukan Biofilm .....   | 18 |
| 2.4.4 Pembentukan Biofilm pada <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....                            | 20 |
| 2.5 Quorum Sensing .....  | 22 |
| 2.6 Fungsi dan Peranan Biofilm dalam Resistensi Bakteri .....                                     | 24 |
| 2.7 Uji Pembentukan Biofilm.....  | 26 |
| 2.7.1 Metode <i>Congo Red Agar</i> .....  | 26 |
| 2.7.2 Metode Tabung .....   | 26 |
| 2.7.3 Metode <i>Tissue Culture Plate (TCP) / Microtiter Plate (MtP)</i> .....                     | 27 |
| 2.8 Optical Density .....   | 28 |
| 2.9 Uji Aktivitas Antibiofilm.....  | 29 |

### BAB III. METODE PENELITIAN

|   |           |
|---|-----------|
| 3.1 Rancangan Penelitian .....  | 30        |
| 3.2 Waktu dan Tempat .....  | 30        |
| 3.3 Alat dan Bahan .....  | 30        |
| 3.3.1 Alat.....   | 30        |
| 3.3.2 Bahan.....  | 30        |
| 3.4 Prosedur Penelitian .....   | 31        |
| 3.4.1 Sterilisasi Alat .....  | 31        |
| 3.4.2 Pembuatan Media.....  | 31        |
| 3.4.3 Peremajaan Isolat Bakteri .....   | 32        |
| 3.4.4 Pembuatan <i>Cell Free Supernatant</i> .....  | 32        |
| 3.4.5 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji .....  | 33        |
| 3.4.6 Pembuatan Kelompok Kontrol.....   | 33        |
| 3.4.7 Uji Deteksi Pembentukan Biofilm .....   | 33        |
| 3.4.8 Uji Aktivitas Antibiofilm .....   | 35        |
| 3.4.8.1 Uji Penghambatan Perlekatan Biofilm.....  | 35        |
| 3.4.8.2 Uji Penghambatan Pertumbuhan Biofilm .....  | 36        |
| 3.4.8.3 Uji Degradasi Biofilm .....   | 36        |
| 3.5 Analisis Data .....   | 37        |
| <br>  |           |
| <b>BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN</b>   |           |
| 4.1 Pembentukan Biofilm <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....   | 43        |
| 4.2 Aktivitas Antibiofilm <i>Cell-Free Supernatant Lactobacillus plantarum</i> Terhadap <i>Staphylococcus epidermidis</i> ..... | 48        |
| 4.2.1 Uji Pencegahan Penempelan Biofilm <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....   | 48        |
| 4.2.2 Uji Penghambatan pembentukan Biofilm <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....  | 52        |
| 4.2.3 Uji Penghancuran/Degradasi Biofilm <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....  | 56        |
| 4.3 Tinjauan Hasil Penelitian dalam Perspektif Al-Qur'an .....  | 60        |
| <br>  |           |
| <b>BAB V. PENUTUP</b>   |           |
| 5.1 Kesimpulan .....  | 63        |
| 5.2 Saran .....   | 63        |
| <br>  |           |
| <b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>  | <b>65</b> |
| <br>  |           |
| <b>LAMPIRAN.....</b>  | <b>72</b> |
| 1. Alat-alat Yang Digunakan Dalam Penelitian .....  | 72        |
| 2. Komposisi Media.....   | 73        |
| 3. Proses Pembuatan Cell-Free Supernatant (CFS) <i>L. Plantarum</i> ....  | 75        |
| 4. Uji Pembentukan Biofilm .....  | 76        |
| 5. Gambaran Uji Deteksi Pembentukan Biofilm pada <i>Microplate</i> ...  | 77        |
| 6. Gambaran Uji Aktivitas Antibiofilm pada <i>Microplate</i> .....  | 78        |
| 7. Hasil Uji Aktivitas Pencegahan Penempelan Biofilm pada <i>Microplate</i> .....   | 79        |
| 8. Hasil Uji Aktivitas Penghambatan Pertumbuhan Biofilm pada <i>Microplate</i> .....  | 79        |

|     |   |    |
|-----|---|----|
| 9.  | Hasil Uji Penghancuran/Degradasi Biofilm pada <i>Microplate</i> .....             | 79 |
| 10  | Data Hasil Uji Antibiofilm .....  | 80 |
| 11. | Analisis Data Uji Pencegahan Penempelan Biofilm.....                              | 82 |
| 12. | Analisis Data Uji Penghambatan Pertumbuhan Biofilm<br><i>S. epidermidis</i> ..... | 84 |
| 13  | Analisis Data Uji Penghancuran Biofilm <i>S. epidermidis</i> .....                | 86 |

## DAFTAR TABEL

| Tabel   | Halaman |
|---|---------|
| 2.1 Interpretasi Hasil OD .....                     | 26      |
| 3.1 Interpretasi Hasil OD .....                     | 33      |
| 4.1 Nilai OD dan Hasil Pengkategorian Biofilm ..... | 46      |

## DAFTAR GAMBAR

| Gambar  | Halaman |
|---|---------|
| 2.1 <i>Staphylococcus epidermidis</i> pada Mikroskop Elektron .....   | 10      |
| 2.2 Intervensi medis termasuk luka operasi dan berbagai perangkat medis implan yang dikaitkan dengan peningkatan risiko <i>S. epidermidis</i> ..... | 12      |
| 2.3 <i>Lactobacillus plantarum</i> pada Mikroskop Elektron .....  | 13      |
| 2.4 Beberapa mekanisme molekuler sekresi zat antagonis .....  | 15      |
| 2.5 Tahapan dan Mekanisme Pembentukan Biofilm.....  | 18      |
| 2.6 Heterogenitas Temporal dan Spasial dalam Biofilm Stafilokokus.....  | 21      |
| 2.7 Mekanisme Kuorum Sensing pada Bakteri Gram Negatif.....   | 23      |
| 2.8 Mekanisme Kuorum Sensing pada Bakteri Gram positif .....  | 24      |
| 2.9 Koloni Bakteri pada <i>Congo Red Agar</i> .....   | 26      |
| 2.10 Penilaian Pembentukan Biofilm.....   | 27      |
| 2.11 Metode Microtiter Plate .....  | 28      |
| 4.1 Hasil uji deteksi pembentukan biofilm bakteri <i>S. epidermidis</i> pada media CRA.....   | 43      |
| 4.2 Hasil uji deteksi pembentukan biofilm bakteri <i>S. epidermidis</i> pada microplate .....   | 45      |
| 4.3 Hasil OD uji pencegahan penempelan biofilm <i>S. epidermidis</i> .....  | 48      |
| 4.4 Presentase aktivitas pencegahan penempelan biofilm <i>S. epidermidis</i> .....  | 49      |
| 4.5 Hasil OD uji penghambatan pembentukan biofilm <i>S. epidermidis</i> .....   | 52      |
| 4.6 Presentase aktivitas penghambatan pembentukan biofilm <i>S. epidermidis</i> .....   | 53      |
| 4.7 Hasil OD uji penghancuran biofilm <i>S. epidermidis</i> .....   | 56      |
| 4.8 Presentase penghancuran biofilm <i>S. epidermidis</i> .....   | 57      |

## DAFTAR SINGKATAN

| Simbol/Singkatan      | Keterangan                                       |
|-----------------------|--|
| <i>L. plantarum</i>   | <i>Lactobacillus plantarum</i>                   |
| <i>S. epidermidis</i> | <i>Staphylococcus epidermidis</i>                |
| BAL                   | Bakteri Asam Laktat                              |
| CFS                   | <i>cell-free supernatant</i>                     |
| EPS                   | <i>extracellular polymeric substance</i>         |
| PIA                   | <i>Polysaccharide Intercellular Adhesin</i>      |
| Ica                   | <i>intracellular adhesion</i>                    |
| AI                    | <i>autoinducer</i>                               |
| AHL                   | <i>acyl homoserine lactones</i>                  |
| AIP                   | <i>autoinducible peptide</i>                     |
| DNA                   | <i>Deoxyribo Nucleid Acid</i>                    |
| NA                    | <i>Nutrient Agar</i>                             |
| MRSA                  | <i>de Mann Rogosa Sharpe Agar</i>                |
| MRSB                  | <i>de Mann Rogosa Sharpe Broth</i>               |
| TSB                   | <i>Tryptic Soy Broth</i>                         |
| CRA                   | <i>Congo Red Agar</i>                            |
| pH                    | <i>power of Hydrogen</i>                         |
| OD                    | <i>optical density</i>                           |
| RPM                   | <i>rotation per minute</i>                       |
| SPSS                  | <i>Statistical Product and Service Solutions</i> |
| ANOVA                 | <i>Analysis of variance</i>                      |
| SD                    | <i>Standar Deviasi</i>                           |

# BAB I PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang

Allah SWT menciptakan berbagai makhluk hidup antara lain adalah mikroorganisme sebagai makhluk yang tidak kasat mata. Mikroorganisme telah diindikasikan oleh Al-Qur'an seperti pada firman Allah SWT sebagai berikut:

وَالْخَيْلَ وَالْبِغَالَ وَالْحَمِيرَ لِتَرْكَبُوهَا وَزِينَةً وَيَخْلُقُ مَا لَا تَعْلَمُونَ ﴿٨﴾ (النحل/16:8)

Artinya: “(Dia telah menciptakan) kuda, bagal, dan keledai untuk kamu tunggangi dan (menjadi) perhiasan. Allah menciptakan apa yang tidak kamu ketahui.” (Q.S An-Nahl/16:8).

Menurut Quraish Shihab (2002) dalam Tafsir Al-Misbah Jilid 7, penggalan akhir ayat (وَيَخْلُقُ مَا لَا تَعْلَمُونَ) yang berarti “...Dan Allah menciptakan apa yang tidak kamu ketahui,” menunjukkan bahwa proses penciptaan oleh Allah bersifat berkelanjutan. Hal ini memberikan isyarat bahwa Allah terus menghadirkan berbagai ciptaan baru di alam semesta, yang sebagian besar belum diketahui oleh manusia pada masa lalu. Pesan ini mendorong umat manusia untuk senantiasa memperluas wawasan, menggali pengetahuan, dan memanfaatkan potensi akal yang dimiliki dalam memahami ciptaan Tuhan baik yang telah dikenal maupun yang belum tersingkap. Pada masa lampau, berbagai makhluk mikroskopis belum dapat diobservasi karena keterbatasan alat. Namun, seiring kemajuan teknologi, manusia berhasil mengembangkan instrumen seperti mikroskop, yang memungkinkan pengamatan terhadap organisme yang tidak tampak oleh mata telanjang (Musthafa *et al.*, 2022).

Dalam tinjauan ilmiah, makhluk-makhluk yang tidak tampak oleh mata telanjang dikenal sebagai mikroorganisme atau mikroba (Musthafa *et al.*, 2022). Mikroorganisme ini merupakan entitas biologis yang mampu bertahan hidup secara bebas di berbagai jenis habitat. Mereka dapat ditemukan di udara, air, tanah, pada permukaan benda, serta di dalam tubuh manusia. Mikroba terbagi ke dalam beberapa kategori, salah satunya adalah bakteri. Bakteri termasuk dalam kelompok organisme prokariotik, yaitu organisme yang tidak memiliki membran inti sel. Setiap jenis bakteri memiliki struktur morfologis dan karakteristik fisiologis yang berbeda-beda. Bakteri ada yang bersifat non patogen dan patogen (Badaring dan Bahr, 2020). Bakteri non patogen adalah bakteri yang tidak menyebabkan penyakit

seperti bakteri asam laktat (BAL), sementara bakteri patogen adalah bakteri yang dapat menyebabkan penyakit dengan menyebabkan infeksi kontak langsung maupun tidak langsung seperti melalui udara, orang, atau benda yang terkontaminasi. Seperti bakteri *Staphylococcus epidermidis* yang dikenal sebagai salah satu bakteri komensal yang mampu membentuk biofilm secara efektif pada permukaan benda asing seperti kateter atau implan. Kemampuan ini memfasilitasi kolonisasi jangka panjang serta memberikan perlindungan terhadap respons imun inang dan terapi antibiotik, yang dapat memperparah infeksi sistemik pada individu yang rentan (Burke *et al*, 2023).

Bakteri *Staphylococcus* merupakan genus bakteri yang memiliki lebih dari 30 jenis spesies, diantaranya yang memiliki pengaruh besar dalam bidang klinis adalah *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* dan *Staphylococcus saprophyticus*. Dari spesies *Staphylococcus* tersebut, terutama *Staphylococcus epidermidis* merupakan bakteri patogen yang paling sering menginfeksi alat medis rumah sakit (Klubthawee, 2023) terutama pada implant medis seperti kateter, silicon, piccline, dan tabung endotrakeal). Infeksi yang disebabkan oleh *S. epidermidis* dalam banyak situasi disebabkan oleh kemampuannya untuk menghasilkan peptida PSM yang berperan dalam pembentukan biofilm pada permukaan biotik (jaringan inang) atau permukaan inert perangkat medis (implan medis, kateter, prostesis) (Oliviera *et al*, 2021).

Biofilm adalah faktor virulensi yang memungkinkan bakteri planktonik untuk melekat pada permukaan dan menghasilkan agregat seluler, sehingga membentuk mikrokoloni sessile yang dikelilingi oleh matriks ekstraseluler polimer yang sebagian besar dibentuk oleh protein, karbohidrat, lipid, dan DNA, meningkatkan reaksi sistem imun inang serta resistensinya terhadap antibiotik (Sharma *et al*, 2023). Karakteristik ini membuat biofilm sulit untuk dihilangkan. Jika biofilm bertahan pada instrumen bedah atau implan medis, bakteri hidup dapat menyebabkan infeksi yang didapat di rumah sakit, yang mengakibatkan masalah kesehatan masyarakat dan peningkatan biaya rumah sakit. Kontaminasi implan medis ini dapat menyebabkan malfungsi alat, infeksi sistemik melalui penyebaran hematogen agen bakteri, dan bahkan kerusakan jaringan yang mengakibatkan penyakit parah dan kematian (Moris, *et al*, 2022).

Bakteri yang berada dalam struktur biofilm memiliki ketahanan yang lebih tinggi terhadap berbagai tekanan lingkungan, disebabkan oleh adanya lapisan matriks pelindung yang mengelilinginya. Struktur ini juga membuat biofilm sangat sulit untuk dihilangkan, terutama ketika menempel pada permukaan biomaterial. Kemampuannya untuk berikatan kuat memungkinkan biofilm tetap bertahan meskipun telah mengalami paparan gesekan berulang (Hidayati & Liuwan, 2019). Misalnya, pada endoskopi fleksibel yang digunakan dalam gastroenterologi adalah permukaan yang ideal untuk pertumbuhan biofilm. Banyak bakteri yang hidup ditemukan pada endoskopi meskipun rumah sakit telah melakukan proses pembersihan, disinfeksi, dan sterilisasi (Kovaleva *et al*, 2013). Pada infeksi terkait biomaterial, sumber utama kontaminasi adalah kulit pasien yang satu diantaranya berasal dari bakteri *Staphylococcus epidermidis*. Hal ini karena *Staphylococcus epidermidis* merupakan flora bakteri yang berada pada kulit yang menyebabkan bakteri tersebut bisa dengan mudah menempati dan menempel pada luka maupun implan medis. Ketika alat medis ditanamkan, kontak dengan kulit sudah cukup untuk mengontaminasi implan, sehingga perlu adanya upaya antisipasi berupa pengendalian biofilm untuk meminimalisir infeksi dari bakteri *S.epidermidis* tersebut (Rachmawati dkk, 2019).

Strategi pengendalian biofilm umumnya dilakukan melalui tiga pendekatan utama, yaitu secara fisik, kimiawi, dan biologis. Pendekatan biologis memanfaatkan aktivitas mikroorganisme tertentu, khususnya bakteri, yang memiliki kemampuan sebagai agen antibiofilm (Yana *et al.*, 2019). Bakteri yang digunakan dalam metode ini dinilai efektif karena mampu menghasilkan berbagai senyawa metabolit yang berperan dalam menghambat atau menghancurkan biofilm patogen. Mekanisme pengendalian tersebut dapat berlangsung melalui proses biologis seperti *quorum quenching*, yaitu gangguan terhadap komunikasi antar sel bakteri, maupun melalui produksi enzim yang mampu menguraikan komponen EPS (ekstraseluler polimerik substansi) penyusun biofilm (Li *et al.*, 2021).

Antibiofilm yang berasal dari bakteri memiliki beberapa keunggulan dibandingkan kapang, jamur, dan tumbuhan. Enzim dan metabolit bakteri seperti glycoside hydrolases, biosurfaktan, dan antimicrobial peptides (AMP) terbukti mampu menghancurkan biofilm lintas spesies dengan lebih efektif karena dapat

merusak matriks EPS dan menghambat ekspresi gen pembentuk biofilm. Selain itu, produksi senyawa aktif oleh bakteri lebih stabil dan efisien secara industri, serta lebih mudah dimodifikasi secara genetik dibandingkan organisme lain. Pendekatan ini juga menunjukkan resistensi yang lebih rendah dan telah mencapai tahap uji klinis, sedangkan senyawa seperti fitokimia dari tumbuhan atau fungi sebagian besar masih terbatas pada penelitian *in vitro* dan belum mencapai tahap uji klinis (Mishra *et al*, 2020).

Bakteri asam laktat (BAL) dari family Lactobacteriaceae merupakan salah satu kelompok bakteri yang memiliki peranan yang menguntungkan dan sering dijadikan sebagai probiotik yang bermanfaat bagi manusia. Bakteri probiotik ini memiliki potensi sebagai anti jamur, anti bakteri, anti tumor, termasuk juga anti biofilm dengan mekanisme EPSnya (Abdelaziz *et al*, 2018). Selain itu, bakteri asam laktat (BAL) merupakan salah satu kelompok probiotik paling vital yang dikaitkan dengan beberapa sifat fungsional. Bakteri asam laktat (BAL) dianggap sebagai probiotik dengan kemungkinan terbesar untuk dimanfaatkan sebagai pembuatan “*natural food*”, yang alami dan sehat (Ayivi *et al*, 2020).

Salah satu spesies bakteri probiotik yang termasuk dalam kelompok bakteri asam laktat (BAL) dan berpotensi digunakan sebagai agen antibakteri sekaligus penghambat biofilm patogen adalah *Lactobacillus plantarum* (Elez *et al.*, 2023). *Lactobacillus plantarum* (*Streptobacterium plantarum*) seperti yang dikemukakan oleh Orla-Jensen pada tahun 1919, adalah spesies bakteri asam laktat Gram-positif, heterofermentatif fakultatif, yang juga sebagian besar tersebar di alam. *Lactobacillus plantarum* adalah mikroba yang luar biasa karena dapat beradaptasi dengan beragam lingkungan yang berbeda. Selain itu, sangat toleran terhadap berbagai kondisi yang ekstrem termasuk tekanan sistem pencernaan, saluran pencernaan, vagina, dan urogenital (Abdelaziz *et al*, 2018). BAL termasuk juga *Lactobacillus plantarum* mampu menghambat banyak patogen dan bersifat antagonis terhadap bakteri patogen dengan mekanisme pelepasan berbagai senyawa aktif fungsional termasuk asam organik, eksopolikharida dan bakteriosin yang secara alami dilepaskan ke dalam bakteri media pertumbuhan. Senyawa ini mempunyai sifat antibakteri dan potensi antibiofilm yang mampu menghambat infektivitas bakteri patogen. Senyawa-senyawa aktif tersebut perlu diekstraksi

dalam bentuk zat metabolik terlarut *Cell free supernatant* (CFS) atau Postbiotik. (Mao *et al*, 2023).

*Cell free supernatant* (CFS) adalah zat metabolik terlarut yang dibuat oleh BAL yang hidup atau dibebaskan setelah kerusakan sel bakteri dan dianggap sebagai bentuk olahan yang baik dibandingkan bentuk-bentuk lainnya seperti ekstrak kasar, fraksi murni dan senyawa rekombinan. CFS dari BAL kemudian dapat digunakan untuk menghambat dan mengelola proliferasi bakteri penyebab penyakit dan pembentukan biofilm. Cell-Free Supernatant (CFS) dari bakteri dianggap lebih baik dibandingkan bentuk olahan ekstrak kasar, fraksi murni, atau senyawa rekombinan karena bentuk olahan CFS mengandung campuran alami senyawa bioaktif seperti asam organik, biosurfaktan, dan antimicrobial peptides yang bekerja sinergis terhadap biofilm. Keberagaman ini memungkinkan CFS menyerang biofilm melalui berbagai mekanisme sekaligus, mulai dari degradasi matriks EPS hingga penghambatan quorum sensing, sehingga meningkatkan efektivitas dan menurunkan risiko resistensi mikroba. Selain itu, CFS bersifat stabil, bebas sel, mudah diaplikasikan tanpa proses pemurnian kompleks, serta lebih mencerminkan kondisi biologis alami dibanding senyawa tunggal hasil rekayasa atau pemisahan kimia. Oleh karena itu, pendekatan menggunakan CFS dinilai lebih efisien dan relevan untuk aplikasi praktis antibiofilm (Kalam dan Ali, 2021).

Penciptaan Bakteri Asam Laktat (BAL) oleh Allah SWT tentu mengandung hikmah dan tujuan tertentu. Hal ini sejalan dengan firman-Nya dalam Q.S Al-'Ankabut ayat 44 sebagai berikut:

خَلَقَ اللَّهُ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضَ بِالْحَقِّ إِنَّ فِي ذَلِكَ لَآيَةً لِّلْمُؤْمِنِينَ ﴿٤٤﴾ (العنكبوت/29: 44)

Artinya: “Allah menciptakan langit dan bumi dengan hak. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda (kebesaran Allah) bagi orang-orang mukmin. Allah Swt. menciptakan semua yang disebutkan itu bukan dengan percuma, melainkan dengan penuh hikmah.” (Al-'Ankabut/29:44)

Menurut Imam Jalaluddin Al-Mahally dalam Tafsir Jalalain jilid 2 (2014) kata ( بِالْحَقِّ ) berarti (dengan tujuan yang benar dan tidak sia-sia) hal ini menunjukkan bahwa penciptaan langit dan bumi bukanlah hal yang tanpa maksud, melainkan penuh hikmah manfaat dan tujuan yang ditujukan untuk orang-orang yang mukmin

(لِّلْمُؤْمِنِينَ) tidak lain untuk meningkatkan keimanannya atas penciptaan Allah SWT tersebut. Dalam hal ini, penciptaan mikroorganisme seperti BAL merupakan bagian dari sistem ciptaan Allah SWT yang kompleks dan penuh hikmah. BAL memiliki peran penting dalam kehidupan manusia, seperti antibiofilm bakteri, yang mencerminkan manfaat dan tujuan dari penciptaan-Nya. Dengan demikian, ayat ini mengajarkan bahwa setiap ciptaan Allah SWT, termasuk mikroorganisme seperti BAL, memiliki tujuan dan manfaat tertentu yang mendukung kehidupan manusia dan menunjukkan kebesaran-Nya (Tafsir Jalalain Jilid 2, 2014).

Kemampuan CFS dari BAL *Lactobacillus plantarum* sebagai antibiofilm berkaitan dengan CFS dari bakteri tersebut yang mengandung berbagai senyawa aktif biologis termasuk eksopolisakarida dan protein. CFS dari *Lactobacillus plantarum* dapat memberikan efek antimikroba, dan senyawa antimikroba dalam CFS terutama meliputi asam laktat, asam asetat, hidrogen peroksida, asam lemak rantai panjang dan esternya, dan senyawa protein. CFS juga mengandung zat mirip biosurfaktan yang dapat menghambat pembentukan biofilm. Selain itu, CFS dapat menghambat pertumbuhan dan pembentukan biofilm melalui zat mirip bakteriosin. Dengan adanya senyawa-senyawa tersebut, proses perlekatan sel bakteri patogen pada permukaan dapat dicegah. Selain itu, senyawa ini juga berperan dalam menghambat adhesi, mengganggu ekspresi gen yang berhubungan dengan pembentukan biofilm, serta berkontribusi dalam proses degradasi struktur biofilm itu sendiri (Liang *et al.*, 2023).

Uji kemampuan CFS dari Bakteri Asam Laktat (BAL) sebagai antibiofilm merupakan bagian dari aktivitas berpikir dan mengolah ciptaan Allah SWT untuk memahami tanda-tanda kebesaran-Nya, sebagaimana yang dijelaskan dalam QS Ali Imran ayat 190 sebagai berikut:

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَاخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لَآيَاتٍ لِّأُولِي الْأَلْبَابِ ﴿١٩٠﴾ (آل عمران/3:

Artinya: “*Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi serta pergantian malam dan siang terdapat tanda-tanda (kebesaran Allah) bagi orang yang berakal.*” (Ali 'Imran/3:190)

Menurut Imam Jalaluddin Al-Mahally dalam Tafsir Jalalain jilid 1 (2014) dalam kalimat ( الْأَلْبَابِ لِأُولَى ) dijelaskan sebagai “*bagi orang-orang yang berakal*”, yaitu bagi mereka yang menggunakan akalinya untuk memikirkan atas ciptaan Allah untuk meningkatkan keimanannya. Oleh karena itu penelitian terhadap CFS dari BAL sebagai antibiofilm merupakan tindakan yang mencerminkan aktivitas "ulul albab", yaitu menggunakan akal untuk memahami dan mengambil manfaat dari ciptaan Allah SWT. Hal ini sejalan dengan perintah Allah dalam QS Ali Imran ayat 190 untuk menguraikan tanda-tanda kebesaran-Nya melalui penciptaan alam semesta (Tafsir Jalalain Jilid 1, 2014).

Hasil penelitian sebelumnya terkait pengujian 5 CFS yang berasal dari BAL *L. casei*, *L. salivarius*, *L. fermentum*, *L. gasserri*, dan *L. plantarum* dengan konsentrasi CFS 12,5% yang kemudian diujikan terhadap biofilm dari patogen *Streptococcus mutans* menunjukkan bahwa CFS *L. plantarum* memiliki efek antibiofilm yang paling kuat dibandingkan CFS yang lain yaitu dengan menyisakan pembentukan biofilm hanya 44%, sedangkan BAL yang lain masih menyisakan biofilm diatas 50%. Kemampuan sebagai antibiofilm ini karena kandungan senyawa aktif dari CFS *L. plantarum* tersebut (Liang *et al*, 2023). Selain itu penelitian yang dilakukan oleh Nufuz (2022) diketahui bahwa CFS *L. plantarum* secara efektif menghambat pembentukan biofilm oleh *S. aureus* dengan mengurangi optical density dalam pengujian aktivitas antibiofilm terutama dalam konsentrasi CFS *L. plantarum* 50% dengan nilai optical density (OD) uji penghambatan perlekatan sebesar 0,089 (menghambat 86%), uji penghambatan pertumbuhan biofilm sebesar 0,068 (menghambat 67%) dan uji degradasi biofilm sebesar 0,100 (menghambat 73%). Hal tersebut menunjukkan bahwa CFS mengurangi aktivitas hidrofobik, menghambat agregasi diri, dan menghentikan pembentukan biofilm.

