



**POTENSI ANTIBIOFILM PRODUK EKSTRASELULER**

*Pseudomonas stutzeri* TERHADAP ISOLAT

*Staphylococcus haemolyticus*

**SKRIPSI**

Oleh:

**Aditya Faradina Salsabilla**

**NIM 192210101053**

**BAGIAN BIOLOGI FARMASI**

**FAKULTAS FARMASI**

**UNIVERSITAS JEMBER**

**2023**



**POTENSI ANTIBIOFILM PRODUK EKSTRASELULER**

*Pseudomonas stutzeri* TERHADAP ISOLAT

*Staphylococcus haemolyticus*

**SKRIPSI**

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat  
untuk menyelesaikan Program Studi Farmasi  
dan mencapai gelar Sarjana Farmasi

Oleh:

**Aditya Faradina Salsabilla**

**NIM 192210101053**

**BAGIAN BIOLOGI FARMASI**

**FAKULTAS FARMASI**

**UNIVERSITAS JEMBER**

**2023**

## PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT yang senantiasa memberikan rahmat dan kasih sayangnya hingga hambanya dapat berjuang dalam segala kesulitan yang dihadapi;
2. (Alm.) Ayahku terhebat yang telah menjadi pendukung utama dari setiap langkah kecil yang kucapai, serta (Alm.) Mama yang melahirkanku dan yang telah menjadi teladanku dalam menuntut ilmu;
3. Kakakku Prima dan orangtua keduaku, Papa Agus dan Bu Lia yang menguatkan untuk selalu menjadi pribadi tangguh, penyabar, dan dapat menjadi wanita yang dibanggakan;
4. Guru-guru penulis sejak menempuh pendidikan di bangku TK hingga SMA, juga dosen dan tenaga kependidikan di Fakultas Farmasi Universitas Jember;
5. Almamater Fakultas Farmasi Universitas Jember.

**MOTO**

*“The secret of life, though, is to fall seven times and to get up eight times.”*

— Paulo Coelho, *The Alchemist*



**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Aditya Faradina Salsabilla

NIM : 192210101053

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul “Potensi Antibiofilm Produk Ekstraseluler *Pseudomonas stutzeri* terhadap Isolat *Staphylococcus haemolyticus*” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak mana pun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, Juli 2023

Yang menyatakan,

Aditya Faradina Salsabilla

NIM. 192210101053

**SKRIPSI**

**POTENSI ANTIBIOFILM PRODUK EKSTRASELULER  
*Pseudomonas stutzeri* TERHADAP ISOLAT  
*Staphylococcus haemolyticus***

Oleh:

Aditya Faradina Salsabilla

NIM 192210101053

Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama : Dr. apt. Evi Umayah Ulfa, S.Si., M.Si.

Dosen Pembimbing Anggota : dr. Dini Agustina, M.Biomed.

## PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Potensi Antibiofilm Produk Ekstraseluler *Pseudomonas stutzeri* terhadap Isolat *Staphylococcus haemolyticus*” karya Aditya Faradina Salsabilla telah diuji dan disahkan pada:

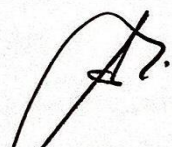
hari, tanggal : Kamis, 13 Juli 2023

tempat : Fakultas Farmasi Universitas Jember

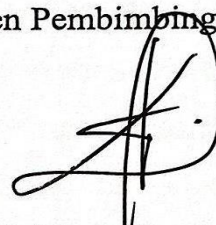
### Tim Pembimbing

Dosen Pembimbing Utama,

Dosen Pembimbing Anggota,



Dr. apt. Evi Umayah Ulfa, S.Si., M.Si.  
NIP. 197807282005012001



dr. Dini Agustina, M.Biomed.  
NIP. 198308012008122003

### Tim Penguji

Dosen Penguji I

Dosen Penguji II



apt. Endah Puspitasari, S.Farm., M.Sc.  
NIP. 198107232006042002



apt. Bawon Triatmoko, S.Farm., M.Sc.  
NIP. 198201292009121003

Mengesahkan

Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember,



Dr. apt. Nuri, S.Si., M.Si.  
NIP. 196904122001121007

## RINGKASAN

**Potensi Antibiofilm Produk Ekstraseluler *Pseudomonas stutzeri* terhadap Isolat *Staphylococcus haemolyticus*:** Aditya Faradina Salsabilla: 192210101053; 2023; 85 Halaman; Fakultas Farmasi, Universitas Jember

