

**UJI IN VITRO AKTIVITAS ANTIBAKTERI DAN ANTIBIOFILM
PEMBALUT LUKA YANG MELEPASKAN
S-NITROSOGLUTATHIONE DARI *SELF-HEALING* HIDROGEL
POLIVINIL ALKOHOL-BORAKS DIPERKUAT DENGAN
KARBOKSIMETIL KITOSAN**

**IN VITRO ANTIBACTERIAL AND ANTIBIOFILM ACTIVITIES OF
WOUND DRESSING RELEASING S-NITROSOGLUTATHIONE
FROM POLYVINIL ALCOHOL-BORAX BASED
REINFORCED *CARBOXYMETHYL CHITOSAN*
*SELF-HEALING HYDROGEL***

WIDYA LUTHFIYAH

N012211028



SEKOLAH PASCASARJANA

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2024

**UJI IN VITRO AKTIVITAS ANTIBAKTERI DAN ANTIBIOFILM
PEMBALUT LUKA YANG MELEPASKAN
S-NITROSOGLUTATHIONE DARI *SELF-HEALING* HIDROGEL
POLIVINIL ALKOHOL-BORAKS DIPERKUAT DENGAN
KARBOKSIMETIL KITOSAN**

Tesis

Sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister

Program Studi

Farmasi

Disusun dan diajukan oleh

WIDYA LUTHFIYAH

N012211028

**SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

LEMBAR PENGESAHAN

UJI IN VITRO AKTIVITAS ANTIBAKTERI DAN ANTIBIOFILM PEMBALUT LUKA YANG MELEPASKAN S-NITROSOGLUTATHIONE DARI *SELF-HEALING* HIDROGEL POLIVINIL ALKOHOL-BORAKS DIPERKUAT DENGAN KARBOKSIMETIL KITOSAN

Disusun dan diajukan oleh

WIDYA LUTHFIYAH

NIM N012211028

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka
Penyelesaian Studi Magister Program Studi Magister Farmasi Fakultas Farmasi
Universitas Hasanuddin

Pada tanggal 27 Februari 2024

Dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

Pembimbing Utama

Nurhasni Hasan, M.Si., M.Pharm.Sc., Ph.D., Apt.
NIP. 19860116 201012 2 009

Pembimbing Pendamping

Dr. Aliyah, M.S., Apt.
NIP. 19570704 198603 2 001

Ketua Program Studi Magister
Ilmu Farmasi Fakultas Farmasi

Muhammad Aswad, M.Si., Ph.D., Apt
NIP. 19800101 20031 2 1004

Dekan Fakultas Farmasi
Universitas Hasanuddin



Prof. Dr. rer.nat. Marianti A. Manggau, Apt
NIP. 19670319 199203 2 002

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, tesis yang berjudul “ UJI IN VITRO AKTIVITAS ANTIBAKTERI DAN ANTIBIOFILM PEMBALUT LUKA YANG MELEPASKAN S-NITROSOGLUTATHIONE DARI *SELF-HEALING* HIDROGEL POLIVINIL ALKOHOL-BORAKS DIPERKUAT DENGAN KARBOKSIMETIL KITOSAN” adalah benar karya saya dengan arahan dari komisi pembimbing (Nurhasni Hasan, M.Si., M.Pharm.Sc., Ph.D, Apt sebagai pembimbing utama dan Dr. Aliyah, M.S., Apt sebagai pembimbing pendamping). Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apapun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka tesis ini.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta dari karya tulis saya berupa tesis ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 27 Februari 2024



WIDYA LUTHFIYAH
N012211028

UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah Rabbil'alamiin, puji syukur kepada Allah Swt karena atas rahmat dan hidayah-Nya, penulis dapat menyelesaikan tesis ini sebagai syarat memperoleh gelar magister di Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin. Tak lupa pula shalawat dan taslim penulis sampaikan kepada Rasulullah Muhammad Saw yang menjadi pemberi cahaya dan ilmu yang bermanfaat.

Penulis menyadari bahwa dalam menyusun tesis ini begitu banyak kendala yang penulis alami. Namun, karena adanya bantuan dan dukungan dari berbagai pihak, akhirnya penulis mampu merampungkan tesis ini. Banyak kendala yang dihadapi selama penelitian dan penyusunan tesis ini, namun dapat diselesaikan dengan baik berkat bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin menyampaikan rasa hormat dan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Ibu Nurhasni Hasan, M.Si., M.Pharm.Sc., Ph.D, Apt. Selaku pembimbing utama dan dosen penasihat akademik yang telah membimbing, memberikan arahan dan motivasi, serta telah meluangkan waktu kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan masa studinya selama di Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.
2. Ibu Dr. Aliyah, M.S., Apt selaku pembimbing pendamping yang telah membimbing, memberikan masukan serta saran dan telah meluangkan waktu kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan Tesis ini.
3. Ibu Dr. Herlina Rante, M.Si., Apt, bapak Prof.Andi Dian Permana, M.Si., Ph.D.,Apt dan Ibu Rina Agustina, M.Pharm.Sc., Ph.D.,Apt selaku tim penguji yang telah meluangkan waktu untuk memberikan saran dan masukan yang membangun kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan tesis ini.
4. Dekan, wakil dekan, seluruh staf dosen dan pegawai Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin atas ilmu, bantuan, dan fasilitas yang diberikan kepada penulis selama menempuh studi hingga menyelesaikan tesis ini.
5. Orang tua penulis, Ibunda Nurlailah, Ayah Muhammad Nasir, dan nenek penulis Hj. Rada untuk semua doa, serta kasih sayang tulus yang telah diberikan yang tidak akan mampu penulis balas. Adik-adik penulis, Muhammad Alfian adzilah, Muhammad Fahri Ramadhan untuk motivasi, serta kepada sanak keluarga yang turut mendoakan.

6. Teman-teman pasca sarjana angkatan 2021 khususnya Juliana Palungan, Nur Alifa dan Aliyah Diah Nugraheni yang telah memberikan banyak kenangan, dukungan, dan pengalaman yang tidak terlupakan selama menjadi mahasiswi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin
7. Semua pihak yang telah membantu dan tidak sempat disebutkan namanya satu persatu.

Penulis menyadari bahwa penyusunan Tesis masih jauh dari kata sempurna. Oleh karena itu, penulis sangat mengharapkan saran dan masukan yang membangun dari berbagai pihak. Semoga karya ini dapat bermanfaat bagi pengembangan ilmu pengetahuan, khususnya ilmu farmasi. Aamiin.

Makassar, 27 Februari 2024



Widya Luthfiah

ABSTRAK

WIDYA LUTHFIYAH. *Uji In Vitro Aktivitas Antibakteri dan Antibiofilm Pembalut Luka yang Melepaskan S-Nitrosogluthatione dari Self-Healing Hidrogel Polivinil Alkohol-Boraks yang diperkuat dengan Karboksimetil Kitosan* (dibimbing oleh Nurhasni Hasan dan Aliyah).

Infeksi bakteri dan pembentukan biofilm saat ini memegang peranan penting dalam penundaan penyembuhan luka. *S-nitrosoglutathione* (GSNO) telah diidentifikasi sebagai donor *nitric oxide* (NO) yang menunjukkan aktivitas antibakteri dan antibiofilm yang kuat. Namun, NO memiliki beberapa kekurangan dalam stabilitas yang mengharuskannya dibuat sebagai sediaan farmasi. Dalam penelitian ini, kami mengembangkan hidrogel dalam bentuk *self-healing hydrogel* untuk pelepasan NO yang terdiri atas *S-nitrosoglutathione* (GSNO), polivinil alkohol/boraks (PVA/B) dan karboksimetil kitosan (KMK). Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui aktivitas antibakteri dan antibiofilm *self-healing hydrogel* (PVA-B-KMK/GSNO) terhadap beberapa bakteri dan biofilm polimikrobial. Konsentrasi 40 mg/mL *self-healing hydrogel* (PVA-B-KMK/GSNO) secara signifikan meningkatkan aktivitas antibakteri terhadap *P.aeruginosa*, *S.aureus*, dan MRSA yang ditunjukkan dengan pengurangan > 5 log viabilitas bakteri (~ 99,999% membunuh bakteri). Selain itu, PVA-B-KMK/GSNO menunjukkan aktivitas antibiofilm tiga kali lipat lebih tinggi daripada *self-healing hydrogel* kontrol (PVA-B-KMK) dengan menghambat masing-masing $87,86 \pm 2,06\%$ dan $84,27 \pm 0,96\%$ biofilm *P.aeruginosa* dan MRSA, $78,40 \pm 0,66\%$ biofilm polimikrobial. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *self-healing hydrogel* yang melepaskan NO (PVA-B-KMK/GSNO) dalam penelitian ini menunjukkan sifat antibakteri dan antibiofilm yang kuat dan dengan demikian dapat menjadi pendekatan yang menjanjikan untuk pengobatan luka yang terinfeksi bakteri atau biofilm.

Kata kunci : *Self-healing hydrogel*, antibakteri, antibiofilm, *P.aeruginosa*, *s.aureus*, dan MRSA

ABSTRACT

WIDYA LUTHFIYAH. *In Vitro Antibacterial and Antibiofilm Activities of Wound Dressing Releasing S-Nitrosogluthathione from Polivinil Alcohol-Borax Based Reinforced Carboximethyl Chitosan Self-Healing Hydrogel* (supervised by Nurhasni Hasan and Aliyah).

Bacterial infections and the formation of biofilms are currently key factors in the delay of wound healing. S-Nitroso glutathione (GSNO) is recognized as a nitric oxide (NO) donor that exhibits potent antibacterial and antibiofilm activities. However, some of the stability limitations of NO require it to be prepared pharmaceutically. In this study, we developed a self-healing hydrogel dressing consisting of S-nitroso glutathione (GSNO), polyvinyl alcohol/borax (PVA/B), and carboxymethyl chitosan (cmCHI). This research aimed to determine the antibacterial and antibiofilm activities of a self-healing hydrogel (PVA-B-cmCHI/GSNO) against multiple bacteria and polymicrobial biofilms. Concentration 40 mg/mL PVA-B-cmCHI/GSNO significantly increased the antibacterial activity against *P. aeruginosa*, *S. aureus*, and MRSA, as indicated by a > 5 log reduction in bacterial viability (~99.999% killing). In addition, PVA-B-cmCHI/GSNO showed antibiofilm activity three times greater than that of the blank self-healing hydrogel (PVA-B-cmCHI) by inhibiting $87,86 \pm 2,06\%$ and $84,27 \pm 0,96\%$ of *P.aeruginosa* and MRSA biofilms respectively, $78,40 \pm 0,66\%$ polymicrobial biofilm. The results suggest that the NO-releasing self-healing hydrogels (PVA-B-cmCHI/GSNO) examined in this study exhibit notable antibacterial and antibiofilm properties and thus could be a promising approach for the treatment of bacterial or biofilm-infected wounds.

