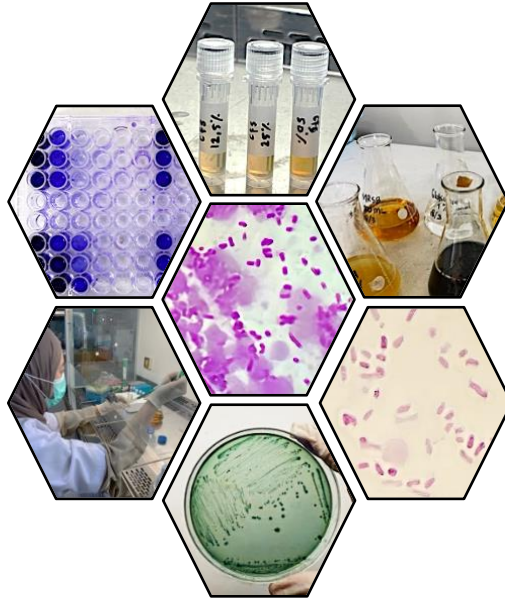


POTENSI *CELL-FREE SUPERNATANT (CFS) LACTOBACILLUS PLANTARUM* SEBAGAI ANTIBIOFILM TERHADAP *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* PADA UDANG PENYEBAB *FOODBORNE DISEASE*



**IORELLA BADZLI IRHEN LIE
H041201088**



**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

POTENSI *CELL-FREE SUPERNATANT (CFS) LACTOBACILLUS PLANTARUM* SEBAGAI ANTIBIOFILM TERHADAP *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* PADA UDANG PENYEBAB *FOODBORNE DISEASE*

**FIGRELLA BADZLI IRHEN LIE
H041201088**



**PROGRAM STUDI BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

POTENSI *CELL-FREE SUPERNATANT (CFS) LACTOBACILLUS PLANTARUM* SEBAGAI ANTIBIOFILM TERHADAP *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* PADA UDANG PENYEBAB *FOODBORNE DISEASE*

FIORELLA BADZLI IRHEN LIE
H041201088

Skripsi

Sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar sarjana

Program Studi Biologi

pada

**PROGRAM STUDI BIOLOGI
DEPARTEMEN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

SKRIPSI

**POTENSI CELL-FREE SUPERNATANT (CFS) LACTOBACILLUS
PLANTARUM SEBAGAI ANTIBIOFILM TERHADAP VIBRIO
PARAHAEMOLYTICUS PADA UDANG PENYEBAB *FOODBORNE
DISEASE***

FIGRELLA BADZLI IRHEN LIE

H041201088

Skripsi,

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Sarjana Biologi pada 06 Agustus
2024 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

pada



Mengesahkan:
Pembimbing tugas akhir,

Dr. Nur Haedar, S.Si.M.Si
NIP. 196801291997022001

Mengetahui:
Ketua Program Studi



PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, skripsi berjudul: "*Potensi Cell-Free Supernatant (CFS) Lactobacillus plantarum* Sebagai Antibiofilm Terhadap *Vibrio parahaemolyticus* Pada Udang Penyebab *Foodborne Disease*" adalah benar karya saya dengan arahan dari pembimbing Dr. Nur Haedar, S.Si. , M.Si. Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apa pun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebut-kan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka skripsi ini. Apabila di kemu-dian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini adalah karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut berdasarkan aturan yang berlaku.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta (hak ekonomis) dari karya tulis saya berupa skripsi ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 15 Mei 2024



Fiorella Badzli Irhen Lie
H041201088

UCAPAN TERIMA KASIH

Pertama-tama, puji syukur yang tak terhingga kepada Allah SWT atas terselesaikannya skripsi ini dengan baik dan lancar. Pada kesempatan ini, perkenankan saya mengucapkan terima kasih kepada pihak-pihak yang telah berkontribusi dalam menyusun dan menyelesaikan tugas akhir ini, khususnya kepada:

- Diri saya sendiri, yang telah bertahan dan berusaha semaksimal mungkin hingga dapat menyelesaikan skripsi ini.
- Orang tua tercinta, Ayahanda Henky Liesan dan Ibunda Irawaty, serta adik tercinta, Jona Alvaro Lie yang telah mendidik, mendoakan, mendukung dan mengusahakan yang terbaik untuk saya.
- Ketua Departemen Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Hasanuddin, sekaligus Penasehat Akademik (PA) serta dosen penguji, Ibu Dr. Magdalena Litaay, M.Sc. atas ilmu dan saran hingga terselesaikannya penelitian ini.
- Dosen pembimbing, Ibu Dr. Nur Haedar, S.Si. , yang telah meluangkan waktu memberikan bimbingan dan arahan dalam penelitian hingga terselesaikannya skripsi ini.
- Dosen penguji, Ibu Dr. Andi Masniawati, S.Si., M.Si yang meluangkan waktu memberikan arahan dan petunjuk dalam pelaksanaan penelitian.
- Ibu Meidistria Tandil Rapak, S.Si., M.Sc yang telah meluangkan waktu untuk memberikan masukan terkait ide penelitian.
- Kak Muhammad Yusuf Usman, S.Si selaku pendamping peneliti di Laboratorium HUM-RC (Hasanuddin University Medical Research Center) yang telah membantu dalam proses penelitian ini.
- Teman-teman seperjuangan Cegil: Fika, Yunika, Tiwai, Febby, Ara, Indah, dan Dytha, yang telah kebersamai proses perkuliahan.
- Teman-teman Biologi Angkatan 2020, yang telah memberi warna dalam perjalanan menyelesaikan perkuliahan.
- Sahabat saya, Sonia, Keyla, dan Rean, yang senantiasa menjadi penghibur dan penyemangat dalam penulisan skripsi ini.
- Sahabat saya, Adedas: Mari, Jess dan Pitti, atas motivasi dan dukungan yang diberikan.