Berbagai studi telah membuktikan bahwa cell-free supernatant (CFS) dari *Lactobacillus plantarum* mengandung beragam senyawa bioaktif, seperti eksopolisakarida (EPS), biosurfaktan, hidrogen peroksida, asam laktat, asam asetat,

asam lemak, serta berbagai asam organik lainnya yang memiliki peran penting dalam menghambat dan mengendalikan pembentukan biofilm oleh patogen. Kandungan senyawa tersebut menunjukkan bahwa CFS dari *L. plantarum* memiliki potensi besar sebagai agen antibiofilm. Namun demikian, sejauh ini masih terbatas jumlah penelitian yang secara spesifik mengevaluasi efektivitas CFS *L. plantarum* dalam menghambat biofilm patogen yang sering mencemari peralatan medis, termasuk implan, dan berkolonisasi di berbagai jaringan tubuh manusia—seperti yang dilakukan oleh *Staphylococcus epidermidis*. Oleh karena itu, penelitian ini penting untuk dilakukan guna mengeksplorasi potensi CFS dari *Lactobacillus plantarum* sebagai agen antibiofilm terhadap patogen *S. epidermidis*.

## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini adalah:

1. Bagaimana kemampuan bakteri *Staphylococcus epidermidis* dalam membentuk biofilm?
2. Bagaimana aktivitas antibiofilm *cell free supernatant Lactobacillus plantarum* terhadap *Staphylococcus epidermidis*?

## 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah untuk:

1. Mengetahui kemampuan produksi biofilm dari bakteri *Staphylococcus epidermidis*
2. Mengetahui aktivitas antibiofilm *cell free supernatant Lactobacillus plantarum* terhadap *Staphylococcus epidermidis*

## 1.4 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini adalah:

H0: CFS dari *Lactobacillus plantarum* tidak memiliki aktivitas antibiofilm terhadap *Staphylococcus epidermidis*.

H1: CFS dari *Lactobacillus plantarum* memiliki aktivitas antibiofilm terhadap *Staphylococcus epidermidis*.

## 1.5 Manfaat Penelitian

### 1.5.1 Manfaat Akademis

Manfaat akademis dari penelitian ini adalah memberikan kontribusi sebagai sumber informasi tambahan dalam bidang mikrobiologi, khususnya terkait potensi *cell-free supernatant (CFS)* dari *Lactobacillus plantarum* dalam menghambat dan mengatasi pembentukan biofilm oleh *Staphylococcus epidermidis*.

### 1.5.2 Manfaat Aplikatif

Manfaat aplikatif dari penelitian ini terletak pada penyediaan informasi yang berguna bagi industri, khususnya dalam pengembangan terapi antibiofilm berbasis metabolit bakteri probiotik. Penelitian ini dapat menjadi dasar dalam merancang solusi efektif untuk mengatasi biofilm bakteri patogen, seperti *Staphylococcus epidermidis*, yang sering menjadi penyebab kontaminasi pada alat medis dan implan..

## 1.6 Batasan Masalah

Batasan Masalah Penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Isolat bakteri *Lactobacillus plantarum* yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari stok kultur pada penelitian terdahulu Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Sedangkan Isolat bakteri uji *Staphylococcus epidermidis* diperoleh dari stok kultur medis Universitas Brawijaya Malang. Semua isolat bakteri yang digunakan tidak diketahui jenis strainnya.
2. Parameter dalam menentukan kemampuan bakteri *Staphylococcus epidermidis* dalam membentuk biofilm adalah dengan uji kualitatif dengan metode *Congo Red Agar (CRA)* dengan interpretasi warna dan tekstur koloni dan metode kuantitatif dengan microtiter plate melalui interpretasi hasil OD (*Optical Density*) yang terbagi menjadi kategori tidak membentuk biofilm, lemah, sedang, sampai kuat dalam membentuk biofilm. Sedangkan parameter untuk menguji aktivitas antibiofilm pada *Staphylococcus epidermidis* yaitu dengan melihat nilai OD (*Optical Density*) dari uji pencegahan penempelan biofilm, uji penghambatan pembentukan biofilm, dan uji penghancuran/degradasi biofilm.

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Tinjauan Bakteri Penghasil Biofilm dan Bakteri Antibiofilm dalam Perspektif Al-Qur'an

Bakteri yang dapat menghasilkan biofilm diantaranya adalah bakteri *Staphylococcus epidermidis* yang dapat menginfeksi dengan menghasilkan toksin seperti peptida PSM yang berperan dalam pembentukan biofilm, sementara Bakteri Asam Laktat (BAL) seperti *Lactobacillus plantarum* mampu menghasilkan senyawa aktif seperti eksopolisakarida (ESP), biosurfaktan, hidrogen peroksida, asam laktat, asam asetat, asam lemak dan asam organik lain sebagai senyawa antibiofilm (Liang *et al*, 2023). Dengan demikian ada bakteri penghasil biofilm yang bersifat patogen, dan juga ada bakteri yang menghasilkan senyawa aktif yang bersifat sebagai antibiofilm. Fenomena produk yang berlawanan ini merupakan wujud berpasangan ciptaan Allah seperti pada firman Allah SWT sebagai berikut:

وَمِنْ كُلِّ شَيْءٍ خَلَقْنَا زَوْجَيْنِ لَعَلَّكُمْ تَذَكَّرُونَ ﴿٤٩﴾ (الذّٰرِيّٰت/51: 49)

Artinya: “Segala sesuatu Kami ciptakan berpasang-pasangan agar kamu mengingat (kebesaran Allah)” (Az-Zariyat/51:49).

Menurut Quraish Shihab dalam Tafsir Al-Misbah Jilid 13 (2002) makna dari lafadz “وَمِنْ كُلِّ شَيْءٍ خَلَقْنَا زَوْجَيْنِ” (Segala sesuatu yang diciptakan oleh Allah terjadi dalam bentuk berpasang-pasangan). Hal ini mencakup seluruh ciptaan, mulai dari unsur alam seperti bumi dan langit, malam dan siang, bulan dan matahari, lautan dan daratan, hingga fenomena seperti gelap dan terang, kebahagiaan dan kesengsaraan, bahkan surga dan neraka, serta kematian dan kehidupan. Pasangan-pasangan ini juga ditemukan pada makhluk hidup seperti tumbuhan dan hewan, yang masing-masing memiliki pasangannya sendiri (Shihab, 2002). Hal ini terjadi juga di bakteri dimana itu semua merupakan kuasa Allah SWT ada baik dan ada buruk, dimana ada bakteri sebagai penghasil biofilm sebagai bakteri patogen, dan ada juga bakteri sebagai antibiofilm dari bakteri patogen tersebut.

Fenomena bakteri patogen menghasilkan biofilm yang kemudian menginfeksi merupakan wujud sebagai ujian untuk manusia, agar manusia berpikir atas hal baik dan hal buruk yang kemudian dari ujian tersebut membuat manusia

berpikir sehingga terjadi kemajuan atau perkembangan dibidang Ilmu Pengetahuan dan Teknologi (IPTEK), seperti pada firman Allah SWT sebagai berikut:

كُلُّ نَفْسٍ ذَائِقَةُ الْمَوْتِ وَنَبَلُّوكُم بِالشَّرِّ وَالْخَيْرِ فِتْنَةً وَإِلَيْنَا تُرْجَعُونَ ﴿٣٥﴾ (الانبیاء/21: 35)

Artinya: “Setiap yang bernyawa akan merasakan kematian. Kami menguji kamu dengan keburukan dan kebaikan sebagai cobaan. Kepada Kamilah kamu akan dikembalikan” (Al-Anbiya/21:35).

Menurut Quraish Shihab dalam Tafsir Al-Misbah Jilid 8 (2002) menjelaskan bahwa ujian merupakan bagian penting dari kehidupan manusia. Ujian dapat datang dalam bentuk kesulitan seperti dalam lafadz “ شَرٌّ ” (musibah, bencana, atau kematian) maupun kebaikan “ خَيْرٌ ” (kenikmatan, kekayaan, atau keberhasilan). Ujian ini bertujuan untuk mengukur sejauh mana manusia mampu bersabar, bersyukur, dan menggunakan akalnyanya untuk menghadapi tantangan hidup (Shihab, 2002). Ujian-ujian yang datang kepada manusia termasuk ujian musibah seperti sakit yang disebabkan oleh infeksi bakteri merupakan sarana untuk memicu manusia agar berpikir dan memikirkan hikmah dari setiap peristiwa yang terjadi. Dengan berpikir, manusia akan mencari solusi untuk mengatasi permasalahan tersebut, sehingga di masa yang akan datang, terjadi kemajuan di bidang IPTEK baik itu dari bidang medis, farmasi, ataupun ilmu pengetahuan lainnya.

Kemampuan bakteri *S. epidermidis* menghasilkan biofilm sebagai faktor virulensi merupakan wujud kuasa Allah SWT. Tanpa Kuasa dari Allah SWT, biofilm tidak akan mampu menjadi pelindung bagi bakteri *S. epidermidis*. Demikian pula BAL yang memiliki potensi sebagai antibiofilm melalui enzim dan senyawa aktifnya yang juga karena kuasa Allah SWT. Hal ini sebagaimana dalam firman Allah SWT Q.S Al-Anbiya ayat 30 sebagai berikut:

أولم ير الذين كفروا أن السموات والأرض كانتا رتقا ففتقنهما وجعلنا من الماء كل شيء حي أفلا

يؤمنون ﴿٣٠﴾ (الانبیاء/21: 30)

Artinya: “Apakah orang-orang kafir tidak mengetahui bahwa langit dan bumi, keduanya, dahulu menyatu, kemudian Kami memisahkan keduanya dan Kami menjadikan segala sesuatu yang hidup berasal dari air? Maka, tidakkah mereka beriman?”. (Al-Anbiya'/21:30)

Menurut Imam Jalaluddin Al-Mahally dalam Tafsir Jalalain jilid 2 (2014) kalimat (كُلُّ شَيْءٍ حَيٍّ) memiliki arti “segala sesuatu yang hidup” yang merujuk kepada segala sesuatu yang hidup seperti manusia, hewan, tumbuhan, termasuk juga mikroorganisme yang melalui penciptaan yang sangat kompleks dan teratur sebagai bukti keesaan Allah SWT. Hal ini menunjukkan bahwa seluruh kehidupan merupakan manifestasi dari kekuasaan dan kehendak Allah. Dengan demikian, kemampuan antibiofilm BAL dan pembentukan biofilm oleh *Staphylococcus epidermidis* merupakan bentuk penghayatan terhadap tanda-tanda kekuasaan Allah SWT, dan segala bentuk kehidupan, termasuk mikroorganisme seperti *S. epidermidis* dan BAL, merupakan hasil manifestasi dari kekuasaan Allah dan keesaannya (أَفَلَا يُؤْمِنُونَ) (Tafsir Jalalain jilid 2, 2014).

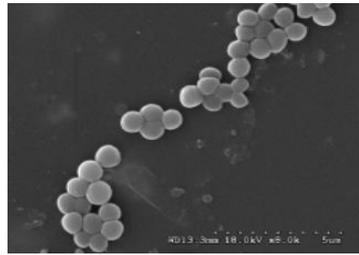
## 2.2 *Staphylococcus epidermidis*

### 2.2.1 Klasifikasi *Staphylococcus epidermidis*

Klasifikasi *Staphylococcus epidermidis* adalah sebagai berikut (ITIS,

|         |   |
|---------|---|
| Kingdom | : Bacteria  |
| Phylum  | : Firmicutes  |
| Class   | : Bacilli   |
| Order   | : Staphylococcales  |
| Family  | : Staphylococcaceae   |
| Genus   | : <i>Staphylococcus</i> (Rosenbach, 1884)                       |
| Species | : <i>Staphylococcus epidermidis</i> (Winslow dan Winslow, 1908) |

### 2.2.2 Karakteristik *Staphylococcus epidermidis*



**Gambar 2.1** *Staphylococcus epidermidis* pada mikroskop elektron (Lei *et al*, 2021).

*Staphylococcus* berasal dari kata *staphyle*, yang berarti gugusan atau kelompok anggur, sedangkan *coccus* memiliki arti granula atau bulat yang mengacu kepada morfologi yang bulat berkelompok seperti anggur (Lei *et al*, 2021) (Gambar 2.1) *Staphylococcus epidermidis* adalah bakteri gram positif anaerob fakultatif katalase-positif, koagulase-negatif (CoNS). Dengan karakteristik fenotip sel-sel *S. epidermidis* berukuran 0,5–1 mm, kokus Gram-positif, *non motil* (tidak bergerak), tersusun dalam kelompok seperti anggur dan berupa koloni putih berukuran 1–2 mm apabila ditumbuhkan pada media agar. Bakteri ini sering diisolasi dari epitel manusia, terutama dari aksila, lubang hidung, dan kepala (Skovdal *et al*, 2022). *S. epidermidis* mampu beradaptasi untuk bertahan hidup dalam kondisi lingkungan yang berbeda dan kemudian menempati relung yang berbeda pada kulit. Sebagian besar isolat patogen mampu beradaptasi untuk menoleransi stres osmotik melalui delapan penukar ion/proton natrium dan enam sistem transportasi untuk osmoprotektan dengan biomarker genetik yang berpotensi untuk virulensi yang mencakup beberapa gen yang terlibat dalam pembentukan biofilm. Gen-gen ini diaktifkan oleh rangsangan lingkungan dan keberadaan komponen inang (Paharik dan Horswil, 2016). Suhu optimum pertumbuhan *S. epidermidis* yaitu 36 dan pH optimum antara 7-8 (Rahman dkk, 2023).

### 2.2.3 Patogenitas *Staphylococcus epiermidis*

*Staphylococcus epiermidis* merupakan bakteri komensal yang tersebar luas pada kulit dan mukosa manusia serta mamalia lain, umumnya bersifat protektif dan non-patogen pada individu sehat tetapi dapat menyebabkan infeksi pada orang dengan sistem kekebalan tubuh yang lemah. *Staphylococcus epiermidis* ditemukan pada semua manusia dan memiliki tingkat penularan asimtomatik yang tinggi.

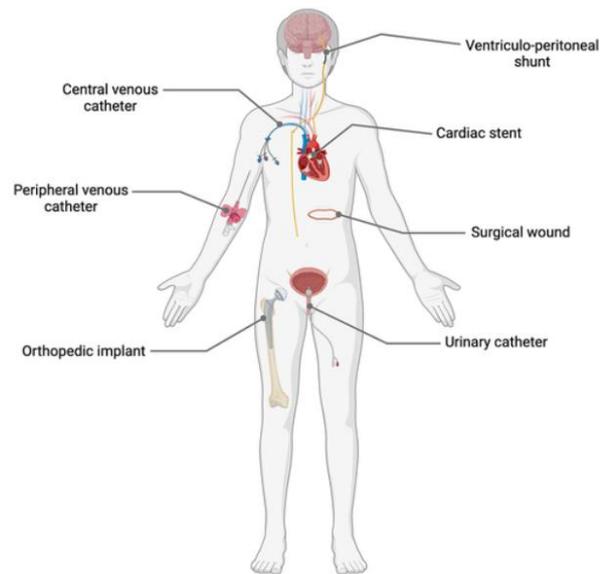
Strain *S. epidermidis* yang resistan dapat ditularkan melalui kontak dan lingkungan dari satu orang ke orang lain, misalnya selama dirawat di rumah sakit (Banaszkiewicz *et al*, 2019). *S. epidermidis* merupakan patogen oportunistik dengan virulensi rendah yang dapat menyebabkan infeksi jika menembus penghalang epitel pada individu yang mengalami gangguan kekebalan atau memiliki implan. *S. epidermidis* mampu membentuk biofilm pada permukaan abiotik apa pun.

Faktor virulensi utama *S. epidermidis* adalah kemampuannya untuk menempel pada komponen ekstraseluler manusia, membentuk biofilm dan dengan demikian menghindari perlindungan inang. Namun, sifat-sifat ini sangat perlu diperhatikan selama infeksi dan kolonisasi. *S. epidermidis* mampu menghasilkan serangkaian protein yang berlabuh di permukaan yang berinteraksi dengan matriks protein ekstraseluler manusia untuk memulai pembentukan biofilm. Protein yang sudah diproduksi seperti eksopolisakarida, protein, asam teikoat dan eDNA kemudian mengalami pembentukan zat polimer matriks/ekstraseluler, yang melindungi dari fagositosis, peptida antimikroba, antibiotik dan stresor lingkungan (Skovdal *et al*, 2022).

Tidak seperti *S. aureus*, *S. epidermidis* jarang menghasilkan toksin atau faktor virulensi agresif lainnya, dan produksi toksin tersebut tidak diikuti dengan sifat invasif. Namun, yang perlu diperhatikan adalah modulin yang larut dalam fenol (PSM) pro-inflamasi dengan aktivitas sitolitik, dan sejumlah enzim ekstraseluler yang kemudian berhubungan dengan virulensi *S. epidermidis*. Protease, lipase dan enterotoksin pada beberapa strain *S. epidermidis* dapat mendegradasi peptida antimikroba dan faktor komplemen, serta matriks protein ekstraseluler manusia, yang kemudian berkontribusi terhadap kerusakan jaringan (Banaszkiewicz *et al*, 2019).

Karena keberadaannya yang luas, infeksi klinis *S. epidermidis* sering terjadi dan dianggap sebagai kontaminasi yang tidak disengaja, hingga akhirnya dianggap sebagai patogen penting dalam infeksi terutama yang berhubungan dengan perangkat medis implan (Burke, 2024) (Gambar 2.2). Selain itu, patogen ini dikenal sebagai satu-satunya faktor penyebab infeksi serius seperti bakteremia, endokarditis, meningitis, dan sindrom syok toksik, serta infeksi kulit superfisial,

infeksi mata, dan infeksi yang disebutkan sebelumnya terkait dengan perangkat medis yang terpasang di dalam tubuh termasuk shunt, kateter dan sendi prostetik (Clemente *et al*, 2023).



**Gambar 2.2** Intervensi medis termasuk luka operasi dan berbagai perangkat medis implan yang dikaitkan dengan peningkatan risiko *S. epidermidis* dan infeksi oportunistik CoNS lainnya (Burke, 2024).

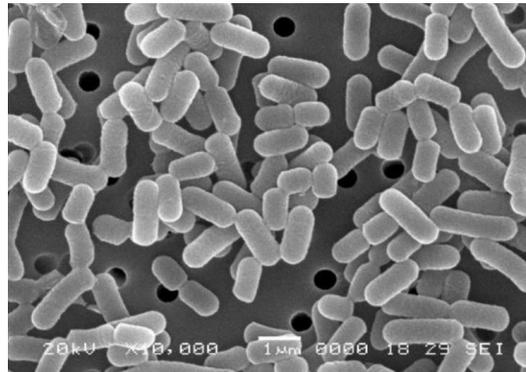
### 2.3 *Lactobacillus plantarum*

#### 2.3.1 Klasifikasi *Lactobacillus plantarum*

Klasifikasi *Lactobacillus plantarum* adalah sebagai berikut (ITIS,

|         |  |
|---------|--|
| Kingdom | : Bacteria   |
| Phylum  | : Firmicutes   |
| Class   | : Bacill   |
| Order   | : Lactobacillales                                    |
| Family  | : Lactobacillaceae                                   |
| Genus   | : <i>Lactobacillus</i> (Beijerinck,1884)             |
| Species | : <i>Lactobacillus plantarum</i> (Orla-Jensen, 1919) |

### 2.3.2 Karakteristik *Lactobacillus plantarum*



**Gambar 2.3** *Lactobacillus plantarum* pada mikroskop elektron (Muthusamy *et al*, 2020).

*Lactobacillus plantarum* adalah bakteri asam laktat Gram positif yang umum ditemukan dalam makanan fermentasi dan di saluran pencernaan dan umum digunakan dalam industri makanan sebagai probiotik potensial. *Lactobacillus plantarum* memiliki bentuk morfologi sel yaitu berbentuk batang dengan ujung membulat, lurus, umumnya lebar 0,9–1,2  $\mu\text{m}$  dan panjang 3–8  $\mu\text{m}$ , dan terdapat secara tunggal, berpasangan atau dalam rantai pendek (Gambar 2.3), bersifat heterofermentatif, mikro-aerofilik, toleran asam, dan tidak membentuk spora (Todorov, 2010). *Lactobacillus plantarum* mampu tumbuh pada pH antara 4,0-8,0 dan suhu 28-45 C, dengan pertumbuhan sel optimum pada suhu 37 C dan pH 7,0 (Arasu *et al*, 2015). *L. plantarum* sudah memiliki Qualified Presumption of Safety (QPS) dari Otoritas Keamanan Pangan Eropa (EFSA). Selain itu, *L. plantarum* juga sudah terdaftar dan diakui “generally recognized as safe” (GRAS) oleh the United States Food and Drug Administration (US FDA). Karena banyak spesies BAL yang diterima sebagai QPS dan GRAS, bakteriosin yang dihasilkan oleh strain ini juga dianggap aman (Echegaray *et al*, 2023).

Koloni *Lactobacillus plantarum* yang ditumbuhkan pada media agar memiliki warna koloni putih kecoklatan, shiny, koloni berbentuk mukoid, permukaan halus dengan tepi entire. *Lactobacillus plantarum* memiliki waktu pertumbuhan inkubasi selama 12-24 jam untuk menghasilkan bakteriosin, dan optimum pada waktu pertumbuhan selama 24 jam untuk menghasilkan senyawa metabolit terbaik. *Lactobacillus plantarum* tergolong dalam kelompok bakteri asam

laktat (BAL) yang menghasilkan asam laktat sebagai produk metabolit utama. Asam laktat ini berfungsi secara langsung dalam menghambat pertumbuhan bakteri patogen dengan cara menurunkan pH lingkungan. Selain itu, BAL juga memproduksi berbagai metabolit sekunder seperti hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ), asam lemak hidroksil, diasetil, retinol, serta senyawa protein seperti bakteriosin, tripsin, dan peptida, yang turut berkontribusi dalam menekan perkembangan mikroorganisme patogen (Karni *et al.*, 2024).

### **2.3.3 Cell-Free Supernatant (CFS) *Lactobacillus plantarum* sebagai Senyawa Antibiofilm**

Mikroorganisme probiotik memberikan manfaat melalui dua mekanisme yaitu efek langsung pada sel hidup dan efek tidak langsung yang melibatkan produksi beberapa metabolit. Mikroorganisme probiotik yang paling sering digunakan adalah bakteri asam laktat (BAL) seperti *Lactobacillus plantarum* karena kemampuannya dalam menghasilkan zat metabolit terhadap bakteri patogen. Probiotik *Lactobacillus plantarum* menghasilkan zat metabolit seperti asam organik (asam asetat, asam propionat, dan asam laktat), eksopolisakarida (ESP), senyawa aromatik, diasetil, hidrogen peroksida, zat antimikroba, bakteriosin, dan metabolit lain yang mampu berfungsi sebagai agen antibiofilm dalam menghambat pembentukan biofilm oleh banyak patogen (Sornsenee *et al.*, 2021). Untuk mendapatkan zat metabolit tersebut perlu dilakukan ekstraksi pembebasan sel terhadap *Lactobacillus plantarum* sehingga didapatkan cell free supernatant (CFS) *Lactobacillus plantarum* dalam bentuk supernatant yang mengandung semua protein dan metabolit yang terkandung dalam bakteri tersebut (Landete *et al.*, 2021).

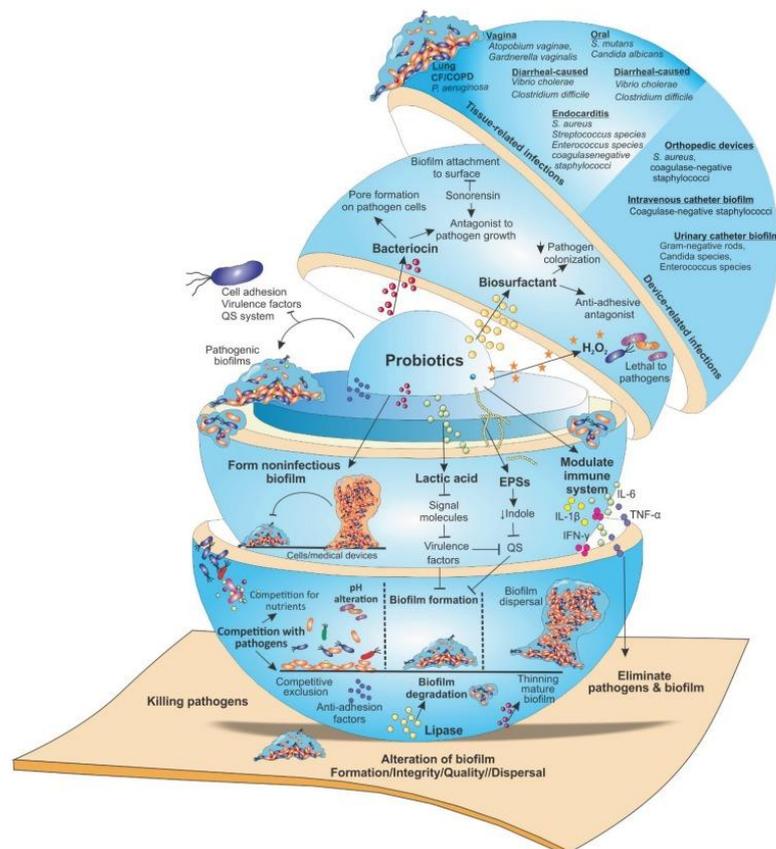
*Cell free supernatant Lactobacillus plantarum* merupakan bentuk ekstraksi yang potensial sebagai agen antibiofilm terhadap bakteri patogen. Ekstrak sel ini mengandung zat metabolit eksopolisakarida (EPS) yang mampu mengurangi sinyal QS yang terlibat dalam pembentukan biofilm patogenik sehingga mampu menurunkan hidrofobisitas permukaan sel dan produksi indol (molekul sinyal yang terlibat dalam QS) dalam menghambat pembentukan biofilm. Eksopolisakarida (EPS) ini dapat memberikan efek anti-adhesif dengan melemahkan modifikasi permukaan sel, mengganggu interaksi sel-ke-sel dan membatasi bakteri patogen ke

permukaan yang merupakan tahap awal mekanisme yang penting untuk mencegah patogen dari penggumpalan dan membentuk jaringan yang terorganisir menjadi biofilm. *Cell free supernatant Lactobacillus plantarum* juga mengandung bakteriosin yang berperan sebagai pencegahan antibiofilm yang mampu menginduksi kematian sel melalui penghambatan dinding sel, sintesis asam nukleat dan protein, atau aktivitas enzimatik, sehingga mampu mencegah patogen dalam pembentukan biofilm. Melalui mekanisme tersebut, bakteriosin mampu membentuk pori di membran sel, yang menyebabkan kebocoran sel dan kematian bakteri patogen.

*Cell-free supernatant (CFS)* dari *Lactobacillus plantarum* diketahui mampu memengaruhi ekspresi gen pada bakteri patogen pembentuk biofilm dengan cara menurunkan aktivitas gen-gen yang terkait pembentukan biofilm, melalui mekanisme produksi eksopolisakarida (EPS). Selain itu, supernatan dari *L. plantarum* juga mengandung senyawa bioaktif seperti hidrogen peroksida, metabolit oksigen, dan asam lemak jenuh, yang memiliki kemampuan sebagai agen antibiofilm. Senyawa-senyawa ini bekerja dengan menargetkan aktivitas sel patogen maupun merusak struktur matriks biofilm, terutama EPS, yang merupakan komponen utama dalam struktur biofilm. Agar bisa bekerja secara optimal, senyawa ini harus berada dalam fase dan waktu inkubasi yang tepat yang berhubungan dengan waktu panen atau pengambilan supernatan (Wasfi *et al.*, 2018).