Keywords: NO-releasing *self-healing hydrogel*; antibacterial; antibiofilm; *P. aeruginosa*; *S. aureus*; MRSA.

DAFTAR ISI

PERNYATAAN PENGAJUAN.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS.....	ii
UCAPAN TERIMA KASIH.....	v
ABSTRAK.....	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
DAFTAR SINGKATAN.....	xv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah.....	4
C. Tujuan Penelitian.....	4
D. Manfaat Penelitian.....	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
A. Bakteri	5
B. Infeksi Bakteri.....	8
C. Biofilm	9
D. Antibakteri	13
E. Antibiofilm.....	16
F. <i>Nitric Oxide</i> (NO)	18
G. <i>S-Nitrosoglutathione</i> (GSNO)	19

H. <i>Self-Healing Hydrogel</i>	20
I. Monografi Bahan.....	21
J. Kerangka Teori	24
K. Kerangka Konsep.....	25
BAB III METODE KERJA.....	26
A. Waktu dan Lokasi Penelitian.....	26
B. Alat dan Bahan	26
C. Prosedur Penelitian	26
D. Pengumpulan dan Analisis Data.....	31
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN.....	32
A. <i>Self-Healing Hydrogel</i> GSNO	32
B. Uji Aktivitas Antibakteri	33
C. Uji Aktivitas Antibiofilm	43
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	52
A. Kesimpulan.....	52
B. Saran.....	52
DAFTAR PUSTAKA.....	53
LAMPIRAN	59

DAFTAR TABEL

Tabel 1.	Formula Optimum PVA-B-KmK/GSNO dan PVA-B-KMK dari peneliti Palungan, J. (2024)	27
Tabel 2.	Hasil penentuan MIC GSNO terhadap bakteri uji menggunakan metode mikrodilusi.....	33
Tabel 3.	Data rata-rata \pm SD hasil pengenceran dan perhitungan ALT	36
Tabel 4.	Hasil rata \pm SD OD dan persentase penghambatan biofilm.....	47
Tabel 5.	Hasil pengamatan ALT bakteri <i>P.aeruginosa</i> konsentrasi 10 mg/mL.....	61
Tabel 6.	Hasil pengamatan ALT bakteri <i>P.aeruginosa</i> konsentrasi 20 mg/mL.....	61
Tabel 7.	Hasil pengamatan ALT bakteri <i>P.aeruginosa</i> konsentrasi 40 mg/mL.....	61
Tabel 8.	Hasil pengamatan ALT bakteri <i>S.aureus</i> konsentrasi 10 mg/mL.....	62
Tabel 9.	Hasil pengamatan ALT bakteri <i>S.aureus</i> konsentrasi 20 mg/mL.....	62
Tabel 10.	Hasil pengamatan ALT bakteri <i>S.aureus</i> konsentrasi 40 mg/mL.....	62
Tabel 11.	Hasil pengamatan ALT bakteri MRSA konsentrasi 10 mg/mL.....	63
Tabel 12.	Hasil pengamatan ALT bakteri MRSA konsentrasi 20 mg/mL.....	63
Tabel 13.	Hasil pengamatan ALT bakteri MRSA konsentrasi 40 mg/mL.....	63
Tabel 14.	Data pengukuran Optical density (OD) dan penghambatan biofilm pada bakteri <i>P.aruginosa</i>	69
Tabel 15.	Data pengukuran Optical density (OD) dan penghambatan biofilm pada bakteri MRSA.....	70
Tabel 16.	Data pengukuran Optical density (OD) dan penghambatan biofilm pada bakteri Polimikrobial.....	71
Tabel 17.	Data Antibiofilm <i>S.aureus</i>	90

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	Proses pembentukan biofilm	11
Gambar 2.	Struktur kimia PVA	21
Gambar 3.	Struktur kimia boraks.....	22
Gambar 4.	Struktur kimia KMK.....	23
Gambar 5.	Sediaan self-healing hydrogel PVA-KMK-B/GSNO formula 7	32
Gambar 6.	Hasil pengujian MIC	34
Gambar 7.	Grafik log reduction aktivitas antibakteri pada sediaan <i>self-healing hydrogel</i> PVA-B-KMK/GSNO terhadap bakteri <i>P.aeruginosa</i>	37
Gambar 8.	Hasil pengamatan makroskopik pada pengenceran 10^4 <i>self-healing hydrogel</i> PVA-B-KMK dan PVA-B-KMK/GSNO terhadap bakteri <i>P.aeruginosa</i>	38
Gambar 9.	Grafik log reduction aktivitas antibakteri pada sediaan <i>self-healing hydrogel</i> PVA-B-KMK/GSNO terhadap bakteri <i>S.aureus</i>	39
Gambar 10.	Hasil pengamatan makroskopik pada pengenceran 10^4 <i>self-healing hydrogel</i> PVA-B-KMK dan PVA-B-KMK/GSNO terhadap bakteri <i>S.aureus</i>	40
Gambar 11.	Grafik log reduction aktivitas antibakteri pada sediaan <i>self-healing hydrogel</i> PVA-B-KMK/GSNO terhadap bakteri MRSA	41
Gambar 12.	Hasil pengamatan makroskopik pada pengenceran 10^4 <i>self-healing hydrogel</i> PVA-B-KMK dan PVA-B-KMK/GSNO terhadap bakteri MRSA	42
Gambar 13.	Hasil pengamatan makroskopik bakteri <i>P.aeruginosa</i> pada polyurethane coupon setelah pewarnaan kristal violet.....	44
Gambar 14.	Hasil pengamatan makroskopik bakteri MRSA pada polyurethane coupon setelah pewarnaan kristal violet.....	45
Gambar 15.	Hasil pengamatan makroskopik bakteri polimikrobia pada polyurethane coupon setelah pewarnaan kristal violet.....	46
Gambar 16.	Gambar diagram hasil aktivitas antibiofilm pada bakteri <i>P.aeruginosa</i>	48

Gambar 17. Gambar diagram hasil aktivitas antibiofilm pada bakteri MRSA.....	49
Gambar 18. Gambar diagram hasil aktivitas antibiofilm pada bakteri Polimikrobial.....	50
Gambar 19. Hasil pengamatan makroskopik bakteri <i>S.aureus</i> pada polyurethane coupon setelah pewarnaan kristal violet.....	90
Gambar 20. Gambar diagram hasil aktivitas antibiofilm pada bakteri <i>S.aureus</i>	90
Gambar 21. Hasil sintesis GSNO.....	91
Gambar 22. Penyiapan bakteri uji.....	91
Gambar 23. Proses pengerjaan uji antibakteri dan antibiofilm.....	91

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Skema kerja	59
Lampiran 2. Komposisi media	60
Lampiran 3. Data hasil uji pengamatan makroskopik ALT antibakteri	61
Lampiran 4. Perhitungan ALT bakteri	64
Lampiran 5. Data pengukuran Optical density (OD) dan penghambatan biofilm	69
Lampiran 6. Perhitungan persentase penghambatan biofilm.....	72
Lampiran 7. Hasil analisis statistik antibakteri	76
Lampiran 8. Hasil analisis statistik antibiofilm.....	79
Lampiran 9. Data antibiofilm <i>S.aureus</i>	90
Lampiran 10. Dokumentasi penelitian	91

DAFTAR SINGKATAN

Lambang/singkatan	Arti dan keterangan
NO	<i>Nitric Oxide</i>
GSNO	<i>S-Nitroglutathione</i>
GSH	Glutathione
PVA	Polivinil Alkohol
KmK	Karboksimetil kitosan
PVA-B-KmK	Polivinil alkohol boraks yang diperkuat karboksimetil kitosan
PVA-B-KmK/GSNO	Polivinil alkohol boraks yang diperkuat karboksimetil kitosan melepaskan S- <i>Nitroglutathione</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
LB	<i>Luria Broth</i>
<i>S.aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>P. areuginosa</i>	<i>Pseudomonas areuginosa</i>
MRSA	<i>Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus</i>
WFI	<i>Water for Injection</i>

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Infeksi bakteri memegang peranan penting dalam penundaan penyembuhan luka, misalnya luka yang terbuka memiliki risiko tinggi terinfeksi bahkan setelah pemberian pengobatan kuratif. Jika infeksi tersebut tetap tidak diobati, maka dapat mengakibatkan komplikasi infeksi klinis (Pandian *et al.*, 2021). Salah satu contoh penyakit infeksi adalah luka gangren diabetik pada penderita diabetes melitus (DM). Gangren diabetik adalah pembusukan luka yang terjadi di kaki dan akan terjadi pelebaran luka akibat sumbatan yang terjadi pada pembuluh darah tungkai (Nillah *et al.*, 2021). Pada penderita diabetes melitus 15% akan mengalami komplikasi ulkus, 17 - 32% mengalami komplikasi gangren dan 15-30% mengalami amputasi apabila tidak ditangani (Salim *et al.*, 2020).

Bakteri penyebab infeksi terbagi menjadi dua kelompok, yaitu bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif. Contoh bakteri Gram positif antara lain *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*), *Streptococcus mutans*, *Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA), sedangkan contoh bakteri Gram negatif antara lain *Klebsiella sp*, *Proteus mirabilis*, *Eschericia coli*, *Pseudomonas areuginosa* (*P.areuginosa*) (Savitri *et al.*, 2019). Pengobatan infeksi dapat menggunakan antibiotik, namun pemberian antibiotik yang tidak tepat dapat menyebabkan terjadinya resistensi pada bakteri. Hal ini ditemukan di negara besar salah satunya Amerika yang sebagian besar resisten dengan antibiotik Vancomycin pada pasien DM dengan infeksi MRSA (Cao *et al.*, 2020; Salim *et al.*, 2020).

Salah satu alasan utama mengapa suatu infeksi luka begitu sulit untuk disembuhkan karena adanya pembentukan biofilm pada luka. Biofilm adalah kumpulan kompleks yang terdiri atas sel-sel mikroba yang tertanam dalam matriks *extracellular polymeric substance* (EPS) yang diproduksi sendiri sehingga memberikan perlindungan kepada bakteri terhadap sistem kekebalan inang dan antibiotik (Afonso *et al.*, 2021; Gawande *et al.*, 2014). Strain bakteri seperti *S.aureus*, MRSA dan *P.areuginosa* kerap ditemukan pada luka infeksi yang kemudian dapat membentuk biofilm pada luka (Negut *et al.*, 2018). Oleh karena

itu, diperlukan pengembangan terapi baru untuk pengobatan luka infeksi yang disertai dengan biofilm.