Makassar, 15 Mei 2024

Fiorella Badzli Irhen Lie

ABSTRAK

FIORELLA BADZLI IRHEN LIE. **Potensi *Cell-Free Supernatant (CFS) Lactobacillus plantarum* Sebagai Antibiofilm Terhadap *Vibrio parahaemolyticus* Pada Udang Penyebab *Foodborne Disease*** (dibimbing oleh Nur Haedar)

Latar belakang. *Vibrio parahaemolyticus* adalah bakteri umum yang sering mencemari makanan laut, termasuk udang dan menyebabkan *foodborne disease*. Bakteri ini memiliki kemampuan untuk membuat biofilm, yang tahan terhadap tekanan lingkungan dan senyawa antimikroba. Biofilm juga sulit dihilangkan, sehingga meningkatkan risiko infeksi. Biofilm dapat dikelola dengan menggunakan bakteri BAL. *Lactobacillus plantarum* memiliki kemampuan untuk menghasilkan senyawa yang bertindak sebagai antibiofilm dan dapat diperoleh dalam bentuk *cell-free supernatant (CFS)*. **Tujuan.** Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pembentukan biofilm *V. parahaemolyticus* dan potensi CFS dari *L. plantarum* dan mengatasi biofilm *V. parahaemolyticus*. **Metode.** Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental. Uji deteksi biofilm menggunakan metode *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.** Aktivitas pencegahan penempelan biofilm tertinggi yaitu sebesar 84,77% dari hasil perlakuan konsentrasi 50%. Aktivitas penghambatan pembentukan biofilm tertinggi yaitu sebesar 90,82% dari hasil perlakuan konsentrasi 50% Aktivitas penghancuran tertinggi sebesar 60,36% dari hasil perlakuan konsentrasi 12,5%. **Kesimpulan.** Berdasarkan hasil tersebut, disimpulkan bahwa CFS *L. plantarum* berpotensi sebagai agen antibiofilm terhadap *V. parahaemolyticus* pada udang penyebab *foodborne disease*.

Kata Kunci: *Cell-free supernatant; antibiofilm; Lactobacillus plantarum; Vibrio parahaemolyticus; foodborne disease*.

ABSTRACT

FIORELLA BADZLI IRHEN LIE. **Potential of Cell-Free Supernatant (CFS) *Lactobacillus plantarum* as Antibiofilm Against *Vibrio parahaemolyticus* in Shrimp Causing Foodborne Disease** (supervised by Nur Haedar)

Background. *Vibrio parahaemolyticus* is a common bacterium that frequently contaminates seafood, including shrimp, and causes foodborne disease. These bacteria have the ability to create biofilms, which are resistant to environmental stresses and antimicrobial compounds. Biofilms are also difficult to remove, increasing the risk of infection. Biofilms can be managed using LAB bacteria. *Lactobacillus plantarum* has the ability to produce compounds that act as antibiofilms and can be obtained in the form of cell-free supernatant (CFS). **Aim.** The aim of this study was to determine the biofilm formation of *V. parahaemolyticus* and the CFS potential of *L. plantarum* and overcome the biofilm of *V. parahaemolyticus*. **Methods.** This study is an experimental study. Biofilm detection test using Microtiter Plate Assay method. The antibiofilm activity test includes biofilm attachment prevention test, biofilm formation inhibition test, and biofilm destruction test carried out by Microtiter Plate Assay method. The CFS concentrations used were 12.5%, 25%, and 50%. **Results.** The highest biofilm attachment prevention activity was 84.77% from the 50% concentration treatment. The highest biofilm formation inhibition activity was 90.82% of the 50% concentration treatment result. The highest destruction activity was 60.36% of the 12.5% concentration treatment result. **Conclusion.** Based on these results, it is concluded that CFS *L. plantarum* has the potential as an antibiofilm agent against *V. parahaemolyticus* in shrimp that causes foodborne disease.