Waktu pengambilan supernatan yang tepat merupakan faktor penting dalam memperoleh Cell-Free Supernatant (CFS) *Lactobacillus plantarum* dengan aktivitas antibiofilm yang optimal. CFS sebaiknya diambil pada fase stasioner awal, yaitu setelah proses inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Pada saat ini, *L. plantarum* telah mencapai puncak produksi metabolit sekunder seperti asam organik, biosurfaktan, dan bakteriosin yang berperan aktif sebagai agen antibiofilm. Pengambilan supernatan yang dilakukan terlalu dini (<12 jam) belum menghasilkan senyawa aktif secara maksimal, sementara pengambilan yang terlalu lama (>48 jam) berisiko mengalami degradasi senyawa dan penurunan efektivitas akibat perubahan pH dan penipisan nutrisi. Oleh karena itu, inkubasi selama 24 jam merupakan waktu yang ideal untuk menghasilkan CFS dengan potensi antibiofilm tertinggi. CFS yang dikumpulkan setelah 24 jam juga menunjukkan aktivitas

penghambatan tertinggi terhadap patogen pembentuk biofilm (Barzegari *et al*, 2020).



**Gambar 2.4** Beberapa mekanisme molekuler sekresi zat antagonis (misalnya, surfaktan, bakteriosin, eksopolisakarida (EPS), asam organik, asam laktat, asam lemak, enzim (amilase, lipase) dan hidrogen peroksida) dan pembentukan kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan bagi patogen (misalnya, perubahan pH serta persaingan untuk permukaan dan nutrisi) (Barzegari *et al*, 2020).

Selain menggunakan zat antagonis (Gambar 2.4) untuk mengganggu aktivitas bakteri patogen, probiotik CFS *L.plantarum* dapat mencegah QS dalam pembentukan biofilm dan kelangsungan hidup bakteri patogen serta mengganggu integritas/kualitas biofilm yang akhirnya menyebabkan penghilangan biofilm. Selain mekanisme pencegahan QS, probiotik CFS dapat menghasilkan kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan bagi patogen (misalnya, perubahan pH serta persaingan untuk permukaan dan nutrisi). Adhesi kompetitif mereka ke jaringan

manusia atau perangkat medis (kateter, prostesis, atau perangkat medis lainnya), mencegah kolonisasi bakteri berbahaya. Selain itu, dengan memodulasi respons imun inang dan pembentukan biofilm non-patogen, probiotik menargetkan biofilm patogen yang mencegah pembentukan biofilm oleh bakteri patogen.

## **2.4 Biofilm**

### **2.4.1 Definisi Biofilm**

Biofilm adalah komunitas sel mikroorganisme yang menempel pada permukaan, baik yang bersifat biologis maupun non-biologis (benda mati), dan diselubungi oleh matriks polisakarida yang dihasilkan oleh bakteri itu sendiri. Matriks ini berperan penting dalam mempertahankan keberlangsungan infeksi, karena mampu melindungi bakteri dari berbagai upaya eradikasi, termasuk penggunaan antibiotik. Akibatnya, pembentukan biofilm turut meningkatkan tingkat patogenisitas bakteri serta menyulitkan proses pengobatan. Matriks polisakarida biofilm ini berfungsi sebagai pelindung bakteri sehingga lebih tahan terhadap serangan mekanis, biologis dan kimia. Anton Van Leeuwenhoek pertama kali mendeskripsikan biofilm pada akhir abad ke-17 sebagai gugusan bakteri yang dapat beragregasi pada suatu permukaan dalam matriks polimer anion terhidrasi yang mereka sintesiskan (Costerton *et al*, 1993). Biofilm ditandai dengan perubahan adhesi ireversibel sel mikroba ke permukaan atau substrat atau satu sama lain, tertanam dalam EPS, dan menunjukkan fenotipe spesifik dalam hal transkripsi gen dan laju pertumbuhan. Biofilm bakteri terdiri dari satu jenis mikroorganisme atau campuran bakteri, jamur, archaea, protozoa, dan ragi. Biofilm umumnya ditemukan pada permukaan instrumen rumah sakit dan jaringan tubuh, di industri, unit pemrosesan makanan, dan lingkungan ( Schulze *et al.*, 2021 ).

Biofilm 10-1000 kali lebih toleran terhadap perawatan antimikroba daripada sel planktonik. Karakteristik utama biofilm adalah bahwa mereka dapat ditemukan pada permukaan apa pun dengan tingkat kelembapan yang cukup tinggi untuk mendukung pertumbuhannya dalam semua ekosistem alami. Struktur tiga dimensi biofilm mampu melindungi komunitas mikroba dari faktor biotik dan abiotik yang mengancam keberadaan biofilm seperti zat beracun, predasi, dan stres lingkungan. Selain itu, biofilm mampu menciptakan lingkungan mikro yang kompleks dan

beragam sehingga memungkinkan terjadinya interaksi antara berbagai spesies mikroba. Keberagaman metabolisme ini memungkinkan biofilm untuk bertahan dalam berbagai kondisi lingkungan yang tidak bersahabat. Dalam situasi di mana sumber daya terbatas atau kondisi fisik berubah, keberadaan berbagai spesies dalam biofilm dapat memberikan keuntungan adaptif, meningkatkan kelangsungan hidup komunitas mikroba tersebut (Lopez, 2010). Oleh karena semua kemampuan biofilm tersebut membuat biofilm substansial dalam meningkatkan virulensi resistensi antibiotik dari bakteri probiotik (Lewandowski dan Beyenal, 2014)

Allah SWT menciptakan bakteri patogen dengan kemampuan pembentukan biofilm sebagai penyebab virulensi, disamping sebagai ujian bagi manusia agar manusia berpikir, hal ini merupakan bagian dari sistem yang telah ditetapkan-Nya sebagaimana dijelaskan dalam Q.S Al-Qomar ayat 49 sebagai berikut:

إِنَّا كُلَّ شَيْءٍ خَلَقْنَاهُ بِقَدَرٍ ﴿٤٩﴾ ( القمر/54: 49 )

Artinya: “*Sesungguhnya Kami menciptakan segala sesuatu sesuai dengan ukuran*” (Al-Qamar/54:49).

Menurut Imam Jalaluddin Al-Mahally dalam Tafsir Jalalain jilid 2 (2014) menjelaskan bahwa setiap ciptaan Allah, termasuk mikroorganisme seperti bakteri, diciptakan dengan ukuran dan ketentuan yang telah ditetapkan. Kata ( بِقَدَرٍ ) menunjukkan bahwa segala sesuatu yang diciptakan sesuai dengan takdir dan ukuran yang telah ditentukan oleh Allah SWT. Hal ini disebabkan Allah SWT telah merancang bahwa struktur bakteri patogen memiliki pelindung khusus seperti biofilm untuk melindungi diri dari lingkungan eksternal dan membantu dalam proses infeksi. Dengan adanya struktur seperti biofilm, maka menjadikan ujian bagi manusia untuk berpikir mengembangkan antibiofilm. Dengan demikian, penciptaan biofilm bukan tanpa maksud melainkan pasti terdapat fungsi dan hikmah dibalik setiap ciptaan-Nya. Sebagaimana Firman Allah SWT dalam Q.S Ali Imran 191 sebagai berikut:

الَّذِينَ يَذْكُرُونَ اللَّهَ قِيَامًا وَقُعُودًا وَعَلَىٰ جُنُوبِهِمْ وَيَتَفَكَّرُونَ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَاطِلًا سُبْحَانَكَ فَقِنَا عَذَابَ النَّارِ ﴿١٩١﴾ (آل عمران/3:191)

Artinya: “(yaitu) orang-orang yang mengingat Allah sambil berdiri, duduk, atau dalam keadaan berbaring, dan memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata), “Ya Tuhan kami, tidaklah Engkau menciptakan semua ini sia-sia. Maha Suci Engkau. Lindungilah kami dari azab neraka” (Ali 'Imran/3:191).

Menurut Prof. Wahbah az-Zuhaili dalam tafsir Al-Wajiz (1993) menjelaskan bahwa kalimat ( رَبَّنَا مَا خَلَقْتَ هَذَا بَاطِلًا ) memiliki arti “Tidaklah Engkau menciptakan semua ini sia-sia” kalimat ini menegaskan bahwa setiap ciptaan Allah tidak ada yang sia-sia, termasuk mikroorganisme seperti bakteri yang memiliki fungsi dan tujuan dalam sistem kehidupan yang telah ditetapkan-Nya. Dengan demikian, tidak ada yang sia-sia dalam penciptaan Allah SWT termasuk juga kemampuan bakteri patogen dalam membentuk biofilm yang dapat dipahami sebagai bagian dari hikmah dan ketetapan Allah SWT, yang mengandung pelajaran dan ujian bagi manusia agar selalu menggunakan akal dan hati untuk memikirkan serta memahami kebesaran-Nya (Az-Zuhaili, 1993).

#### 2.4.2 Struktur Biofilm

Struktur utama dari biofilm terdiri atas *Substansi Polimerik Ekstraseluler* (SPE), yaitu matriks polimer dengan berat molekul tinggi yang disekresikan oleh bakteri ke lingkungan sekitarnya. Matriks ini tersusun atas berbagai komponen seperti protein, polisakarida, dan DNA. Di antara komponen tersebut, eksopolisakarida memiliki peran sentral sebagai kerangka struktural yang kokoh dan lengket, mendukung pembentukan dan stabilitas biofilm. Eksopolisakarida dapat disintesis baik di dalam sel (intraseluler) maupun di luar sel (ekstraseluler), dan berfungsi sebagai penopang bagi molekul lain seperti protein, asam nukleat, dan lipid. Adapun struktur, komposisi kimia, serta karakteristik fisik dari eksopolisakarida ini sangat bervariasi antar jenis mikroorganisme (Lembre *et al.*, 2012). DNA ekstraseluler berperan signifikan terhadap pembentukan biofilm dan

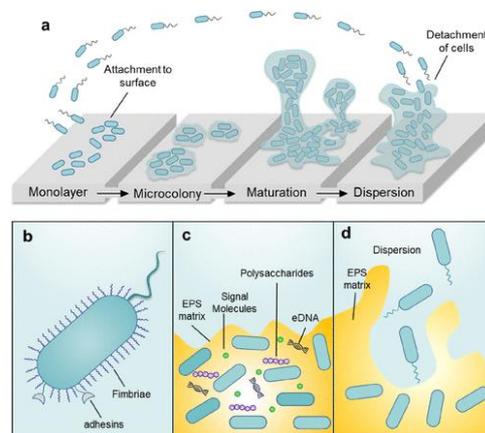
perluasnya serta memberikan resistensi dan perlindungan terhadap bakteri yang terkandung dalam biofilm. Protein ekstraseluler yang terdapat pada permukaan luar sel bakteri merupakan blok pembangun untuk pembentukan biofilm. Protein tersebut dapat berupa protein permukaan atau protein sekretori. Protein ekstraseluler berperan dalam pembentukan biofilm, agregasi sel, perlekatan, dan pengelompokan sel bakteri (Shree *et al*, 2023).

Bakteri mempunyai kemampuan membentuk biofilm berlapis-lapis. Lapisan terdalam berfungsi melindungi sel bakteri dari zat anti mikroba dengan cara menghalangi difusi antimikroba tersebut. Lapisan biofilm tersebut mengandung lapisan lendir ekstraseluler yang memiliki keanekaragaman kimia yang kompleks sehingga mampu membentuk matriks EPS biofilm yang merupakan jaringan polisakarida dan protein yang kompleks. Seperti DNA ekstraseluler (eDNA) dalam matriks biofilm yang berperan memberikan struktur dan stabilitas pada biofilm. Kehadiran matriks dalam biofilm memungkinkan terbentuknya lingkungan mikro yang membatasi mobilitas sel, meningkatkan kepadatan populasi mikroba, serta menciptakan kondisi yang mendukung terjadinya pertukaran materi genetik melalui mekanisme konjugasi. Hal ini menjadikan biofilm sebagai faktor utama dalam terjadinya infeksi persisten, karena struktur tersebut mampu meningkatkan resistensi bakteri terhadap antibiotik, desinfektan, dan respons imun tubuh. Selain itu, pertumbuhan bakteri yang difasilitasi oleh biofilm juga berkontribusi terhadap kemampuan mikroba untuk menghindari deteksi dan serangan dari sel imun maupun agen antimikroba lainnya (Shree *et al.*, 2023).

### **2.4.3 Mekanisme Pembentukan Biofilm**

Pembentukan biofilm merupakan proses berkelanjutan yang telah disubkategorikan menjadi beberapa tahapan yang saling berhubungan (Gambar 2.5). Tahap awal yaitu perlekatan sel (attachment) ke permukaan biotik dan abiotik yang bersifat reversible sehingga mampu menjadi bentuk planktonik kembali, tahap ini memungkinkan sel terlepas dari permukaan dan berpindah tempat. Tahap kedua ditandai dengan fase irreversible yaitu menempelnya sel secara permanen ke permukaan. Selama tahap ini, sel kehilangan kemampuan untuk melepaskan diri dari permukaan dan terikat pada pengembangan biofilm dengan adanya interaksi

kimia yang kuat dan eksudasi matriks lendir polisakarida, yang mendorong akumulasi detritus seluler oleh suatu proses komunikasi untuk pengaturan pertumbuhan yang disebut quorum sensing. Tahap ketiga yaitu pembentukan mikrokoloni, yang merupakan akumulasi dari fase irreversible sehingga terjadi pembentukan mikrokoloni (kumpulan kecil sel) yang berfungsi sebagai dasar untuk struktur biofilm yang lebih kompleks. Hal ini didorong oleh kondisi lingkungan yang kaya nutrisi, yang membuat sel menunjukkan efisiensi pertumbuhan yang cepat dalam pembentukan mikrokoloni biofilm (Kumar *et al*, 2023).



**Gambar 2.5 Tahapan dan mekanisme pembentukan biofilm. (a) Tahapan pembentukan biofilm. (b) Adhesin dan fimbriae pada perlekatan sel. (c) Peran EPS, eDNA, dan polisakarida dalam biofilm dewasa. (d) Proses dispersi dalam biofilm untuk memperluas area biofilm (Kumar *et al*, 2023).**

Tahap keempat yaitu maturasi atau pematangan biofilm. Pada tahap ini, mikrokoloni berkembang menjadi koloni berukuran lebih besar dan dimulainya perkembangan tiga dimensi, seiring dengan meningkatnya ketebalan biofilm, resistensi antibiotik pada biofilm juga meningkat. Hal ini disebabkan oleh kegagalan antibiotik untuk masuk ke dalam biofilm untuk membunuh sel target. Pada tahap ini, biofilm sudah resisten terhadap pengobatan antibiotik. Terhambatnya penetrasi biofilm oleh antibiotik melalui EPS disebabkan oleh pengikatan agen antimikroba dengan komponen EPS, seperti protein, DNA, dan polisakarida, sehingga mengakibatkan penurunan konsentrasi antibiotik efektif dalam matriks biofilm dan terbentuknya penghalang difusi (Barzegri *et al*, 2020).

Tahap terakhir dalam pembentukan biofilm adalah dispersi, yaitu saat sel-sel melepaskan diri dari biofilm dan berpindah ke lokasi lain untuk membentuk biofilm baru. Tahap ini dicirikan dengan tingkat fluks biofilm yang tinggi dengan sel-sel yang terus-menerus melepaskan diri dari struktur biofilm utama, baik secara aktif maupun pasif, dan menyebar ke lingkungan sekitar, untuk menjajah wilayah baru. Seiring bertambahnya usia biofilm sumber daya makanan dan nutrisi semakin berkurang, dan produk sampingan metabolik yang bersifat toksik semakin menumpuk. Oleh karena itu terjadi peristiwa dispersi oleh sel mikroba untuk menyebar ke bagian lain dari host yang terinfeksi atau area lain dari implan medis untuk tumbuh, memperoleh nutrisi, dan mengeluarkan situasi pemicu stres dan produk sampingan limbah (Barzegri *et al*, 2020).

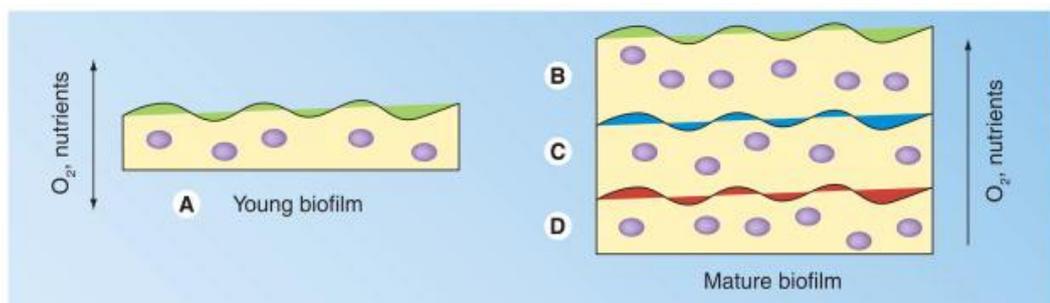
#### **2.4.4 Pembentukan Biofilm pada *Staphylococcus epidermidis***

Pembentukan biofilm *Staphylococcus epidermidis* melalui empat tahapan yaitu perlekatan (attachment), akumulasi, pematangan (maturasi) dan pelepasan (dispersi). Tahapan pertama yaitu perlekatan yang terbagi menjadi perlekatan awal dan perlekatan spesifik. Pada perlekatan awal bakteri akan melekat pada permukaan secara nonspesifik melalui interaksi hidrofobik. Selanjutnya akan terjadi perlekatan spesifik oleh protein-protein adhesi seperti AtlE, Aae, dan Embp yang mengikat pada komponen matriks ekstraseluler, memperkuat ikatan bakteri dengan permukaan. AtlE dan Aae juga berperan dalam melepaskan eDNA yaitu komponen penting dalam pembentukan matriks biofilm. eDNA yang dilepaskan oleh bakteri bersama dengan polisakarida interseluler membentuk matriks biofilm yang kokoh dan melindungi bakteri dari pengaruh lingkungan. Hingga akhirnya terjadi pertumbuhan dan perkembangan biofilm terus menerus oleh bakteri yang terus membelah dan membentuk struktur biofilm yang lebih kompleks (Fey dan Olson, 2010).

Tahapan selanjutnya yaitu akumulasi oleh protein PIA (*polisakarida interseluler adhesif*) yang disintesis oleh *Staphylococcus epidermidis*. PIA membantu sel-sel bakteri saling terhubung dan membentuk matriks ekstraseluler yang kuat. Biofilm yang dimediasi PIA lebih tahan terhadap gaya geser dan kondisi lingkungan yang berubah-ubah. Kemampuan *S. epidermidis* untuk membentuk

biofilm yang kompleks dan stabil berkontribusi pada persistensi infeksi terkait implan medis. Biofilm yang dimediasi PIA lebih sulit dibersihkan dan lebih resisten terhadap antibiotik (Marti *et al*, 2010).

Tahap pematangan (maturasi) pada bakteri *S.epidermidis* akan mengalami perubahan fisiologis yang signifikan. Perubahan ini meliputi pergeseran menuju metabolisme yang lebih sederhana, seperti anaerobik atau mikroaerobik, serta penurunan aktivitas metabolisme lainnya. Selain itu, biofilm juga menunjukkan heterogenitas, di mana sel-sel dalam biofilm memiliki kondisi dan fungsi yang berbeda-beda. Seperti variasi genetik dan fenotip yang memungkinkan biofilm untuk beradaptasi dengan lingkungan yang berubah-ubah dan meningkatkan peluang bertahan hidup. Selain itu terdapat juga Jalur metabolisme arginin (ADI) yang memungkinkan bakteri untuk menghasilkan energi dan amonia dalam kondisi kekurangan oksigen. Amonia yang dihasilkan dapat membantu mengatur pH lingkungan sekitar biofilm dan memberikan perlindungan terhadap sistem imun inang (Fey dan Olson, 2010).



**Gambar 2.6 Heterogenitas temporal dan spasial dalam biofilm stafilokokus** (Fey dan Olson, 2010).

(A) Biofilm muda yang kaya akan oksigen dan substrat nutrisi. Sebaliknya, biofilm dewasa memiliki sel-sel yang memiliki akses ke oksigen dan substrat (B), substrat tetapi tidak ada oksigen (C) dan tidak ada oksigen atau substrat (D), yang menghasilkan heterogenitas metabolik (Gambar 2.6). Dalam media yang mengandung substrat yang mudah dikatabolisme seperti glukosa dan sebagai tambahan sumber karbon terpisah seperti asam amino atau peptida, daerah atas biofilm (B) akan memiliki akses ke glukosa, sedangkan daerah yang lebih mikroaerobik (C) akan memiliki akses ke sumber karbon sekunder seperti asam amino/peptida (Fey dan Olson, 2010).

Tahap pelepasan (dispersi) biofilm pada *S. epidermidis* adalah proses di mana sel-sel individu atau potongan biofilm melepaskan diri dari struktur biofilm utama dan menyebar ke area baru. Tahapan ini dikendalikan oleh sistem regulasi quorum sensing agr. Mutasi pada sistem agr dapat menyebabkan peningkatan pembentukan biofilm dan penurunan dispersi sel. Hal ini diduga karena hilangnya produksi molekul tertentu seperti  $\delta$ -toksin yang berfungsi sebagai surfaktan, yang membantu memisahkan sel-sel bakteri dalam biofilm. Selain itu, sistem agr juga mengatur produksi enzim protease yang dapat memecah matriks ekstraseluler biofilm dan memfasilitasi pelepasan sel (Buttner *et al*, 2015)

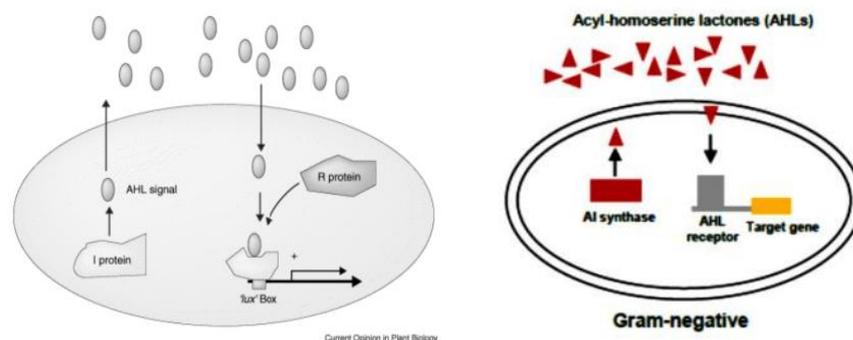
*Staphylococcus epidermidis* dalam pembentukan biofilm merupakan bakteri yang bisa menghasilkan asam poli- $\gamma$ -DL-glutamat (PGA) yang merupakan faktor virulensi yang tidak ditemukan pada *S. aureus* yang melindungi *S. epidermidis* terhadap konsentrasi garam tinggi selain memediasi resistensi terhadap peptida antimikroba dan fagositosis. Oleh karena itu, ekspresi PGA pada *S. epidermidis* menguntungkan bagi stafilokokus yang berada di lingkungan garam tinggi seperti kulit. Interaksi antara sintesis PIA dan PGA pada *S. epidermidis* akan menghasilkan sifat antifagositosis dan resisten terhadap aksi sistem imun bawaan fagositosis dan antimikroba (Buttner *et al*, 2015).

## 2.5 Quorum Sensing

*Quorum sensing* (QS) merupakan mekanisme komunikasi antar sel bakteri yang berperan penting dalam pembentukan biofilm. Melalui proses ini, bakteri dapat mendeteksi kepadatan populasi di sekitarnya dan menyesuaikan ekspresi gen secara kolektif sebagai respons terhadap perubahan lingkungan. Sistem komunikasi ini melibatkan produksi, pengenalan, dan respons terhadap molekul sinyal kecil yang bersifat spesifik, dapat berdifusi secara bebas keluar dan masuk sel, serta disintesis oleh bakteri itu sendiri. Molekul-molekul sinyal ini dikenal sebagai *autoinducers* (AI) atau feromon (Kurniawan & Asriani, 2020).

Bakteri Gram negatif dan Gram positif sama-sama menggunakan molekul sinyal (*autoinducers*) untuk berkomunikasi melalui quorum sensing, namun dengan perbedaan struktur dan fungsi. Pada bakteri Gram negatif, molekul sinyal yang umum digunakan adalah *N-acylhomoserine lactones* (AHLs), yang terdiri dari

cincin laktone dan rantai asam lemak. AHLs ini mudah larut dan berdifusi, berfungsi untuk menstimulasi ekspresi gen berdasarkan kepadatan sel di lingkungan. AHLs diproduksi oleh *AHLs synthases*, yang menggunakan *adenosyl-methionine* (SAM) dan *acyl-carrier proteins* (ACP) untuk membentuk strukturnya. Struktur AHLs dapat bervariasi antara 4 hingga 18 karbon, dan molekul ini dapat berperan dalam komunikasi antar spesies bakteri, selain spesies yang sama. Sintesis sinyal AHL diatur oleh protein LuxI, sedangkan penerima sinyal diatur oleh LuxR.

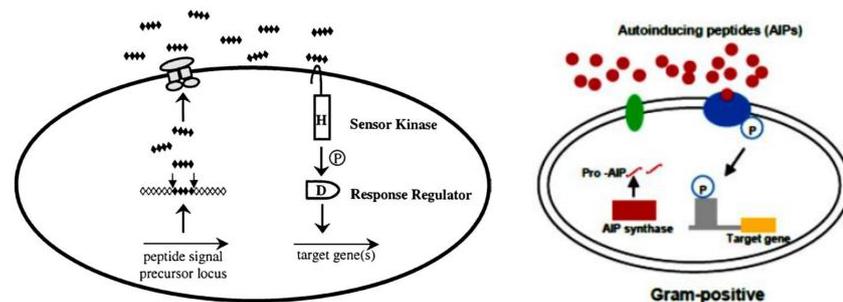


**Gambar 2.7 Mekanisme kuorum sensing pada bakteri Gram negatif**  
(Kurniawan dan Ariani, 2020).

Pada bakteri Gram negatif, mekanisme *quorum sensing* (QS) berlangsung melalui produksi dan pelepasan molekul sinyal berupa *acyl-homoserine lactone* (AHL). Ketika AHL mencapai konsentrasi ambang tertentu di lingkungan, molekul ini mampu berdifusi kembali ke dalam sel dan berikatan dengan reseptor spesifiknya, sehingga memicu aktivasi sistem QS (Gambar 2.7). Dalam proses ini, enzim LuxI bertanggung jawab untuk mensintesis AHL, yang kemudian dilepaskan keluar sel melalui membran plasma dan mengalami akumulasi seiring peningkatan jumlah populasi bakteri. Setelah konsentrasi AHL cukup tinggi untuk dikenali, ia membentuk kompleks dengan protein regulator LuxR, yang selanjutnya akan mengaktifkan transkripsi gen-gen target. Aktivasi ini dapat memicu berbagai respon fisiologis, seperti produksi bioluminesensi, pembentukan biofilm, atau sekresi faktor virulensi.

Pada bakteri Gram positif, mekanisme *quorum sensing* (QS) dikendalikan oleh molekul sinyal berupa *autoinducing peptides* (AIPs), yaitu peptida-peptida pendek yang berfungsi dalam regulasi komunikasi antar sel. AIPs diproduksi di dalam sel sebagai propeptida dan membutuhkan sistem transport membran khusus

untuk melewati membran sel bakteri. Propeptida tersebut selanjutnya diproses oleh enzim endopeptidase yang terasosiasi dengan membran, sehingga menghasilkan AIPs dalam bentuk matang yang kemudian dilepaskan ke lingkungan ekstraseluler. AIPs yang telah disekresikan ini akan terdeteksi oleh sistem sensor bakteri lainnya untuk mengatur ekspresi gen target yang berperan dalam berbagai proses fisiologis, termasuk pembentukan biofilm dan produksi faktor virulensi.