Nitric oxide (NO) adalah radikal bebas dan merupakan salah satu molekul pemberi sinyal terpenting serta berperan dalam berbagai fungsi fisiologis tubuh (Cao *et al.*, 2020). Selain itu, NO merupakan agen antibakteri baru dengan spektrum luas terhadap bakteri Gram positif maupun bakteri Gram negatif dengan merusak membran sel bakteri, menghalangi sintesis protein dan DNA sehingga mengakibatkan kematian sel bakteri. NO juga memiliki aktivitas antibiofilm dengan mekanisme aksi yaitu meregulasi *second messenger cyclic dimeric GMP (c-di-GMP)* (Cai & Webb., 2020). NO telah banyak diteliti memiliki aktivitas untuk penyembuhan infeksi luka dengan memodulasi peradangan dan memfasilitasi proses penyembuhan luka seperti proliferasi sel serta remodeling jaringan (Lee *et al.*, 2020). Akan tetapi NO memiliki keterbatasan dalam pengaplikasiannya karena NO bersifat gas, memiliki waktu paro yang pendek (3 - 4 detik) dan jarak difusi yang pendek (150-300 μm) sehingga dibutuhkan donor NO untuk mengatasi kekurangan NO tersebut (Cao *et al.*, 2020; Choi *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2020).

Beberapa tipe donor NO yang diketahui seperti *N-diazoniumdiolate* (NONOates), nitrit organik, nitrat organik dan *S-nitrosothiol* (RSNO) (Midgley *et al.*, 2019). *S-nitrosoglutathione* (GSNO) merupakan golongan dari RSNO yang telah banyak dikembangkan sebagai agen donor NO eksogen yang ampuh untuk pengobatan pasien luka infeksi (Lee *et al.*, 2020). GSNO adalah donor NO yang disintesis secara endogen yang berubah menjadi *glutathione* (GSH) dan melepaskan NO secara spontan yang memiliki efek dalam penyembuhan luka infeksi. (Lee *et al.*, 2020; Cao *et al.*, 2020). Namun GSNO memiliki keterbatasan dalam pengaplikasian karna memiliki laju dekomposisi yang cepat dengan pengaruh cahaya dan redoks, sehingga diperlukan pengembangan sistem penghantaran obat (DDS) untuk GSNO terutama sebagai *wound dressing* (pembalut luka).

Telah dikembangkan DDS untuk pembalut luka berbasis GSNO seperti sediaan film, *in situ hydrogel*, nanopartikel dan hidrogel yang juga berfungsi sebagai agen antibakteri dan mediator penyembuhan luka infeksi (Khorasani *et al.*, 2018). Berbagai sifat hidrogel seperti biokompatibilitas, biodegradabilitas, elastisitas, dan hidrofilisitas tinggi yang dapat memfasilitasi pelepasan senyawa aktif sehingga dapat diterapkan dalam manajemen penyembuhan luka infeksi

(K *et al.*, 2021). Namun, hidrogel memiliki sifat mekanik yang buruk sehingga perlu dikembangkan model pembalut luka lain seperti *self-healing hydrogel* yang memiliki kemampuan untuk memperbaiki dirinya sendiri dalam hitungan detik setelah terkena gaya eksternal. Oleh karena itu, *self-healing hydrogel* menunjukkan potensi yang sangat menjanjikan dalam aplikasi biomedis, terutama dalam penggunaannya sebagai pembalut luka (Gupta *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2020).

Polivinil alkohol (PVA) adalah polimer sintesis yang paling sering digunakan sebagai basis *hydrogel*, karena sifatnya yang larut dalam air dan mudah terdegradasi di lingkungan (Eivazzadeh-keihan *et al.*, 2020). PVA dapat bereaksi dengan banyak jenis gugus fungsi dan membentuk hidrogel yang berikatan silang secara kimia. Menurut penelitian Bian *et al.*, (2018) penggunaan boraks sebagai agen pengikat silang yang reversibel dapat meningkatkan viskoelastisitas dari larutan PVA. Akan tetapi menghasilkan *self-healing hydrogel* dengan sifat mekanis yang lemah dan stabilitas yang rendah.

Kitosan merupakan polimer bahan tambahan yang digunakan untuk meningkatkan sifat mekanis dari *self-healing hydrogel* PVA-Boraks. Kitosan memiliki peranan penting dalam mempercepat penyembuhan luka dengan cara mengaktivasi fibroblas, produksi sitokin, dan migrasi sel (Zhang *et al.*, 2020). Namun, kitosan memiliki kekurangan yaitu kelarutannya yang buruk dalam air sehingga menghambat dalam proses pengaplikasiannya oleh karena itu perlu ditingkatkan dengan karboksimetilisasi sebagai modifikasi hidrofilik untuk menghasilkan karboksimetil kitosan (KMK) yang memiliki biokompatibilitas dan kelarutan yang baik dalam air. Dalam berbagai aplikasi biomedis, hidrogel KMK juga digunakan sebagai penyembuh luka, *bio imaging*, rekayasa jaringan dan pengiriman obat/genetik. Hidrogel KMK umumnya dibuat dengan ikatan silang secara fisik dengan kalsium dan biopolimer polielektrolit, atau secara kimiawi berikatan silang dengan bahan kimia (Shariatnia, 2018). Sejauh pengetahuan kami, belum ada studi pembalut luka berbasis *self-healing hydrogel* yang mengkombinasikan antara GSNO dengan PVA-boraks yang diperkuat dengan KMK untuk mengidentifikasi aktivitas *in vitro* antibakteri dan antibiofilm.

Oleh karena itu, dalam penelitian ini telah dilakukan uji *in vitro* aktivitas antibakteri dan antibiofilm pembalut luka yang melepaskan GSNO dari *self-healing hydrogel* PVA-Boraks yang diperkuat KMK dengan menggunakan polibakteri uji (*S.aureus*, *P.aeruginosa* dan *MRSA*).

B. Rumusan Masalah

1. Bagaimana aktivitas antibakteri dan antibiofilm dari sediaan *self-healing hydrogel* PVA-boraks yang diperkuat karboksimetil kitosan yang melepaskan GSNO (PVA-B-KMK/GSNO) sebagai pembalut luka ?
2. Berapa konsentrasi sediaan *self-healing hydrogel* PVA-B-KMK/GSNO yang berefek sebagai antibakteri ?
3. Berapa konsentrasi sediaan *self-healing hydrogel* PVA-B-KMK/GSNO sebagai antibiofilm?

C. Tujuan Penelitian

1. Menguji aktivitas antibakteri dan antibiofilm dari sediaan *self-healing hydrogel* PVA-B-KMK/GSNO yang digunakan sebagai pembalut luka.
2. Menentukan konsentrasi sediaan *self-healing hydrogel* PVA-B-KMK/GSNO yang berefek sebagai antibakteri.
3. Menentukan konsentrasi sediaan *self-healing hydrogel* PVA-B-KMK/GSNO sebagai antibiofilm.

D. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah sebagai sumber data ilmiah bagi mahasiswa dan peneliti lainnya tentang studi uji *in vitro* aktivitas antibakteri dan antibiofilm *self-healing hydrogel* PVA-B-KMK/GSNO sebagai pembalut luka, serta dapat dijadikan sebagai dasar penelitian selanjutnya untuk dikaji melalui riset lanjutan yang lebih spesifik.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Bakteri

1. Definisi Bakteri

Bakteri merupakan salah satu jenis mikroorganisme yang tidak bisa dilihat oleh mata langsung. Bakteri merupakan organisme yang jumlahnya paling banyak dibandingkan makhluk hidup lain dan tersebar luas di dunia. Bakteri memiliki ratusan ribu spesies yang hidup di darat, laut, udara dan tempat-tempat ekstrem. Ukuran sel bakteri pada umumnya adalah 0,5 - 1,0 μm , dan mempunyai tiga bentuk dasar yaitu bulat atau kokus, batang atau bacillus, dan bentuk spiral. Berdasarkan strukturnya, bakteri terbagi menjadi dua, yaitu struktur luar dan struktur dalam. Struktur luar meliputi kapsul, dinding sel, membran plasma, pili, flagel, sedangkan struktur dalam meliputi sitoplasma, ribosom, nukleoid, plasmid (Rini & rochman., 2020).

2. Uraian Bakteri

1). *Staphylococcus aureus*

a. Klasifikasi (Krishna., 2013)

Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Firmicutes
Kelas	: Bacilli
Ordo	: Bacillales
Family	: Staphylococcaceae
Genus	: <i>Staphylococcus</i>
Spesies	: <i>Staphylococcus aureus</i>

b. Morfologi dan fisiologi

S. aureus merupakan bakteri Gram positif dan berbentuk kokus. *S. aureus* bersifat non-motil, nonspora, anaerob fakultatif, katalase positif dan oksidase negatif. *S. aureus* tumbuh pada suhu 37°C dan pada pH 4,2 - 9,3. Koloni tumbuh dalam waktu 24 jam dengan diameter mencapai

4 mm. Koloni pada perbenihan padat berbentuk bundar, halus, menonjol dan berkilau, *S. aureus* membentuk koloni berwarna abu-abu sampai kuning emas tua. *S. aureus* membentuk pigmen lipochrom yang menyebabkan koloni tampak berwarna kuning keemasan dan kuning jeruk. Pigmen kuning tersebut membedakannya dari *Staphylococcus epidermidis* yang menghasilkan pigmen putih. Pigmen kuning keemasan timbul pada pertumbuhan selama 18 - 24 jam pada suhu 37°C. *S. aureus* mudah tumbuh pada banyak pembedahan bakteri. Berbagai tingkat hemolisis dihasilkan oleh *S. aureus* dan kadang-kadang oleh spesies bakteri lain (Krishna, 2013).

Infeksi oleh *S. aureus* ditandai dengan kerusakan jaringan yang disertai abses bernanah. Beberapa penyakit infeksi yang disebabkan oleh *S.aureus* adalah bisul, jerawat, impetigo, dan infeksi luka. Infeksi yang lebih berat di antaranya pneumonia, mastitis, plebitis, meningitis, infeksi saluran kemih, osteomielitis, dan endokarditis. *S.aureus* juga merupakan penyebab utama infeksi nosokomial, keracunan makanan, dan sindroma syok toksik, kontaminasi langsung *S.aureus* pada luka terbuka (seperti luka pascabedah) atau infeksi setelah trauma (seperti osteomielitis kronis setelah fraktur terbuka) dan meningitis setelah fraktur tengkorak, merupakan penyebab infeksi nosocomial.

