

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Infeksi Saluran Kemih (ISK) merupakan salah satu penyebab utama infeksi nosokomial dan 80% diakibatkan penggunaan kateter urin (Asbone *et al.*, 2017). Menurut penelitian Buntuan *et al* (2014), dari hasil kultur urin ada beberapa jenis bakteri yang berhasil diidentifikasi dan salah satu penyebab terbesar yaitu *Staphylococcus aureus* sebesar 45%.

Bakteri *S.aureus* sering menjadi pathogen nosokomial pada rumah sakit, salah satunya adalah infeksi saluran kemih akibat penggunaan kateter di rumah sakit dengan prevalensi kasus 0,5-6% dari ISK (Lister & Horswill, 2014). Bakteri *S. aureus* dapat membentuk biofilm—matriks polimer ekstraseluler—pada kateter dan menyebabkan ISK. Biofilm ini mampu melindungi sel terhadap kondisi yang tidak menguntungkan seperti perubahan suhu, kurangnya nutrisi atau dehidrasi, dan melindungi sel terhadap agen antibakteri (Rabin *et al.*, 2017). Akibatnya obat menjadi kurang atau tidak aktif sama sekali terhadap *S. aureus* karena tidak dapat menembus biofilm. Hal ini menyebabkan penanganan biofilm *S. aureus* menjadi penting.

Pembentukan biofilm berlangsung melalui empat tahap yang berbeda, yaitu: perlekatan sel planktonik ke permukaan inang (inang biotik maupun abiotik), kolonisasi dan pembentukan biofilm, pematangan biofilm, penyebaran biofilm (Idrees *et al.*, 2021). Agen antibiofilm umumnya bekerja pada tahap pembentukan biofilm dengan cara menghambat atau mencegah pembentukan biofilm baru, umumnya agen antibiofilm ini dapat diperoleh dari bahan alam (Idrees *et al.*, 2021).

Raorane *et al.* (2019) melaporkan kandungan metabolit flavonoid memiliki potensi sebagai agen antibiofilm. Silva *et al.* (2016) juga melaporkan bahwa flavonols kuarsetin, luteolin dan kaemferol dapat menghambat pembentukan biofilm *S. aureus*. Senyawa-senyawa tersebut terkandung dalam bawang daun, salah satu tanaman yang sering digunakan sebagai bumbu masak pada masakan Asia. Berdasarkan analisis fitokimia, ekstrak etanol bawang daun dilaporkan mengandung *allicin*, belerang, sulfur, flavonoid, asam lemak, kaemferol, polifenol dan sterol (Parvu *et al.*, 2012). Selain itu, kandungan *allicin* pada bawang daun dapat menghambat pertumbuhan *S. aureus* (Chang *et al.*, 2016)

Berdasarkan studi literatur, belum ada penelitian tentang aktivitas penghambatan biofilm bawang daun terhadap *S. aureus* sehingga penelitian ini difokuskan pada uji aktivitas antibiofilm ekstrak bawang daun (*A. fistulosum* L.) terhadap penghambatan biofilm *S. aureus*.



Optimized using
trial version
www.balesio.com

salah

latar belakang di atas, rumusan masalah yang diperoleh yaitu:

< etanol 70% bawang daun dari Desa Kanreapia memiliki aktivitas biofilm pada bakteri *S. aureus*?

otat flavonoid yang terkandung dalam ekstrak etanol 70% bawang Kanreapia?

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah di atas, tujuan penelitian yang diperoleh yaitu:

1. Untuk mengetahui ekstrak etanol 70% bawang daun dari Desa Kanreapia memiliki aktivitas penghambatan biofilm terhadap bakteri *S. aureus*.
2. Untuk mengetahui kadar total flavonoid yang terkandung dalam ekstrak etanol 70% bawang daun dari Desa Kanreapia.



Optimized using
trial version
www.balesio.com

BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Alat dan Bahan

2.1.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini: alat-alat gelas (Pyrex[®]), autoklaf (All American Model 25X-2[®]), ayakan nomor mesh 40, Biosafety Cabinet (Thermo Scientific[®]), inkubator (Memmert[®]), Laminar Air Flow (Labolytic[®]), microplate reader (Biotek[®]), mikropipet (Dragonlab[®]), timbangan analitik (Sartorius[®]), rotary evaporator (Heidolph[®]), seperangkat alat sonikator (VWR[®]), spektrofotometer UV-VIS (Shimadzu[®]), dan waterbath.