Keywords: *Cell-free supernatant, antibiofilm, Lactobacillus plantarum, Vibrio parahaemolyticus, foodborne disease.*

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGAJUAN.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA	iv
UCAPAN TERIMA KASIH.....	v
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Tujuan Penelitian	3
1.3 Manfaat penelitian.....	3
1.4 Waktu dan lokasi penelitian	4
BAB II METODE PENELITIAN	5
2.1 Alat dan bahan.....	5
2.2 Tahapan penelitian	5
2.2.1 Sterilisasi Alat	5
2.2.2 Pembuatan Media	5
2.2.3 Peremajaan Isolat Bakteri.....	6
2.2.4 Pengamatan Mikroskopis Isolat Bakteri	6
2.2.5 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji	6
2.2.6 Pembuatan Kelompok Kontrol	6
2.2.7 Pembuatan <i>Cell Free Supernatant</i> (CFS)	6
2.2.8 Uji Deteksi Pembentukan Biofilm.....	7
2.2.9 Uji Aktivitas Antibiofilm.....	8
2.2.9.1 Uji Pencegahan Penempelan Biofilm	8
2.2.9.2 Uji Penghambatan Pembentukan Biofilm	8

2.2.9.3 Uji Penghancuran/Degradasi Biofilm	9
2.3 Analisis dan Interpretasi Data Penelitian	9
BAB III HASIL DAN PEMBAHASAN.....	10
3.1 Pembentukan Biofilm <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	10
3.2 Aktivitas Antibiofilm <i>Cell-Free Supernatant</i> (CFS) <i>Lactobacillus plantarum</i> Terhadap <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	13
3.2.1 Uji Pencegahan Penempelan Biofilm <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	15
3.2.2 Uji Penghambatan Pembentukan Biofilm <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	17
3.2.3 Uji Penghancuran/Degradasi Biofilm <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	19
BAB IV KESIMPULAN DAN SARAN	23
4.1 Kesimpulan	23
4.2 Saran.....	23
DAFTAR PUSTAKA.....	24
LAMPIRAN.....	29

DAFTAR TABEL

Nomor urut	Halaman
1. Interpretasi nilai OD dan kekuatan pembentukan biofilm.....	7
2. Nilai OD dan hasil pengkategorian biofilm.....	12

DAFTAR GAMBAR

Nomor urut	Halaman
1. Hasil uji deteksi pembentukan biofilm <i>Vibrio parahaemolyticus</i> pada <i>microplate</i>	11
2. Hasil OD uji pencegahan penempelan biofilm <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ...	15
3. Persentase aktivitas pencegahan penempelan biofilm <i>Vibrio</i> <i>parahaemolyticus</i>	16
4. Hasil OD uji penghambatan pembentukan biofilm <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	17
5. Persentase aktivitas penghambatan pembentukan biofilm <i>Vibrio</i> <i>parahaemolyticus</i>	18
6. Hasil OD uji penghancuran biofilm <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	20
7. Persentase aktivitas penghancuran biofilm <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	21

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor urut	Halaman
1. Medium Pertumbuhan Yang Digunakan Pada Penelitian	29
2. Proses Pembuatan Cell-Free Supernatant (CFS) <i>L. plantarum</i>	30
3. Dokumentasi kegiatan penelitian	31
4. Gambaran Uji Deteksi Pembentukan Biofilm pada Microplate	33
5. Gambaran Uji Aktivitas Antibiofilm pada Microplate.....	34
6. Hasil Uji Aktivitas Pencegahan Penempelan Biofilm pada Microplate	35
7. Hasil Uji Aktivitas Penghambatan Pertumbuhan Biofilm pada Microplate ..	36
8. Hasil Uji Aktivitas Penghancuran Biofilm pada Microplate	37
9. Data Hasil Uji Antibiofilm.....	38

BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Indonesia, sebagai negara kepulauan dengan wilayah maritim yang luas, memiliki garis pantai sepanjang 99.093 km, sehingga menempati peringkat di antara negara-negara dengan garis pantai terpanjang di dunia. Sumber daya laut yang melimpah memberikan keuntungan besar bagi industri perikanan, terutama dalam bidang budidaya udang (Yahya dan Hasti, 2021). Pada tahun 2014, produksi udang global mencapai 645 ribu ton, dengan Amerika Serikat muncul sebagai tujuan utama ekspor, senilai US\$ 938 juta (Prabowo, 2019). Menurut data dari Departemen Kelautan dan Perikanan di Indonesia, sebagian besar tambak udang berfungsi sebagai pemasok udang khusus untuk tujuan ekspor. Namun demikian, masalah kontaminasi bakteri patogen pada produk udang merupakan masalah signifikan yang menyebabkan penolakan ekspor.

Indonesia sering mengalami kasus penolakan ekspor untuk produk perikanan. FDA, badan pengawas yang bertanggung jawab untuk mengawasi makanan dan obat-obatan di Amerika Serikat, telah mengungkapkan bahwa telah terjadi beberapa kali penolakan ekspor udang vannamei selama tahun 2002, 2007, dan 2010. Selain itu, Uni Eropa telah mendokumentasikan beberapa kasus penolakan ekspor yang disebabkan oleh adanya infeksi *Vibrio* sp. pada udang beku dan produk sushi ebi. Cina menolak ekspor ikan Indonesia pada tahun 2009 dan 2010 karena alasan yang sama (Sunorita & Tjarsono, 2014). Penolakan produk udang sebagian besar disebabkan oleh perbedaan kualitas dan keamanan yang ditemukan di bawah standar internasional, termasuk masalah sanitasi dan keberadaan patogen.