2). *Pseudomonas aeruginosa*

a. Klasifikasi (Siegrist., 2010)

Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Proteobacteria
Class	: Gamma Proteobacteria
Ordo	: Pseudomonadales
Family	: Pseudomonadaceae
Genus	: <i>Pseudomonas</i>
Species	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

b. Morfologi dan fisiologi

P. aeruginosa adalah bakteri Gram negatif yang berbentuk batang, bakteri ini memiliki penampilan pearlescent dan bau seperti anggur atau tortilla. *P.aeruginosa* tumbuh baik pada suhu 25°C sampai 37°C, dan kemampuannya untuk tumbuh pada 42°C membantu membedakannya dari banyak spesies *Pseudomonas* lainnya. *P. aeruginosa* adalah mikroorganisme yang memiliki kemampuan untuk bertahan hidup di bawah berbagai keadaan lingkungan.

Tidak hanya menyebabkan penyakit pada tanaman dan hewan, tetapi juga pada manusia menyebabkan infeksi serius pada pasien immuno compromised dengan kanker dan pasien menderita luka bakar parah dan *cystic fibrosis* (CF) (Wu *et al.*, 2014). Bakteri ini bersifat motil dan berbentuk batang dengan ukuran sekitar 0,6 x 2µm. Bakteri ini terlihat sebagai bakteri tunggal, berpasangan, dan terkadang membentuk rantai pendek (Surkama, 2021).

Terapi pada penyakit infeksi akibat *P.aeruginosa* menjadi sulit karena adanya resistensi terhadap berbagai jenis antibiotik. Prevalensi resistensi berbagai mikroorganisme terhadap antibiotik lebih tinggi pada isolat pasien ICU dibandingkan dengan pasien non-ICU termasuk pada *P.aeruginosa*. Resistensi antibiotik pada *P.aeruginosa* mengalami peningkatan di Amerika Serikat, dari 51.000 infeksi *P.aeruginosa* tiap tahun lebih dari 6.000 (13%) mengalami multi-drug resistant (MDR). *P.aeruginosa* dilaporkan memiliki resistensi terhadap beberapa jenis antibiotik, sefalosporin seperti sefotaksim (90%) dan seftriakson (85%), aminoglikosida seperti tobramisin (70,07%) dan gentamisin (71,89%). Resistensi antibiotik dapat terjadi pada *P. aeruginosa* karena beberapa sebab, antara lain: permeabilitas membran yang rendah, sistem pompa refluks, dan produksi enzim yang dapat menyebabkan inaktivasi antibiotik (Surkama., 2021).

3). MRSA (*Methicilin-resistantStaphylococcus aureus*)

Bakteri *S.aureus* yang telah menjadi resisten terhadap antibiotik dikenal dengan MRSA (*Methicilin-resistantStaphylococcus aureus*). Resistensi suatu bakteri dapat terjadi karena pemberian antibiotik yang tidak tepat dosis, diagnosis yang salah, dan tidak tepat sasaran bakteri penyebabnya. Bakteri MRSA akan membentuk protein transmembran yang dikenal dengan protein refluks dan plasmid yang mengkode gen resisten terhadap suatu antibiotik. Bakteri MRSA mengalami resistensi antibiotik disebabkan oleh perubahan genetik yang disebabkan terapi antibiotik yang bersifat tidak rasional. Faktor-faktor resiko terjadinya MRSA antara lain lingkungan, populasi, kontak olahraga, kebersihan individu, riwayat perawatan, riwayat operasi, riwayat infeksi dan penyakit, riwayat pengobatan, serta kondisi medis. Bakteri MRSA umumnya menyebar melalui kontak langsung pada luka terbuka atau sayatan operasi yang dapat menimbulkan infeksi berat. Bakteri MRSA awalnya mengenai kulit dan jaringan lunak, namun dengan cepat dapat menimbulkan

sepsis dan atau pneumonia yang dapat menimbulkan kematian (Mahmudah *et al.*, 2013; Nasution., 2017).

Transmisi bakteri berpindah dari satu pasien ke pasien lainnya melalui alat medis yang tidak diperhatikan sterilitasnya melalui udara maupun fasilitas rumah sakit. Infeksi MRSA telah menjadi suatu masalah yang besar bagi klinisi di rumah sakit selama bertahun-tahun, sebagai penyebab infeksi nosokomial yang angka kejadiannya meningkat 10 - 20 % setiap tahunnya. Bakteri MRSA dapat menyebabkan infeksi pada kulit, tulang, paru-paru, jantung atau infeksi sistemik. Infeksi MRSA hanya dapat diobati dengan antibiotik tertentu. Apabila antibiotik yang diberikan tidak mampu membunuh MRSA, infeksi tidak teratasi dan menyebar luas serta membahayakan nyawa penderitanya. Infeksi oleh MRSA juga sudah mulai meluas di rumah sakit seperti infeksi MRSA pada luka bekas operasi (Yanti, 2020).

B. Infeksi Bakteri

Masalah kesehatan utama yang terjadi pada negara berkembang adalah penyakit infeksi. Infeksi akibat bakteri merupakan hal yang paling sering terjadi berdasarkan pewarnaannya, bakteri terbagi menjadi dua kelompok yaitu bakteri Gram positif antara lain *S. aureus*, MRSA, *Streptococcus mutans* dan Gram negatif antara lain *Klebsiella sp*, *Proteus mirabilis*, *Eschericia coli*, *P. aeruginosa* (Savitri *et al.*, 2019).

Hambatan yang paling umum dan tidak terhindarkan untuk penyembuhan luka adalah infeksi pada sebagian besar dalam kasus luka kronis. Meskipun bakteri adalah bagian umum dari mikrobiota kulit utuh dan luka, ambang batas bakteri yang ada dan pembentukan biofilm dapat menghambat penyembuhan luka. Karena fakta-fakta ini, terlepas dari kemajuan terbaru dalam pengelolaan luka infeksi bakteri dan jamur masih dianggap sebagai salah satu keadaan paling kolektif dan menyakitkan yang menyebabkan kematian yang signifikan dan morbiditas. *S.aureus*, MRSA dan *P.aeruginosa* adalah strain mikroba yang dapat terjadi pada pasien dengan luka yang terinfeksi. Karena lingkungan luka biologis yang tidak steril dan lingkungan luka yang sangat rumit sistem penyembuhan luka, penyembuhan yang efektif dan tepat sasaran masih diperlukan. Dalam kasus terjadinya luka kronis, di mana individu sering mengalami perawatan ekstensif dan penggantian pembalut luka secara teratur, pembalut luka yang

dapat larut sepenuhnya tidak dapat diganti atau tidak melekat, yang mendistribusikan perawatan ke lokasi luka dengan cara yang tepat dapat meningkatkan hasil terapi dan respon luka terhadap obat (Negut *et al.*, 2018). Luka kronis yang terinfeksi, seperti ulkus vena atau arteri, diabetes, borok kaki, luka tekan, dan luka bedah yang tidak sembuh-sembuh menunda penyembuhan luka, memiliki dampak yang signifikan pada kualitas hidup pasien, merupakan penyebab signifikan dari morbiditas dan mortalitas, dan menghasilkan perawatan kesehatan yang sangat besar pengeluaran. Infeksi luka paling sering disebabkan oleh bakteri pembentuk biofilm seperti *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *enterococcus faecalis*, MRSA, *acinetobacter baumannii*, *escherichia coli*, *klebsiella pneumoniae*, *enterobacter spp.*, dll (Fijan *et al.*, 2019 ; Saghazadeh *et al.*, 2019).

Penyebab utama kematian antara lain 28,1% disebabkan oleh penyakit infeksi dan parasit, 18,9% disebabkan oleh penyakit vaskuler, dan 15,7% disebabkan oleh penyakit pernapasan. Penyakit diare, demam *tifoid*, demam berdarah, infeksi saluran pernapasan atas (influenza, radang amandel, radang tenggorokan), radang paru-paru, dan demam yang belum diketahui penyebabnya (observasi *febris*) merupakan penyakit infeksi yang termasuk ke dalam 10 penyakit terbanyak rumah sakit di Indonesia yang disebabkan oleh infeksi virus, infeksi bakteri, dan infeksi parasite (Noor Mutsaqof *et al.*, 2016). infeksi bakteri dikalangan masyarakat saat ini yang paling sering ditemukan adalah pada luka yang terbuka. Ketika luka timbul, beberapa efek akan muncul seperti hilangnya seluruh atau sebagian fungsi organ, respon stress simpatis, pendarahan dan pembekuan darah, kontaminasi bakteri, dan kematian sel (Asri & Fahril., 2019; Shankar *et al.*, 2014; Toole *et al.*, 2000).

C. Biofilm

1. Definisi Biofilm

Biofilm secara sederhana didefinisikan sebagai komunitas mikroorganisme yang melekat pada permukaan dan terdiri atas *Extracellular Polymeric Substance* (EPS). Hasil pengamatan tentang biofilm pada tahun 1933 oleh Henrici, menunjukkan " bahwa sebagian besar bakteri dalam air bukanlah organisme yang mengambang bebas, tetapi tumbuh di permukaan yang terendam". Biofilm terdapat dalam matriks yang tersusun atas polisakarida, protein dan DNA dari

mikroba. Terapi dengan antibiotik hanya membunuh sel-sel bakteri planktonik, sedangkan bakteri dalam bentuk biofilm tetap hidup (Shantina *et al.*, 2019; Toole *et al.*, 2000).

Bakteri biofilm terbungkus matriks yang terbentuk pada implan perangkat medis sering menyebabkan penyakit sistemik yang mengancam jiwa, infeksi dan kegagalan perangkat. Biofilm tahan terhadap pembunuhan oleh antibiotik pada konsentrasi yang 10 - 1000 kali lebih besar dari konsentrasi yang dibutuhkan untuk membunuh sel atau "planktonik" (Kaplan, 2011).

Semua luka terbuka yang tidak memiliki pelindung kulit mengandung mikroorganisme dari sumber endogen (flora pasien sendiri) atau eksogen. Pada tahap awal pembentukan luka kronis, mikroba ini umumnya ditahan atau dihancurkan oleh sistem imun inang. Namun, jika mikroba menempel pada permukaan luka dan berkembang biak, biofilm akan mulai berkembang. Ketika biofilm sudah pada tahap dewasa, maka akan menunjukkan resistensi terhadap penghancuran oleh sistem kekebalan inang dan antimikroba. Pengembangan biofilm dalam luka berlangsung dalam serangkaian langkah yang kompleks. Namun, mekanisme yang tepat terlibat dalam proses ini berbeda antara jenis. Dengan demikian, tahapan pengembangan biofilm serupa di berbagai keadaan dan jenis mikroorganisme. Urutan perkembangan biofilm pada luka dapat dibagi menjadi tiga tahap besar, yaitu (Percival *et al.*, 2015):

- (1) Perlekatan mikroba pada permukaan luka.
- (2) Produksi EPS (*extracellular polymeric substance*) dan pertumbuhan mikroba membentuk mikrokoloni
- (3) Pematangan dan penyebaran mikroba sel.