Pengobatan penyakit infeksius yang disebabkan oleh bakteri patogen menghadapi tantangan dengan adanya peningkatan kejadian resistensi antibiotik, khususnya pada kasus infeksi nosokomial. Infeksi nosokomial adalah infeksi yang didapatkan oleh pasien saat dirawat di rumah sakit, seperti pada pasien ICU dan *immunocompromised*. Salah satu bakteri yang menyebabkan infeksi nosokomial adalah *Staphylococcus haemolyticus*. Keparahan infeksi yang disebabkan oleh *S. haemolyticus* melibatkan faktor virulensinya berupa pembentukan biofilm. Bakteri ini dapat tumbuh di permukaan alat perangkat medis sebagai komunitas biofilm yang terbungkus dalam matriks polimer biofilm, sehingga mampu melindungi bakteri dari tekanan luar seperti sel imun inang dan antibiotik. Meskipun saat ini antibiotik adalah satu-satunya intervensi medis yang digunakan untuk mengobati dan mencegah infeksi, terutama infeksi biofilm, tingginya angka resistensi antibiotik menjadi alasan pengembangan penelitian dari bahan alam untuk menemukan agen antibiofilm yang dapat membantu penetrasi antibiotik dalam pengobatan infeksi bakteri. Salah satu agen antibiofilm yang telah berhasil diproduksi dari biota laut adalah produk ekstraseluler *Pseudomonas stutzeri* yang mampu menghambat pembentukan biofilm dan menghancurkan biofilm yang dibentuk oleh *Pseudomonas aeruginosa*. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui potensi antibiofilm yang dimiliki oleh produk ekstraseluler *P. stutzeri* terhadap isolat *S. haemolyticus*.

Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental laboratories* untuk mengamati adanya aktivitas antibiofilm dari produk ekstraseluler *P. stutzeri* meliputi supernatan bebas sel, presipitat amonium sulfat, dan presipitat etanol, terhadap biofilm dari isolat *S. haemolyticus*. Metode uji aktivitas antibiofilm yang digunakan adalah *microtiter plate assay* dengan pembacaan *optical density* pada panjang gelombang 595 nm untuk dilakukan analisis statistika berupa *One-Way ANOVA*. Selain itu, dilakukan uji kualitatif kandungan protein dan polisakarida



dengan penetasan reagen Bradford dan Lugol, serta analisis profil pita protein yang dihasilkan melalui metode elektroforesis SDS-PAGE.

Hasil pengujian dari ketiga sampel produk ekstraseluler *P. stutzeri* menunjukkan adanya aktivitas penghambatan pembentukan biofilm yang signifikan dibandingkan kelompok kontrol negatif, dengan penghambatan pembentukan biofilm terbesar dimiliki oleh sampel supernatan bebas sel dengan volume perlakuan 40  $\mu$ L (70%) dan aktivitas degradasi biofilm terbesar dimiliki oleh sampel supernatan bebas sel dengan volume perlakuan 80  $\mu$ L (39%). Aktivitas antibiofilm dari produk ekstraseluler *P. stutzeri* tidak bergantung pada volume uji dari sampel yang digunakan.

Hasil uji skrining kualitatif kandungan produk ekstraseluler *P. stutzeri* menunjukkan adanya kandungan protein pada uji kualitatif Bradford, serta adanya pita protein pada elektroforesis SDS-PAGE dengan berat molekul 29—252 kDa. Namun hasil negatif pada uji kualitatif polisakarida dengan menggunakan reagen Lugol menandakan bahwa produk ekstraseluler *P. stutzeri* tidak mengandung polisakarida. Penelitian yang dapat dilakukan selanjutnya adalah mengidentifikasi komponen produk ekstraseluler *P. stutzeri* secara kuantitatif dan mengamati aktivitas antibiofilm yang dihasilkan melalui *Scanning Electron Microscope* (SEM).

## PRAKATA

Bismillahirrahmanirrahiim, puji syukur penulis haturkan kepada Allah WT. yang memberi rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan rangkaian penelitian dan penulisan skripsi yang berjudul “Potensi Antibiofilm Produk Ekstraseluler *Pseudomonas stutzeri* terhadap Isolat *Staphylococcus haemolyticus*”. Skripsi ini ditulis untuk melengkapi syarat tugas akhir guna menyelesaikan pendidikan S1 Farmasi di Universitas Jember.

Penyusunan skripsi yang dilalui oleh penulis tidak lepas dari bantuan dan dukungan dari berbagai pihak, sehingga penulis ingin berterimakasih kepada:

1. Mending orangtua tercinta dari penulis yang menjadi motivasi utama penulis untuk menjadi anak yang dibanggakan dengan berbagai dukungan yang telah diberi keduanya;
2. Penulis, diri saya sendiri, yang mampu bertahan dan senantiasa belajar untuk menjadi pribadi yang tegar;
3. Saudara kandung penulis, Prima Aditya, yang juga menjadi pribadi kuat sehingga dapat memberikan contoh kepada penulis untuk tetap berdiri teguh dengan usaha sendiri;
4. Orangtua asuh penulis, Ibu Lia dan Papa Agus, yang telah menguatkan dan memberikan dukungan sehingga penulis tidak patah semangat dalam menyelesaikan studi yang ditempuh;
5. Bapak Dr. apt. Nuri, S.Si., M.Si. selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Jember;
6. Dosen pembimbing penulis, Ibu Dr. apt. Evi Umayah Ulfa, S.Si., M.Si. dan Ibu dr. Dini Agustina, M.Biomed. yang telah meluangkan tenaga dan waktunya untuk membimbing penulis dengan memberikan arahan sehingga penulisan naskah skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik;
7. Ibu apt. Endah Puspitasari, S.Farm., M.Sc. dan Bapak apt. Bawon Triatmoko, S.Farm., M.Sc. selaku dosen penguji yang telah memberikan bantuan berupa kritik, saran, dan masukan untuk penulis dalam memperbaiki naskah skripsi ini;