**Gambar 2.8 Mekanisme quorum sensing pada bakteri Gram positif**  
(Kurniawan dan Ariani, 2020).

Pada bakteri Gram positif, *autoinducing peptides* (AIPs) yang telah mengalami pematangan akan berinteraksi dengan reseptor berupa protein histidin kinase transmembran. Interaksi ini memicu proses autofosforilasi yang mengaktifkan regulator transkripsi dan selanjutnya menginduksi ekspresi gen target (Gambar 2.8). Tidak seperti bakteri Gram negatif, molekul sinyal pada bakteri Gram positif tidak berdifusi secara pasif melalui membran sel, melainkan diekspor keluar melalui sistem transporter ATP-binding cassette (ABC). Ketika konsentrasi AIP di lingkungan mencapai ambang tertentu, sensor kinase mendeteksinya, lalu mengikat molekul tersebut dan mentransfer sinyalnya melalui mekanisme fosforilasi ke protein regulator respons selanjutnya. Selain sistem persinyalan *autoinducer peptides* (AIPs) pada bakteri gram positif dan *N-acylhomoserine lactones* (AHLs) pada bakteri gram negatif, terdapat juga molekul persinyalan autoinducer 2 (AI-2) yang merupakan molekul sinyal interspesies yang memungkinkan bakteri gram negatif dan positif untuk saling berinteraksi dan berkomunikasi dalam pembentukan biofilm (Jiang *et al*, 2022).

## 2.6 Fungsi dan Peranan Biofilm dalam Resistensi Bakteri

Mikroorganisme yang tumbuh dalam biofilm lebih resistan terhadap lingkungan ekstrem dan antibiotik dibandingkan dengan mikroorganisme yang tumbuh dalam bentuk planktonik. Bakteri pembentuk biofilm yang tertanam dalam matriks akan memperoleh sifat-sifat yang membuat mereka sangat toleran terhadap antibiotik, sinar UV, biosida kimia, respons imun inang, dan stres eksternal lainnya (Li, 2017). Biofilm juga dapat melindungi mikroorganisme dari kondisi lingkungan yang keras seperti suhu dan pH ekstrem, salinitas dan tekanan tinggi, nutrisi yang buruk, antibiotik, dll., dengan bertindak sebagai penghalang. Penghalang tersebut ialah matriks zat polimer ekstraseluler (EPS) yang menunjukkan sifat pelindung sebagai perisai fisik. Dalam lingkungan ekstrem, mikroorganisme mengatur ekspresi serangkaian gen pembentuk biofilm melalui QS, pensinyalan berbasis pembawa pesan kedua nukleotida, dll., untuk memberi mikroorganisme kemampuan menjadi resistan terhadap berbagai lingkungan ekstrem seperti radiasi UV, suhu dan pH ekstrem, salinitas tinggi, tekanan tinggi, nutrisi buruk, antibiotik (Yin *et al*, 2019).

Biofilm dapat memberikan toleransi mikroba terhadap antibiotik dengan mekanisme biofilm yang dapat berfungsi sebagai barier fisik, dan ketebalan serta komposisi kimianya dapat mencegah perfusi antibiotik. Selain itu Ada banyak molekul anionik dan kationik dalam EPS biofilm, seperti asam uronat, protein, glikoprotein, glikolipid, eDNA, yang dapat mengikat antibiotik bermuatan dan membentuk tempat berlindung bagi mikroorganisme untuk membantu sel mikroba yang tertanam dalam biofilm membangun toleransi terhadap antibiotik (Nunez *et al*, 2013).

Penelitian Singh *et al* (2010) menunjukkan bahwa penetrasi oksasilin, sefotaksim, dan vankomisin berkurang secara signifikan melalui biofilm *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus epidermidis*. Adsorpsi antibiotik oleh komponen biofilm atau degradasi antibiotik oleh hidrolase, seperti  $\beta$ -laktamase juga dapat membatasi penetrasi antibiotik. Keterbatasan fisiologis termasuk laju pertumbuhan usia biofilm, kelaparan, juga dapat mengurangi kerentanan biofilm terhadap antibiotik. Resistensi mikroba oleh biofilm ini lah yang memainkan peran penting dalam produksi sediaan enzim khusus untuk industri farmasi, industri

makanan, produksi pertanian, perlindungan lingkungan, pemanfaatan energi, dan bidang industri lainnya, serta penelitian ilmiah. Mekanisme perlindungan biofilm terhadap mikroorganisme di lingkungan ekstrem dijadikan sebagai upaya untuk menyelesaikan kontradiksi antara lingkungan ekstrem produksi industri dan stabilitas protein enzim yang terbatas, yang memungkinkan seseorang untuk membangun teknologi bioproses yang berbiaya rendah dan berefisiensi tinggi (Yin *et al*, 2019).

## 2.7 Uji Pembentukan Biofilm

### 2.7.1 Metode Congo Red Agar

Freeman *et al* (1989) menjelaskan bahwa metode Congo Red Agar adalah metode kualitatif sederhana yang murah dan mudah digunakan untuk mendeteksi pembentukan biofilm. Metode ini menggunakan pengamatan visual dengan mengamati hasil bakteri yang diinokulasikan pada media congo red agar. Hasil interpretasi koloni bakteri yang tumbuh pada media tersebut berdasarkan kriteria sebagai berikut: koloni berwarna hitam atau hitam kemerahan dengan morfologi kristal kering dan permukaan kasar dianggap positif untuk bakteri penghasil biofilm, sementara koloni berwarna merah muda dianggap sebagai bakteri yang lemah atau tidak menghasilkan biofilm (Gambar 2.9) (Mohammed *et al*, 2020).

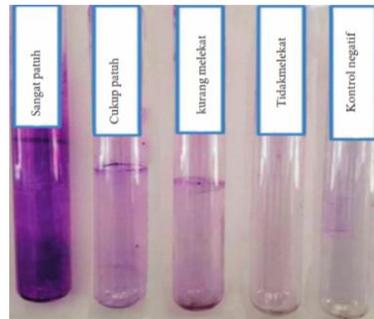


**Gambar 2.9 Koloni bakteri pada congo red agar.** Koloni pembentuk biofilm (A) dan koloni non-biofilm (B) (Mohammed *et al*, 2021).

### 2.7.2 Metode Tabung

Metode tabung adalah metode kualitatif untuk mendeteksi biofilm yang dilakukan dengan menginokulasi mikroorganisme ke dalam tabung reaksi dan diinkubasi. Media yang digunakan yaitu TSB (Tryptic Soy Broth). Prinsip dari metode tabung yaitu Mikroorganisme yang memproduksi biofilm akan membentuk

lapisan pada dinding dan dasar tabung reaksi. Semakin tebal lapisan yang terbentuk pada tabung akibat pewarnaan crystal violet menandakan semakin kuat juga bakteri tersebut dalam membentuk biofilm. Kriteria penilaian dari metode tabung ini terbagi menjadi *strong*, *moderate*, *weak*, dan *non-biofilm* (Gambar 2.10).



**Gambar 2.10** Penilaian pembentukan biofilm dari kiri ke kanan : *strong*, *moderate*, *weak*, dan *non-biofilm* (Mohammed *et al*, 2021).

### 2.7.3 Metode Tissue Culture Plate (TCP) / Microtiter Plate (MtP)

Metode Tissue Culture Plate (TCP) atau metode pada microtiter plate adalah metode kuantitatif yang paling banyak digunakan dan dianggap sebagai gold method untuk mendeteksi pembentukan biofilm. Mikroorganisme diinokulasikan ke dalam microplate 96 well yang berisi media nutrisi, diinkubasi selama 24 jam, lalu sel planktonik dicuci dengan PBS. Biofilm yang menempel diwarnai dengan kristal violet (Gambar 2.11) dan diukur densitasnya microplate reader untuk mendapatkan nilai OD (Optical Density) (Anggraini *et al*, 2023). Pembentukan biofilm dapat dilihat dengan membandingkan OD (Optical Density) nilai dengan OD-cutoff. Nilai OD-cutoff dihitung menggunakan rumus berikut:

$$OD_{cut} = \text{Rata-rata } OD_c + (3 \times \text{Standar Deviasi } OD_c)$$

Keterangan:  $OD_{cut}$  = Optical Density cut-off

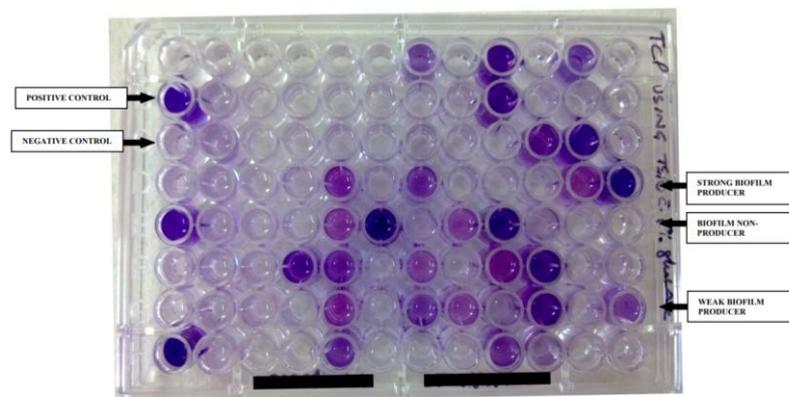
$OD_c$  = Optical Density control

**Tabel 2.1** Interpretasi Hasil OD dibagi kedalam kategori berikut:

| Rata-rata nilai OD      | Kekuatan Pembentuk Biofilm                                | Interpretasi |
|-------------------------|---|--------------|
| $OD_{isolat} \leq OD_c$ | <i>Non biofilm production</i> /tidak menghasilkan biofilm | 0            |

|  |  |            |
|--|--|------------|
| $OD_{cut} < OD_{isolat} \leq 2 \times OD_{cut}$          | <i>Weak biofilm production</i> /Membentuk biofilm lemah      | + atau 1   |
| $2 \times OD_{cut} < OD_{isolat} \leq 4 \times OD_{cut}$ | <i>Moderate biofilm production</i> /Membentuk biofilm sedang | ++ atau 2  |
| $4 \times OD_{cut} < OD_{isolat}$                        | <i>Strong biofilm production</i> /Membentuk biofilm kuat     | +++ atau 3 |

ODcut = Optical Density cut off, OD<sub>isolat</sub> = Optical Density isolat  
 Sumber: Hassan *et al* (2011).



**Gambar 2.11** Metode Microtiter plate (Ruchi *et al*, 2015).

## 2.8 Optical Density

Optical density (OD) atau kepadatan optik adalah metode untuk mengukur biomassa biofilm, pertumbuhan mikroorganisme, atau reaksi biokimia secara kuantitatif dan efisien. OD juga dapat digunakan untuk menghitung jumlah sel mikroba. Dalam penelitian antibiofilm, OD adalah metode kuantitatif untuk mengukur aktivitas biofilm dengan menggunakan spektrofotometer. OD digunakan untuk menilai biomassa biofilm sebelum dan setelah perlakuan dengan agen antibiofilm. Nilai OD ini akan memberikan informasi mengenai jumlah atau kepadatan biofilm yang terbentuk, terhambat, atau hancur setelah perlakuan dengan agen antibiofilm. Semakin tinggi nilai OD, semakin besar biomassa biofilm yang terbentuk atau sisa setelah perlakuan. Sebaliknya, nilai OD yang lebih rendah

menunjukkan biofilm yang terhambat atau hancur oleh agen antibiofilm (Abdelhamid dan Yousef, 2023).

Pengukuran Optical Density dalam penelitian biofilm dengan metode microtiter plate dilakukan dengan menumbuhkan bakteri ke dalam sumur microtiter plate, kemudian biofilm yang terbentuk diwarnai dengan crystal violet untuk memvisualisasikan biomassa. Pewarnaan ini dilarutkan dan OD diukur menggunakan spektrofotometer/microplate reader pada panjang gelombang tertentu. Penurunan OD dibandingkan kontrol menunjukkan efektivitas agen antibiofilm dalam menghambat atau menghancurkan biofilm.

## **2.9 Uji Aktivitas Antibiofilm**

Menurut penelitian Zarko dan Shai (2017) terdapat pengujian aktivitas biofilm yang berhubungan dengan tahapan utama siklus hidup biofilm yaitu uji pencegahan penempelan biofilm (adhesi atau penempelan awal bakteri ke permukaan) dan uji pembentukan dan degradasi biofilm (tahap pembentukan dan degradasi mikrokoloni sessile biofilm). Uji pencegahan penempelan biofilm bertujuan menilai kemampuan agen untuk mencegah mikroorganisme menempel ke permukaan substrat, yang merupakan tahap awal pembentukan biofilm. Hal ini relevan dalam aplikasi pencegahan infeksi atau kontaminasi pada perangkat medis dan lingkungan industri (Abdelhamid dan Yusuf, 2023).

Uji penghambatan pembentukan biofilm dilakukan untuk menganalisis kemampuan agen dalam mengintervensi proses maturasi biofilm setelah penempelan awal, seperti penghambatan produksi matriks ekstraseluler yang diperlukan untuk pembentukan struktur biofilm yang stabil. Sementara uji degradasi biofilm dilakukan untuk mengevaluasi kemampuan agen untuk menghancurkan atau mengurangi biomassa biofilm yang sudah matang, yang penting dalam penanganan infeksi kronis dan biofilm yang sudah berkembang di permukaan benda. Oleh karena itu pengujian aktivitas antibiofilm mencakup 3 hal tersebut karena penting untuk dilakukan terkait dengan siklus hidup utama biofilm (Peterson *et al*, 2011).

## **BAB III METODE PENELITIAN**

### **3.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini menggunakan pendekatan eksperimental untuk mengevaluasi potensi *cell-free supernatant* (CFS) dari *Lactobacillus plantarum* sebagai agen antibiofilm terhadap biofilm yang dibentuk oleh *Staphylococcus epidermidis*. Pengujian dilakukan dengan metode *Tissue Culture Plate* (TCP) menggunakan mikrotiter plate, di mana setiap sumur (well) diisi sesuai dengan pembagian kelompok perlakuan dan kontrol. Evaluasi pembentukan dan penghambatan biofilm dilakukan dengan mengukur nilai *optical density* (OD) pada masing-masing sumur menggunakan *Microplate Reader*. Secara keseluruhan, penelitian ini terdiri dari lima perlakuan, yang meliputi tiga kelompok uji (konsentrasi CFS *L. plantarum* 12,5%, 25%, dan 50%), kelompok kontrol negatif dan kelompok kontrol media. Perlakuan diulang dengan melakukan perhitungan jumlah ulangan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan rumus:  $t(r-1) \geq 15$  dengan  $t$  adalah jumlah perlakuan,  $r$  adalah jumlah ulangan yang dicari, sehingga didapatkan jumlah ulangan sebanyak 4 ulangan.

### **3.2 Waktu dan Tempat**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret-Mei 2025 di Laboratorium Mikrobiologi serta Laboratorium Genetika dan Biomolekuler, Prodi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

### **3.3 Variabel Penelitian**

#### **3.3.1 Variabel Bebas**

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi CFS (*L. plantarum*) yang digunakan yaitu 12,5%, 25% dan 50%.

#### **3.3.2 Variabel Terikat**

Variabel terikat pada penelitian ini adalah Nilai Optical Density (OD) biofilm *S. epidermidis* setelah perlakuan.

### 3.3.3 Variabel Kontrol

Variabel kontrol pada penelitian ini adalah suhu dan waktu inkubasi

## 3.4 Alat dan Bahan

### 3.4.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi timbangan analitik, gelas beaker, *hot plate*, *magnetic stirrer*, tabung reaksi, tabung Erlenmeyer, pipet tetes, mikropipet beserta *microtube*, cawan petri, jarum ose, autoklaf, inkubator, sentrifus, vortex, tabung Eppendorf, *microplate* 96 (*flat-bottom*), *Microplate Reader*, spektrofotometer, *Laminar Air Flow* (LAF), serta perlengkapan penunjang lainnya seperti kamera, kertas label, buku catatan, dan spidol.

### 3.4.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini meliputi isolat bakteri uji *Lactobacillus plantarum* yang diperoleh dari kultur Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang serta isolat bakteri *Staphylococcus epidermidis* yang diperoleh dari stok kultur Universitas Brawijaya Malang. Medium Nutrient Agar (NA), medium De Man, Rogosa, dan Sharpe Agar (MRSA), serta medium De Man, Rogosa, dan Sharpe Broth (MRSB). Selain itu, digunakan juga medium Brain Heart Infusion Agar (BHIA), aquades, sukrosa, pewarna Merah Congo, medium Trypticase Soy Broth (TSB), larutan glukosa 1%, larutan pewarna Crystal Violet 1%, dan asam asetat 30%. Untuk keperluan sterilisasi dan perlindungan, digunakan juga kertas saring dengan pori 0,22  $\mu\text{m}$ , aluminium foil, kertas, plastik tahan panas, kapas, serta plastik wrap.

## 3.5. Prosedur Penelitian

### 3.5.1 Sterilisasi Alat

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

### 3.5.2 Pembuatan Media

Media untuk peremajaan isolat *Lactobacillus plantarum* menggunakan medium De Man, Rogosa, dan Sharpe Agar (MRSA), sedangkan *Staphylococcus epidermidis* diremajakan menggunakan medium Nutrient Agar (NA). Sebanyak 6,82 gram bubuk MRSA ditimbang dan dilarutkan dalam 100 mL aquades, kemudian dipanaskan di atas *hot plate* pada suhu 80°C selama 30 menit hingga larut sempurna. Selain itu, 4 gram bubuk NA juga ditimbang dan dilarutkan dalam 200 mL aquades dengan prosedur pemanasan serupa.

Media untuk mendeteksi pembentukan biofilm oleh bakteri patogen digunakan *Congo Red Agar* (CRA). Sebanyak 5,2 gram *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA), 3,6 gram sukrosa, dan 0,08 gram pewarna Merah Congo ditimbang. BHIA dan sukrosa dilarutkan dalam 100 mL aquades, lalu dipanaskan menggunakan *hot plate* hingga mendidih dan larut sempurna. Pewarna Merah Congo dipersiapkan secara terpisah dan disterilkan dengan cara autoklaf terpisah dari larutan media agar. Setelah proses autoklaf, pewarna Merah Congo ditambahkan ke dalam larutan media agar yang suhunya telah didinginkan hingga sekitar 80°C. Campuran media CRA kemudian dituangkan ke dalam cawan petri steril sebanyak 15 mL per cawan.

Media pertumbuhan untuk persiapan suspensi bakteri yang digunakan adalah *Trypticase Soy Broth* (TSB). Sebanyak 3 gram bubuk TSB ditimbang dan dilarutkan dalam 100 mL aquades, kemudian dipanaskan menggunakan *hot plate* hingga mendidih selama 30 menit. Larutan media tersebut selanjutnya dipindahkan ke dalam tabung Erlenmeyer berkapasitas 100 mL. Setelah semua media siap, dilakukan sterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit. Setelah proses sterilisasi selesai dan media sudah dingin, dilakukan penambahan glukosa 1% sebanyak 0,5 gram ke dalam salah satu tabung Erlenmeyer berisi media TSB. Penambahan glukosa bertujuan untuk meningkatkan pembentukan biofilm oleh bakteri.

Media untuk pembuatan *cell-free supernatant* (CFS) dari isolat *Lactobacillus plantarum* menggunakan *De Man, Rogosa, dan Sharpe Broth* (MRSB). Sebanyak 2,8 gram bubuk MRSB ditimbang dan dilarutkan dalam 50 mL aquades, kemudian dipanaskan di atas *hot plate* pada suhu 80°C selama 30 menit hingga larut sempurna.

### 3.5.3 Peremajaan Isolat Bakteri

Peremajaan isolat *Lactobacillus plantarum* dilakukan dengan menggunakan media De Man, Rogosa, dan Sharpe Agar (MRSA). Media MRSA yang telah disterilisasi kemudian dituangkan secara aseptik ke dalam cawan petri sebanyak 10 mL dan dibiarkan mengeras pada suhu ruang. Setelah media memadat, isolat bakteri diinokulasikan secara zigzag pada permukaan media MRSA, kemudian inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 48 jam.

Peremajaan isolat *Staphylococcus epidermidis* dilakukan dengan menggunakan media Nutrient Agar (NA). Sebanyak 5 mL media NA yang telah disterilisasi dituangkan ke dalam dua tabung reaksi yang dimiringkan, kemudian ditutup dengan kapas dan dibiarkan mengeras. Setelah media memadat, isolat *S. epidermidis* diinokulasikan secara zigzag pada permukaan media NA miring secara aseptik. Selanjutnya, tabung reaksi diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

### 3.5.4 Pembuatan *Cell free supernatant* (CFS)

Pembuatan *cell-free supernatant* (CFS) dilakukan dengan cara menambahkan 5 ose inokulum bakteri *Lactobacillus plantarum* ke dalam 45 mL media *De Man, Rogosa, dan Sharpe Broth* (MRSB), kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Setelah inkubasi, suspensi sel tersebut disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit pada suhu 20°C. Supernatan yang dihasilkan kemudian disaring menggunakan kertas saring steril dengan ukuran pori 0,22 µm untuk memperoleh CFS steril (Khiralla *et al.*, 2015).

Penentuan konsentrasi didasarkan pada hasil penelitian Lee *et al.* (2021) yaitu ditentukan menggunakan teknik pengenceran serial dalam 96-well plates. sehingga didapatkan konsentrasi 12,5%, 25%, dan 50%. Dari hasil pengenceran berturut-turut  $\frac{1}{4}$ ,  $\frac{1}{2}$ , dan 1. Larutan CFS dengan konsentrasi 12,5% dibuat dengan mencampurkan 125 µL *cell-free supernatant* ke dalam media Trypticase Soy Broth (TSB) hingga mencapai volume total 1 mL. Sedangkan untuk konsentrasi 25%, sebanyak 250 µL CFS dilarutkan dalam media TSB sampai volume akhir 1 mL. Untuk konsentrasi 50%, 500 µL CFS dicampurkan ke dalam media TSB hingga volume mencapai 1 mL. Seluruh suspensi tersebut kemudian dihomogenkan menggunakan vortex mixer untuk memastikan pencampuran yang merata.

### 3.5.5 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Suspensi bakteri *Staphylococcus epidermidis* dibuat dengan menggunakan media Trypticase Soy Broth (TSB) yang telah ditambahkan glukosa 1%. Sebanyak satu ose biakan murni *S. epidermidis* dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi 5 mL media TSB dengan penambahan glukosa secara aseptik, kemudian suspensi tersebut dihomogenkan menggunakan vortex. Tabung reaksi ditutup menggunakan kapas dan plastik wrap, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kepadatan sel bakteri diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm hingga diperoleh nilai optical density (OD) sebesar 0,2.

### 3.5.6 Pembuatan Kelompok Kontrol

Kelompok kontrol dalam penelitian ini terdiri dari dua jenis, yaitu kontrol negatif dan kontrol media. Kontrol negatif menggunakan suspensi bakteri *Staphylococcus epidermidis* tanpa perlakuan tambahan, sedangkan kontrol media terdiri dari campuran media Trypticase Soy Broth (TSB) dengan penambahan glukosa 1% tanpa adanya bakteri.

### 3.5.7 Uji Deteksi Pembentukan Biofilm

Pembentukan biofilm oleh bakteri uji diuji menggunakan metode Congo Red Agar (CRA). Isolat *Staphylococcus epidermidis* yang telah diremajakan diinokulasikan secara aseptik pada media CRA yang terdapat dalam cawan petri dengan teknik streak pada dua area. Kontrol negatif menggunakan isolat *S. epidermidis* yang telah diuji sebelumnya tanpa perlakuan. Selanjutnya, cawan petri diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dalam kondisi aerobik (Purbowati *et al.*, 2017). Hasil pengujian dievaluasi berdasarkan perubahan warna koloni pada media CRA. Koloni yang berwarna hitam pekat, hitam, atau hitam kemerahan dengan permukaan kasar, kering, dan kristalin dikategorikan sebagai pembentuk biofilm. Sebaliknya, koloni yang berwarna merah muda, merah, atau kemerahan dengan permukaan halus dianggap sebagai non-pembentuk biofilm (Purbowati *et al.*, 2017).

Deteksi pembentukan biofilm pada bakteri uji dilakukan menggunakan metode Microtiter Plate Assay (MtP) untuk menentukan tingkat kemampuan pembentukan biofilm secara kuantitatif. Sebanyak 200 µL suspensi bakteri

*Staphylococcus epidermidis* diinokulasikan ke dalam masing-masing sumur pada microplate 96-well yang steril. Kontrol negatif menggunakan 200  $\mu$ L campuran media TSB dan glukosa 1% yang dimasukkan ke dalam sumur kontrol negatif. Microplate kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah inkubasi, isi setiap sumur dibuang dan dilakukan pencucian dengan akuades steril sebanyak tiga kali, lalu dibiarkan kering pada suhu kamar selama 15 menit. Pewarnaan biofilm dilakukan dengan menambahkan 200  $\mu$ L larutan kristal violet 1% ke setiap sumur dan didiamkan selama 20 menit. Microplate kemudian dicuci kembali dengan akuades steril sebanyak tiga kali dan dikeringkan. Selanjutnya, ditambahkan 200  $\mu$ L asam asetat 30% ke dalam tiap sumur untuk melarutkan pewarna dan didiamkan selama 15 menit. Pengujian dilakukan dengan tiga kali ulangan. Nilai densitas optik (OD) diukur menggunakan microplate reader pada panjang gelombang 595 nm untuk menentukan tingkat pembentukan biofilm. Jika nilai OD bakteri uji lebih dari nilai OD kontrol negatif, maka bakteri tersebut positif membentuk biofilm. Perhitungan nilai cut off (ODcut) yaitu (Anggraini *et al*, 2023).:

$$\text{ODcut} = \text{Rata-rata ODc} + (3 \times \text{Standar Deviasi ODc})$$

Keterangan: ODcut = Optical Density cut-off

ODc = Optical Density control

**Tabel 3.1** Interpretasi Hasil OD dibagi kedalam kategori berikut:

| Rata-rata nilai OD   | Kekuatan Pembentuk Biofilm                                   | Interpretasi |
|--|--|--------------|
| $\text{OD}_{\text{isolat}} \leq \text{ODc}$                                    | <i>Non biofilm production</i> /tidak menghasilkan biofilm    | 0            |
| $\text{ODcut} < \text{OD}_{\text{isolat}} \leq 2 \times \text{ODcut}$          | <i>Weak biofilm production</i> /Membentuk biofilm lemah      | + atau 1     |
| $2 \times \text{ODcut} < \text{OD}_{\text{isolat}} \leq 4 \times \text{ODcut}$ | <i>Moderate biofilm production</i> /Membentuk biofilm sedang | ++ atau 2    |

|   |  |            |
|---|--|------------|
| 4x OD <sub>cut</sub> < OD <sub>isolat</sub> | <i>Strong biofilm production</i> /Membentuk biofilm kuat | +++ atau 3 |
|---|--|------------|

OD<sub>cut</sub> = Optical Density cut off, OD<sub>isolat</sub> = Optical Density isolat

Sumber: Hassan *et al* (2011).