Mikroba yang ditemukan dalam makanan dapat menyebabkan berkembangnya *foodborne disease* (Utari dkk., 2023). *Foodborne disease* adalah masalah kesehatan masyarakat dan keamanan pangan yang mendapat perhatian di seluruh dunia, yang memberikan beban penyakit yang besar pada masyarakat (Li dkk., 2022). Organisme utama yang terlibat dalam *foodborne disease* adalah *Vibrio* spp, khususnya *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, dan *V. vulnificus* (Arunkumar, 2020). Morsy dkk. (2023) menegaskan bahwa spesies *Vibrio*, khususnya *Vibrio parahaemolyticus*, adalah penyebab utama dibalik kasus-kasus keracunan makanan yang berhubungan dengan makanan laut. Bakteri ini menjadi ancaman yang signifikan bagi manusia dan organisme air.

Vibrio parahaemolyticus adalah bakteri yang mampu bergerak, memiliki reaksi negatif terhadap pewarnaan Gram, dan tumbuh subur di lingkungan dengan konsentrasi garam yang tinggi. Bakteri ini umumnya ditemukan di perairan payau, pesisir, dan laut (Ceccarelli dkk., 2013). *Vibrio parahaemolyticus* biasanya berada dalam makanan laut, terutama udang (baik udang mentah atau kurang matang, serta udang matang). *Vibrio parahaemolyticus* dikenal sebagai patogen bawaan makanan utama pada

makanan laut yang menyebabkan gastroenteritis di seluruh dunia, terutama di negara dan wilayah pesisir (Chen dkk., 2020). Gejala umum dari penyakit ini termasuk mual dan muntah pada perut, diare, pireksia, dan kejang-kejang (Hidayah dkk., 2022). Penyakit berisiko tinggi lainnya meliputi infeksi aliran darah dan lesi kulit melepuh yang parah. Faktor virulensi dari strain *Vibrio parahaemolyticus* meliputi *thermostable direct hemolysin* (tdh), *tdh-related hemolysin* (trh), dan gen biofilm VP950 (mengkode protein terkait lipoprotein). Hal ini karena korelasi mereka dengan sifat enterotoksik, hemolitik, dan sitotoksik (Ashrafudoulla dkk., 2021). *Vibrio parahaemolyticus* memiliki kemampuan untuk membentuk biofilm di lingkungan makanan laut, sehingga memberikan keuntungan tersendiri untuk diri bakteri tersebut (Wang dkk., 2023).

Biofilm adalah jaringan rumit yang terdiri dari satu atau banyak spesies mikroba, yang membentuk kerangka kerja tiga dimensi yang kuat yang terdiri dari eksopolisakarida (EPS), protein, dan DNA ekstraseluler (Lucero-Mejia, 2020). Biofilm memiliki peran penting dalam kemampuan bakteri *Vibrio* untuk bertahan hidup di lingkungan dan menyebar. Sel-sel bakteri terlindung di dalam biofilm, memungkinkan mereka untuk bertahan dari elemen-elemen yang merugikan seperti suhu tinggi, suhu rendah, predator, zat antimikroba, dan sistem kekebalan tubuh inang, yang kesemuanya merupakan kontributor penting dalam patogenesis (Nurhafizah dkk., 2021). Menurut Li dkk. (2022), biofilm bertanggung jawab atas sekitar 60% wabah *foodborne disease*. Proses pembentukan biofilm merupakan siklus yang kompleks dan terus berubah yang meliputi pergerakan sel, penempelan pada permukaan, pembentukan biofilm, dan penyebaran biofilm tersebut. Setelah biofilm terbentuk, kemampuannya untuk bertahan dan beradaptasi dengan lingkungan sekitar memungkinkan sel untuk bertahan hidup dari berbagai tekanan lingkungan (Wang dkk., 2022). Biofilm memiliki ketahanan yang lebih besar dibandingkan dengan sel planktonik individu, karena adanya matriks zat polimer ekstraseluler (EPS) yang bertindak sebagai penghalang terhadap infiltrasi zat asing, termasuk bahan kimia antimikroba. Oleh karena itu, penghapusan biofilm menjadi sangat rumit jika hanya mengandalkan antibiotik konvensional (Arunkumar, 2020), sehingga membutuhkan strategi yang efektif untuk mengelola dan memberantas biofilm bakteri ini.

Bakteri asam laktat (BAL) adalah jenis bakteri spesifik yang mampu mensintesis bahan kimia metabolit dengan sifat antibakteri. *Lactobacillus plantarum* adalah bakteri asam laktat yang memiliki kapasitas untuk berfungsi sebagai biopreservatif karena kemampuannya untuk menghambat perkembangbiakan mikroorganisme patogen dan merusak. *Lactobacillus plantarum* memiliki kapasitas yang unggul untuk menghambat perkembangbiakan bakteri berbahaya, melebihi jenis bakteri asam laktat lainnya dalam hal penghambatan. Zat bakterisida yang berasal dari *Lactobacillus plantarum* dikenal sebagai *plantaricin* (Usman dkk., 2018).