8. Bapak apt. Ari Satia Nugraha, S.F.,GDipSc.,MSc-res.,PhD..., selaku Dosen Pembimbing Akademik atas arahan dan bimbingannya selama penulis menjadi mahasiswa;
9. Mbak Parka, Mbak Dian, Mbak Indri, Ibu Widi, dan rekan-rekan penelitian di Laboratorium Biologi Farmasi Universitas Jember, yang telah membantu penulis dalam melakukan penelitian skripsi ini;
10. Elvira, Namira, Pradia, selaku sahabat terbaik yang senantiasa saling menyokong dalam kegiatan yang positif serta senda gurauanya yang mampu meningkatkan motivasi penulis dalam penyelesaian penulisan skripsi;
11. Semua pihak yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu, yang terlibat baik secara langsung maupun tidak langsung atas bantuan dan kerjasamanya.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari sempurna. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan penulisan skripsi ini. Akhir kata, penulis berharap agar skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, Juli 2023

Penulis

Aditya Faradina Salsabilla

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PERSEMBAHAN .....	ii
HALAMAN MOTO .....	iii
MOTO.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN .....	iv
HALAMAN PEMBIMBINGAN .....	v
HALAMAN PENGESAHAN.....	vi
RINGKASAN .....	vii
PRAKATA.....	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR GAMBAR .....	xiv
BAB 1. PENDAHULUAN .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	4
1.3 Tujuan Penelitian .....	4
1.4 Manfaat Penelitian .....	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA .....	6
2.1 Tinjauan tentang Biofilm .....	6
2.2 <i>Staphylococcus haemolyticus</i> .....	10
2.3 Tinjauan tentang <i>Pseudomonas stutzeri</i> .....	13
2.4 Metode Pengujian Pembentukan Biofilm .....	15
2.5 Tinjauan tentang Produk Ekstraseluler Bakteri Laut .....	17
2.6 Tinjauan tentang Produk Ekstraseluler <i>Pseudomonas stutzeri</i> sebagai Agen Antibiofilm.....	19
2.7 Uji Aktivitas Antibiofilm dengan Metode Kolorimetri .....	22
2.8 Uji Kandungan Produk Ekstraseluler <i>P. stutzeri</i> dengan Reagen Lugol dan Bradford .....	23
2.9 Elektroforesis Protein.....	24
BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN .....	25
3.1 Jenis Penelitian.....	25

3.2	Rancangan Penelitian .....	25
3.3	Tempat dan Waktu Penelitian .....	26
3.4	Alat dan Bahan Penelitian .....	26
3.5	Variabel Penelitian .....	27
3.6	Definisi Operasional.....	28
3.7	Prosedur Penelitian.....	29
3.8	Analisis Data .....	36
3.9	Skema Penelitian .....	38
BAB 4.	HASIL DAN PEMBAHASAN .....	39
4.1	Hasil Identifikasi Bakteri Uji ( <i>Staphylococcus haemolyticus</i> ) .....	39
4.2	Hasil Uji Pembentukan Biofilm Isolat <i>Staphylococcus haemolyticus</i> .....	41
4.3	Hasil Uji Aktivitas Antibiofilm <i>Staphylococcus haemolyticus</i> oleh Produk Ekstraseluler <i>Pseudomonas stutzeri</i> .....	42
4.4	Hasil Uji Kualitatif Kandungan Protein dan Polisakarida Produk Ekstraseluler <i>P. stutzeri</i> menggunakan Reagen Bradford dan Lugol .....	46
4.5	Hasil Elektroforesis SDS-PAGE Sampel Produk Ekstraseluler <i>P. stutzeri</i> ... ..	47
BAB 5.	KESIMPULAN.....	51
5.1	Kesimpulan .....	51
5.2	Saran.....	51
DAFTAR PUSTAKA	.....	52
LAMPIRAN	.....	65

**DAFTAR TABEL**

Tabel 4.1 Hasil uji pembentukan biofilm <i>S. haemolyticus</i> .....	41
Tabel 4.2 Hasil analisis profil pita protein (SDS-PAGE) produk ekstraseluler <i>P. stutzeri</i> menggunakan software <i>GelAnalyzer</i> .....	48