### 3.5.8 Uji Aktifitas Antibiofilm

#### 3.5.8.1 Uji Pencegahan Perlekatan Biofilm (Nufus, 2022 dengan modifikasi).

Uji penghambatan perlekatan sel dilakukan dengan menggunakan microtiter plate flat-polystyrene 96-well. Pertama, sebanyak 200 µL Cell Free Supernatant (CFS) *Lactobacillus plantarum* dengan konsentrasi bervariasi 12,5%, 25%, dan 50% ditambahkan ke masing-masing sumur. Sumur tanpa penambahan CFS *L. plantarum* digunakan sebagai kontrol negatif, sedangkan kontrol media diisi dengan 200 µL campuran media TSB dan glukosa 1%. Microplate kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit. Setelah inkubasi, microplate dicuci tiga kali menggunakan akuades steril untuk menghilangkan sisa sampel, kemudian dikeringkan pada suhu ruang. Setelah kering, masing-masing sumur diberi 200 µL suspensi bakteri *Staphylococcus epidermidis* pada kelompok uji dan kontrol negatif, serta 200 µL campuran media TSB dan glukosa 1% pada sumur kontrol media. Microplate kemudian diinkubasi selama 72 jam pada suhu 37°C. Setelah inkubasi, microplate dicuci kembali tiga kali dengan akuades steril untuk menghilangkan sel planktonik yang tidak menempel, kemudian dikeringkan pada suhu ruang.

Pewarnaan biofilm dilakukan dengan menambahkan 200 µL larutan kristal violet 1% ke dalam setiap sumur microplate, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 20 menit untuk mewarnai biofilm yang terbentuk. Setelah pewarnaan, microplate dibilas menggunakan akuades steril untuk menghilangkan sel-sel yang tidak melekat, lalu dibiarkan kering pada suhu ruang. Selanjutnya, sebanyak 200 µL asam asetat 30% ditambahkan ke setiap sumur sebagai pelarut untuk melarutkan kristal violet yang terikat, kemudian diinkubasi kembali pada suhu ruang selama 20 menit. Nilai Optical Density (OD) dari larutan di dalam microplate diukur

menggunakan microplate reader pada panjang gelombang 595 nm. Tingkat pencegahan perlekatan sel biofilm dihitung menggunakan rumus berikut:

$$\% \text{Pencegahan Perlekatan Sel} = \frac{OD \text{ Kontrol negatif} - OD \text{ sampel eksperimental}}{OD \text{ Kontrol negatif}} \times 100\%$$

### 3.5.8.2 Uji Penghambatan Pertumbuhan Biofilm (Nufuz, 2022 dengan modifikasi).

Uji penghambatan pertumbuhan biofilm dilakukan dengan menambahkan 200  $\mu\text{L}$  Cell Free Supernatant (CFS) *Lactobacillus plantarum* pada berbagai konsentrasi (12,5%, 25%, dan 50%) ke dalam masing-masing sumur microplate, kemudian ditambahkan 200  $\mu\text{L}$  suspensi bakteri *Staphylococcus epidermidis*. Sebagai kontrol media, 200  $\mu\text{L}$  campuran media Trypticase Soy Broth (TSB) dan glukosa 1% dimasukkan ke dalam sumur kontrol media, sedangkan kontrol negatif berisi 200  $\mu\text{L}$  suspensi bakteri *S. epidermidis* tanpa penambahan CFS. Microplate kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah inkubasi, microplate dibilas dengan akuades steril sebanyak tiga kali untuk menghilangkan sel yang tidak menempel, kemudian dikeringkan pada suhu ruang.

Selanjutnya dilakukan pewarnaan biofilm dengan menambahkan 200  $\mu\text{L}$  larutan kristal violet 1% ke setiap sumuran microplate, lalu diinkubasi selama 20 menit pada suhu ruang. Setelah pewarnaan, microplate dibilas dengan akuades steril untuk menghilangkan pewarna yang tidak terikat, kemudian dibiarkan mengering. Selanjutnya, ditambahkan 200  $\mu\text{L}$  asam asetat 30% ke setiap sumuran untuk melarutkan kristal violet yang terikat, kemudian diinkubasi kembali selama 20 menit pada suhu ruang. Absorbansi larutan diukur menggunakan microplate reader pada panjang gelombang 595 nm untuk memperoleh nilai Optical Density (OD). Tingkat penghambatan pertumbuhan biofilm dihitung menggunakan rumus berikut:

$$\% \text{Penghambatan Pertumbuhan Sel} = \frac{OD \text{ Kontrol negatif} - OD \text{ sampel eksperimental}}{OD \text{ Kontrol negatif}} \times 100\%$$

### 3.5.8.3 Uji Degradasi Biofilm (Nufuz, 2022 dengan modifikasi)

Uji degradasi biofilm dilakukan dengan menumbuhkan biofilm terlebih dahulu pada microplate. Sebanyak 200  $\mu\text{L}$  suspensi bakteri *Staphylococcus epidermidis* dimasukkan ke dalam sumur uji dan sumur kontrol negatif, sedangkan

sumur kontrol media diisi dengan 200  $\mu$ L campuran media TSB dan glukosa 1%. Microplate diinkubasi selama 72 jam pada suhu 37°C untuk memungkinkan pembentukan biofilm. Setelah inkubasi, microplate dibilas tiga kali dengan akuades steril dan dikeringkan pada suhu ruang. Selanjutnya, untuk menguji kemampuan degradasi, 200  $\mu$ L Cell Free Supernatant (CFS) *Lactobacillus plantarum* dengan konsentrasi 12,5%, 25%, dan 50% ditambahkan ke sumur uji. Sumur tanpa penambahan CFS digunakan sebagai kontrol negatif. Microplate kemudian ditutup dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 60 menit. Setelah inkubasi, microplate kembali dibilas tiga kali dengan akuades steril dan dikeringkan pada suhu ruang.

Selanjutnya, biofilm yang telah mengalami perlakuan diwarnai dengan menambahkan 200  $\mu$ L larutan kristal violet 1% ke dalam masing-masing sumur microplate. Pewarnaan dilakukan dengan inkubasi selama 20 menit pada suhu ruang, kemudian microplate dibilas menggunakan akuades steril untuk menghilangkan pewarna yang tidak menempel dan dibiarkan mengering. Setelah kering, sebanyak 200  $\mu$ L asam asetat 30% ditambahkan ke tiap sumur untuk melarutkan kristal violet yang menempel, dan diinkubasi selama 20 menit pada suhu ruang. Pengukuran densitas optik (OD) dilakukan menggunakan microplate reader pada panjang gelombang 595 nm. Persentase degradasi biofilm dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{Degradasi Biofilm} = \frac{OD \text{ Kontrol negatif} - OD \text{ sampel eksperimental}}{OD \text{ Kontrol negatif}} \times 100\%$$

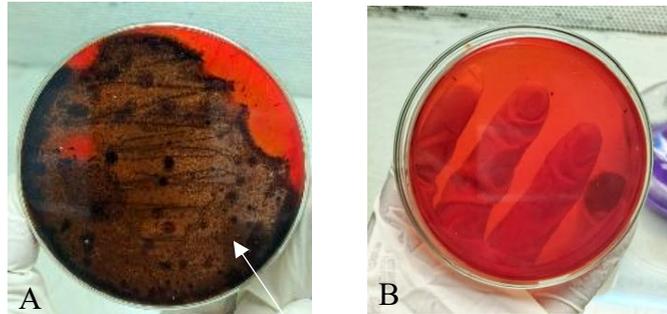
### 3.6 Analisis Data

Hasil dari uji aktivitas antibiofilm, yaitu uji pencegahan perlekatan, penghambatan pembentukan, dan degradasi biofilm, masing-masing dianalisis menggunakan SPSS. Data diuji normalitas dengan Shapiro-Wilk dan homogenitas dengan uji Levene's. Jika data berdistribusi normal dan homogen ( $p > 0,05$ ), digunakan uji parametrik One Way ANOVA, dan jika tidak, digunakan uji non-parametrik Kruskal-Wallis. Bila terdapat perbedaan yang signifikan ( $p < 0,05$ ), dilakukan uji lanjut Post-Hoc Tukey (untuk ANOVA) atau uji Mann-Whitney (untuk Kruskal-Wallis).

## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Pembentukan Biofilm *Staphylococcus epidermidis*

Hasil uji deteksi pembentukan biofilm bakteri *S. epidermidis* pada media CRA (Congo Red Agar) disajikan pada gambar 4.1.



**Gambar 4.1 Hasil uji deteksi pembentukan biofilm bakteri *S. epidermidis* pada media CRA (A: kiri hasil positif biofilm, B: kanan kontrol negatif) tanda panah: koloni hitam, penghasil biofilm.**

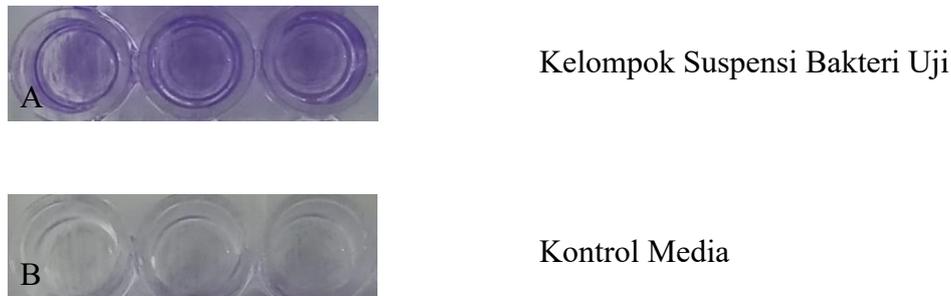
Uji deteksi pembentukan biofilm dalam penelitian ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri uji dalam membentuk biofilm. Hasil kultur bakteri uji *S. epidermidis* pada media CRA (*Congo Red Agar*) menunjukkan bahwa bakteri *S. epidermidis* mampu membentuk biofilm, yang ditunjukkan dengan perubahan warna koloni menjadi hitam serta permukaan koloni yang kering. Sementara itu, kontrol negatif yang digunakan sebagai pembandingan menghasilkan koloni berwarna merah hingga kemerahan. Hal ini sesuai dengan interpretasi dari penelitian Akbar *et al* (2022) yang menyatakan bahwa interpretasi deteksi biofilm pada CRA diklasifikasikan menjadi koloni hitam atau hitam kemerahan dengan konsistensi permukaan kasar dan kering merupakan koloni bakteri penghasil biofilm, sementara koloni merah atau merah muda dengan konsistensi permukaan halus dan lembap bukan merupakan pembentuk biofilm. Hal yang sama juga dikemukakan oleh Kaiser *et al* (2013) yang menjelaskan bahwa koloni *S. epidermidis* pada CRA dibagi menjadi koloni merah, merah tua bukan penghasil biofilm dan koloni hitam, dan coklat yang merupakan penghasil biofilm.

Proses penghitaman koloni bakteri pada media Congo Red Agar (CRA) disebabkan oleh interaksi kimia antara molekul Congo red dan eksopolisakarida (EPS) yang diproduksi oleh bakteri pembentuk biofilm. Bakteri *S. epidermidis*

menghasilkan senyawa polisakarida ekstraseluler, protein, dan asam nukleat yang membentuk matriks biofilm. Selain itu bakteri *S. epidermidis* memiliki senyawa PIA (*polisakarida interseluler adhesin*) sebagai komponen utama polisakarida yang berperan dalam pewarnaan oleh bakteri tersebut. Congo Red sebagai zat pewarna azo yang bermuatan negatif akan berikatan dengan senyawa positif atau gugus polar dalam senyawa EPS. EPS memiliki gugus hidroksil, amina, dan karboksil yang mampu berinteraksi melalui ikatan hidrogen dan gaya elektrostatik dengan Congo red, sehingga akan terjadi penyerapan Congo red oleh EPS. Interaksi ini menyebabkan Congo red menjadi terikat secara permanen atau semipermanen membentuk kompleks Congo red-EPS pada permukaan koloni, terutama pada EPS yang diproduksi secara berlebihan. Pewarnaan menjadi intens karena terjadi agregasi dan perubahan konformasi Congo red, menyebabkan pergeseran spektrum serapan cahaya sehingga warna tampak lebih gelap (hitam atau ungu kehitaman). Kompleks Congo red-EPS menyebabkan koloni hitam terlihat kering atau kehitaman, terutama setelah inkubasi 24–48 jam. Warna ini menunjukkan bahwa bakteri tersebut memiliki kemampuan tinggi dalam membentuk biofilm. Sebaliknya, jika EPS tidak diproduksi atau dalam jumlah kecil, Congo red tidak akan mengikat secara signifikan, sehingga koloni tampak merah atau merah muda.

Uji deteksi pembentukan biofilm yang kedua menggunakan metode Microtiter Plate Assay (MtP). Bakteri uji *S. epidermidis* pada metode ini ditumbuhkan dalam media TSB sebagai media yang kaya akan protein dan karbohidat untuk nutrisi bakteri uji tersebut serta penambahan 1% glukosa ke dalam media TSB untuk meningkatkan pembentukan biofilm. Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Vaschenko *et al* (2021) yang dalam penelitian tersebut didapatkan hasil bahwa penambahan glukosa hingga 2% meningkatkan jumlah sel dalam biofilm secara signifikan dibandingkan kontrol, hal ini menunjukkan bahwa glukosa dapat memengaruhi produksi polisakarida interseluler adhesin (PIA), komponen utama dalam matriks biofilm. Setelah bakteri uji *S. epidermidis* sudah dikultivasi pada microplate, selanjutnya dilakukan pewarnaan dengan kristal violet 1%. Menurut (Ball *et al*, 2022) dalam penelitiannya menyatakan bahwa kristal violet akan bermuatan dengan komponen bermuatan negatif dalam matriks biofilm, seperti polisakarida dan protein yang terdapat dalam

bakteri penghasil biofilm, sehingga memungkinkan pewarnaan kristal violet terhadap bakteri uji akan tetap terikat meskipun setelah proses pencucian. Proses pembentukan biofilm yang diuji menggunakan metode mikrotiter plate divisualisasikan dalam Gambar 4.2



**Gambar 4.2. Hasil uji deteksi pembentukan biofilm bakteri *S. epidermidis* pada microplate (kelompok uji terletak di sebelah atas (A) dan kelompok kontrol media di sebelah bawah (B))**

Gambar tersebut memperlihatkan bahwa *Staphylococcus epidermidis* mampu membentuk biofilm, yang ditandai dengan terbentuknya plak berwarna ungu pada bagian dasar maupun dinding sumur mikrotiter plate. Fenomena ini tidak ditemukan pada kelompok kontrol negatif, yang menunjukkan bahwa bakteri uji memiliki kemampuan adhesi dan produksi matriks biofilm. Hal ini sesuai dengan pernyataan dari Akbar *et al.* (2022), yang menyatakan bahwa metode mikrotiter plate efektif dalam mendeteksi pembentukan biofilm oleh *S. epidermidis*, dengan pewarnaan kristal violet yang menunjukkan adanya biofilm pada permukaan sumur mikrotiter plate. Hasil positif terlihat ketika terbentuk plak yang mampu mengikat pewarna kristal violet sehingga tampak berwarna ungu. Berdasarkan gambar tersebut, bakteri *Staphylococcus epidermidis* menunjukkan pembentukan biofilm yang tebal, yang ditandai dengan warna ungu yang pekat pada plak di kelompok uji. Hal ini sejalan dengan penjelasan dari Jannah *et al.* (2023) yang menyatakan bahwa semakin tebal biofilm yang terbentuk, semakin banyak kristal violet yang terikat dan tertahan dalam matriks biofilm, sehingga nilai absorbansi atau intensitas warna ungu yang terukur akan meningkat.

Hasil uji deteksi pembentukan biofilm selanjutnya digunakan metode microplate untuk mengukur nilai *Optical Density (OD)* pada bakteri uji. Pengukuran OD dilakukan untuk mengetahui kemampuan bakteri uji dalam membentuk biofilm dengan kategori pembentuk biofilm lemah, sedang atau kuat. Menurut Karamba dan Ahmad (2024) *Optical Density (OD)* pada panjang gelombang tertentu menunjukkan korelasi linier yang signifikan dengan jumlah sel hidup (CFU/mL) dan biomassa mikroba (mg/mL) dalam kultur bakteri yang diuji. Selain itu penelitian oleh Yokoi *et al* (2024) menunjukkan bahwa pola hamburan cahaya dapat digunakan untuk menyatukan pembentukan biofilm di dalam tabung kaca. Perubahan dalam pola hamburan cahaya mencerminkan pertumbuhan dan struktur biofilm, yang terhambat dengan peningkatan kekeruhan media. Semakin tinggi nilai OD berarti semakin keruh media yang menandakan semakin banyaknya biofilm yang terbentuk. Nilai *Optical Density (OD)* yang diperoleh dari pengukuran pembentukan biofilm disajikan secara sistematis dalam Tabel 4.1.

**Tabel 4.1. Nilai OD dan ODc**

| Perlakuan            | Ulangan 1 | Ulangan 2 | Ulangan 3                            | Rata-rata |
|----------------------|-----------|-----------|--------------------------------------|-----------|
| Kontrol              | 0,030     | 0,035     | 0,028                                | 0,031     |
| <i>S.epidermidis</i> | 0,228     | 0,185     | 0,210                                | 0,207     |
| Standar Deviasi (SD) |           |           | Nilai ODc                            |           |
| 0,0036               |           |           | Rata-rata OD kontrol + 3x SD kontrol |           |
|                      |           |           | 0,0418                               |           |
| 0,207 > 4xODc        |           |           | Kategori Biofilm                     |           |
| 0,207 > 0,1672       |           |           | Biofilm Kuat                         |           |

Sumber: Hassan, *et al* (2011)

**Tabel 4.2 Kategori Ambang Batas Kekuatan Biofilm**

| Kategori Biofilm        |                       | Kategori berdasarkan ODc=0,0418 |
|-------------------------|-----------------------|---------------------------------|
| Tidak Membentuk Biofilm | $\leq ODc$            | $\leq 0,0418$                   |
| Biofilm Lemah           | $>ODc - \leq 2xODc$   | $>0,0418 - \leq 0,0836$         |
| Biofilm Sedang          | $>2xODc - \leq 4xODc$ | $>0,0836 - \leq 0,1672$         |

|              |        |         |
|--------------|--------|---------|
| Biofilm Kuat | >4xODc | >0,1672 |
|--------------|--------|---------|

Sumber: Hassan, *et al* (2011)

Uji ini bertujuan untuk mengetahui kemampuan pembentukan biofilm oleh isolat bakteri uji dengan cara mengukur nilai Optical Density (OD) yang kemudian dibandingkan dengan nilai OD dari kontrol tanpa perlakuan (kontrol negatif). Hasil pengukuran menunjukkan bahwa isolat bakteri uji memiliki nilai OD yang lebih tinggi dibandingkan dengan kontrol negatif, yang mengindikasikan bahwa biofilm terbentuk pada permukaan media uji. Temuan ini konsisten dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Hassan *et al.* (2011), yang menjelaskan bahwa peningkatan nilai OD mencerminkan akumulasi biomassa biofilm pada permukaan. Oleh karena itu, nilai OD dapat digunakan sebagai indikator kuantitatif untuk menilai tingkat pembentukan dan penghilangan biofilm oleh bakteri.

Berdasarkan data pada Tabel 4.1, dan hasil perhitungan pada lampiran 11. isolat bakteri uji *Staphylococcus epidermidis* menunjukkan kemampuan pembentukan biofilm yang tergolong kuat. Hal ini ditunjukkan oleh nilai Optical Density (OD) isolat yang memenuhi kriteria >4xODc, sesuai dengan klasifikasi kuantitatif pembentukan biofilm. Temuan ini sejalan dengan hasil penelitian oleh Grzebyk *et al.* (2021), yang melaporkan bahwa 87% dari isolat *S. epidermidis* yang diuji merupakan pembentuk biofilm kuat. Lebih lanjut, penelitian oleh Liu *et al.* (2023) menekankan bahwa bakteri pembentuk biofilm kuat memiliki kemampuan untuk membentuk matriks biofilm yang lebih cepat dan lebih tebal dibandingkan dengan bakteri pembentuk biofilm sedang atau lemah dalam periode waktu yang sama. Kondisi ini menyebabkan bakteri pembentuk biofilm kuat, seperti *S. epidermidis*, memiliki resistensi yang lebih tinggi terhadap antibiotik, sehingga menyulitkan proses eradikasi infeksi yang disebabkan oleh bakteri tersebut.

Pembentukan biofilm oleh bakteri secara umum terdiri dari tiga tahap, yaitu attachment (penempelan), maturasi, dan dispersi, sebagaimana dijelaskan oleh Qi *et al.* (2023) dan Masud *et al.* (2022). Pada tahap attachment, bakteri melakukan perlekatan awal secara reversibel pada permukaan substrat dan antar sel. Tahapan ini kemudian berkembang menjadi perlekatan ireversibel yang ditandai dengan pembentukan mikrokoloni. Proses ini melibatkan komunikasi antar sel melalui

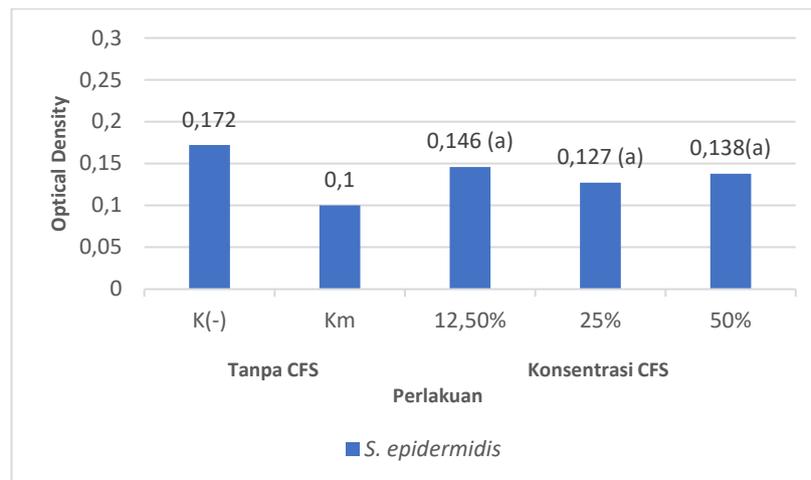
mekanisme *quorum sensing*, yang berperan dalam pengaturan ekspresi genetik setelah tercapainya ambang populasi tertentu, sehingga memicu produksi eksopolisakarida sebagai komponen utama matriks biofilm. Pada tahap maturasi, struktur biofilm menjadi lebih kompleks dengan terbentuknya pori-pori yang memfasilitasi difusi oksigen, penyerapan nutrisi, serta pengeluaran produk limbah dan sel mati. Akhirnya, pada tahap dispersi, sel-sel bakteri dapat melepaskan diri dari biofilm dan kembali ke bentuk planktonik untuk menyebar ke lingkungan baru.

#### **4.2 Aktivitas Antibiofilm Cell-Free Supernatant *Lactobacillus plantarum* Terhadap *Staphylococcus epidermidis***

Zat antibiofilm yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Cell-Free Supernatant* (CFS) yang diperoleh dari hasil ekstraksi kultur bakteri *Lactobacillus plantarum* yang ditumbuhkan dalam media MRSB dan diinkubasi selama 48 jam. Menurut penelitian oleh Ogunbanwo *et al.* (2017), produksi maksimum bakteriosin oleh *L. plantarum* dicapai setelah 48 jam inkubasi pada suhu 37°C dan pH 5,5, dengan aktivitas antibakteri mencapai 200 AU/mL. Selain itu, studi oleh Wang *et al.* (2020) menunjukkan bahwa produksi eksopolisakarida (EPS) oleh *L. plantarum* meningkat secara signifikan hingga 44 jam inkubasi, dengan hasil mencapai 4370 mg/L. Uji aktivitas antibiofilm dalam penelitian ini meliputi tiga pendekatan: uji pencegahan penempelan biofilm (anti-adhesi), uji penghambatan pembentukan biofilm, dan uji degradasi biofilm yang telah terbentuk.

##### **4.2.1 Uji Pencegahan Penempelan Biofilm *Staphylococcus epidermidis***

Pengujian aktivitas pencegahan penempelan biofilm dilakukan untuk mengevaluasi kemampuan *Cell-Free Supernatant* (CFS) dari *Lactobacillus plantarum* dalam menghambat adhesi awal sel bakteri uji pada permukaan substrat selama tahap inisiasi pembentukan biofilm. Hasil pengujian ini disajikan secara rinci pada Lampiran 6, sedangkan data nilai Optical Density (OD) serta persentase efektivitas pencegahan penempelan biofilm ditampilkan pada Gambar 4.3 dan 4.4.

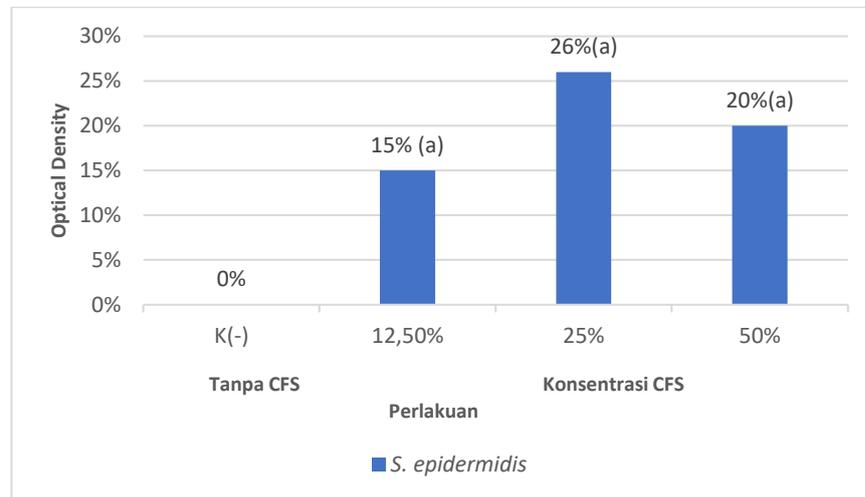


**Gambar 4.3. Hasil OD uji pencegahan penempelan biofilm *S. epidermidis*.**  
Keterangan: Notasi huruf berbeda menunjukkan adanya perbedaan signifikan ( $p\text{-value} < 0,05$ ).

Gambar 4.3 menunjukkan bahwa kontrol media menghasilkan nilai OD paling rendah, yaitu sebesar 0,100. Sebaliknya, kontrol negatif yang terdiri dari suspensi *Staphylococcus epidermidis* tanpa perlakuan CFS menghasilkan nilai OD tertinggi sebesar 0,172. Seluruh perlakuan yang mengandung CFS menunjukkan penurunan nilai OD dibandingkan kontrol negatif. Penurunan ini menunjukkan bahwa formasi matriks biofilm menjadi lebih tipis atau berkurang akibat perlakuan tersebut, sehingga dapat disimpulkan bahwa CFS dari *Lactobacillus plantarum* memiliki efektivitas dalam menghambat tahap awal adhesi biofilm yaitu proses awal penempelan biofilm oleh *S. epidermidis*.