Lactobacillus plantarum menghasilkan metabolit, khususnya senyawa *plantaricin*, yang mencakup bakteriosin yang mampu menekan ekspresi gen yang terkait dengan produksi biofilm oleh bakteri patogen (Wang dkk., 2019). Biasanya, metabolit ini diproduksi di luar sel ke dalam media pertumbuhan, sehingga dapat dikumpulkan sebagai supernatan. Hasil dari proses ekstraksi ini disebut sebagai *Cell-Free Supernatant (CFS)*, yang telah terbukti secara efektif memerangi biofilm bakteri patogen (Abdelhamid dkk., 2018). Efek penghambatan dan pemberantasan CFS pada biofilm bakteri disebabkan oleh adanya eksopolisakarida, biosurfaktan, hidrogen peroksida, asam lemak jenuh, dan enzim pencernaan ekstraseluler di dalamnya. Zat-zat tersebut memiliki kemampuan untuk menghambat melekatnya sel bakteri berbahaya di permukaan, mempengaruhi ekspresi gen yang terkait dengan produksi biofilm, dan memecah biofilm (Zamani dkk., 2017).

Telah terbukti bahwa CFS bakteri *Lactobacillus plantarum* mengandung senyawa aktif yang berperan dalam melawan dan mengendalikan biofilm bakteri patogen. Hal ini menunjukkan bahwa CFS bakteri *Lactobacillus plantarum* berpotensi sebagai agen antibiofilm. Selain itu, masih sangat jarang ditemukan penelitian yang menggunakan CFS *Lactobacillus plantarum* untuk penerapannya sebagai agen antibiofilm pada patogen yang mengkontaminasi udang seperti *Vibrio parahaemolyticus* sehingga dilakukan penelitian ini untuk mengkaji potensi antibiofilm *cell-free supernatant (CFS) Lactobacillus plantarum* terhadap *Vibrio parahaemolyticus* pada udang penyebab *foodborne disease*.

Penelitian telah menunjukkan bahwa *Cell-Free Supernatant (CFS) Lactobacillus plantarum* mengandung senyawa aktif yang secara efektif memerangi dan mengatur biofilm yang dibentuk oleh bakteri berbahaya. Hal ini menunjukkan bahwa CFS *Lactobacillus plantarum* memiliki potensi untuk bertindak sebagai agen antibiofilm. Selain itu, ada kelangkaan penelitian yang menyelidiki penerapan CFS *Lactobacillus plantarum* sebagai agen antibiofilm terhadap patogen udang seperti *Vibrio parahaemolyticus*. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk menilai potensi CFS *Lactobacillus plantarum* dalam menghambat pembentukan biofilm *Vibrio parahaemolyticus* pada udang penyebab *foodborne disease*.

1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah:

1. Mengetahui pembentukan biofilm oleh *Vibrio parahaemolyticus* .
2. Mengetahui aktivitas antibiofilm *cell-free supernatant (CFS) Lactobacillus plantarum* terhadap *Vibrio parahaemolyticus* pada udang penyebab *foodborne disease*.

1.3 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah:

1. Penelitian ini dapat digunakan sebagai sumber pengetahuan tambahan dalam ilmu mikrobiologi mengenai potensi antibiofilm *cell-free supernatant (CFS)*

Lactobacillus plantarum terhadap *Vibrio parahaemolyticus* pada udang penyebab *foodborne disease*.

2. Penelitian ini dapat digunakan sebagai informasi awal bagi industri terkait pengembangan terapi antibiofilm dari bahan metabolit bakteri probiotik seperti *Lactobacillus plantarum* untuk mengatasi biofilm *Vibrio parahaemolyticus* pada udang penyebab *foodborne disease*.

1.4 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari hingga Maret 2024 di Laboratorium Mikrobiologi Hasanuddin University Medical Research Center (HUM-RC) Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin.

BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah autoklaf, *biological safety cabinet* (BSC), bunsen, cawan petri, gelas beker, gelas ukur, *hot plate* dan *magnetic stirrer*, inkubator, kertas label, mikroskop, *microplate flat-bottom 96 wells*, *microplate reader*, mikropipet, *microtube*, ose, pipet tetes, sentrifus, spektrofotometer, tabung erlenmeyer, tabung eppendorf, tabung reaksi, timbangan analitik, timer dan *vortex*.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat bakteri *Lactobacillus plantarum* yang diperoleh dari Laboratorium AGAVI serta isolat bakteri *Vibrio parahaemolyticus* yang diperoleh dari stok kultur Balai Perikanan Budidaya Air Payau Takalar. medium *DeMan Rogosa Sharpe Agar* (MRSA), medium *DeMan Rogosa Sharpe Broth* (MRSB), medium *Trypticase Soy Broth* (TSB), akuades, glukosa 1%, pewarna kristal violet 1%, asam asetat 30%, *filter* 0,22 μm , lugol, safranin, alkohol 96%, minyak imersi, aluminium foil, kapas dan plastik *wrap*.