**DAFTAR GAMBAR**

Gambar 2.1 Faktor virulensi <i>S. haemolyticus</i> .....	8
Gambar 2.2 Morfologi <i>Pseudomonas stutzeri</i> .....	14
Gambar 3.1 Rancangan penelitian.....	25
Gambar 3.2 Denah penggunaan <i>microplate 96-wells</i> pada uji pembentukan biofilm <i>S. haemolyticus</i> .....	32
Gambar 3.3 Denah penggunaan <i>microplate 96-wells</i> pada uji penghambatan pembentukan biofilm dan degradasi biofilm .....	34
Gambar 3.4 Skema penelitian .....	38
Gambar 4.1 Pertumbuhan bakteri <i>S. haemolyticus</i> pada media <i>Blood Agar</i> ....	39
Gambar 4.2 Hasil pewarnaan Gram bakteri <i>S. haemolyticus</i> dengan mikroskop perbesaran 1000x .....	40
Gambar 4.3 Grafik aktivitas penghambatan pembentukan biofilm <i>S. haemolyticus</i> oleh produk ekstraseluler <i>P. stutzeri</i> .....	43
Gambar 4.4 Grafik aktivitas degradasi biofilm <i>S. haemolyticus</i> oleh produk ekstraseluler <i>P. stutzeri</i> .....	45
Gambar 4.5 Hasil penetesan reagen Bradford pada sampel produk ekstraseluler <i>P. stutzeri</i> (uji kualitatif kandungan protein).....	47
Gambar 4.6 Hasil penetesan reagen Lugol pada sampel produk ekstraseluler <i>P. stutzeri</i> (uji kualitatif kandungan polisakarida).....	47
Gambar 4.7 Hasil elektroforesis SDS-PAGE sampel produk ekstraseluler....	48

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Infeksi merupakan kontributor dominan beban penyakit global. Penyakit infeksi menjadi ancaman besar bagi kesehatan manusia menurut *World Health Organization* (WHO) dengan jumlah sekitar 17% dari kasus kematian (9,2 juta kematian) pada tahun 2013 terkait penyakit infeksi (Koriem, 2017). Penyakit infeksi dapat didefinisikan sebagai penyakit yang disebabkan oleh patogen atau produk toksiknya yang muncul melalui penularan dari orang yang terinfeksi, hewan yang terinfeksi, atau benda mati yang terkontaminasi oleh inang yang rentan (van Seventer dan Hochberg, 2016). Mikroorganisme patogen yang termasuk penyebab penyakit infeksi adalah bakteri, virus, jamur, dan parasit (Khan dkk., 2017). Stafilococcus koagulase-negatif (CoNS) saat ini merupakan mikroorganisme paling umum yang bertanggung jawab atas infeksi nosocomial (Potter dkk., 2009). Selain itu, semakin banyak bukti infeksi pada unit perawatan intensif neonatal disebabkan oleh CoNS, termasuk *Staphylococcus haemolyticus* (Li dkk., 2013).

*Staphylococcus haemolyticus* termasuk dalam kelompok stafilococcus koagulase negatif (CoNS) dan merupakan bagian dari flora normal manusia yang terdapat pada kulit dan membran mukosa. Bakteri ini juga merupakan patogen oportunistik dan CoNS kedua yang paling sering diisolasi dari kultur darah manusia (Eltwisy dkk., 2022). *S. haemolyticus* juga menjadi penyebab keparahan dalam kasus septikemia, pneumonia, peritonitis, otitis, dan infeksi saluran kemih. Infeksi *S. haemolyticus* terutama terjadi pada pasien *immunocompromised*, misalnya pasien dengan penyakit hematologi dan bayi prematur (Cavanagh dkk., 2012; Li dkk., 2013).

Infeksi nosokomial menjadi mengkhawatirkan karena meningkatnya resistensi antibiotik. Terbentuknya biofilm pada bakteri menjadi salah satu penyebab terjadinya resistensi antibiotik. Karakteristik penting dari *S. haemolyticus* adalah kemampuannya dalam pembentukan biofilm yang menjadi



peran dalam memperparah infeksi yang telah terjadi. Selanjutnya, *S. haemolyticus* menghasilkan beberapa toksin dan enzim invasif yang membantu dalam patogenesis bakteri dengan mengubah respons imun inang dan menyebabkan kerusakan pada sel inang (Gwisai dkk., 2017; Eltwisy dkk., 2022). Kemampuan bakteri untuk membentuk biofilm pada permukaan inert perangkat medis dapat menjadi penyebab keparahan infeksi nosokomial karena biofilm memberikan perlindungan tambahan pada bakteri dan menjadikannya resisten terhadap beberapa jenis antibiotik (Nuryastuti, 2018). Sel bakteri yang berada dalam biofilm tertanam dalam matriks ekstraseluler yang memberikan perlindungan tambahan pada populasi bakteri dari mekanisme pertahanan inang dan agen antimikroba (Ribeiro dkk., 2012). *Extracellular Polymeric Substances* (EPS) berperan penting dalam pembentukan biofilm dan juga dalam resistensi biofilm terhadap agen antimikroba dan pertahanan inang (Melander dkk., 2020).