Hasil pengujian menunjukkan bahwa konsentrasi 12,5% menghasilkan nilai OD tertinggi sebesar 0,146 untuk *S. epidermidis*, sedangkan konsentrasi 25% menghasilkan nilai OD terendah sebesar 0,127. Data ini menunjukkan bahwa CFS dengan konsentrasi 25% merupakan yang paling efektif dalam menghambat penempelan biofilm, ditunjukkan oleh rendahnya nilai OD dibandingkan konsentrasi lainnya. Dari hasil pengujian yang ditampilkan oleh (Gambar 4.3) juga menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan antara hasil OD sampel uji karena semua sampel memiliki notasi yang sama (a) berdasarkan hasil uji statistik. Secara keseluruhan, nilai OD menunjukkan tren penurunan dari konsentrasi 12,5% ke 25%, lalu meningkat kembali pada konsentrasi 50%, meskipun nilai OD pada konsentrasi 50% sebesar 0,138 tetapi masih lebih rendah dibandingkan 12,5%. Tren

ini mengindikasikan bahwa efektivitas CFS dalam menghambat biofilm paling tinggi pada konsentrasi 25%, dan efektivitasnya menurun kembali pada konsentrasi yang lebih tinggi, yaitu 50%.



**Gambar 4.4 Presentase aktivitas pencegahan penempelan biofilm *S. epidermidis*.** Keterangan: Notasi huruf berbeda menunjukkan adanya perbedaan signifikan ( $p$ -value < 0,05).

Dari gambar tersebut dapat diketahui bahwa tidak adanya perbedaan signifikan dari masing-masing konsentrasi dengan ditunjukkan oleh notasi yang sama (a) (Gambar 4.4). Gambar tersebut juga menunjukkan kemampuan CFS *L. plantarum* dalam mencegah penempelan biofilm meningkat dari konsentrasi 12,5% hingga mencapai titik tertinggi pada konsentrasi 25%, kemudian turun kembali pada konsentrasi 50%. Semakin tinggi konsentrasi CFS yang diaplikasikan, semakin besar penghambatan penempelan biofilm yang ditunjukkan hingga konsentrasi optimum, namun setelah itu efektivitasnya menurun. Peningkatan efektivitas CFS *L. plantarum* dalam menghambat biofilm disebabkan oleh akumulasi senyawa antimikroba aktif seperti asam organik, biosurfaktan, dan bakteriosin yang mengganggu pembentukan matriks biofilm dan adhesi awal bakteri. Namun, pada konsentrasi 50%, efektivitas menurun yang kemungkinan disebabkan oleh stres lingkungan berlebihan yang memicu respon adaptif bakteri atau ketidakseimbangan komponen aktif dalam CFS (Murphy *et al*, 2024).

Konsentrasi *Cell-Free Supernatant* (CFS) sebesar 25% menunjukkan kemampuan tertinggi dalam mencegah aktivitas penempelan biofilm oleh

*Staphylococcus epidermidis*, dengan persentase pencegahan sebesar 26%. Sebaliknya, konsentrasi CFS 12,5% menunjukkan efektivitas terendah, yaitu hanya 15%. Menurut kriteria yang dikemukakan oleh Misba *et al.* (2022), aktivitas antibiofilm dikategorikan sebagai "baik" apabila mampu menghambat pembentukan biofilm dengan persentase  $\geq 50\%$ , sedangkan aktivitas dengan persentase 0–49% dianggap "rendah". Dengan demikian, seluruh konsentrasi CFS yang diuji dalam penelitian ini belum mencapai ambang batas efektivitas tersebut, sehingga diklasifikasikan memiliki aktivitas antibiofilm yang rendah terhadap *S. epidermidis*.

Efek CFS terhadap pencegahan penempelan biofilm *S. epidermidis* yang rendah dalam penelitian ini disebabkan oleh komposisi matriks biofilm *S. epidermidis* dan ketahanannya terhadap terapi antibiofilm dari CFS *L. Plantarum*. Penelitian yang dilakukan oleh Tübel *et al.* (2021) menjelaskan bahwa *S. epidermidis* memproduksi polisakarida adhesif (PIA/PNAG) dalam jumlah yang besar yang berperan penting dalam pembentukan dan stabilitas biofilm. Selain itu, *S. epidermidis* juga menghasilkan senyawa *Phenol-Soluble Modulins* (PSM) yaitu peptida yang berfungsi untuk meningkatkan adhesi dan stabilitas biofilm, serta dapat melindungi bakteri dari faktor-faktor eksternal, termasuk antibiofilm. Sehingga CFS *L. plantarum*, seperti asam laktat dan peptida antibiofilm bakteri akan kesulitan untuk menembus lapisan matriks biofilm yang kuat, sehingga efektivitasnya menjadi berkurang.

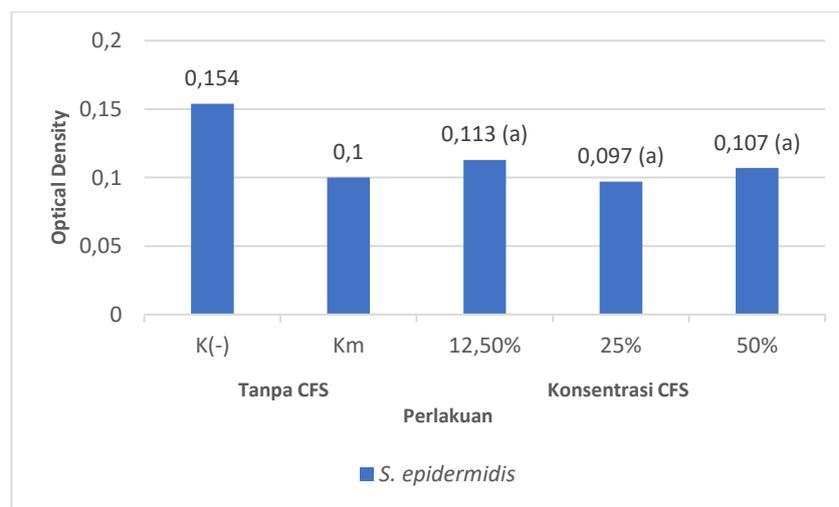
Hasil dari uji pencegahan penempelan biofilm selanjutnya dianalisis secara statistik. Sebelum dilakukan analisis lebih lanjut, dilakukan uji normalitas dan homogenitas untuk memastikan kecocokan distribusi data. Uji normalitas dilakukan menggunakan uji Shapiro-Wilk, yang menunjukkan bahwa terdapat kelompok data yang tidak terdistribusi normal yaitu pada kelompok data CFS konsentrasi 25% dengan nilai  $p < 0,05$ . Sehingga uji lanjut yang digunakan yaitu uji nonparametrik kruskal wallis untuk membandingkan tiga atau lebih kelompok yang tidak berpasangan dengan data ordinal atau interval/rasio yang tidak berdistribusi normal.

Hasil uji nonparametrik kruskal wallis menunjukkan nilai  $p\text{-value} > 0,05$ , sehingga berdasarkan hasil uji kruskal-wallis tersebut, tidak ditemukan perbedaan

yang signifikan/nyata antara ketiga kelompok perlakuan. Hal ini menunjukkan bahwa secara statistik, tidak ada perbedaan yang nyata atau signifikan dari ketiga perlakuan yang diberikan, sehingga uji lanjut post-hoc tidak memenuhi untuk dilakukan karena tidak adanya perbedaan yang nyata dari ketiga kelompok perlakuan.

#### 4.2.2 Uji Penghambatan pembentukan Biofilm *Staphylococcus epidermidis*

Uji penghambatan pembentukan biofilm dilakukan untuk mengevaluasi kemampuan CFS *L. plantarum* dalam menghambat pembentukan biofilm pada bakteri uji selama fase pertumbuhannya. Hasil dari uji pencegahan penempelan biofilm dapat dilihat pada lampiran 7. Data mengenai pengukuran OD dan persentase penghambatan pembentukan biofilm disajikan pada gambar 4.5 dan 4.6.



**Gambar 4.5. Hasil OD uji penghambatan pembentukan biofilm *S. epidermidis*.**

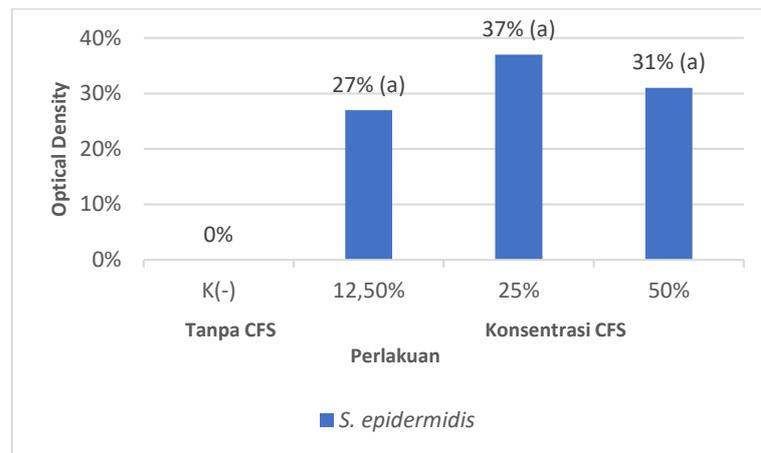
Keterangan: Notasi huruf berbeda menunjukkan adanya perbedaan signifikan ( $p$ -value < 0,05).

Dari hasil pengujian yang ditampilkan oleh (Gambar 4.5) menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan antara hasil OD sampel uji karena semua sampel memiliki notasi yang sama (a) berdasarkan hasil uji statistik. Gambar yang ditampilkan juga menunjukkan bahwa kelompok kontrol negatif menghasilkan nilai OD tertinggi di antara semua kelompok perlakuan, yaitu 0,154. Semua kelompok uji dengan berbagai konsentrasi menunjukkan nilai OD yang lebih rendah dibandingkan dengan kontrol negatif. Penurunan nilai OD ini mengindikasikan

adanya pengurangan ketebalan matriks biofilm yang disebabkan oleh perlakuan menggunakan CFS *L. plantarum*. Hal ini membuktikan bahwa CFS *L. plantarum* memiliki potensi untuk menghambat pembentukan biofilm pada *S. epidermidis*.

Grafik nilai OD *S. epidermidis* menunjukkan penurunan dari konsentrasi 12,5% hingga 25%, kemudian nilai OD naik kembali pada konsentrasi 50% yang menandakan penurunan efektivitas dalam penghambatan pembentukan biofilm. Peningkatan nilai OD ini dapat disebabkan oleh kejenuhan reaksi antara senyawa aktif dalam CFS dan reseptor target pada bakteri. Tan *et al.* (2020) menjelaskan bahwa setelah suatu senyawa mencapai titik kejenuhan terhadap targetnya, penambahan dosis lebih lanjut tidak akan menyebabkan peningkatan proporsional terhadap efek yang diinginkan. Penelitian lain oleh Li *et al.* (2021) juga menekankan bahwa hubungan antara dosis dan respons tidak selalu bersifat linier, yang berarti peningkatan dosis tidak selalu berbanding lurus dengan peningkatan efektivitas pengobatan. Hal ini menunjukkan bahwa setelah dosis tertentu, peningkatan konsentrasi CFS justru tidak berkontribusi pada peningkatan penghambatan biofilm pada *S. epidermidis*.

Seluruh nilai OD penghambatan pada *S. epidermidis* lebih rendah dibandingkan dengan kontrol negatif. Nilai OD tertinggi pada *S. epidermidis* tercatat pada konsentrasi 12,5%, yaitu 0,113, sementara nilai OD terendah terdapat pada konsentrasi 25%, yakni 0,097. Dari hasil ini, dapat disimpulkan bahwa pada *S. epidermidis*, peningkatan konsentrasi CFS dari 25% ke 50% justru menyebabkan peningkatan nilai OD, yang mencerminkan penurunan efektivitas penghambatan pembentukan biofilm. Konsentrasi CFS 25% menunjukkan hasil yang paling optimal dalam menghambat pembentukan biofilm *S. epidermidis*, karena menghasilkan nilai OD terendah. Hal ini menunjukkan bahwa pada penambahan konsentrasi yang lebih tinggi dari konsentrasi optimal, efektivitas penghambatan tidak meningkat secara proporsional, bahkan dapat menurun. Dari hasil pengujian yang ditampilkan oleh (Gambar 4.5) juga menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan antara hasil OD sampel uji karena semua sampel memiliki notasi yang sama (a) berdasarkan hasil uji statistik



**Gambar 4.6. Presentase aktivitas penghambatan pembentukan biofilm *S. epidermidis*.** Keterangan: Notasi huruf berbeda menunjukkan adanya perbedaan signifikan ( $p$ -value < 0,05).

Hasil dari persentase penghambatan pembentukan biofilm yang diperoleh menunjukkan tidak adanya perbedaan signifikan dari masing-masing konsentrasi dengan ditunjukkan oleh notasi yang sama (a) (Gambar 4.6). Hasil tersebut juga menunjukkan adanya penurunan dalam efektivitas penghambatan biofilm pada *S. epidermidis* seiring dengan peningkatan konsentrasi CFS dari konsentrasi 25% yang merupakan konsentrasi optimal dibandingkan lainnya. Data ini mengindikasikan bahwa, pada konsentrasi yang lebih tinggi dari konsentrasi optimal justru terjadi penurunan persentase penghambatan pembentukan biofilm. Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi CFS dari konsentrasi optimal menyebabkan penurunan kemampuan senyawa tersebut dalam menghambat pembentukan biofilm, yang dapat disebabkan oleh faktor kejenuhan reaksi antara senyawa aktif dalam CFS dan targetnya pada bakteri.

Konsentrasi Cell-Free Supernatant (CFS) 25% menunjukkan kemampuan paling efektif dalam menghambat pembentukan biofilm *Staphylococcus epidermidis*, dengan tingkat penghambatan mencapai 37%. Sebaliknya, konsentrasi CFS 12,5% memberikan hasil yang paling rendah, yaitu 27%. Berdasarkan kriteria yang diusulkan oleh Misba *et al.* (2022), aktivitas antibiofilm dianggap "baik" apabila dapat menghambat pembentukan biofilm dengan persentase penghambatan  $\geq 50\%$ . Sedangkan, aktivitas antibiofilm dengan persentase penghambatan antara 0–49% dikategorikan sebagai "rendah". Oleh karena itu, hasil penelitian ini menunjukkan bahwa semua konsentrasi CFS yang diuji belum mampu mencapai

ambang batas efektivitas yang ditetapkan, sehingga dapat disimpulkan bahwa aktivitas penghambatan pembentukan biofilm oleh CFS terhadap *S. epidermidis* tergolong rendah.

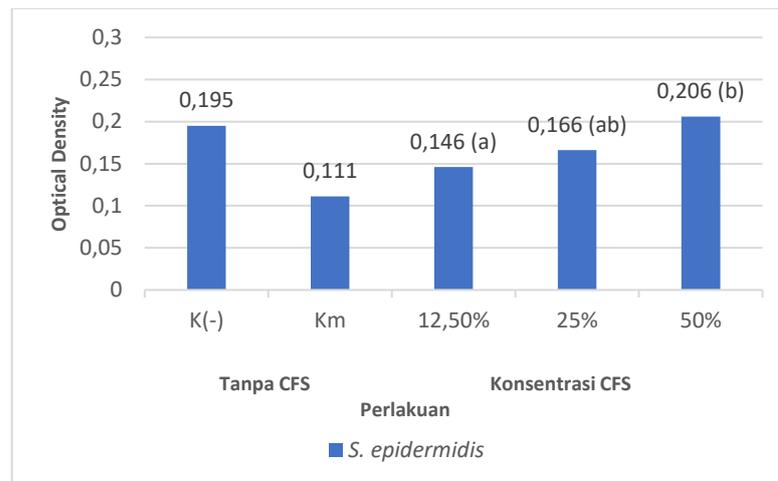
Setelah bakteri melekat pada permukaan (proses perlekatan atau adhesi), proses pembentukan biofilm berlanjut melalui tahap pertumbuhan dan pematangan. Pada tahap pertumbuhan, bakteri mengaktifkan komunikasi antar sel atau Quorum Sensing (QS), yang mengatur ekspresi gen dan memulai pembentukan matriks biofilm. *Lactobacillus plantarum* menghasilkan CFS yang dapat mengganggu mekanisme QS pada *S. epidermidis* sehingga menghambat pembentukan biofilm dan adhesi bakteri pada permukaan. Sebagaimana dijelaskan oleh Jang *et al.* (2024), CFS dari *Lactobacillus plantarum* dapat mengurangi aktivitas QS *S. mutans*, yang berperan penting dalam pembentukan biofilm, sehingga menurunkan kapasitas *S. mutans* untuk membentuk biofilm. Selain itu, metabolit antagonistik seperti bakteriosin yang diproduksi oleh *L. plantarum* dapat merusak struktur dan matriks biofilm yang mengganggu proses dan menghambat pematangan biofilm *S. epidermidis* (Jang *et al.*, 2024).

Hasil uji penghambatan pertumbuhan biofilm kemudian dianalisis secara statistik. Sebelum melanjutkan analisis lebih lanjut, dilakukan uji normalitas dan homogenitas untuk memastikan kesesuaian distribusi data. Uji normalitas menggunakan uji Shapiro-Wilk menunjukkan bahwa terdapat kelompok data *S. epidermidis* yang tidak terdistribusi normal dengan nilai  $p < 0,05$ . Sehingga uji selanjutnya digunakan uji nonparametrik kruskal-wallis yaitu untuk membandingkan tiga atau lebih kelompok yang tidak berpasangan dengan data ordinal atau interval/rasio yang tidak berdistribusi normal.

Hasil uji nonparametrik kruskal wallis menunjukkan nilai  $p$ -value  $> 0,05$ , sehingga berdasarkan hasil uji kruskal-wallis tersebut, tidak ditemukan perbedaan yang signifikan/nyata antara ketiga kelompok perlakuan. Hal ini menunjukkan bahwa secara statistik, tidak ada perbedaan yang nyata atau signifikan dari ketiga perlakuan yang diberikan, sehingga uji lanjut post-hoc tidak memenuhi untuk dilakukan karena tidak adanya perbedaan yang nyata dari ketiga kelompok perlakuan.

#### 4.2.3 Uji Penghancuran/Degradasi Biofilm *Staphylococcus epidermidis*

Uji penghancuran biofilm dilakukan untuk mengevaluasi kemampuan CFS *Lactobacillus plantarum* dalam menghancurkan biofilm bakteri uji yang telah terbentuk. Hasil dari uji penghancuran biofilm dapat ditemukan pada Lampiran 8. Data mengenai pengukuran nilai OD dan persentase penghancuran biofilm disajikan pada Gambar 4.7 dan 4.8.

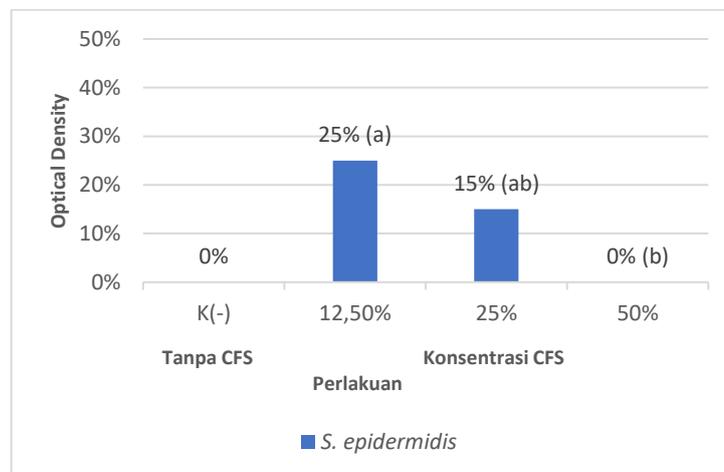


**Gambar 4.7. Hasil OD uji penghancuran biofilm *S. epidermidis*.** Keterangan: Notasi huruf berbeda menunjukkan adanya perbedaan signifikan (p-value < 0,05).

Dari hasil pengujian yang ditampilkan oleh (Gambar 4.7) menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan antara hasil OD sampel uji karena semua sampel memiliki notasi yang sama (a) berdasarkan hasil uji statistik. Hasil pengukuran OD pada uji penghancuran biofilm dari gambar tersebut juga menunjukkan bahwa kelompok perlakuan konsentrasi CFS 15% dengan OD 0,146 dan 25% dengan OD 0,166 menunjukkan nilai yang lebih rendah dibandingkan nilai OD kontrol negatif sebesar 0,195. Sementara pada konsentrasi CFS 50% dengan nilai OD 0,206 justru memiliki nilai OD yang sedikit lebih tinggi dibandingkan kontrol negatif. Penurunan nilai OD ini mengindikasikan adanya pengurangan ketebalan biofilm yang terbentuk setelah perlakuan dengan CFS, yang mengindikasikan bahwa CFS *Lactobacillus plantarum* memiliki kemampuan dalam menghancurkan biofilm *S. epidermidis*. Sementara kenaikan nilai OD pada konsentrasi 50% menunjukkan

indikasi sebagai hasil dari respons adaptif bakteri terhadap stres lingkungan yang berlebihan akibat tingginya konsentrasi senyawa antimikroba dalam CFS.

Nilai Optical Density (OD) tertinggi pada kelompok uji tercatat pada *S. epidermidis* dengan konsentrasi CFS 50%, yaitu 0,206 sedangkan nilai OD terendah ditemukan pada konsentrasi CFS 12,5%, dengan hasil 0,146. Konsentrasi CFS 12,5% terbukti paling efektif dalam menghancurkan biofilm *S. epidermidis*, karena menghasilkan nilai OD terendah yang menunjukkan perbedaan dibandingkan dengan konsentrasi lainnya. Peningkatan nilai OD dari konsentrasi 12,5% hingga 50% menunjukkan hubungan langsung antara peningkatan konsentrasi CFS dan peningkatan efektivitas penghancuran biofilm. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi CFS yang digunakan, semakin besar juga nilai OD yang tercatat, yang mencerminkan kejenuhan pada CFS yang digunakan sehingga peningkatan efektivitas dalam menghancurkan biofilm *S. epidermidis* akan berkurang seiring dengan meingkatnya konsentrasi CFS yang digunakan.



**Gambar 4.8. Presentase penghancuran biofilm *S. epidermidis*.** Keterangan: Notasi huruf berbeda menunjukkan adanya perbedaan signifikan (p-value < 0,05).

Hasil uji penghancuran biofilm menunjukkan bahwa terdapat perbedaan signifikan dari konsentrasi 12,5% dan 50% dengan ditunjukkan oleh notasi yang berbeda (Gambar 4.8). Dari gambar tersebut juga menunjukkan adanya peningkatan konsentrasi CFS secara langsung berhubungan dengan penurunan persentase penghancuran biofilm pada bakteri *S. epidermidis*. Hal ini menggambarkan bahwa

penggunaan CFS dengan konsentrasi yang lebih tinggi akan menghasilkan efek penurunan penghancuran biofilm. Proses ini dapat diindikasikan sebagai hasil dari respons adaptif bakteri terhadap stres lingkungan yang berlebihan akibat tingginya konsentrasi senyawa antimikroba dalam CFS. Studi oleh Murphy *et al.* (2024) menunjukkan bahwa konsentrasi tinggi CFS dapat memicu peningkatan aktivitas metabolik yang mengindikasikan respons adaptif terhadap tekanan lingkungan yang tinggi. Hal ini menunjukkan bahwa, alih-alih menghambat, kondisi stres yang berlebihan dapat memicu bakteri untuk memperkuat pembentukan biofilm sebagai mekanisme pertahanan.

Pada penelitian ini, konsentrasi Cell-Free Supernatant (CFS) 12,5% menunjukkan hasil terbaik dalam menghilangkan atau merusak biofilm *Staphylococcus epidermidis*, dengan tingkat penghancuran mencapai 25%. Berdasarkan kriteria yang ditetapkan oleh Misba *et al.* (2022), aktivitas antibiofilm dikategorikan sebagai "baik" jika dapat mengurangi biofilm sebesar  $\geq 50\%$ , sedangkan pengurangan antara 0-49% dianggap "rendah". Oleh karena itu, hasil penelitian ini mengindikasikan bahwa semua konsentrasi CFS yang diuji belum mampu mencapai tingkat efektivitas yang diinginkan, yang berarti aktivitas penghancuran biofilm oleh CFS terhadap *S. epidermidis* masih tergolong rendah.

Biofilm bakteri mengalami perkembangan dan pematangan yang terus-menerus selama sumber nutrisi masih tersedia, yang menyebabkan struktur biofilm menjadi lebih kompleks dan padat. Lapisan eksopolisakarida (EPS) yang terbentuk semakin tebal, memberikan perlindungan yang signifikan terhadap bakteri yang ada di dalamnya. Untuk mengatasi biofilm yang telah matang, antibiofilm harus dapat menembus lapisan EPS yang tebal ini, sehingga memungkinkan proses degradasi atau penghancuran biofilm. Proses tersebut mengurangi stabilitas struktur biofilm, memungkinkan bahan antibiofilm untuk merusak matriks biofilm dan mengganggu integritasnya. Menurut Qazi *et al.* (2023) Menurut Qazi *et al.* (2023), CFS dari bakteri *Lactobacillus* dapat menghambat pembentukan biofilm *Staphylococcus epidermidis* dengan mengganggu sistem quorum sensing (QS) berbasis autoinducing peptide (AIP). Sistem QS pada *S. epidermidis* diatur oleh sistem agr, yang mengontrol ekspresi gen terkait virulensi dan pembentukan biofilm. CFS mengandung senyawa seperti peptida siklik yang menghambat interaksi antara AIP

dan reseptor AgrC pada *S. aureus*, yang memiliki sistem QS serupa. Selain itu, CFS dapat menurunkan produksi eksopolisakarida (EPS) dengan mengurangi ekspresi gen biosintesis EPS dan menyebabkan stres oksidatif pada *S. epidermidis*, merusak struktur biofilm, dan meningkatkan kerentanannya terhadap terapi antibiofilm.

Hasil data uji penghancuran biofilm kemudian dianalisis secara statistik. Sebelum melanjutkan analisis lebih lanjut, dilakukan uji normalitas dan homogenitas untuk memastikan kesesuaian distribusi data. Uji normalitas menggunakan uji Shapiro-Wilk menunjukkan bahwa terdapat data *S. epidermidis* yang tidak terdistribusi normal dengan nilai  $p < 0,05$ . Sehingga uji lanjut yang digunakan yaitu uji nonparametrik kruskal wallis untuk membandingkan tiga atau lebih kelompok yang tidak berpasangan dengan data ordinal atau interval/rasio yang tidak berdistribusi normal.

Hasil uji nonparametrik kruskal wallis menunjukkan nilai  $p\text{-value} < 0,05$ , sehingga berdasarkan hasil uji kruskal-wallis tersebut, terdapat perbedaan yang signifikan/nyata dari ketiga perlakuan, sehingga untuk mengetahui perlakuan mana yang signifikan atau berbeda nyata, maka dilanjutkan dengan uji lanjut post hoc kruskal wallis. Hasil uji lanjut dihasilkan bahwa perlakuan yang terdapat perbedaan nyata/signifikan yaitu pada perlakuan konsentrasi CFS 12,5% dengan perlakuan konsentrasi CFS 50% yaitu dengan signifikansi 0.033 yang nilai tersebut  $< 0.05$  sehingga terdapat perbedaan nyata/signifikan dari kedua perlakuan tersebut.