2.2 Tahapan Penelitian

2.2.1 Sterilisasi Alat

Proses sterilisasi alat melibatkan pembungkusan alat dalam aluminium foil dan melakukan sterilisasi dalam autoklaf. Sterilisasi dilakukan pada suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit.

2.2.2 Pembuatan Media

Media untuk peremajaan isolat bakteri *Lactobacillus plantarum* menggunakan MRSA. Bakteri *Vibrio parahaemolyticus* diremajakan menggunakan media TCBS Agar. Ditimbang 6,82 gram bubuk MRSA dan dilarutkan ke dalam 100 mL akuades, dipanaskan pada *hot plate* hingga larut pada suhu 80 °C selama 30 menit. Ditimbang pula 8,8 gram bubuk TCBS Agar dan dilarutkan pada 100 mL akuades dengan cara yang sama.

Media pertumbuhan untuk pembuatan suspensi bakteri yang digunakan yaitu TSB. Ditimbang bubuk TSB sebanyak 3 gram dan dicampurkan dengan 100 mL akuades. Dipanaskan pada *hot plate* sampai mendidih selama 30 menit. Media dibagi menjadi dua dengan cara dituang ke dalam dua buah tabung erlenmeyer ukuran 100 mL. Setelah semua media siap, selanjutnya dilakukan sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C tekanan 1 atm selama 15 menit. Setelah steril, ditambahkan glukosa 1% sebanyak 0,5 gram ke dalam media TSB pada salah satu tabung erlenmeyer. Penambahan glukosa 1% untuk meningkatkan pembentukan biofilm bakteri.

Media untuk pembuatan *Cell-Free Supernatant* dari isolat bakteri *Lactobacillus plantarum* menggunakan MRSB. Ditimbang 2,8 gram bubuk MRSB

dan dilarutkan ke dalam 50 mL akuades, dipanaskan pada *hot plate* hingga larut pada suhu 80 °C selama 30 menit.

2.2.3 Peremajaan Isolat Bakteri

Peremajaan isolat bakteri *Lactobacillus plantarum* menggunakan media MRSA. Media MRSA yang telah steril dituangkan ke dalam cawan petri sebanyak 10 mL secara steril. Cawan petri ditutup dan media dibiarkan memadat. Selanjutnya, masing-masing isolat bakteri diinokulasikan secara zigzag pada masing-masing media MRSA dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam.

Peremajaan isolat bakteri *Vibrio parahaemolyticus* menggunakan media TCBS Agar. Media TCBS Agar yang telah steril dituangkan ke dalam cawan petri sebanyak 10 mL secara steril. Cawan petri ditutup dan media dibiarkan memadat. Selanjutnya, isolat bakteri *Vibrio parahaemolyticus* diinokulasikan secara metode kuadran lalu diinkubasi pada suhu 28 °C selama 24 jam.

2.2.4 Pengamatan Mikroskopis Isolat Bakteri

Pewarnaan gram dilakukan dengan cara mengambil sedikit goresan pada biakan bakteri menggunakan ose steril pada kaca preparat secara perlahan. Kemudian, bakteri difiksasi diatas nyala bunsen menggunakan larutan fisiologis. Pewarnaan pertama diberi larutan kristal violet selama 1 menit lalu dibilas dengan akuades. Selanjutnya diberi iodin selama 1 menit lalu dibilas dengan akuades. Kemudian melakukan dekolonisasi menggunakan etanol 96% selama 1 menit lalu dibilas dengan akuades. Pewarnaan terakhir diberikan safranin selama 1 menit lalu dibilas dengan akuades. Kaca preparat dikeringkan pada suhu ruang. Selanjutnya diamati biakan bakteri dibawah mikroskop dengan pembesaran 1000x menggunakan bantuan minyak imersi.

2.2.5 Pembuatan Suspensi Bakteri Uji

Pembuatan suspensi bakteri *Vibrio parahaemolyticus* menggunakan media TSB yang telah dicampur dengan glukosa 1%. Masing-masing satu ose biakan murni bakteri *Vibrio parahaemolyticus* dimasukkan ke dalam masing-masing tabung reaksi berisi 5 mL media TSB dengan penambahan glukosa secara steril kemudian dihomogenkan dengan *vortex*. Selanjutnya tabung ditutup dengan kapas dan plastik wrap lalu diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Kepadatan bakteri *Vibrio parahaemolyticus* diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 620 nm hingga didapatkan OD 0,2.

2.2.6 Pembuatan Kelompok Kontrol

Kelompok kontrol terdiri dari kontrol negatif dan kontrol media. Kontrol negatif menggunakan suspensi bakteri *Vibrio parahaemolyticus*. Kontrol media dibuat dari campuran media TSB dan glukosa 1%.