Biofilm dapat melindungi bakteri dari terhadap kondisi ekstrem, termasuk dehidrasi, senyawa beracun, dan stres (perubahan pH, osmolaritas), serta perlindungan terhadap respon imun dan serangan fag (Yin dkk., 2019). Pada penelitian Melander dkk. (2020) menyimpulkan bahwa pemberian antimikroba kurang efektif pada kasus infeksi yang disebabkan oleh bakteri pembentuk biofilm dibandingkan dengan sel planktonik bakteri. Pada beberapa antibiotik, nilai konsentrasi hambat minimal (KHM) terhadap bakteri dalam biofilm bisa lebih tinggi beberapa log dibandingkan dengan bakteri planktonik atau bakteri yang hidup bebas (Otto, 2012; Szczuka dkk., 2015; Eltwisy dkk., 2022).

Bahan alam dengan aktivitas antibiofilm yang telah diidentifikasi dari tanaman, mikroba, dan biota laut menjadi strategi penemuan terapi yang potensial untuk melawan infeksi bakteri pembentuk biofilm yang resisten terhadap antibiotik. Biota laut menjadi salah satu area penelitian yang relatif kurang dieksplorasi tentang potensinya sebagai penghasil zat bioaktif baru, salah satunya sebagai agen antibiofilm. Produk yang dihasilkan biota laut diyakini dapat menjadi zat bioaktif potensial tanpa berkontribusi besar terhadap kerusakan lingkungan (*bio sustainable*) (Melander dkk., 2020).

Saat ini, produk ekstraseluler kultur bakteri laut menjadi objek penelitian terkait kemampuannya untuk sebagai agen antibiofilm. Penelitian oleh Wu dkk. (2016) menunjukkan bahwa supernatan dan eksopolisakarida dari kultur bakteri laut *P. stutzeri* 273 secara efektif menghambat pembentukan biofilm dan menghancurkan biofilm *P. aeruginosa* PAO1 yang telah terbentuk sebelumnya tanpa menunjukkan adanya aktivitas penghambatan pertumbuhan bakteri. Hasil penelitian yang serupa juga ditunjukkan oleh penelitian Magdalena dkk. (2020) yang melakukan uji aktivitas antibiofilm dari bakteri laut genus *Vibrio* dan *Pseudomonas* secara *in vitro* terhadap bakteri patogen manusia, di antaranya *Acinetobacter baumannii*, *Burkholderia cepacia*, *E. Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, dan *Staphylococcus aureus*. Produk ekstraseluler bakteri laut yang berisikan polisakarida, protein, dan asam nukleat berpotensi memiliki aktivitas antibiofilm dengan mendispersikan pembentukan biofilm, mencegah sel planktonik menempel pada permukaan, dan mendegradasi biofilm yang telah terbentuk (Rendueles dkk., 2013; Roy dkk., 2018; Magdalena dkk., 2020).

Dari penelitian yang telah dilakukan oleh Wu dkk. (2016), belum ditemukan studi dan penelitian lain terkait aktivitas antibiofilm dari produk ekstraseluler yang dihasilkan bakteri laut *P. stutzeri* terhadap bakteri patogen selain *P. aeruginosa*. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Wu dkk. (2016), perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui potensi antibakteri dan antibiofilm dari produk ekstraseluler yang dihasilkan oleh *P. stutzeri* terhadap *S. haemolyticus* sehingga dapat menjadikan produk ekstraseluler *P. stutzeri* sebagai sumber zat bioaktif baru dalam pengembangan agen antibiofilm (Merritt dkk., 2011; Sambanthamoorthy dkk., 2015; Wu dkk., 2016).

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dipaparkan, maka dirumuskan permasalahan sebagai berikut:

1. Bagaimana aktivitas penghambatan pembentukan biofilm dari produk ekstraseluler *P. stutzeri* terhadap isolat bakteri *S. haemolyticus*?
2. Bagaimana aktivitas degradasi biofilm dari produk ekstraseluler *P. stutzeri* terhadap isolat bakteri *S. haemolyticus*?
3. Apakah produk ekstraseluler *P. stutzeri* mengandung polisakarida dan protein berdasarkan uji kualitatif dengan reagen Lugol dan Bradford?
4. Bagaimanakah profil protein dari produk ekstraseluler *P. stutzeri* berbasis SDS-PAGE?

## 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari dilakukannya penelitian ini adalah:

1. Mengetahui aktivitas penghambatan pembentukan biofilm produk ekstraseluler *P. stutzeri* terhadap isolat bakteri *S. haemolyticus*.
2. Mengetahui aktivitas degradasi biofilm produk ekstraseluler *P. stutzeri* terhadap isolat bakteri *S. haemolyticus*.
3. Mengetahui kandungan polisakarida dan protein yang terdapat dalam produk ekstraseluler *P. stutzeri* secara kualitatif berdasarkan uji Lugol dan uji Bradford.
4. Mengetahui profil protein dari produk ekstraseluler *P. stutzeri* berbasis SDS-PAGE.