2. Komposisi dan Struktur Biofilm

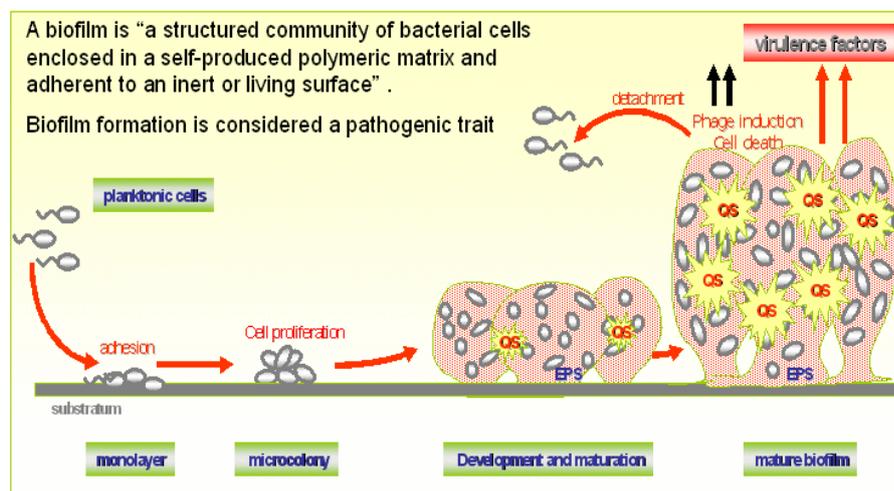
Komponen utama biofilm terdiri atas sel-sel mikroorganisme (15%) dan bahan matriks yang terdiri dari campuran komponen seperti protein, asam nukleat, karbohidrat dan zat lainnya (85%). Eksopolisakarida yang dihasilkan berbeda-beda komposisi dan sifat kimiawinya. Beberapa merupakan makromolekul yang bersifat netral, mayoritas bermuatan karena adanya asam uronat, asam D-galakturonat, dan asam D-manuroniat (Donlan., 2000).

Ikatan eksopolisakarida pada biofilm bersifat kaku. Jumlah eksopolisakarida yang dihasilkan oleh organisme berbeda-beda, jumlah eksopolisakarida akan

meningkat seiring dengan bertambahnya usia biofilm tersebut. Eksopolisakarida yang dihasilkan tergantung dari kandungan nutrisi dan media pertumbuhan, kekurangan nitrogen, kalium dan fosfat juga dapat meningkatkan sintesis eksopolisakarida (Donlan., 2002).

3. Pembentukan Biofilm

Pembentukan biofilm terdiri atas beberapa tahap: (1) pelekatan sel pada permukaan, (2) pembentukan mikrokoloni, (3) maturasi, (4) pelepasan atau dispersi (Crouzet *et al.*, 2014). Pada awalnya, bakteri yang bebas bebas yang disebut sel planktonik melakukan inisiasi untuk melekat pada suatu permukaan. Bakteri ini akan menghasilkan material ekstraseluler dan senyawa QS yang akan membuat bakteri akan tetap melekat dan membentuk koloni bakteri. Spesies bakteri lain akan bergabung dan menghasilkan material ekstraseluler untuk membentuk suatu kumpulan bakteri yang besar dan kompleks. Setelah biofilm memasuki fase dewasa, bakteri akan berhenti atau meminimal pelepasan senyawa ekstraseluler dan membuat bakteri terlepas kemudian menjadi planktonik kembali. Bakteri planktonik ini akan membentuk biofilm lagi pada area lain (Cowan dan Smith, 2017; Crouzet *et al.*, 2014).



Gambar 1. Proses pembentukan biofilm (Gunardi, 2019).

4. Metode Uji Pembentukan Biofilm

a. Metode *Cango Red Agar*

Deteksi pembentukan biofilm menggunakan *Cango Red Agar* (CRA) merupakan salah satu metode kualitatif. Metode ini sangat murah dan mudah

diterapkan. Kriteria evaluasi didasarkan pada analisis visual warna koloni yang ditumbuhkan pada media agar. Interpretasi hasil berdasarkan kondisi berikut: bakteri yang menghasilkan koloni hitam pekat dan hitam kemerahan dengan permukaan yang kasar, kering dan kristal merupakan pembentuk biofilm, sedangkan koloni berwarna merah muda, merah dan kemerahan dengan permukaan yang halus bukan pembentuk biofilm (Purbowati *et al.*, 2017).

b. Metode Tabung

Metode ini termasuk metode kualitatif menggunakan tabung reaksi. Media yang digunakan yaitu TSB (*Tryptic Soy Broth*), pada metode ini uji dilakukan dengan pengamatan ada tidaknya garis atau bercak biofilm yang terbentuk pada dinding maupun dasar tabung. Jika terlihat adanya garis, maka hasil positif membentuk biofilm. Semakin pekat atau tebal garis yang terbentuk dibantu dengan pewarnaan *crystal violet* menandakan semakin banyak atau kuat pembentukan biofilm tersebut (Kirmusaoğlu, 2019).

c. Metode *Microtiter Plate Assay* (MtP)

Metode ini merupakan metode kuantitatif untuk menentukan produksi biofilm. Suspensi bakteri diinokulasikan ke dalam *microplate 96-well* steril untuk mendapatkan 5×10^5 cfu/mL sebagai konsentrasi akhir (pengenceran sepuluh kali lipat). Pada metode ini, disiapkan kontrol negatif yaitu media ditambah dengan glukosa 1% sebagai blank. Nilai OD kemudian diukur pada *microplate reader*. Jika nilai OD bakteri uji lebih dari nilai OD kontrol negatif maka bakteri tersebut positif membentuk biofilm (Kirmusaoğlu, 2019).

d. Pemeriksaan Mikroskopik Biofilm

Pemindaian menggunakan mikroskop elektron dapat dilakukan untuk mendeteksi biofilm dengan elektron pada perbesaran dan resolusi tinggi. Pemeriksaan mikroskopik elektron menggunakan pewarnaan fluoresen yang rumit. Teknik yang dapat digunakan untuk mendeteksi biofilm yaitu *light microscopy*, *scanning electron microscopy*, *transmission electron microscopy*, *epifluorescent microscopy*, dan *confocal scanning laser microscopy*. Pembentukan biofilm terdiri atas tahapan penempelan sel, pembentukan mikrokoloni, dan maturasi biofilm. Selanjutnya, biofilm diberi pewarnaan dan perlakuan dengan bahan kimia tertentu sehingga densitas dan struktur biofilm dapat dideteksi melalui pemindaian elektron mikroskop (Kirmusaoğlu, 2019).

D. Antibakteri

Penyakit infeksi merupakan suatu penyakit yang disebabkan karena adanya mikroba patogen, salah satu penyebab penyakit infeksi adalah bakteri. Pengobatan infeksi yang disebabkan oleh bakteri dapat diatasi dengan antibiotik/ antibakteri. Antibakteri adalah senyawa yang digunakan untuk mengendalikan pertumbuhan bakteri yang bersifat merugikan. Pengendalian pertumbuhan mikroorganisme bertujuan untuk mencegah penyebaran penyakit dan infeksi, membasmi mikroorganisme pada inang yang terinfeksi, dan mencegah pembusukan serta kerusakan bahan oleh mikroorganisme (Utomo *et al.* 2018).

Antibakteri yang digunakan untuk membasmi mikroorganisme adalah antibiotik. Berdasarkan kerjanya dibedakan menjadi antibiotik berspektrum sempit (menghambat pertumbuhan bakteri atau hanya membunuh bakteri gram negatif atau positif saja) dan antibiotik berspektrum luas (menghambat atau membunuh bakteri Gram positif maupun Gram negatif). Berdasarkan mekanisme kerjanya, antibakteri dibagi dalam empat kelompok, yaitu : (Zainab *et al.*, 2022).

1) Menghambat sintesis dinding sel bakteri

Dinding sel bakteri sangat penting untuk mempertahankan struktur sel bakteri sehingga zat yang dapat merusak dinding sel atau menghancurkan dinding sel yang mempengaruhi bentuk dan struktur sel dan akhirnya dapat membunuh sel bakteri itu. Struktur dinding sel dapat dirusak dengan cara menghambat pembentukannya atau mengubah dinding sel setelah terbentuk.

2) Mengganggu permeabilitas membrane sel bakteri

Membrane sel mempunyai peran penting dalam mengatur transportasi nutrisi dan metabolit yang dapat keluar dan masuk ke dalam sel tersebut, selain itu membrane sel memiliki fungsi tempat berlangsungnya respirasi dan aktivitas biosintesis dalam sel. Kerusakan pada membran ini akan mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan sel atau matinya sel.

3) Menghambat sintesis protein sel bakteri

Hidupnya suatu sel bergantung pada terpeliharanya molekul-molekul protein dan asam nukleat dalam keadaan alamianya. Sintesis protein merupakan rangkaian proses dari proses transkripsi (DNA menjadi mRNA) dan proses translasi (mRNA menjadi protein). Beberapa jenis zat antibakteri dapat

menghambat proses tersebut yang pada akhirnya akan menghambat sintesis protein.

4) Menghambat sintesis atau merusak asam nukleat sel bakteri

DNA, RNA dan protein memegang peranan penting di dalam proses kehidupan normal sel. Hal itu berarti bahwa gangguan apapun yang akan terjadi pada pembentukan atau pada fungsi zat-zat tersebut dapat mengakibatkan kerusakan total pada sel.

1. Metode Pengujian Antibakteri

Pada pengujian antibakteri ini diukur respon pertumbuhan populasi mikroorganisme terhadap agen antibakteri. Kegunaan uji antibakteri adalah diperolehnya suatu sistem pengobatan yang efektif dan efisien. Terdapat dua metode pokok uji antibakteri terhadap penentuan kepekaan bakteri patogen, yaitu difusi dan dilusi. Adapun macam-macam metode pengujian tersebut sebagai berikut:

1) Metode difusi

1.1. Metode *disc diffusion* untuk menentukan aktivitas agen antimikroba.

Piringan yang berisi agen antimikroba diletakkan pada media agar yang telah ditanami mikroorganisme yang akan berdifusi pada media agar tersebut. Area jernih mengindikasikan adanya hambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh agen antimikroba pada permukaan media agar (Pratiwi, 2008).

1.2. Metode *E-test*, digunakan untuk mengestimasi MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) atau KHM (Kadar Hambat Minimum), yaitu konsentrasi minimal suatu agen antimikroba untuk dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Pada metode ini digunakan strip plastik yang mengandung agen antimikroba dari kadar terendah hingga tertinggi dan diletakkan pada permukaan media agar yang telah ditanami mikroorganisme. Pengamatan dilakukan pada area jernih yang ditimbulkan yang menunjukkan kadar agen antimikroba yang menghambat pertumbuhan mikroorganisme pada media agar (Pratiwi, 2008).