2.2.7 Pembuatan Cell Free Supernatant (CFS)

Pembuatan CFS dilakukan dengan mensuspensikan 5 ose inokulum bakteri *Lactobacillus plantarum* pada 45 mL media MRSB kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam. Suspense selanjutnya disentrifugasi pada

kecepatan 3000 rpm selama 15 menit pada suhu 20°C. Setelah sentrifugasi, supernatant yang terbentuk disaring menggunakan *filter* steril 0,22 µm.

Penentuan konsentrasi didasarkan pada hasil penelitian Lee dkk., (2021). Berdasarkan penelitian tersebut, konsentrasi Hambat Minimum atau *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) yang diperoleh sebesar 12,5%. Maka variasi yang digunakan pada penelitian ini meliputi MIC-3xMIC sehingga didapatkan konsentrasi 12,5%, 25% dan 50%. Konsentrasi 12,5% dibuat dengan melarutkan 125 µL CFS yang terbentuk setelah sentrifugasi ke dalam media TSB hingga mencapai volume 1 mL. Konsentrasi 25% dibuat dengan 250 µL CFS ke dalam TSB hingga mencapai volume 1 mL. Konsentrasi 50% dibuat dengan melarutkan 500 µL CFS ke dalam media TSB hingga mencapai volume 1 mL. Semua suspensi kemudian dihomogenkan dengan vortex.

2.2.8 Uji Deteksi Pembentukan Biofilm

Uji deteksi biofilm dilanjutkan dengan metode *Microtiter Plate Assay* (MtP) untuk mengetahui tingkatan pembentukan biofilm bakteri uji. Diinokulasikan 200 µL suspensi bakteri *Vibrio parahaemolyticus* ke dalam sumur uji pada *microplate* 96 well steril. Kontrol negatif menggunakan 200 µL campuran media TSB dan glukosa 1% dimasukkan ke dalam sumur kontrol negatif. Diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Isi *microplate* dibuang dan dibilas dengan akuades steril sebanyak tiga kali dan dikeringkan pada suhu ruang selama 15 menit. Dilakukan pewarnaan biofilm dengan memasukkan 200 µL kristal violet 1% ke dalam masing-masing sumuran dan dibiarkan selama 20 menit. Setelahnya, *microplate* dibilas kembali dengan akuades steril sebanyak tiga kali dan dikeringkan. Ditambahkan 200 µL asam asetat 30% ke dalam masing-masing sumuran dan didiamkan selama 15 menit. Uji dilakukan sebanyak tiga kali ulangan. Nilai OD kemudian diukur pada *microplate reader* pada panjang gelombang 620 nm. Jika nilai OD bakteri uji lebih dari nilai OD kontrol negatif, maka bakteri tersebut positif membentuk biofilm. Perhitungan nilai cut off (ODcut) yaitu (Ruchi dkk., 2015):

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

Keterangan: ODcut = *Optical Density cut-off*

ODc = *Optical Density control*

Interpretasi hasil sebagai berikut:

Tabel 1. Interpretasi nilai OD dan kekuatan pembentukan biofilm

Rata-rata Nilai OD	Kekuatan Produksi Biofilm
$\text{OD}_{\text{isolat}} \leq \text{ODcut}$	<i>Non biofilm production</i>
$\text{ODcut} < \text{OD}_{\text{isolat}} \leq 2 \times \text{ODcut}$	<i>Weak biofilm production</i>
$2 \times \text{ODcut} < \text{OD}_{\text{isolat}} \leq 4 \times \text{ODcut}$	<i>Moderate biofilm production</i>
$4 \times \text{ODcut} < \text{OD}_{\text{isolat}}$	<i>Strong biofilm production</i>

ODcut = *Optical Density cut-off value*,

OD_{isolat} = *Optical Density isolat*

Sumber: Ruchi dkk., (2015)

2.2.9 Uji Aktivitas Antibiofilm

2.2.9.1 Uji Pencegahan Penempelan Biofilm (Kining dkk., 2016)

Uji pencegahan penempelan biofilm dilakukan dengan memasukkan 3 variasi presentasi 12,5%, 25%, dan 50% CFS *Lactobacillus plantarum* sebanyak 200 μ L ke dalam sumur uji. Kontrol media menggunakan 200 μ L campuran media TSB dan glukosa 1% dimasukkan ke dalam sumur kontrol media. *Microplate* kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 60 menit. Selanjutnya *microplate* dibilas dengan akuades steril sebanyak tiga kali untuk mengeluarkan sisa sampel dan dikeringkan pada suhu ruang. Setelah kering, dimasukkan masing-masing 200 μ L suspensi bakteri *Vibrio parahaemolyticus* pada tiap sumur uji dan sumur kontrol negatif. Dimasukkan pula 200 μ L campuran media TSB dan glukosa 1% ke dalam sumur kontrol media. Diinkubasi pada suhu 37 °C selama 72 jam. Setelah inkubasi, *microplate* dibilas dengan akuades steril tiga kali untuk mengeluarkan sel planktonik lalu dikeringkan pada suhu ruang.