#### 1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah:

1. Memberikan informasi mengenai potensi antibiofilm produk ekstraseluler *P. stutzeri* terhadap bakteri *S. haemolyticus*.
2. Menjadikan penelitian ini sebagai referensi penelitian selanjutnya untuk menilai potensi antibiofilm metabolit ekstraseluler *P. stutzeri* terhadap biofilm yang dibentuk oleh bakteri patogen lainnya.
3. Menjadikan penelitian ini sebagai referensi penelitian untuk pengembangan produk ekstraseluler *P. stutzeri* sebagai agen antibiofilm.



## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Tinjauan tentang Biofilm

#### 2.1.1 Definisi Biofilm

Bakteri secara alami hidup sebagai komunitas yang melekat pada permukaan. Setelah menempel, sel-sel bakteri membentuk zat polimer ekstraseluler atau *extracellular polymeric substance* (EPS) yang diproduksi untuk membentuk matriks yang memberikan perlindungan dari ancaman lingkungan, sehingga menjadi strategi bakteri untuk bertahan hidup. Istilah “biofilm” pertama kali digunakan untuk menggambarkan bentuk kehidupan bakteri yang dominan dalam mikrobiologi lingkungan pada tahun 1935. Kemudian sejak tahun 1985, biofilm menjadi hal yang biasa disebut dalam mikrobiologi medis. Istilah biofilm secara resmi diperkenalkan oleh Bill Costerton pada tahun 1978. Biofilm bervariasi dalam morfologinya, tergantung pada konstituen bakteri serta kondisi di mana biofilm tersebut terbentuk. Costerton dkk. menyimpulkan bahwa adhesi memainkan peran penting dalam infeksi bakteri patogen, sehingga pencegahan adhesi bisa menjadi cara yang efektif untuk memerangi infeksi (Bowler dkk., 2020).

Matriks biofilm EPS memungkinkan komunitas bakteri berdekatan dan menyediakan reservoir yang ideal untuk pertukaran seluler pengkodean plasmid yang memicu resistensi terhadap antibiotik, sehingga berpotensi mendorong penyebaran resistensi bakteri. Transfer horizontal gen pemberi resistensi antara sel bakteri dalam biofilm dan telah dilaporkan 700 kali lebih efisien daripada di antara sel bakteri planktonik yang hidup bebas (Flemming dkk., 2016; Bowler dkk., 2020).

#### 2.1.2 Peran Biofilm dalam Resistensi Antibiotik

Biofilm terdiri dari populasi bakteri yang dijejali oleh matriks ekstraseluler yang memiliki polimer yang disekresikan bakteri seperti eksopolisakarida, DNA ekstraseluler, protein, dan protein amiloidogenik. Koordinasi dalam biofilm

melalui komunikasi antarsel yang disebut *quorum sensing* (QS) adalah akumulasi molekul pensinyalan di lingkungan ekstraseluler mengarah pada pengaturan ekspresi gen spesifik. Beberapa spesies bakteri menggunakan QS untuk mengkoordinasikan pembongkaran komunitas biofilm. Biofilm memberikan perlindungan kepada mikroorganisme tidak hanya dari perubahan pH, osmolaritas, kelangkaan nutrisi, tekanan fisik, tetapi juga memblokir akses kumpulan biofilm bakteri dari antibiotik dan sel imun inang. Oleh karena itu, matriks biofilm memberikan perlindungan tambahan terhadap bakteri yang membuatnya tidak hanya mentolerir kondisi yang ekstrem tetapi juga resisten terhadap antibiotik yang mengarah pada munculnya infeksi bakteri yang parah yang disebabkan oleh seperti bakteri *multi drug resistant*, bakteri *extensively drug resistant*, dan bakteri *totally drug resistant* (Sharma dkk., 2019).