1.3. *Cup-plate technique*. Metode ini serupa dengan metode *disc diffusion*, dimana dibuat sumur pada media agar yang telah ditanami dengan mikroorganisme dan pada sumur tersebut diberi agen antimikroba yang

diuji. Pengamatan dilakukan dengan adanya zona jernih disekitar sumur yang menunjukkan ada tidaknya pertumbuhan bakteri (Pratiwi, 2008).

1.4. Metode Angka Lempeng Total

Prinsip dari ALT adalah menghitung pertumbuhan koloni bakteri setelah sampel ditanam pada media yang sesuai dengan cara tuang kemudian diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37°C. Uji angka lempeng total merupakan metode yang umum digunakan untuk menghitung adanya bakteri yang terhadap dalam sediaan yang diperiksa. Uji angka lempeng total dapat dilakukan dengan dua teknik, yaitu teknik cawan tuang (*pour plate*) dan teknik sebaran (*spread plate*). Pada prinsipnya dilakukan pengenceran terhadap sediaan yang diperiksa kemudian dilakukan penanaman pada media agar. Jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada media agar dihitung sebagai *Colony Forming Unit* (CFU). Penghitungan CFU mengasumsikan bahwa setiap koloni terpisah dan didirikan oleh satu sel mikroba yang dapat hidup. Perhitungan dilakukan terhadap petri dengan jumlah koloni bakteri antara 25 hingga 250 CFU atau 30 hingga 300 CFU per pelat agar 30-300. Angka lempeng total dinyatakan sebagai jumlah koloni bakteri hasil perhitungan dikalikan faktor pengenceran (Sundari., 2019).

2) Metode dilusi

Metode dilusi dibedakan menjadi dua yaitu:

2.1. Metode dilusi cair / *broth dilution test* (serial dilution)

Metode ini mengukur MIC (*Minimum Inhibitory concentration* atau Kadar hambat minimum (KHM) dan MBC (*Minimum Bacteridal Concentration*) atau Kadar Bunuh Minimum (KBM). Cara yang dilakukan adalah dengan membuat seri pengenceran agen antimikroba pada medium cair yang ditambahkan dengan mikroba uji. Larutan uji agen antimikroba pada kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan mikroba uji ditetapkan sebagai KHM tersebut selanjutnya dikultur ulang pada media cair tanpa penambahan mikroba uji ataupun agen antimikroba, dan diinkubasi selama 18-24 jam. Media cair yang tetap terlihat jernih setelah inkubasi ditetapkan sebagai KBM (Pratiwi, 2008).

2.2. Metode dilusi padat / *solid dilution test*

Metode ini serupa dengan metode dilusi cair namun menggunakan media

padat (solid). Keuntungan metode ini adalah satu konsentrasi agen mikroba yang diuji dapat digunakan untuk menguji beberapa mikroba uji (Pratiwi, 2008).

E. Antibiofilm

1. Strategi Antibiofilm

Biofilm mewakili bentuk flora bakteri. Dari 99% bakteri di alam akan berada di bawah bentuk biofilm, pembentukan biofilm pada permukaan juga merupakan salah satu masalah di berbagai bidang seperti kontaminasi sistem medis dan industri bio. Dengan demikian, biofilm bakteri adalah terlibat dalam sekitar 60% infeksi nosokomial seperti kontaminasi alat prostetik atau kateter. Kontaminasi biofilm terlibat dalam infeksi luka menunda penyembuhan dan menyebabkan pasien rawat inap, karena semua masalah ini disebabkan oleh biofilm, pemberantasan atau pencegahan biofilm telah mendapat perhatian khusus dalam sepuluh tahun terakhir.

Untuk merancang strategi antibiofilm, pengetahuan tentang biofilm pembentukan proses sangat penting. Secara singkat, proses ini dimulai dengan perlekatan reversibel awal mikroorganisme pada permukaan melalui gaya lemah seperti *Van der Waals*, diikuti oleh lampiran ireversibel melalui misalnya pelengkap sebagai pili. Lapisan pertama bakteri ini memungkinkan kolonisasi oleh bakteri lain organisme dan produksi eksopolimer (exopolysaccharides, DNA, protein) berkontribusi pada pembentukan matriks. Langkah ketiga adalah pematangan biofilm dengan pertumbuhan matriks, konsorsium mencapai bentuk akhirnya. Yang terakhir langkah proses pembentukan biofilm adalah dispersi beberapa mikroorganisme. Sel-sel ini memulihkan status planktoniknya dan mungkin mengkolonisasi kembali permukaan lain. Pengetahuan tentang proses pembentukan biofilm ini memungkinkan mengajukan dua strategi untuk melawan biofilm: yang pertama terdiri untuk membasmi sel-sel biofilm, yang kedua lebih pro filaktik dan bertujuan untuk mencegah pembentukan biofilm dengan menghindari perlekatan bakteri. Pada saat yang sama, beberapa kebersihan baru protokol telah diberlakukan untuk membatasi infeksi nosokomial (Gunardi, 2019).

2. Biofilm Eradication

Bakteri sesil secara drastis lebih resisten terhadap antibiotik (hingga 1000 kali lipat), biosida dan gaya geser hidrodinamik dari rekan planktonik mereka. Karena resistensi yang tinggi ini, penghancuran biofilm membutuhkan desinfektan atau antibiotik konsentrasi tinggi, menyebabkan kerusakan lingkungan yang parah dan munculnya multiresistensi. Dalam konteks ini, beberapa yang baru strategi telah muncul. Salah satu strategi yang menjanjikan adalah penggunaan penghambat *quorum sensing* (QS). *Quorum sensing* adalah proses kompleks yang memungkinkan bakteri mencapai komunikasi sel ke sel. QS dimediasi oleh molekul kecil yang disebut autoinducer yang disekresikan oleh mikroorganisme. Penghambatan QS dasarnya didasarkan pada gangguan komunikasi antar mikroorganisme. Salah satu strategi didasarkan pada modifikasi gen, misalnya pada penelitian Jayaraman, pada *P.aeruginosa* hilangnya lasI gen struktural untuk N-(3-oxododecanoyl) L-homoserine lakton (suatu autoinducer) sintetase. Peneliti menunjukkan hilangnya produksi eksopolisakarida menyebabkan cacat dalam pembentukan biofilm.

3. Pencegahan Pembentukan Biofilm

Strategi ini terdiri untuk menghindari atau mengurangi pembentukan biofilm dengan mengelaborasi permukaan anti-perekat dan/atau antimikroba. Yang pertama bertujuan untuk mencegah adhesi bakteri, yang kedua satu untuk membunuh sel yang bersentuhan dengan permukaan. Untuk menguraikan bahan antiadhesive, adalah mungkin untuk bermain pada kekasaran dengan modifikasi fisik, pada energi permukaan atau dengan imobilisasi senyawa anti-perekat seperti: polietilenglikol (PEG) atau polisakarida. Adapun pengujian efektivitas agen antibiofilm yaitu :

1) Metode *Microtiter Plate Assay* (MtP)

Microtiter plate assay (MtP) adalah uji kuantitatif untuk mendeteksi afisiensi agen antibiofilm terhadap produksi biofilm menggunakan *microplate reader*. Suspensi bakteri agen disiapkan dalam media yang sesuai dan dilengkapi dengan glukosan 1% (untuk meningkatkan produksi biofilm). Agen suspensi bakteri dan bakteri patogen selanjutnya didispersikan ke masing-masing *well microplate* untuk diuji aktivitasnya. Setelah diinkubasi pada 37°C selama 24 jam, uji dilanjutkan sesuai dengan prosedur MtP seperti yang sudah disebutkan sebelumnya untuk penentuan efek agen terhadap produksi biofilm bakteri patogen. Pada penurunan OC, jika tingkat kekeruhan

media uji menurun maka nilai densitas optik (OD) semakin kecil. Semakin kecil nilai OD menandakan efektivitas agen antibiofilm yang semakin baik (Kirmusaoğlu, 2019).

2) Penentuan bMIC dan bMBC dengan *Plate Counting*

Prinsip metode ini yaitu biofilm terlebih dahulu dibiarkan berkembang pada plate. Selanjutnya ditambahkan dengan suspensi agen antibiofilm dan dilakukan kuantifikasi, bakteri biofilm yang tertanam pada *plate counting*. Alat yang digunakan yaitu implan ortopedi kawat Kirschner. Kawat ini ditempatkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 5×10^5 cfu/mL isolat patogen dan diinkubasi untuk menumbuhkan biofilm. Setelahnya, kawat Kirschner yang menghasilkan biofilm dibilas dengan aquadest steril dan dipindahkan ke tabung reaksi berisi suspensi agen antibiofilm. Dilanjutkan dengan proses sonikasi dan inokulasi pada agar *Mueller-Hinton* (MHA). Konsentrasi terendah agen antibiofilm di mana pertumbuhan bakteri kurang atau sama dengan kontrol, ditentukan sebagai konsentrasi hambat minimum biofilm (bMIC), bMIC50 dan bMIC90 menunjukkan konsentrasi minimum zat yang menghambat 50% dan 90% bakteri yang tertanam dalam biofilm. Setelah inkubasi, konsentrasi terendah agen dimana koloni bakteri biofilm tidak tumbuh ditentukan sebagai konsentrasi bakterisida minimum biofilm (bMBC) agen untuk biofilm (Kirmusaoğlu, 2019).

3. Pengukuran ekspresi gen terkait biofilm dengan *Quantitative Real Time PCR* (qPCR)

Pengukuran ekspresi gen terkait biofilm yang direpresi atau diinduksi oleh agen antibiofilm dilakukan dengan *quantitative real-time PCR* (qPCR), sehingga aktivitas agen antibiofilm terhadap gen berasosiasi dengan biofilm dapat dideteksi dengan qPCR. Ekspresi gen patogen dipantau melalui qPCR dengan mendeteksi adanya DNA komplementer (cDNA) dari *template* RNA gen target menggunakan *probe fluorescence* seperti pewarna SYBR green (Kirmusaoğlu, 2019).