Dilakukan pewarnaan menggunakan kristal violet 1% sebanyak 200 μ L yang dimasukkan ke dalam *microplate* untuk mewarnai biofilm yang terbentuk lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 20 menit. *Microplate* dibilas dengan akuades steril untuk melepaskan sel-sel yang tidak menempel pada *microplate* dan dibiarkan mengering pada suhu ruang. Selanjutnya ditambahkan 200 μ L asam asetat 30% dan diinkubasi pada suhu ruang selama 20 menit. *Microplate* diamati menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 620 nm untuk mencari nilai OD (*Optical Density*). Perhitungan pencegahan penempelan biofilm menggunakan rumus berikut

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

Keterangan: OD_{kn} = *Optical Density* kontrol negatif

OD_{uji} = *Optical Density* uji

2.2.9.2 Uji Penghambatan Pembentukan Biofilm (Kining dkk., 2016)

Uji penghambatan pembentukan biofilm dilakukan dengan memasukkan 3 variasi presentasi 12,5%, 25%, dan 50% CFS *Lactobacillus plantarum* sebanyak 100 μ L ke dalam sumur uji. Setelahnya ditambahkan masing-masing 100 μ L suspensi bakteri *Vibrio parahaemolyticus* ke dalam sumur uji. Kontrol media menggunakan 200 μ L campuran media TSB dan glukosa 1% dimasukkan ke dalam sumur kontrol media, sedangkan untuk kontrol negatif ditambahkan 200 μ L suspensi bakteri *Vibrio parahaemolyticus*. *Microplate* kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Selanjutnya *microplate* dibilas dengan akuades steril sebanyak tiga kali untuk mengeluarkan sisa sampel dan dikeringkan pada suhu ruang.

Dilakukan pewarnaan menggunakan kristal violet 1% sebanyak 200 μ L yang dimasukkan ke dalam *microplate* untuk mewarnai biofilm yang terbentuk lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 20 menit. *Microplate* dibilas dengan akuades steril untuk melepaskan sel-sel yang tidak menempel pada *microplate* dan dibiarkan mengering pada suhu ruang. Selanjutnya ditambahkan 200 μ L asam asetat 30% dan diinkubasi pada suhu ruang selama 20 menit. *Microplate*

diamati menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 620 nm untuk mencari nilai OD (*Optical Density*). Perhitungan penghambatan pembentukan biofilm menggunakan rumus berikut:

$$\% \text{ Pencegahan penempelan biofilm} = \frac{OD_{kn} - OD_{uji}}{OD_{kn}} \times 100\%$$

Keterangan: OD_{kn} = *Optical Density* kontrol negatif
OD_{uji} = *Optical Density* uji

2.2.9.3 Uji Penghancuran/Degradasi Biofilm (Mohsenipour dkk., 2015).

Uji penghancuran/degradasi biofilm dilakukan dengan memasukkan 200 µL suspensi bakteri *Vibrio parahaemolyticus* ke dalam sumur uji dan sumur kontrol negatif. Kontrol media menggunakan 200 µL campuran media TSB dan glukosa 1% dimasukkan ke dalam sumur kontrol media. *Microplate* kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 72 jam. Selanjutnya *microplate* dibilas dengan akuades steril sebanyak tiga kali untuk mengeluarkan sisa sampel dan dikeringkan pada suhu ruang. Selanjutnya ditambahkan 3 variasi presentasi 12,5%, 25%, dan 50% CFS *Lactobacillus plantarum* sebanyak 200 µL ke dalam sumur uji, masing-masing 200 µL suspensi *Lactobacillus plantarum* pada sumur kontrol negatif, dan 200 µL campuran media TSB dan glukosa 1% pada kontrol media. *Microplate* ditutup dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 60 menit. Setelah diinkubasi, *microplate* dibilas menggunakan akuades steril tiga kali dan dikeringkan.

Dilakukan pewarnaan menggunakan kristal violet 1% sebanyak 200 µL yang dimasukkan ke dalam *microplate* untuk mewarnai biofilm yang terbentuk lalu diinkubasi pada suhu ruang selama 20 menit. *Microplate* dibilas dengan akuades steril untuk melepaskan sel-sel yang tidak menempel pada *microplate* dan dibiarkan mengering pada suhu ruang. Selanjutnya ditambahkan 200 µL asam asetat 30% dan diinkubasi pada suhu ruang selama 20 menit. *Microplate* diamati menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 620 nm untuk mencari nilai OD (*Optical Density*). Perhitungan penghancuran biofilm menggunakan rumus berikut:

$$\% \text{ Pencegahan penghancuran biofilm} = \frac{OD_{kn} - OD_{uji}}{OD_{kn}} \times 100\%$$

Keterangan: OD_{kn} = *Optical Density* kontrol negatif
OD_{uji} = *Optical Density* uji

2.3 Analisis dan Interpretasi Data Penelitian

Data hasil penelitian yang telah diperoleh kemudian dianalisis lebih lanjut dan diinterpretasikan dalam secara deskriptif, yang disajikan dalam bentuk tabel, grafik, narasi untuk mengungkap hubungan antar parameter dan faktor yang memengaruhinya.