2.1.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini: serbuk bawang daun, etanol 70%, kultur bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, microplate flat bottom 96-well (Biologix[®]), media Nutrient Agar (Merck[®]), media Nutrient Broth (Merck[®]), media Trypticase Soy Broth (Merck[®]), glukosa (Merck[®]), larutan standar McFarland (Himedia[®]), larutan kristal violet (Merck[®]), larutan natrium asetat (Merck[®]), kuersetin (Sigma[®]), aluminum klorida (Merck[®]), aquades steril, blue dan yellow tip.

2.2 Metode Penelitian

2.2.1 Pengumpulan bahan dan preparasi bawang daun

Sampel bawang daun (*A. fistulosum* L.) yang diperoleh dari Desa Kanreapia Kecamatan Tombolo Pao Kabupaten Gowa Sulawesi Selatan, daerah ini dipilih karena Gowa merupakan wilayah yang memiliki potensi penghasil bawang daun di Sulawesi Selatan tepatnya di Kecamatan Tombolo Pao. Tanaman dibersihkan menggunakan air mengalir, daun kemudian dipotong kecil-kecil dan dikeringkan pada suhu 50°C selama 16 jam (Rofi'ah, 2013).

2.2.2 Ekstraksi bawang daun

Simplisia kering yang telah dihaluskan dengan ayakan no. 40, kemudian ditimbang. Selanjutnya simplisia diekstraksi menggunakan penyari etanol 70% dengan perbandingan 1: 10, kemudian disonikasi selama 1 jam. Setelah sonikasi, sampel didiamkan selama 24 jam. Kemudian, sampel disaring menggunakan kertas saring Whatman[®]. Hasil penyaringan diuapkan menggunakan rotary evaporator pada suhu 60°C dengan kecepatan 100 rpm dan dilanjutkan menggunakan waterbath sehingga diperoleh ekstrak etanol bawang daun (Audah *et al.*, 2018).



Teri uji

akteri *S. aureus* ATCC 25923 diinokulasi menggunakan jarum ose dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C (Pratiwi *et al.*,

2.2.4 Penyiapan kontrol negatif dan positif

Streptomisin digunakan sebagai kontrol positif. Larutan stok streptomisin disiapkan dengan menimbang sebanyak 0,0020 g, streptomisin lalu dilarutkan dengan DMSO 10% dicukupkan volume hingga 10 mL. Larutan DMSO 10% digunakan sebagai kontrol negatif (Pratiwi *et al.*, 2015).

2.2.5 Pembuatan media biofilm

Media biofilm menggunakan TSB dengan fortifikasi glukosa 1%. Media TSB dibuat sebanyak 30 mL, kemudian media TSB ditambahkan glukosa 1%. Kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C (Pratiwi *et al.*, 2015).

2.2.6 Penyiapan suspensi bakteri uji

Subkultur bakteri *S. aureus* ATCC 25923 disuspensikan menggunakan air steril hingga diperoleh kekeruhan yang sama dengan standar McFarland 0,5 (setara $1,5 \times 10^8$ CFU/mL) (Pratiwi *et al.*, 2015).

2.2.7 Induksi pertumbuhan biofilm

Suspensi bakteri uji *S. aureus* ATCC 25923 ($1,5 \times 10^8$ CFU/ mL) dan media TSBG 75 μ L dimasukkan kedalam 96-well plate, kemudian diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C (Pratiwi *et al.*, 2015).

2.3 Analisis Fitokimia

2.3.1 Uji Kualitatif

Ekstrak bawang daun dilarutkan menggunakan etanol 70% dan baku kuersetin sebagai pembanding, kemudian ditotolkan pada lempeng silika yang telah diaktifkan dan ditandai batas atas dan batas bawahnya. Lempeng dielusi dengan menggunakan fase gerak heksan: etil asetat dengan perbandingan 2:5. Lempeng diamati di bawah sinar UV pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm dan dilakukan perhitungan nilai Rf ekstrak dan baku kuersetin. Lempeng selanjutnya disemprot menggunakan pereaksi $AlCl_3$ 10% untuk mengamati terbentuknya warna kuning pada hasil positif flavonoid (Marliani *et al.*, 2016).