Hasil uji penghancuran/degradasi biofilm memiliki efektivitas tertinggi pada konsentrasi CFS 12,5% dikarenakan pada konsentrasi ini komponen bioaktif seperti biosurfaktan dan enzim dalam CFS masih berada dalam konsentrasi optimal dan tidak mengalami interferensi atau pengendapan senyawa toksik sekunder yang mungkin muncul di konsentrasi tinggi hal ini berhubungan dengan biofilm yang sudah terbentuk memiliki struktur yang stabil, dan zat aktif pada konsentrasi rendah bisa menarget bagian luar biofilm dengan lebih tepat tanpa menstimulasi mekanisme perlindungan biofilm seperti produksi EPS berlebih atau pembentukan *persister cells*. Sebaliknya, pada uji pencegahan dan penghambatan biofilm, konsentrasi yang lebih tinggi seperti 25% lebih efektif karena proses atau tahapan ini terjadi sebelum biofilm terbentuk, sehingga zat aktif dalam jumlah besar dapat langsung mengganggu adhesi awal dan komunikasi quorum sensing, yang

memerlukan dosis cukup untuk mengintervensi proses seluler awal. Senyawa antimikroba dan biosurfaktan dalam konsentrasi tinggi mampu mencegah kolonisasi permukaan secara lebih efektif daripada dalam konsentrasi rendah. Hal yang sama juga diungkapkan oleh Mishra et al (2020) yaitu bahwa biosurfaktan dan AMP dalam jumlah besar lebih efektif dalam menghambat tahap awal biofilm, sedangkan enzim dan metabolit sekunder pada konsentrasi moderat lebih baik dalam menghancurkan biofilm yang telah terbentuk.

Berdasarkan hasil penelitian, CFS *L. plantarum* terbukti memiliki aktivitas antibiofilm terhadap bakteri *S. epidermidis* meskipun dengan kategori yang rendah dengan presentasi <50%. Hal ini sejalan dengan penelitian Lee et al (2021), yang mengevaluasi efek antibiofilm dari *L. plantarum* yang diisolasi dari kimchi. Dalam penelitian tersebut, CFS dari *L. plantarum* menunjukkan aktivitas antibiofilm terhadap *Staphylococcus aureus* sebesar 44,45% pada konsentrasi 1/2 MIC, yang dikategorikan sebagai aktivitas rendah (<50%). CFS ini juga terbukti menurunkan ekspresi gen pembentuk biofilm seperti *icaA*, yang berperan dalam sintesis PIA (Polysaccharide Intercellular Adhesin), penting dalam pembentukan matriks biofilm. Dari hasil penelitian ini, penetapan uji penghancuran biofilm ditetapkan sebagai tahap utama dalam pengujian antibiofilm CFS *Lactobacillus plantarum* didasarkan pada beberapa referensi yang menyarankan bahwa uji penghancuran (disruption assay) merupakan metode yang sangat relevan untuk menilai efektivitas antibiofilm, terutama dalam kondisi biofilm yang sudah terbentuk. Menurut penelitian Lee et al (2021) penurunan biofilm yang signifikan menunjukkan potensi aplikasi CFS dalam penghancuran matriks biofilm yang telah terbentuk, yang merupakan komponen utama dalam resistensi bakteri terhadap terapi konvensional.

#### **4.3 Tinjauan Hasil Penelitian dalam Perspektif Al-Qur'an**

Hasil penelitian menunjukkan tentang kemampuan pembentukan biofilm oleh *S. epidermidis* dan kemampuan BAL dalam membentuk antibiofilm melalui beberapa mekanisme. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pembentukan biofilm oleh bakteri patogen dan antibiofilm oleh bakteri non-patogen merupakan wujud kuasa Allah SWT atas segala ciptaan-Nya. Hal ini sesuai Q.S Al-Baqarah ayat 29 sebagai berikut:

هُوَ الَّذِي خَلَقَ لَكُمْ مَّا فِي الْأَرْضِ جَمِيعًا ثُمَّ اسْتَوَىٰ إِلَى السَّمَاءِ فَسَوَّاهُنَّ سَبْعَ سَمَوَاتٍ ۗ وَهُوَ بِكُلِّ شَيْءٍ عَلِيمٌ ﴿٢٩﴾ (البقرة/2:29)

Artinya: *Dialah (Allah) yang menciptakan segala yang ada di bumi untukmu, kemudian Dia menuju ke langit, lalu Dia menyempurnakannya menjadi tujuh langit. Dia Maha Mengetahui segala sesuatu.* (Al-Baqarah/2:29)

Menurut Imam Jalaluddin Al-Mahally dalam Tafsir Jalalain jilid 1 (2014) ayat ini menjelaskan bahwa Allah menciptakan segala sesuatu di bumi untuk dimanfaatkan dan diambil pelajarannya oleh manusia. Setelah menciptakan bumi, Allah kemudian menciptakan langit dan menyempurnakannya menjadi tujuh lapis.

Dalam kalimat (وَهُوَ بِكُلِّ شَيْءٍ عَلِيمٌ) Allah Maha Mengetahui segala sesuatu, baik secara umum maupun rinci. Hal ini menandakan bahwa fenomena biologis seperti pembentukan dan penghambatan biofilm oleh bakteri merupakan wujud nyata dari kuasa Allah SWT dalam menciptakan dan mengatur segala sesuatu secara sempurna dan penuh hikmah. Setiap makhluk, termasuk mikroorganisme yang tak kasat mata, diciptakan dengan peran dan fungsi tertentu yang menjadi bukti bahwa kekuasaan Allah meliputi hal-hal besar hingga yang paling kecil, Allah Maha Mengetahui segala sesuatu.

Hasil penelitian juga menunjukkan kebermanfaatannya bagi manusia sebab dengan dihasilkannya antibiofilm oleh CFS *L. plantarum*, maka akan mampu terhindarkan dari infeksi bakteri patogen. Hal ini sesuai dengan Q.S Al-Jasiyah ayat 12-13 sebagai berikut:

وَسَخَّرَ لَكُمْ مَّا فِي السَّمَوَاتِ وَمَا فِي الْأَرْضِ جَمِيعًا مِّنْهُ ۗ إِنَّ فِي ذَٰلِكَ لَآيَاتٍ لِّقَوْمٍ يَّتَفَكَّرُونَ ﴿١٣﴾ (الجاثية/45:12-13)

Artinya: *Dia telah menundukkan (pula) untukmu apa yang ada di langit dan apa yang ada di bumi semuanya (sebagai rahmat) dari-Nya. Sesungguhnya pada yang demikian itu benar-benar terdapat tanda-tanda (kebesaran Allah) bagi kaum yang berpikir*. (Al-Jasiyah/45:12-13)

Menurut Imam Jalaluddin Al-Mahally dalam Tafsir Jalalain jilid 2 (2014) dalam kalimat (وَسَخَّرَ لَكُم مَّا فِي السَّمَوَاتِ) (*Dan Dia menundukkan untuk kalian apa yang ada di langit*) berupa matahari, bulan, bintang-bintang, air hujan dan lainnya (وَمَا فِي الْأَرْضِ) (*dan apa yang ada di bumi*) berupa binatang-binatang, tumbuhan, dan lainnya semua itu diciptakan untuk dimanfaatkan manusia (جَمِيعًا). Dalam penelitian ini *Lactobacillus plantarum* menghasilkan senyawa antibiofilm yang dapat mencegah infeksi bakteri patogen menunjukkan bagaimana Allah membuktikan penciptaan mikroorganisme untuk kemaslahatan manusia. Hal ini juga menunjukkan bahwa segala sesuatu di langit dan di bumi ditundukkan oleh Allah untuk dimanfaatkan manusia.

Hasil penelitian ini juga menunjukkan nilai positif terhadap lingkungan, yakni dengan digunakannya BAL sebagai agen penghasil senyawa antibiofilm yang alami, ramah lingkungan, dan tidak menimbulkan polusi. Penggunaan BAL seperti *Lactobacillus plantarum* dalam menghasilkan CFS sebagai agen antibiofilm akan mengurangi ketergantungan terhadap bahan kimia atau antibiotik yang jika dibuang ke lingkungan dapat menyebabkan kontaminasi dan memicu resistensi bakteri patogen di alam. Selain itu, karena BAL merupakan mikroorganisme non-patogen tidak menimbulkan risiko penyebaran bakteri berbahaya ke ekosistem dan justru akan mencegah bakteri patogen untuk mencemari lingkungan. Hal ini sejalan dengan prinsip menjaga keseimbangan lingkungan seperti dalam Q.S Al-Araf ayat 56 sebagai berikut:

وَلَا تُفْسِدُوا فِي الْأَرْضِ بَعْدَ إِصْلَاحِهَا وَادْعُوهُ خَوْفًا وَطَمَعًا إِنَّ رَحْمَتَ اللَّهِ قَرِيبٌ مِّنَ الْمُحْسِنِينَ ﴿٥٦﴾

(الاعراف/7: 56)

*Artinya: Janganlah kamu berbuat kerusakan di bumi setelah diatur dengan baik. Berdoalah kepada-Nya dengan rasa takut dan penuh harap. Sesungguhnya rahmat Allah sangat dekat dengan orang-orang yang berbuat baik". (Al-A'raf/7:56)*

Menurut Imam Jalaluddin Al-Mahally dalam Tafsir Jalalain jilid 1 (2014) kalimat ( وَلَا تُفْسِدُوا فِي الْأَرْضِ ) (Janganlah kamu berbuat kerusakan di bumi) memiliki arti segala macam bentuk maksiat atau kerusakan dan pelanggaran terhadap aturan Allah. Ayat ini menjelaskan kepada manusia untuk tidak melakukan kerusakan di bumi setelah Allah memperbaiki, serta bertindak untuk berbuat baik sebagaimana Allah telah berbuat baik kepada manusia. Dalam penelitian ini, penggunaan BAL sebagai antibiofilm bagi bakteri patogen, menjadikan bakteri patogen tidak akan mencemari lingkungan dan karena BAL ramah lingkungan, manusia dapat menghindari penggunaan bahan kimia sintetis yang dapat merusak lingkungan dan merusak ekosistem. Hal ini mencerminkan upaya manusia untuk menjaga bumi dan memelihara keseimbangan alam sebagaimana yang diperintahkan oleh Allah SWT.

## **BAB V PENUTUP**

### **5.1 Kesimpulan**

Kesimpulan pada penelitian ini yaitu:

1. *Staphylococcus epidermidis* merupakan bakteri pembentuk biofilm yang kuat berdasarkan uji kualitatif congo red agar dan uji kuantitatif *microtiter plate assay*.
2. Supernatan bebas sel (*cell-free supernatant*) dari *Lactobacillus plantarum* menunjukkan potensi sebagai agen antibiofilm terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis* melalui tiga jenis pengujian, yaitu uji pencegahan perlekatan biofilm, uji penghambatan pembentukan biofilm, dan uji penghancuran biofilm yang telah terbentuk. Aktivitas pencegahan penempelan biofilm tertinggi pada konsentrasi 25% dengan efektivitas sebesar 26%. Aktivitas penghambatan pembentukan biofilm paling tinggi tercatat pada konsentrasi 25% dengan persentase sebesar 37%, sedangkan efektivitas penghancuran biofilm tertinggi ditemukan pada konsentrasi 12,5% dengan nilai sebesar 25%.
3. Hipotesis H1 pada penelitian ini diterima karena *Cell-Free Supernatant* (CFS) dari *Lactobacillus plantarum* terbukti memiliki aktivitas antibiofilm terhadap *Staphylococcus epidermidis*.

### **5.2 Saran**

Penelitian ini masih memiliki sejumlah keterbatasan yang perlu diperhatikan. Oleh karena itu, penulis menyarankan beberapa hal untuk penelitian selanjutnya, antara lain:

1. Perlu dilakukan pengujian lanjutan guna menentukan konsentrasi *cell-free supernatant* (CFS) dari *Lactobacillus plantarum* yang paling efektif sebagai antibiofilm dari *S. epidermidis*.
2. Disarankan agar penelitian mendatang mengevaluasi aktivitas antibiofilm CFS *L. plantarum* pada konsentrasi yang lebih tinggi dari 50%, untuk mengetahui apakah efektivitasnya meningkat secara proporsional.

3. Diperlukan eksplorasi lebih lanjut terkait identifikasi senyawa bioaktif spesifik yang terkandung dalam CFS *L. plantarum* serta mekanisme kerjanya dalam menghambat dan menghancurkan biofilm.
4. Penelitian di masa mendatang juga diharapkan menggunakan metode pengujian antibiofilm yang berbeda atau melibatkan jenis bakteri patogen lain, untuk memperluas pemahaman mengenai spektrum aktivitas CFS *L. plantarum*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abdelaziz A., Heba A., Zhu Z., dan Fang J. (2018). Potential benefits of *Lactobacillus plantarum* as probiotic and its advantages in human health and industrial applications: A review. *Advances in Environmental Biology*. 12 (1): 16-27.
- Abdelhamid A.G., dan Yoesef A.E. (2023). Combating Bacterial Biofilms: Current and Emerging Antibiofilm Strategies for Treating Persistent Infections. *Antibiotics*. 12 (6): 1-18.
- Al-Mahalli, J dan As-Suyuthi J. (2014). *Tafsir Al-Jalalain: Terjemahan Jilid 1 dan Jilid 2*. Sinar Baru Algensindo: Bandung.
- Anggraini W., Djoko A.P., Idha K., Isnaeni., dan Suryanto. (2023). Influence of the Environment on Biofilm Formation *Candida albicans* of Vulvovaginal Candidiasis Isolate Patient. *Pharmacog*. 15 (1): 216-222.
- Arasu M., Al-Dhabi N., Ilavenil S., Choi K., Srigopalram S. (2015). A Novel Approach to *Lactiplantibacillus plantarum*: From Probiotic Properties to the Omics Insights. *Saudi Journal Biomolecular Science*. 23 (1): 6-10.
- Ayivi R.D., Gyawali R., Krastanov A., Aljaloud A., Worku M., Tahergorabi R., Silva R.C., Ibrahim S. (2020). Lactic Acid Bacteria: Food Safety and Human Health Applications. *Dairy*. 1 (3): 202-232
- Az-Zuhaili, W. (1993). *Tafsir al-Wajiz*. Damaskus: Dar Al-Fikr.
- Ball, A. L., Augenstein, E. D., Wienclaw, T. M., Richmond, B. C., Freestone, C. A., Lewis, J. M., Thompson, J. S., Pickett, B. E., & Berges, B. K. (2022). Characterization of *Staphylococcus aureus* biofilms via crystal violet binding and biochemical composition assays of isolates from hospitals, raw meat, and biofilm-associated gene mutants. *Microbial Pathogenesis*, 165, 105554.
- Banaszkiewicz S., Calland J., Mourkas E., Sheppard S., Pascoe B., Bania J. (2019). Genetic Diversity of Composite Enterotoxigenic *Staphylococcus epidermidis* Pathogenicity Islands. *Genome Biology Evolution*. 11 (12): 3498-3509.
- Berzegri A., Kheyrolahzadeh K., Khatibi S., Sharifi S., Memar M., Vahed S. The Battle of Probiotics and Their Derivatives Against Biofilms. *Infection and Drug Resistance*. 13: 659-672.
- Bryers J.D. 2008. Medical Biofilms. *Biotechnol Bioeng*. 100 (1): 1-18.
- Burke O., Zeden M., O’Gara J. (2024). The pathogenicity and virulence of the opportunistic pathogen *Staphylococcus epidermidis*. *Virulence*. 15 (1): 1-36.
- Burke T.L., Rupp., Fey P. (2023). *Staphylococcus epidermidis*. *Trends in Microbiology*. 31 (7): 763-764.
- Buttner H., Mack D., Rohde H. (2015). Structural Basis of *Staphylococcus epidermidis* Biofilm Formation: Mechanisms and Molecular Interactions. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 5 (14): 1-15.
- Chamas J.M., Isla M.I., dan Zampini I.C. (2023). Antibacterial and Antibiofilm Activity of Different Species of *Fabiana* sp. Extract Obtained via Maceration and Ultrasound-Assisted Extraction against *Staphylococcus epidermidis*. *Plants*. 12 (9): 1-19.
- De la Fuente-Núñez, C., Reffuveille, F., Fernández, L., Hancock, R.E. (2013). Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: Antibiotic resistance and new therapeutic strategies. *Curr. Opin. Microbiol*. 16: 580–589.
- Echegaray N., Yilmaz B., Sharma H., Kumar M., Pateiro M., Ozogul F., Lorenzo J. (2023). A Novel Approach to *Lactiplantibacillus plantarum*: From Probiotic Properties to the Omics Insights. *Microbiological Research*. 268.

- Elez R.M., Elsohaby I., Al-Mohammadi A., Seliem M., Tahoun A.B.M.B., Abousaty A., Algendy R., Mohamed A., El-gazzar N. (2023). Antibacterial and anti-biofilm activities of probiotic *Lactobacillus plantarum* against *Listeria monocytogenes* isolated from milk, chicken and pregnant women. *Frontiers in Microbiology*. 14: 1-12.
- Fey P.D., dan Olson M. (2010). Current Concepts in Biofilm Formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Future Microbiology*. 5 (6): 1-26.
- Freeman J, Falkiner FR, Keane CT. (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol*.42:872-4
- Grzebyk, M., Stępień-Pyśniak, D., Dec, M., & Urban-Chmiel, R. (2021). Biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from clinical and subclinical mastitis in cows. *Pathogens*, 10(7), 877
- Harika K., Shenoy W.P., Narasimhaswamy., Chawla K., Detection of Biofilm Production and Its Impact on Antibiotic Resistance Profile of Bacterial Isolates from Chronic Wound Infections. *Journal Global Infection Disease*. 12 (3): 129-134.
- Hidayati dan Liuwan. (2019). Peran Biofilm terhadap Infeksi Saluran Kelamin yang disebabkan oleh Vaginosis Bakterial. *Periodical of Dermatology and Venereology*. 31 (2) : 150-158.
- Jannah, S. F., Widodo, A. D. W., & Setiabudi, R. J. (2023). Analysis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation in several types of intravenous fluids based on time. *Journal of Advanced Biotechnology and Experimental Therapeutics*, 6(2), 458–467.
- Jiang Y.H., Xin W.G., Zhang Q., Lin L. (2022). A Novel Bacteriocin Against *Shigella flexneri* From *Lactiplantibacillus plantarum* Isolated From Tilapia Intestine: Purification, Antibacterial Properties and Antibiofilm Activity. *Frontiers in Microbiology*. 12: 1-13.
- Kaiser, T. D. L., Pereira, E. M., Santos, K. R., Maciel, E. L. N., Schuenck, R. P., & Nunes, A. P. F. (2013). Modification of the Congo red agar method to detect biofilm production by *Staphylococcus epidermidis*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 75(3), 235–239.
- Kalam, A., & Ali, R. (2021). *Antimicrobial Bacillus: Metabolites and their mode of action*. *Antibiotics*, 11(1), 88.
- Karamba, A., & Ahmad, M. F. (2024). Growth estimation of *Serratia marcescens* using spectrophotometric and gravimetric methods. *Journal of Engineering and Materials Technology*, 14(1), 25–32.
- Karni I., Nalurita I., Pravitri K., Naufali M. (2024). Analisis Struktur Genetik dan Filogenetik Bakteri *Lactobacillus plantarum* yang Diisolasi dari Produk Pangan. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan Food Scientia*. 4 (1) : 72-86.
- Khiralla, Ghada M., Eman A.H. Mohamed, Azza G. Farag & Hesham Elhariry. (2015). Antibiofilm Effect of *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus plantarum* Cell free supernatants Against Some Bacterial Pathogens. *Journal of Biotech Research*. 6:86-95.
- Kining E., Firdiani D., Sogandi., Aminullah., dan Asma S. (2022). Aktivitas Antibakteri dan Antibiofilm Ekstrak Air Daun Melinjo Terhadap Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*. *Indonesia Natural Research Pharmaceutical Journal*. 7 (1) : 19-31.
- Kovaleva J, Peters F., Mei H.C., dan Degener J.E. (2013). Transmission of Infection by Flexible Gastrointestinal Endoscopy and Bronchoscopy. *Clinical Microbiology Reviews*. 26 (2): 231-254.

- Kumar L., Bisen M., Harjai K., Chibber S., Azizov S., Lahlmawia H., Kumar D. (2023). Advances in Nanotechnology for Biofilm Inhibition. *ACS Omega*. 8: 21393-21409.
- Kurniawan dan Asriani. (2020). Quorum Sensing Bakteri dan Peranannya pada Perubahan Nilai pH di Kolong Pascatambang Timah dengan Umur Berbeda. *Jurnal Ilmu Lingkungan*. 18 (3): 602-609.
- Klubthawee N., Wongchai M., dan Aunpad R. (2023). The bactericidal and antibiofilm effects of a *lysine-substituted hybrid peptide*, CM-10K14K, on biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Scientific Reports*. 13:1-19.
- Landete J.M., Vinuesa L., Montenegro C., Santamaria L., Reveron I. (2021). The Use of *Lactobacillus plantarum* Esterase Genes: a Biotechnological Strategy to Increase the Bioavailability of Dietary Phenolic Compounds in Lactic Acid Bacteria. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 72 (8): 1035-1045.
- Lee, Ji-Eun, Na-Kyoung Lee & Hyun-Dong Paik. (2021). Antimicrobial and ANTI-Biofilm Effects of Probiotic *Lactobacillus plantarum* KU200656 Isolated from Kimchi. *Food Sci Biotechnol*. 30(1):97-106.
- Lee, H., et al. (2024). Predictive Modeling for Inactivation of Escherichia coli Biofilm with Combined Treatment of Thermosonication and Organic Acid on Polystyrene Surface. *Foods*, 13(24), 4002
- Lembre P, Lorentz C, Di Martino P. (2012). Exopolysaccharides of the Biofilm Matrix: a Complex Biophysical World. *The Complex World Polysaccharides*. 371–92.
- Lewandowski Z., dan Beyenal H. (2014). *Fundamentals of Biofilm Research Second Edition*. CRC Press. Newyork.
- Liang J., Zhou Y., Tang G., Wu R., dan Lin H. (2023). Exploration of the Main Antibiofilm Substance of *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 and Its Effect against *Streptococcus mutans*. *International Journal of Molecular Science*. 24 (3): 1-16.
- Li, X., Kappler, U., Jiang, G., Bond, P.L. (2017). The ecology of acidophilic microorganisms in the corroding concrete sewer environment. *Front. Microbiol*. 8: 683
- Li Y., Li X., Hao Y., Liu Y., Dong Z., dan Li K. (2021). Biological and Physiochemical Methods of Biofilm Adhesion Resistance Control of Medical-Context Surface. *International Journal of Biological Sciences*. 17 (7): 1769-1781.
- Liu, J., Chen, Z., Huang, M., Li, C., Wang, X., & Zhang, W. (2023). Characterization of biofilm formation and antibiotic resistance in *Staphylococcus epidermidis* isolated from medical device-associated infections. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1084652.
- Marti M, Trotonda MP, Tormo-Mas MA, et al. (2010). Extracellular proteases inhibit protein-dependent biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Microbes Infect*. 12(1):55–64.
- Mao Y., Wang Y.X., Luo X., Chen X.H., dan Guiqin R. (2023). Impact of *cell free supernatant of lactic acid bacteria* on *Staphylococcus aureus* biofilm and its metabolites. *Frontiers in Veterinary Science*. 10: 1-11.
- Masud, M. K., Yusof, N. A., Azam, M. A., & Harun, F. W. (2022). Bacterial biofilm development: Molecular mechanisms and clinical significance. *Microorganisms*, 10(3), 8.
- Mishra, R., Panda, A. K., De Mandal, S., Shakeel, M., Bisht, S. S., & Khan, J. (2020). Natural anti-biofilm agents: Strategies to control biofilm-forming pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 11.
- Mohammed A.M., Munaff J., Ahmed M.A., Biofilm Forming Bacteria Isolated From Human Eye Conjunctivitis and Keratitis Cases and their Ability to Adhere on

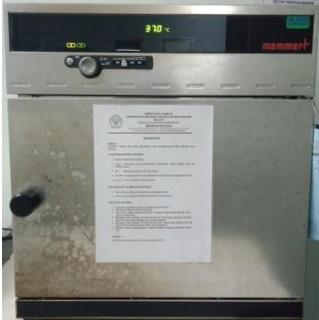
- Contact Lenses in vitro. *Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology*. 15 (3): 1005-1013.
- Moris V., Lam M., Amoureux L., Magallon A., Guilloteau A., Maldiney T., Zwetyenga N., Falentin-Daudre C., dan Neuwirth C. (2022). What is the best technic to dislodge *Staphylococcus epidermidis* biofilm on medical implants?. *BMC Microbiology*. 22: 1-14.
- Murphy, M.M., Culligan, E.P., & Murphy, C.P. (2024). Investigating the antimicrobial and antibiofilm properties of marine halophilic *Bacillus* species against ESKAPE pathogens. *Environmental Microbiology Reports*, 16(5), e70027.
- Musthafa, MW, dkk. (2021). *Al-Asmaul-Husna dalam Perspektif Sains dan Teknologi*. Yogyakarta: Q-Media.
- Muthusamy K., Sound harrajan I., Srisesharam S., Kim D., Kuppusamy P., Lee K., Choi Ki. (2020). Probiotic Characteristics and Antifungal Activity of *Lactobacillus plantarum* and Its Impact on Fermentation of Italian Ryegrass at Low Moisture. *Application Science*. 10 (1): 417.
- Nufuz T. (2022). Potensi Antibiofilm *Cell free supernatant Lactobacillus plantarum* Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Skripsi: Program Studi Biologi*. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.
- Ogunbanwo, S. T., Sanni, A. I., & Onilude, A. A. (2017). Characterization and Optimization of Bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* Isolated from Fermented Beef (Shermout). *Open Access Library Journal*, 4, 1–12.
- Oliviera F., Rohde H., Vilanova M., dan Cerca N. (2021). Infections Caused by *S. epidermidis* in Many Situations are due to its Ability to Form Biofilms on Biotic Surfaces (Host Tissue) or Inert Surfaces. *Frontiers in Cellular and Infections Microbiology*. 11:1-8.
- Oni O., Orok E., Lawal Z., Ojo T., Oluwadare T., Bamitale T., Jaiyesimi B., Akinjisola A., dan Aparata T. (2023). Knowledge and perception of nosocomial infections among patients in a Nigerian hospital. *Scientific Reports*. 13: 1-9.
- Peterson, S.B., Irie, Y., Borlee, B.R., Murakami, K., Harrison, J.J., Colvin, K.M. and Parsek, M.R., (2011). *Different Methods for Culturing Biofilms In Vitro*. Dalam: *Biofilm Infections*. Springer: New York.
- Purbowati, R., Emillia D.D.R., &Fuad A. (2017). Kemampuan Pembentukan Slime pada *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *MRSA* dan *Escherichia coli*. *Jurnal Florea Volume*. 4(2): 1-7.
- Qi, L., Yu, F., Wang, X., et al. (2023). Structural dynamics and regulation of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation. *NPJ Biofilms and Microbiomes*, 9(1), 7.
- Raad, I., Costerton, W., Sabharwal, U., Sacilowski, M., Anaissie, E., and Bodey, G. P. (1993). Ultrastructural analysis of indwelling vascular catheters: a quantitative relationship between luminal colonization and duration of placement. *J. Infect. Dis*. 168 (2), 400–407.
- Rachmawati D., Kuntaman., dan Alimsardjono L. (2019). The Correlation Between ica A and ica D Genes with Biofilm Formation *Staphylococcus epidermidis* in Vitro. *Folia Medica Indonesia*. 55 (4): 251-259.
- Ruchi, Tayal, Baveja Sujata, & De Anuradha. (2015). “Comparison of Phenotypic Methods for the Detection of Biofilm Production in Uro-Pathogens in a Tertiary Care Hospital in India,” *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 4(9): 840-849.