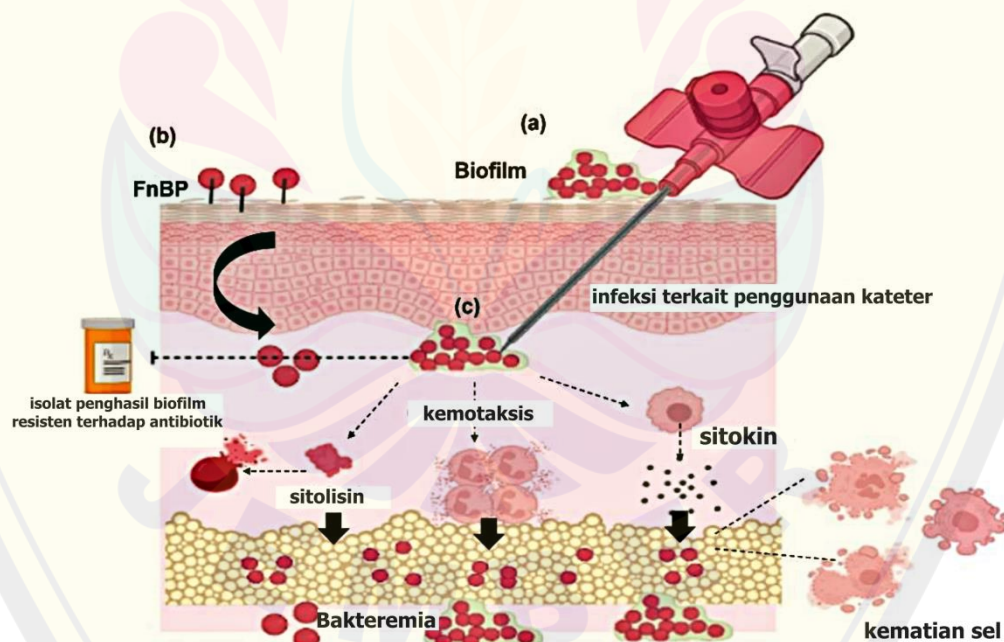
Sekitar 80% infeksi mikroba kronis dan berulang dalam tubuh manusia disebabkan oleh biofilm bakteri. Sel mikroba dalam biofilm menyebabkan resistensi antibiotik 10—1000 kali lebih banyak daripada sel planktonik bakteri. Dalam komunitas biofilm, resistensi antibiotik muncul karena berbagai mekanisme seperti penetrasi antibiotik yang lambat atau tidak lengkap ke dalam biofilm, perubahan lingkungan mikrokimia dalam biofilm dan subpopulasi mikroorganisme dalam biofilm. Mekanisme ini menjadi penyebab dari sifat multiseluler biofilm yang mengarah pada resistensi antibiotik komunitas biofilm bersama dengan mekanisme resistensi konvensional dan menjadi penyebab kegagalan strategi pengobatan infeksi bakteri (Mah, 2012).

### 2.1.3 Proses Pembentukan Biofilm dan Faktor Virulensi *Staphylococcus haemolyticus*

Pembentukan biofilm adalah peristiwa dengan beberapa langkah yaitu (i) adsorpsi molekul (molekul makro dan mikro) pada permukaan; (ii) adhesi bakteri pada permukaan dan pelepasan zat polimer ekstraseluler (EPS); (iii) pembentukan koloni dan pematangan biofilm.

Biofilm memberikan perlindungan bagi mikroorganisme tidak hanya dari perubahan pH, osmolaritas, kelangkaan nutrisi, kekuatan mekanik dan geser, akan tetapi juga memblokir akses komunitas biofilm bakteri dari antibiotik dan sel imun inang. Oleh karena itu, matriks biofilm memberikan daya tahan tambahan terhadap bakteri yang membuat mereka tidak hanya mentolerir kondisi yang keras tetapi juga resisten terhadap antibiotik yang mengarah pada munculnya infeksi bakteri seperti bakteri yang resisten terhadap banyak antibiotik (Sharma dkk., 2019).

Biofilm adalah lapisan polisakarida yang diproduksi secara ekstraseluler yang dapat membantu perlekatan bakteri pada permukaan biomaterial dan alat kesehatan. Isolat *S. haemolyticus* yang membentuk biofilm menjadi salah satu bakteri yang menyebabkan infeksi terkait penggunaan kateter dan perangkat implan medis lainnya. Sebagai bakteri penghasil biofilm, *S. haemolyticus* mampu menyebabkan bakteremia, sehingga menjadi salah satu faktor virulensi dari bakteri tersebut (Vestby dkk., 2020).



Gambar 2.1 Faktor virulensi *S. haemolyticus*  
(Sumber: Eltwisy dkk., 2022)

Pembentukan biofilm oleh *S. haemolyticus* merupakan proses yang kompleks dan keparahan dapat terjadi bahkan dengan adanya agen antimikroba.

Dampak antibiotik pada penghambatan pembentukan biofilm masih kontroversial. Penelitian Pereira-Ribeiro dkk. (2019) melaporkan bahwa pembentukan biofilm *S. haemolyticus* pada permukaan abiotik tidak dihambat oleh antibiotik seperti linezolid, teikoplanin, vankomisin, tigecycline, rifampisin, dll. Sementara Szczuka dkk. (2015) menunjukkan bahwa kombinasi tigesiklin/rifampisin lebih efektif daripada kombinasi daptomisin/rifampisin terhadap biofilm *ica-independen* yang diproduksi oleh *S. haemolyticus*. Pembentukan biofilm dan resistensi terhadap antibiotik dapat menjadi penyebab infeksi bakteri persisten dalam rumah sakit.

Pembentukan biofilm oleh *S. haemolyticus* berbeda dengan bakteri *Staphylococci* lainnya. Pembentukan biofilm oleh *S. epidermidis* dan *S. aureus* dimediasi oleh *ica operon* yang mengkode enzim pembentuk adhesi antarsel poli-N-asetilglukosamin atau polisakarida yang berperan penting dalam pembentukan matriks biofilm (de Araujo dkk., 2006). Namun, pembentukan biofilm oleh *S. haemolyticus* terutama *ica-independen* karena tidak ada gen *icaAD* yang diamati pada bakteri ini. Selain itu, Berbeda dengan *S. aureus* dan *S. epidermidis*, biofilm *S. haemolyticus* tidak terkait dengan *accumulation-associated protein* (Aap) dan *polysaccharide intercellular adhesion* (PIA) (Fredheim dkk., 2009).