2.3.2 Penentuan kadar flavonoid ekstrak

2.3.2.1 Penentuan panjang gelombang maksimum

Sebanyak 500 μ L larutan standar kuersetin dari konsentrasi 100 ppm dipipet 100 μ L, kemudian ditambahkan dengan 100 μ L $AlCl_3$ 10% dan dihomogenkan. Kemudian, campuran ditambahkan 100 μ L larutan natrium asetat 1 M, dihomogenkan kembali dan 1 mL dengan air suling. Selanjutnya, diukur serapan pada rentang 400-800 nm dan ditentukan panjang gelombang maksimumnya



Kurva baku

Sebanyak 10 mg dilarutkan dalam 10 mL etanol, sehingga diperoleh konsentrasi (1000 ppm). Selanjutnya kuersetin diencerkan dengan cara

dipipet 1 mL lalu cukupkan hingga 10 mL dalam labu ukur sehingga diperoleh konsentrasi (100 ppm). Stok kuersetin 100 ppm dipipet sebanyak 100, 200, 300, 400, dan 500 μL kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 5 mL, lalu ditambahkan 1,5 mL etanol p.a, 100 μL AlCl_3 10%, dan 100 μL natrium asetat 1 M. Larutan dikocok hingga homogen, lalu diinkubasi selama 30 menit. Absorbansi larutan diukur pada panjang gelombang 431,5 nm (Chang, *et al.* 2002).

2.3.2.3 Penentuan kadar flavanoid sampel

Ekstrak etanol bawang daun ditimbang sebanyak 50 mg, kemudian dilarutkan dengan etanol 70% dan dicukupkan volumenya dalam labu ukur 10 mL. Setelah itu, 500 μL stok dipipet ke dalam labu ukur 5 mL, lalu ditambah 1,5 mL etanol, 100 μL AlCl_3 10%, 100 μL natrium asetat 1 M dan cukupkan hingga 5 mL aquadest. Campuran dikocok, dan diinkubasi selama 30 menit, kemudian absorbansinya diukur pada panjang gelombang 431,5 nm (Chang, *et al.* 2002).

2.4 Uji Aktivitas Penghambatan Biofilm

Sebanyak 20 μL suspensi bakteri *S. aureus* ATCC 25923 dimasukkan ke dalam 96-well plate, sebanyak 130 μL TSBG dimasukkan ke dalam well, kemudian larutan uji ekstrak etanol 70% bawang daun sebanyak 50 μL dimasukkan ke dalam 96-well plate yang telah berisi media dan bakteri uji. Kontrol positif berisi 20 μL suspensi bakteri + 50 μL streptomisin. Kontrol negatif berisi 180 μL media + 20 μL suspensi bakteri. Kontrol pelarut berisi 130 μL media + 20 μL suspensi bakteri + 50 μL DMSO 10%. Kontrol media berisi 200 μL media. Kontrol ekstrak berisi 150 μL media + 50 μL ekstrak. *Microplate* diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Setelah inkubasi, *microplate* dibilas dengan aquades steril dan dikeringkan selama 10 menit. Sampel ditambahkan kristal violet 1% sebanyak 200 μL dan dibiarkan selama 15 menit kemudian dibilas dengan aquades steril sebanyak 3x. Setelah itu, sebanyak 200 μL etanol 90% ditambahkan dan diukur persen penghambatan (%P) pada panjang gelombang 595 nm. Persentase penghambatan dihitung menggunakan rumus:

$$\% P = \frac{\text{absorbansi biofilm terkoreksi (kontrol negatif)} - \text{absorbansi sampel terkoreksi}}{\text{absorbansi biofilm terkoreksi (kontrol negatif)}} \times 100\% \quad (1)$$

% P = Penghambatan biofilm

Absorbansi biofilm terkoreksi = $\bar{X}_{\text{absorbansi kontrol biofilm}} - \bar{X}_{\text{rata-rata absorbansi kontrol media}}$

Absorbansi sampel terkoreksi = $\bar{X}_{\text{absorbansi sampel}} - \bar{X}_{\text{rata-rata absorbansi kontrol media}}$

2.5 Analisis Data



; secara deskriptif menggunakan software IBM SPSS Versi 23 Shapiro Wilk untuk mengetahui distribusi data dan uji Levene's Test homogenitas. Jika data terdistribusi normal dan homogen maka akan uji *one way anova* dengan taraf kepercayaan 95%.