- Rois U., Widiastuti S., dan Suralaga C. (2023). Hubungan Pengetahuan, Motivasi, dan Beban Kerja, dengan Perilaku Cuci Tangan Perawat Sebagai Upaya Pencegahan Healthcare Associated Infections di RS Marinir Cilandak. *Malahayati Nursing Journal*. 5 (9): 3031-3045.
- Rouhi A., Falah F., Azghandi M., Behbahani B.A., Mortazavi S.A., Yazdi F.T., dan Vasiee A. (2024). Investigating the effect of *Lactiplantibacillus plantarum* TW57-4 in preventing biofilm formation and expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes* ATCC 19115. *Food Science and Technology*. 191: 1-9.
- Schulze, A., Mitterer, F., Pombo, J. P., and Schild, S. (2021). Biofilms by bacterial Human Pathogens: Clinical Relevance - Development, Composition and Regulation - Therapeutical Strategies. *Microb. Cell*. 8 (2): 28–56.
- Sharma S., Mohler J., Mahajan S.D., Schwartz S.A., Bruggemann L., dan Aalinkeel R. (2023). Microbial Biofilm: A Review on Formation, Infection, Antibiotic Resistance, Control Measures, and Innovative Treatment. *Microorganism*. 11 (6): 1-32.
- Shihab, Q. M. (2002). *Tafsir Al-Misbah Pesan Kedan dan Keserasian Al-Qur'an*. Jakarta: Lentera Hati.
- Shree P., Singh C., Sodhi K., Surya J., Singh Dileep. Biofilms: Understanding the Structure and Contribution Towards Bacterial Resistance in Antibiotics. *Medicine in Miroecology*. 16:1-11.
- Singh, R., Ray, P., Das, A., Sharma, M. 2010. Penetration of antibiotics through *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* (2010), 65: 1955–1958.
- Sornsenee P, Chatatikun M, Mitsuwan W, Kongpol K, Kooltheat N, Sohbenalee S, Pruksaphanrat S, Mudpan A, Romyasamit C. (2021). Lyophilized *cell free supernatants* of *Lactobacillus* isolates exhibited antibiofilm, antioxidant, and reduces nitric oxide activity in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *PeerJ*. 9 : 1-18.
- Skovdal S., Jorgensen N., Meyer R. (2022). JMM Profile: *Staphylococcus epidermidis*. *Journal Of Medical Microbiology*. 71 (10).
- Todorov, S. D. dan B. D. G. D. M. Franco. (2010). *Lactobacillus plantarum*: characterization of the species and application in food production. *Food Reviews International*. 26(3): 205-229.
- Tübel, J., Maier, E., Jegen, M., Marthen, C., Obermeier, A., Haug, A. T., Schneider, J., & Burgkart, R. (2021). Patient-specific effects of soluble factors from *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms on osteogenic differentiation of primary human osteoblasts. *Scientific Reports*, 11(1), 17282.
- Vashchenko, A. O., Voronkova, Y. S., Kulyk, E. E., Snisar, O. S., Sidashenko, O. I., & Voronkova, O. S. (2021). Influence of sugars on biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Ukrainian Journal of Ecology*, 11(4), 1–5.
- Wasfi R., Rahman O., Zafer M., dan Ashour H. (2018). Probiotic *Lactobacillus* sp. Inhibit Growth, Biofilm Formation and Gene Expression of Caries-Inducing *Streptococcus mutans*. *J Cell Mol Med*. 22 (3): 1972-1983.
- Wang, Y., et al. (2020). Optimization of Biosynthesis Conditions for the Production of Exopolysaccharides by *Lactobacillus plantarum* SP8 and the Exopolysaccharides Antioxidant Activity Test. *Indian Journal of Microbiology*, 60(3), 334–345.
- Yana, X., S. Gu, X. Cui, Y. Shi, S. Wen, H. Chen, & J. Ge. (2019). Antimicrobial, Anti-Adhesive and Anti-Biofilm Potential of Biosurfactants Isolated from *Pediococcus*

- acidilactici* and *Lactobacillus plantarum* Against *Staphylococcus aureus* CMCC26003. *Microbial Pathogenesis*. 127:12-20.
- Yin W., Wang Y., Liu L., He J. (2019). Biofilms: The Microbial “Protective Clothing” in Extreme Environments. *International Journal of Molecular Sciences*. 20 (14): 3423.
- Yokoi, H., Iwahashi, H., & Ichimura, K. (2024). Visualization of biofilm growth on inner wall of a glass tube based on light scattering pattern. *Optical Review*, 31, 112–119.
- Zarko L.A., dan Shai Y. (2017). Methods for Investigating Biofilm Inhibition and Degradation by Antimicrobial Peptides. *Methods in Molecular Biology*. 1548: 309-322.

## LAMPIRAN

### Lampiran 1. Alat-alat yang digunakan dalam penelitian

|   |   |   |
|---|---|---|
|  <p>Autoklaf</p>                 |  <p>Autoklaf Destruksi</p> |  <p>Inkubator (37)</p>         |
|  <p>Neraca Analitik</p>         |  <p>Vortex</p>            |  <p>Laminar Air Flow (LAF)</p> |
|  <p>Hot Plate</p>              |  <p>Spektrofotometer</p> |  <p>Microplate Reader</p>    |
|  <p>Centrifuge Refrigerate</p> |   |   |

### Lampiran 2. Komposisi Media

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

|                        |                                      |
|------------------------|--------------------------------------|
| Lab-Lemco Powder       | : 1 gram                             |
| Yeast Extract          | : 2 gram                             |
| Peptone                | : 5 gram                             |
| Sodium Chloride (NaCl) | : 5 gram                             |
| Agar                   | : 15 gram                            |
| Water                  | : 1 Liter                            |
| pH akhir               | : $7.4 \pm 0.2 @ 25^{\circ}\text{C}$ |
  
2. MRS (de Man Rogosa Sharpe) Agar (gr/L) :
 

|                         |                                    |
|-------------------------|------------------------------------|
| Dextrose                | : 20 gram                          |
| Bacteriological peptone | : 10 gram                          |
| Beef extract            | : 8 gram                           |
| Sodium acetate          | : 5 gram                           |
| Yeast extract           | : 4 gram                           |
| Dipotassium phosphate   | : 2 Liter                          |
| Ammonium citrate        | : $2 \pm 0.2 @ 25^{\circ}\text{C}$ |
| Tween 80                | : 1 gram                           |
| Magnesium sulfate       | : 0,2 gram                         |
| Manganese sulfate       | : 0,05 gram                        |
| Bacteriological agar    | : 10 gram                          |
| pH akhir                | : 5-6,5                            |
  
3. MRS (de Man Rogosa Sharpe) Broth (gr/L) :
 

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

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

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



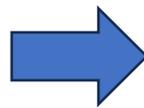
Kultur Bakteri *L. plantarum* pada media MRSA



Kultur Bakteri *L. Plantarum* setelah inkubasi 48 jam



Hasil CFS sentrifugasi 3000 rpm, 20°  
Selama 15 menit

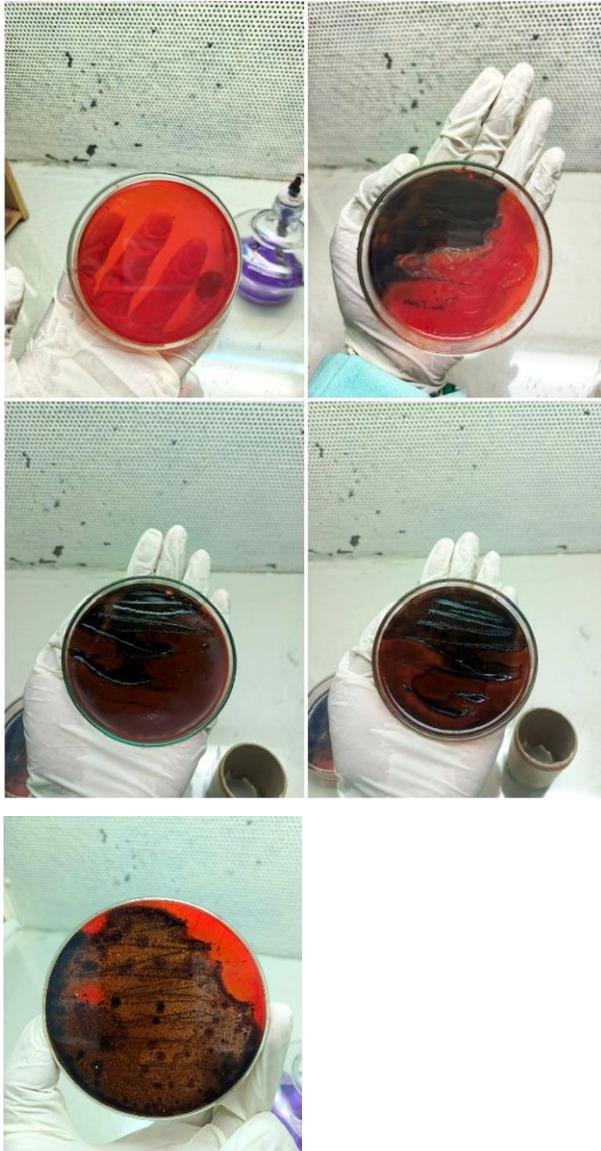


Hasil CFS setelah difilter paper  
0,22  $\mu$ m

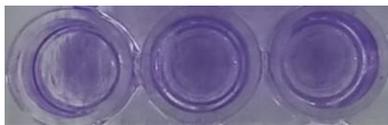


Pembuatan tiga macam  
konsentrasi CFS (12,5 %, 25%, dan 50%)

#### Lampiran 4. Uji Pembentukan Biofilm



Uji Pembentukan menggunakan Microplate Reader

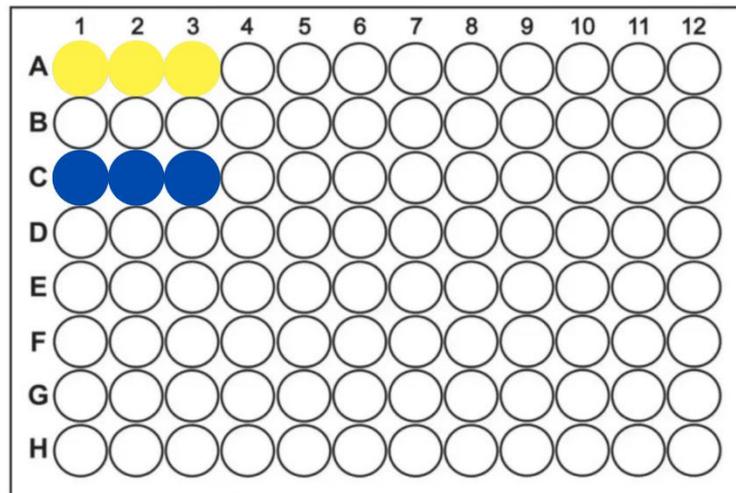


Kelompok Suspensi Bakteri Uji



Kontrol Media

**Lampiran 5.** Gambaran Uji Deteksi Pembentukan Biofilm pada *Microplate*  
**Gambaran Uji Deteksi Pembentukan Biofilm pada *Microplate***

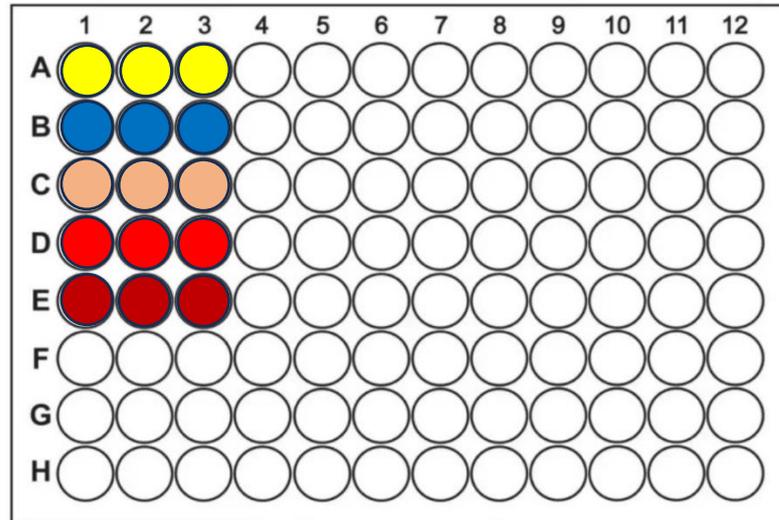


Keterangan:

-  Kelompok Kontrol Media
-  Kelompok Suspensi Bakteri Uji *S. epidermidis*

**Lampiran 6.** Gambaran Uji Aktivitas Antibiofilm pada *Microplate*

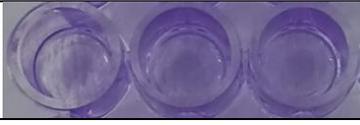
**Gambaran Uji Pencegahan Penempelan Biofilm, Penghambatan Pembentukan Biofilm, dan Penghancuran Biofilm pada Microplate**



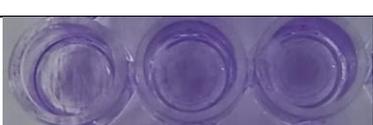
Keterangan:

-  Kelompok Kontrol Media
-  Kelompok Suspensi Bakteri Uji *S. epidermidis*
-  Kelompok Uji CFS 12,5%
-  Kelompok Uji CFS 25%
-  Kelompok Uji CFS 50%

**Lampiran 7.** Hasil Uji Aktivitas Pencegahan Penempelan Biofilm pada *Microplate*

|  |                       |
|--|-----------------------|
|   | Kontrol Media         |
|   | Kontrol Negatif       |
|   | Konsentrasi CFS 12,5% |
|   | Konsentrasi CFS 25%   |
|  | Konsentrasi CFS 50%   |

**Lampiran 8.** Hasil Uji Aktivitas Penghambatan Pertumbuhan Biofilm pada *Microplate*

|   |                       |
|---|-----------------------|
|  | Kontrol Media         |
|  | Kontrol Negatif       |
|  | Konsentrasi CFS 12,5% |
|  | Konsentrasi CFS 25%   |

|   |                     |
|---|---------------------|
|  | Konsentrasi CFS 50% |
|---|---------------------|

**Lampiran 9.** Hasil Uji Penghancuran/Degradasi Biofilm pada *Microplate*

|   |                       |
|---|-----------------------|
|    | Kontrol Media         |
|    | Kontrol Negatif       |
|   | Konsentrasi CFS 12,5% |
|  | Konsentrasi CFS 25%   |
|  | Konsentrasi CFS 50%   |

## Lampiran 10. Data Hasil Uji Antibiofilm

### A. Uji Pencegahan Perlekatan Biofilm

| Perlakuan             | Konsentrasi CFS | Ulangan ke- |       |       | Rata-rata | % Pencegahan |
|-----------------------|-----------------|-------------|-------|-------|-----------|--------------|
|                       |                 | 1           | 2     | 3     |           |              |
| <i>S. epidermidis</i> | 12,50%          | 0,16        | 0,141 | 0,138 | 0,146     | 15           |
|                       | 25%             | 0,18        | 0,1   | 0,1   | 0,127     | 26           |
|                       | 50%             | 0,145       | 0,129 | 0,139 | 0,138     | 20           |
| K(-)                  | 0%              | 0,204       | 0,096 | 0,217 | 0,172     | 0            |
| Km                    | 0%              | 0,101       | 0,123 | 0,108 | 0,111     | 0            |

### B. Uji Penghambatan Pembentukan Biofilm

| Perlakuan             | Konsentrasi CFS | Ulangan ke- |       |       | Rata-rata | % Pencegahan |
|-----------------------|-----------------|-------------|-------|-------|-----------|--------------|
|                       |                 | 1           | 2     | 3     |           |              |
| <i>S. epidermidis</i> | 12,50%          | 0,095       | 0,105 | 0,138 | 0,113     | 27           |
|                       | 25%             | 0,095       | 0,095 | 0,1   | 0,097     | 37           |
|                       | 50%             | 0,111       | 0,109 | 0,101 | 0,107     | 31           |
| K(-)                  | 0%              | 0,185       | 0,094 | 0,183 | 0,154     | 0            |
| Km                    | 0%              | 0,096       | 0,107 | 0,114 | 0,106     | 0            |

### C. Uji Penghancuran/Degradasi Biofilm

| Perlakuan             | Konsentrasi CFS | Ulangan ke- |       |       | Rata-rata | % Pencegahan |
|-----------------------|-----------------|-------------|-------|-------|-----------|--------------|
|                       |                 | 1           | 2     | 3     |           |              |
| <i>S. epidermidis</i> | 12,50%          | 0,156       | 0,132 | 0,149 | 0,146     | 25           |
|                       | 25%             | 0,172       | 0,154 | 0,172 | 0,166     | 15           |
|                       | 50%             | 0,184       | 0,214 | 0,219 | 0,206     | 0            |
| K(-)                  | 0%              | 0,225       | 0,138 | 0,223 | 0,195     | 0            |
| Km                    | 0%              | 0,104       | 0,118 | 0,112 | 0,111     | 0            |

## Lampiran 11. Perhitungan Nilai OD dan Kategori Biofilm

### Rata-rata OD Kontrol

$$\bar{X} = \frac{0.030 + 0.035 + 0.028}{3} = \frac{0.093}{3} = \mathbf{0.0310}$$

### Standar Deviasi OD Kontrol

Rumus standar deviasi :

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Hitung selisih kuadrat:

$$(0.030 - 0.0310)^2 = 0.000001$$

$$(0.035 - 0.0310)^2 = 0.000016$$

$$(0.028 - 0.0310)^2 = 0.000009$$

$$SD = \sqrt{\frac{0.000001 + 0.000016 + 0.000009}{2}} = \sqrt{0.000013} = \mathbf{0.0036056}$$

Hitung ODc (Optical Density Cutoff)

$$\begin{aligned} ODc &= \overline{X_{kontrol}} + (3 \times SD) = 0.0310 + (3 \times 0.0036056) \\ &= 0.0310 + 0.0108168 = \mathbf{0.0418} \end{aligned}$$

Hitung rata-rata OD sampel

$$\overline{X_{sampel}} = \frac{0.228 + 0.185 + 0.210}{3} = \frac{0.623}{3} = \mathbf{0.2077}$$

## Lampiran 12. Analisis Data Uji Pencegahan Penempelan Biofilm

### 1. Uji Normalitas Shapiro-Wilk

|                 | Tests of Normality              |    |      |              |    |      |
|-----------------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
|                 | Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup> |    |      | Shapiro-Wilk |    |      |
|                 | Statistic                       | df | Sig. | Statistic    | df | Sig. |
| CFS 12,5%       | .339                            | 3  | .    | .850         | 3  | .241 |
| CFS 25%         | .385                            | 3  | .    | .750         | 3  | .000 |
| CFS 50%         | .232                            | 3  | .    | .980         | 3  | .726 |
| Kontrol Negatif | .365                            | 3  | .    | .797         | 3  | .107 |
| Kontrol Media   | .260                            | 3  | .    | .958         | 3  | .605 |

a. Lilliefors Significance Correction

### 2. Uji Kruskal-Wallis

|                 | Ranks           |   |           |
|-----------------|-----------------|---|-----------|
|                 | Konsentrasi CFS | N | Mean Rank |
| Optical Density | 12,5%           | 3 | 6.00      |
|                 | 25%             | 3 | 4.00      |
|                 | 50%             | 3 | 5.00      |
|                 | Total           | 9 |           |

#### Test Statistics<sup>a,b</sup>

| Optical Density  |      |
|------------------|------|
| Kruskal-Wallis H | .807 |
| df               | 2    |
| Asymp. Sig.      | .668 |

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Konsentrasi  
CFS

**Lampiran 12.** Analisis Data Uji Penghambatan Pertumbuhan Biofilm *S. epidermidis*

**1. Uji Normalitas Shapiro-Wilk**

|                       | Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup> |    |      | Shapiro-Wilk |    |      |
|-----------------------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
|                       | Statistic                       | df | Sig. | Statistic    | df | Sig. |
| CFS Konsentrasi 12,5% | .300                            | 3  | .    | .913         | 3  | .428 |
| CFS Konsentrasi 25%   | .385                            | 3  | .    | .750         | 3  | .000 |
| CFS3 Konsentrasi 50%  | .314                            | 3  | .    | .893         | 3  | .363 |
| Kontrol Negatif       | .378                            | 3  | .    | .766         | 3  | .037 |
| KM                    | .211                            | 3  | .    | .991         | 3  | .817 |

a. Lilliefors Significance Correction

**2. Uji Nonparametrik Kruskal-Wallis**

|                 | Ranks           |   |           |
|-----------------|-----------------|---|-----------|
|                 | Konsentrasi CFS | N | Mean Rank |
| Optical Density | 12,5%           | 3 | 5.67      |
|                 | 25%             | 3 | 2.67      |
|                 | 50%             | 3 | 6.67      |
|                 | Total           | 9 |           |

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

| Optical Density  |       |
|------------------|-------|
| Kruskal-Wallis H | 3.586 |
| df               | 2     |
| Asymp. Sig.      | .166  |

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Konsentrasi

CFS

### Lampiran 13. Analisis Data Uji Penghancuran Biofim *S. epidermidis*

#### 1. Uji Normalitas Shapiro-Wilk

|                       | Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup> |    |      | Shapiro-Wilk |    |      |
|-----------------------|---------------------------------|----|------|--------------|----|------|
|                       | Statistic                       | df | Sig. | Statistic    | df | Sig. |
| CFS Konsentrasi 12,5% | .273                            | 3  | .    | .945         | 3  | .549 |
| CFS2 Konsentrasi 25%  | .385                            | 3  | .    | .750         | 3  | .000 |
| CFS3 Konsentrasi 50%  | .337                            | 3  | .    | .855         | 3  | .253 |
| Kontrol Negatif       | .378                            | 3  | .    | .767         | 3  | .038 |
| Kontrol Media         | .204                            | 3  | .    | .993         | 3  | .843 |

a. Lilliefors Significance Correction

#### 2. Uji Nonparametrik Kruskal-Wallis

|                 | Ranks           |   |           |
|-----------------|-----------------|---|-----------|
|                 | Konsentrasi CFS | N | Mean Rank |
| Optical Density | 12,5%           | 3 | 2.33      |
|                 | 25%             | 3 | 4.67      |
|                 | 50%             | 3 | 8.00      |
|                 | Total           | 9 |           |

#### Test Statistics<sup>a,b</sup>

|                  | Optical Density |
|------------------|-----------------|
| Kruskal-Wallis H | 6.543           |
| df               | 2               |
| Asymp. Sig.      | .038            |

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Konsentrasi  
CFS

### 3. Uji Lanjut Signifikansi Kruskal Wallis

#### Pairwise Comparisons of Konsentrasi CFS

| Sample 1-Sample 2 | Test Statistic | Std. Error | Std. Test<br>Statistic | Sig. | Adj. Sig. <sup>a</sup> |
|-------------------|----------------|------------|------------------------|------|------------------------|
| 12,5%-25%         | -2.333         | 2.227      | -1.048                 | .295 | .884                   |
| 12,5%-50%         | -5.667         | 2.227      | -2.545                 | .011 | .033                   |
| 25%-50%           | -3.333         | 2.227      | -1.497                 | .134 | .403                   |

Each row tests the null hypothesis that the Sample 1 and Sample 2 distributions are the same.

Asymptotic significances (2-sided tests) are displayed. The significance level is .050.

a. Significance values have been adjusted by the Bonferroni correction for multiple tests.

| Perlakuan | Simbol |
|-----------|--------|
| CFS 12,5% | a      |
| CFS 25%   | ab     |
| CFS 50%   | b      |

## JURNAL BIMBINGAN SKRIPSI/TESIS/DISERTASI

SISWA

: 210602110118  
 : AHMAD ZAKARIA  
 : SAINS DAN TEKNOLOGI  
 : BIOLOGI  
 : Prof. Dr. Hj. ULFAH UTAMI,M.Si  
 : Dr. EKO BUDI MINARNO,M.Pd  
 : SKRINING BAKTERI TERMOFILIK PENGHASIL ENZIM SELULASE DARI SUMBER AIR PANAS CANGAR KOTA BATU  
 JAWA TIMUR

SERTASI

GAN

|    | Nama Pembimbing                | Deskripsi Proses Bimbingan                                     | Tahun Akademik   | Status          |
|----|--------------------------------|--|------------------|-----------------|
|    | Prof. Dr. Hj. ULFAH UTAMI,M.Si | Konfirmasi dan penetapan judul skripsi                         | Ganjil 2024/2025 | Sudah Dikoreksi |
| 14 | Prof. Dr. Hj. ULFAH UTAMI,M.Si | Konsultasi Bab 1, 2 dan 3                                      | Ganjil 2024/2025 | Sudah Dikoreksi |
|    | Prof. Dr. Hj. ULFAH UTAMI,M.Si | Konsultasi Bab 1,2, dan 3                                      | Ganjil 2024/2025 | Sudah Dikoreksi |
|    | Prof. Dr. Hj. ULFAH UTAMI,M.Si | Revisi hasil konsultasi bab 1-3 dan proposal skripsi disetujui | Ganjil 2024/2025 | Sudah Dikoreksi |
|    | Dr. EKO BUDI MINARNO,M.Pd      | Konsultasi Integrasi   | Ganjil 2024/2025 | Sudah Dikoreksi |
|    | Dr. EKO BUDI MINARNO,M.Pd      | Konsultasi dan revisi integrasi                                | Ganjil 2024/2025 | Sudah Dikoreksi |
|    | Dr. EKO BUDI MINARNO,M.Pd      | Konsultasi Revisi dan Konfirmasi Integrasi                     | Ganjil 2024/2025 | Sudah Dikoreksi |
| 5  | Prof. Dr. Hj. ULFAH UTAMI,M.Si | Konsultasi Penelitian dan Peminjaman Alat Laboratorium         | Genap 2024/2025  | Sudah Dikoreksi |
|    | Prof. Dr. Hj. ULFAH UTAMI,M.Si | Konsultasi Hasil Penelitian dan Revisi                         | Genap 2024/2025  | Sudah Dikoreksi |
|    | Dr. EKO BUDI MINARNO,M.Pd      | Konsultasi Integrasi dan Revisi                                | Genap 2024/2025  | Sudah Dikoreksi |

Telah disetujui

Untuk mengajukan ujian Skripsi/Tesis/Desertasi

Malang, \_\_\_\_\_

Dosen Pembimbing 1

Pembimbing 2




Prof. Dr. Hj. ULFAH UTAMI,M.Si

Dr. EKO BUDI MINARNO,M.Pd



Kaprodi,

Evika Sardi Savitri

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

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

**Form Checklist Plagiasi**

: Ahmad Zakaria

: 210602110118

: *Potensi Antibiofilm Cell-Free Supernatant (CFS) Lactobacillus plantarum Terhadap Biofilm Staphylococcus epidermidis*

| Tim Check plagiasi                       | Skor Plagiasi | TTD   |
|--|---------------|---|
| Azizatur Rohmah, M.Sc                    |               |   |
| Berry Fakhry Hanifa, M.Sc                |               |   |
| Bayu Agung Prahardika, M.Si              | 209           |  |
| Tyas Nyonita Punjungsari, M.Sc           |               |   |
| Maharani Retna Duhita, M.Sc., PhD.Med.Sc |               |   |



Mengetahui,  
Ketua Program Studi Biologi

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