F. Nitric Oxide (NO)

1. Definisi Nitric Oxide (NO)

Nitric oxide (NO) radikal bebas diatomik adalah molekul pensinyalan sel yang secara konstitutif diekspresikan dalam sel endotel melalui konversi enzimatik

L-arginine oleh *nitric oxide synthase* (NOS). Peran fisiologis NO termasuk neurotransmisi, penyembuhan luka, regulasi tekanan darah, adhesi trombosit, dan respon imun. Demikian juga, NO memiliki kemanjuran yang kuat terhadap berbagai bakteri Gram positif dan Gram negatif dan memainkan peran penting dalam penyembuhan luka (Cao *et al.*, 2020). Sifat gas NO memungkinkan penetrasi melalui matriks dalam biofilm, yang memberikan keuntungan ekstra dibandingkan antibiotik dan strategi antibakteri berbasis perak. Karena aksinya yang cepat, waktu paro yang pendek dan tindakan non-spesifik itu tidak mempromosikan resistensi antibakteri. Selanjutnya, NO lebih dari hanya agen antibakteri karena perannya yang terbukti dalam angiogenesis, vasodilatasi, proliferasi sel, inflamasi, sintesis kolagen, dan remodeling jaringan (Pant *et al.*, 2019).

2. Nitric Oxide Sebagai Antimikroba

NO muncul sebagai agen antimikroba yang menjanjikan terhadap biofilm dan planktonik bakteri. Pada konsentrasi tinggi, NO membunuh bakteri dengan menyebabkan kerusakan pada DNA dan membran sel bakteri, yang pada akhirnya menyebabkan kematian sel. Kerusakannya bisa disebabkan langsung oleh NO itu sendiri atau dari produksi even molekul yang lebih mematikan seperti nitrogen dioksida (NO₂), dinitrogen trioksida (N₂O₃) dan peroksinitrit (OONO-) melalui reaksi dengan oksigen dan zat antara oksigen reaktif lainnya (mis. superoksida (O₂-). NO juga telah terbukti efektif dengan menghambat penyebaran biofilm pada konsentrasi rendah, meninggalkan sel-sel yang kemudian tersebar lebih rentan terhadap antimikroba (Oliver *et al.*, 2021).

G. S-Nitrosoglutathione (GSNO)

Salah satu donor NO adalah S-nitrosothiols seperti GSNO umumnya disebut sebagai senyawa RSNO, di mana R menunjukkan kelompok organik. S-nitrosothiols seperti GSNO ditemukan secara endogen dalam sistem mamalia, memiliki metabolisme yang dipelajari dengan baik di dalam tubuh dan memiliki toksisitas yang rendah secara intrinsik menjadikannya donor NO yang menarik

untuk aplikasi terapeutik. GSNO telah diidentifikasi sebagai donor NO endogen penyembuhan luka dan memiliki aktivitas antibakteri. GSNO terurai oleh hidrolisis menghasilkan NO dan glutathione teroksidasi. RSNOs adalah donor NO spontan yang memiliki banyak tindakan fisiologis NO in vivo, seperti promosi vasodilatasi dan agregasi antiplatelet. Konsentrasi rendah (1 μM) GSNO dan SNAP dapat mencegah pembentukan biofilm awal pada *P.aeruginosa* secara in vitro. Pada konsentrasi yang lebih tinggi (mM), GSNO dan S-nitroso-N-acetylcysteine (SNAC) juga menghambat dan bakterisida terhadap isolat bakteri dari infeksi keratitis. Selain itu, RSNO dapat dengan mudah dimasukkan ke dalam perancah makromolekul polimer. Dalam sistem seperti itu, hanya NO yang dilepaskan dari strukturnya pada pemutusan ikatan S-N, oleh karena itu memungkinkan pelepasan NO lokal untuk tujuan antibakteri atau antibiofilm. Karena banyak RSNO adalah senyawa yang larut dalam air, mereka dapat dimasukkan dalam kendaraan hidrofilik untuk diterapkan topikal pada jaringan yang memungkinkan pelepasan NO lokal. Salah satu RSNO terpenting yang ditemukan in vivo adalah GSNO, yang telah dilaporkan menghambat agregasi trombosit selama angioplasti koroner dan memiliki efek menguntungkan pada iskemia/reperfusi cedera, pada pre-eklampsia dan dalam pengobatan akut infark miokard dan angina tidak stabil. (Amadeu *et al.*, 2007; Pooh & Rice., 2022).

Pelepasan NO endogen dengan memanfaatkan molekul donor seperti GSNO dan mengintegrasikannya dalam sistem polimer untuk membuat pembalut luka dapat menawarkan potensi besar dalam penyembuhan lebih cepat. GSNO adalah S-nitrosothiol yang diproduksi secara endogen terkenal di manusia. Rentang fungsi GSNO endogen dari mencegah embolisasi di dalam pembuluh darah hingga memodulasi angiogenesis. Seiring dengan fungsi ini, GSNO juga telah terbukti terlibat dalam deposisi kolagen di perbaikan luka kulit, lebih lanjut menunjukkan kemampuannya dalam penyembuhan luka (Pant *et al.*, 2019).

H. Self-Healing Hydrogel

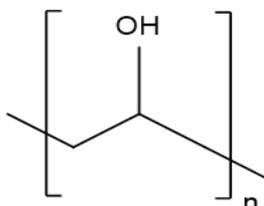
Self-healing hydrogel adalah hidrogel yang dapat menyembuhkan kerusakan secara naluriah dan mengembalikannya kerangka kerja biasa tanpa adanya rangsangan eksternal. Sebagai kelanjutannya, *self-healing hydrogel* juga dapat mengizinkan modalitas terapi untuk disuntikkan langsung ke situs yang ditargetkan tanpa implantasi bedah (Gupta *et al.*, 2020). Bahan hidrogel dengan kemampuan penyembuhan sendiri dapat mencapai integritas struktural dan

fungsional. Bahan *self-healing* adalah kelas bahan modern yang secara otomatis dapat memperbaiki kerusakan tanpa intervensi eksternal. Ketika jaringan rusak, *self-healing hydrogel* dapat mengembalikan aslinya struktur tanpa mempengaruhi fungsi karena hubungan dinamis reversibel di jaringan dibandingkan dengan hidrogel biasa. Oleh karena itu, *self-healing hydrogel* menunjukkan potensi yang sangat menjanjikan dalam biomedis, terutama aplikasi pembalut luka (Zhang *et al.*, 2020).

Self-Healing hydrogel mungkin memiliki nilai lebih praktis dari hidrogel, tanpa sifat penyembuhan diri ketika mereka digunakan untuk pengiriman sel atau regenerasi jaringan. Misalnya, *self-healing hydrogel* dapat memberikan perlindungan mekanis dari geseran kerusakan saat digunakan untuk pengiriman sel. Selain itu, kemampuan penyembuhan diri dapat memperpanjang jangka waktu dari hidrogel untuk memberikan perlindungan yang lebih baik untuk luka ketika hidrogel digunakan sebagai pembalut luka karena dapat memperbaiki sendiri gangguan yang disebabkan oleh gerakan (Zhang *et al.*, 2021).

I. Monografi Bahan

1. PVA

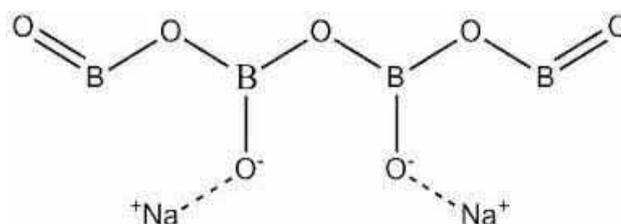


Gambar 2. Struktur kimia PVA (Liu *et al.*, 2022)

PVA berupa serbuk putih hingga berwarna krem dan tidak berbau. PVA memiliki kelarutan larut dalam air, sedikit larut dalam etanol (95%) P, dan tidak larut dalam pelarut organik berfungsi sebagai gelling agent. PVA sebagai salah satu polimer sintetik larut air, dapat bereaksi dengan banyak jenis gugus fungsi dan membentuk hidrogel yang berikatan silang secara kimia atau fisik (Bian *et al.*, 2018). Sifat mekanik dari PVA merupakan sifat yang menarik terutama dalam preparasi hidrogel. PVA memiliki struktur kimia yang sederhana dengan gugus hidroksil yang tidak beraturan. monomernya, yaitu vinil alkohol tidak berada dalam bentuk stabil, tetapi dalam keadaan tautomer dengan asetaldehida. PVA memiliki sifat hidrofilik sehingga selektif terhadap air. sifat hidrofilik ini disebabkan

adanga gugus -OH yang berinteraksi dengan molekul air melalui ikatan hidrogen. Untuk kelarutannya PVA dapat larut dalam air dengan bantuan panas yaitu pada temperature diatas 90°C, pada suhu kamar PVA berwujud padat, lunak dalam pemanasan, kemudian elastis seperti karet. PVA memiliki berat molekul 85.000-146.000 (Perwitasari., 2012). Saat ini, hidrogel berbasis PVA banyak digunakan dalam berbagai aplikasi seperti *hydrogel wound dressing* karena biokompetibel dan biodegradable, dapat menjaga kelembapan, transparan dan dapat digunakan sebagai pembawa obat, selain itu PVA dapat membantu dalam rekayasa jaringan, namun PVA tidak memiliki sifat antimikroba. (kamoun *et al.*, 2015).

2. Boraks

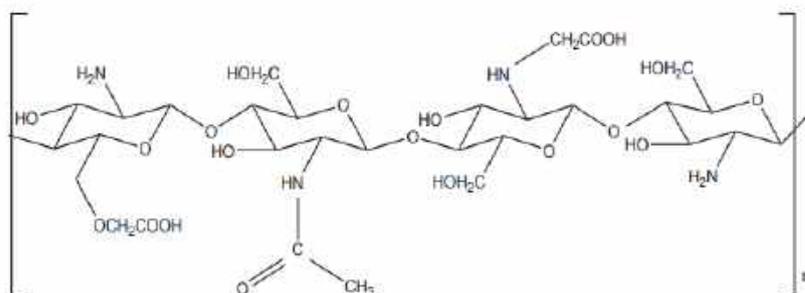


Gambar 3. Struktur kimia boraks (Suharyani, 2021)

Boraks dengan nama ilmiah dikenal sebagai natrium tetraborat dekahidrat ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$). Boraks mempunyai nama lain naitrium biorat, natrium piroborat, natrium tetraborate yang seharusnya hanya digunakan dalam industry non pangan. Boraks juga disebut sebagai *sodium pyroborate* dan *sodium tetraborate*. Boraks jika larut dalam air akan menjadi hidroksida dan asam borat (H_3BO_3). Boraks adalah senyawa berbentuk kristal putih, tidak berbau dan stabil pada suhu ruangan, boraks memiliki berat molekul 231,43 dan mempunyai kandungan boron sebesar 11,34%. Boraks bersifat basa lemah dengan pH (9,15-9,20). Boraks umumnya larut dalam air, kelarutan Boraks berkisar 62,5 g/L pada suhu 25°C dan kelarutan boraks dalam air akan meningkat seiring dengan peningkatan suhu air, namun boraks tidak larut dalam senyawa alkohol (Sammulia *et al.*, 2019; Tanpichai *et al.*, 2022). Dalam pengaplikasian diindustri farmasi boraks sering digunakan sebagai agen *cross-linking*, di antara banyak bahan pengikat silang komplementer yang dapat membentuk ikatan reversibel dengan polimer, boraks merupakan kandidat yang baik dengan toksisitas rendah dan biokompatibilitas baik, yang telah berhasil digunakan sebagai bahan

tambahan kimia untuk hidrogel PVA. Penggunaan sejumlah kecil boraks pada PVA dapat menyebabkan peningkatan viskoelastisitas larutan PVA yang luar biasa. Hal ini disebabkan terbentuknya kompleks antara ion borat dan gugus fungsi hidroksil PVA, yang bertindak sebagai pengikat silang sementara antara rantai molekul PVA (Bian *et al.*, 2018).

3. KMK

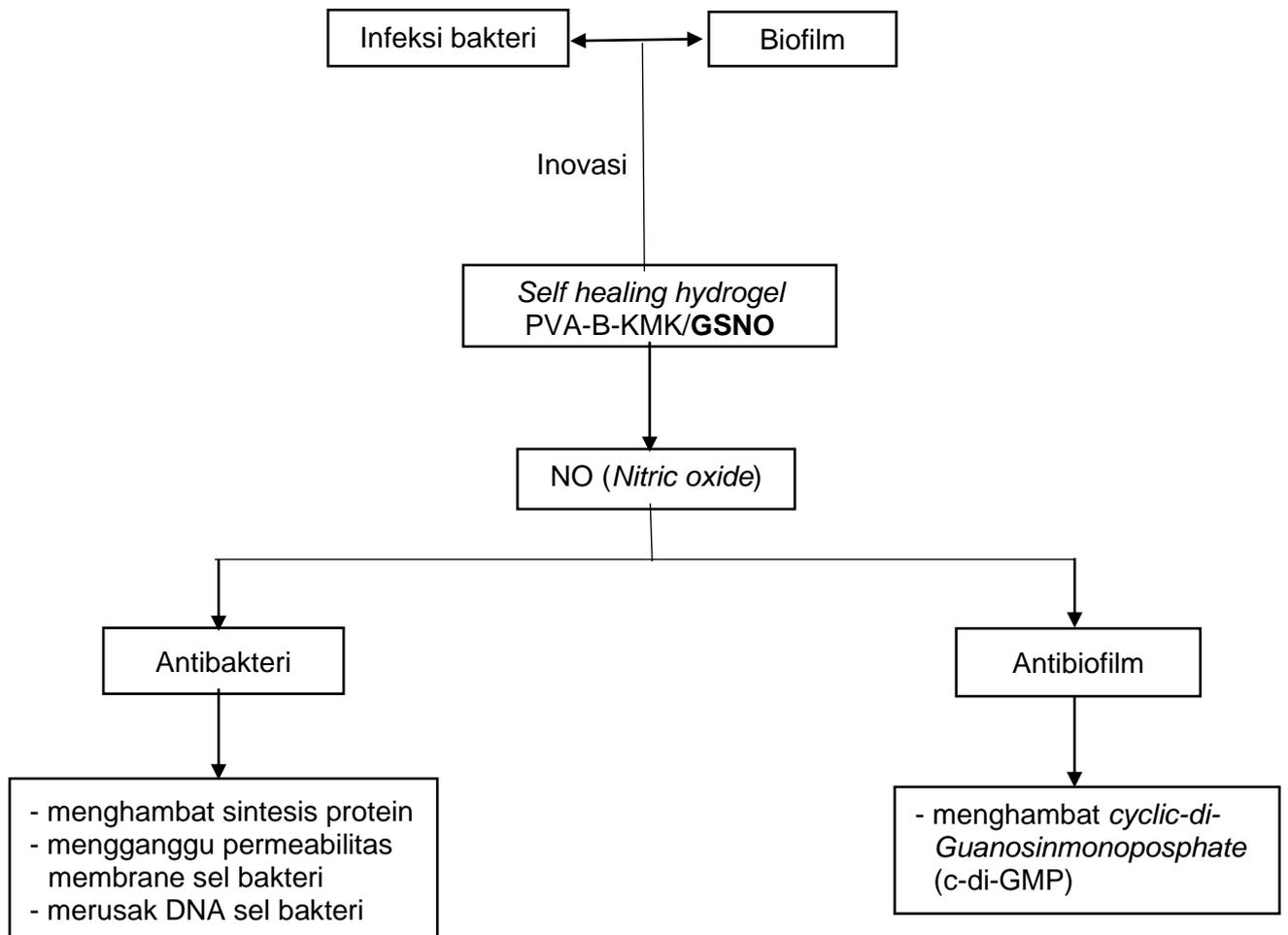


Gambar 4. Struktur kimia KMK (Kurniasih *et al.*, 2020)

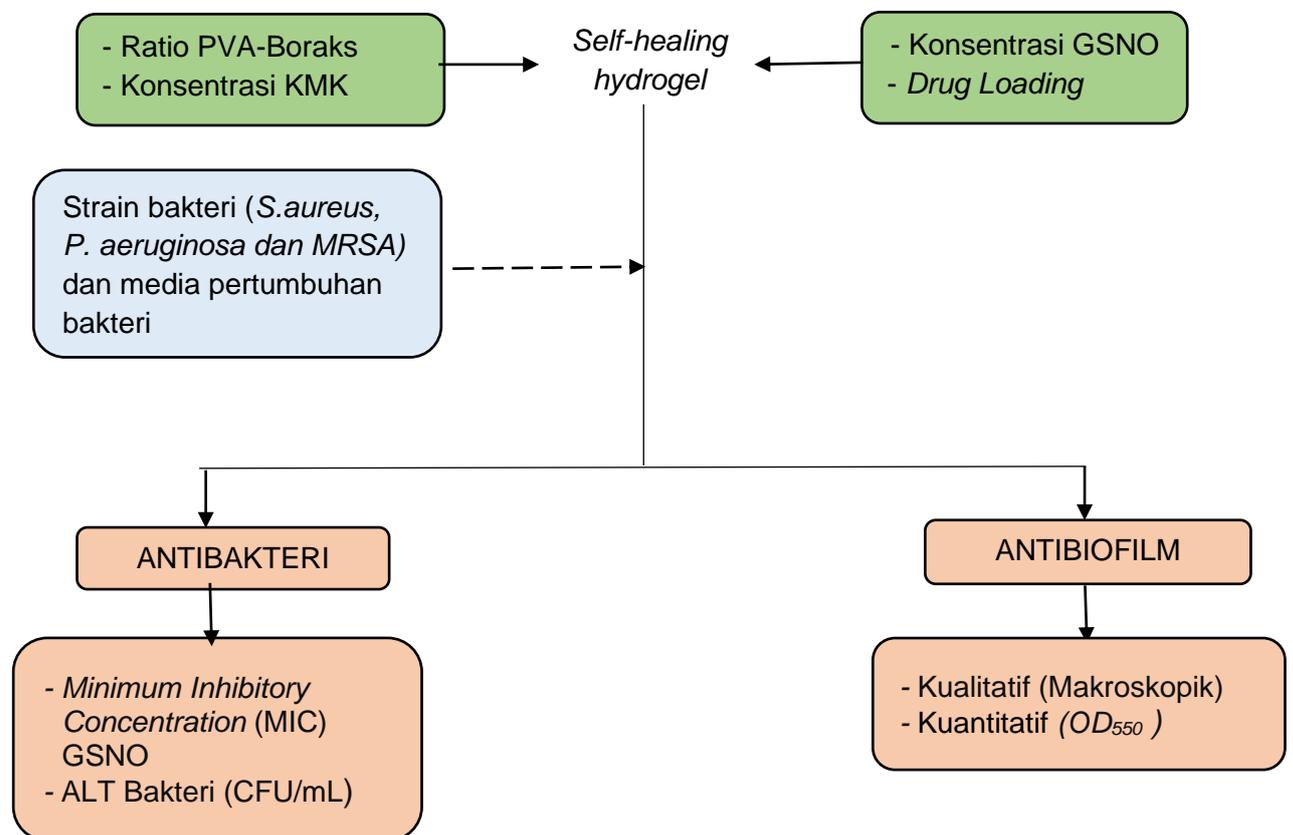
KMK merupakan salah satu derivat dari kitosan yang diperoleh melalui suatu proses eterifikasi (karboksimetilasi) alkalis kitosan dengan asam monokloroasetat. Teknik pembuatan KMK adalah dengan mereaksikan kitosan dengan asam monokloroasetat pada suasana alkali. Gugus karboksimetil dari asam monokloroasetat mensubstitusi gugus hidroksil (-OH) dan gugus amin (-NH₂), sehingga KMK dapat membentuk 3 jenis karboksimetil kitosan masing-masing

N-, O-, N-O karboksimetil kitosan. Secara prinsip reaksi pembentukan KMK adalah reaksi asam basa (Kurniasih *et al.*, 2020). Diantara turunan kitosan yang dapat larut dalam air, KMK merupakan turunan kitosan yang bersifat amfoter akibat gugus -COOH dan -NH₂ yang dimilikinya. KMK memiliki kemampuan dalam berbagai aplikasi biomedis seperti penyembuhan luka, bioimaging, rekayasa jaringan dan pengiriman obat (Shariatnia, 2018; Suseno *et al.*, 2018).

J. Kerangka Teori



K. Kerangka Konsep



Keterangan :

-  : Variabel bebas
 : Variabel terikat
 : Variabel terkontrol

BAB III**METODE KERJA****A. Waktu dan Lokasi Penelitian**

Penelitian ini dilakukan mulai dari bulan Desember tahun 2022 sampai selesai di Laboratorium Farmaseutika, Laboratorium Biofarmaka, dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Hasanuddin.

B. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah 24-well microplate (Nest®), 96-well microplate (Nest®), mikropipet (Dragonlab®), timbangan analitik (Denver Instrument), autoklaf (ALL-American®), inkubator (UNB-200 Mammert®), petridish steril (Onemed®), spektrofotometer UV-Vis, *homogenizer* (Wisestri®), tangas air, tangas es, ose, dan alat-alat gelas (Pyrex®).

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah, aquadest, *water for injection* (WFI), natrium nitrat (NaNO_2), asam klorida (HCl), boraks, eter, karboksimetil kitosan, *reduced L-glutathione* (L-GSH), polivinil alkohol (PVA), etanol p.a, kristal violet, *polyurethane coupon*, medium *Tryptic Soy Broth* (TSB), *Tryptic Soy Agar* (TSA), *medium Luria Broth* (LB), *medium Luria Bertani Agar* (LBA) *phosphate buffered saline* (PBS), bakteri *S.aureus*, *P. aeruginosa*, dan MRSA.

C. Prosedur Penelitian