Selain pembentukan biofilm, *S. haemolyticus* mengeluarkan *fibronectin-binding proteins* (FnBP) yang berperan penting dalam perlekatan bakteri pada matriks ekstraseluler, internalisasi dan invasi bakteri ke dalam sel inang (Eltwisy dkk., 2022). Sifat perlekatan *S. haemolyticus* klinis berbeda dengan *S. haemolyticus* komensal. *S. haemolyticus* komensal memiliki adherensi yang tinggi terhadap fibronektin dan kolagen, sedangkan *S. haemolyticus* klinis memiliki adherensi yang rendah terhadap fibronektin dan kolagen. Terdapat 65 jenis protein permukaan yang telah diidentifikasi dalam isolat klinis *S. haemolyticus* dan dikaitkan dengan adherensi terhadap keratinosit manusia seperti *Toll/interleukin-1 like (TIRs) domain-containing protein*, autolisin bifungsional *Atl*, LPXTG, dan transglukosilase *SceD* (Wolden dkk., 2020; Eltwisy dkk., 2022).

Proses pembentukan biofilm oleh *S. haemolyticus* belum banyak terdokumentasi dengan baik, sehingga penelitian dan studi lebih lanjut diperlukan



untuk menentukan langkah-langkah rinci pembentukan biofilm pada *S. haemolyticus* dan faktor-faktor yang mempengaruhi pembentukannya.

Selain karena pembentukan biofilm, produksi toksin, enzim, dan protein dari *S. haemolyticus* secara kolektif menunjukkan bahwa infeksi *S. haemolyticus* menyebabkan kerusakan sel inang melalui apoptosis (Eltwisy dkk., 2022).

## 2.2 *Staphylococcus haemolyticus*

### 2.2.1 Klasifikasi *Staphylococcus haemolyticus*

Kerajaan	: Bacteria
Subkerajaan	: Posibacteria
Filum	: Firmicutes
Kelas	: Bacilli
Ordo	: Bacillales
Suku	: Staphylococcaceae
Marga	: <i>Staphylococcus</i>
Jenis	: <i>Staphylococcus haemolyticus</i> (Liu, 2014)

### 2.2.2 Deskripsi *Staphylococcus haemolyticus*

Genus *Staphylococcus* terdiri dari sekitar 30 spesies, sekitar 10 diantaranya dianggap sebagai bakteri komensal terhadap manusia. *Staphylococcus haemolyticus* (*S. haemolyticus*) adalah salah satu stafilokokus koagulase-negatif (CoNS) yang menghuni kulit sebagai bakteri komensal (Otto, 2012). Namun, bakteri ini juga dapat terlibat dalam infeksi oportunistik pada pasien *immunocompromised*, terutama pada pasien rawat inap dan pasien dengan implan medis. *S. haemolyticus* adalah CoNS paling sering kedua setelah *S. epidermidis* yang diisolasi dari sampel klinis pasien yang terinfeksi, terutama dari kultur darah pasien dengan sepsis (Silva dkk., 2013).

*S. haemolyticus* adalah bakteri kokus gram positif fakultatif non-sporulasi, dengan diameter 0,8-1,3  $\mu\text{m}$ , non-motil dan biasanya terlihat membentuk tetrad atau berpasangan secara mikroskopis. *S. haemolyticus* memiliki dinding sel yang

tebal (60—80 nm), dan mirip dengan kokus gram positif lainnya, dinding sel terdiri dari peptidoglikan, asam teikoat, dan protein. Koloni tidak berpigmen atau berwarna sedikit kekuningan, bulat, berkilat, dan tidak tembus cahaya, dengan tepian rata dan diameter koloni 5–9 mm. Bakteri ini termasuk bakteri anaerobik fakultatif dan pertumbuhan optimal dalam kondisi aerobik (De Vos dkk., 2009).

*Staphylococcus haemolyticus* tumbuh di berbagai substrat, termasuk glukosa, gliserol, maltosa, sukrosa, dan trehalosa. Bakteri ini juga positif dalam identifikasi produksi asetoin, arginin, dihidrolase, benzidin, katalase, hemolisis, dan lipase, sedangkan hasil tes negatif untuk koagulase, DNase, ornitin dekarboksilase dan fosfatase (De Vos dkk., 2009). Pertumbuhan optimal terjadi antara 30—40°C dengan adanya oksigen dan 10% NaCl. Namun, beberapa *strain S. haemolyticus* dapat tumbuh pada suhu antara 18—45 °C. Pertumbuhan yang buruk terjadi pada suhu 15°C atau media dengan kandungan 15% NaCl (De Vos dkk., 2009). Pembentukan biofilm dari *S. haemolyticus* dipengaruhi oleh adanya glukosa dan NaCl. Pembentukan biofilm meningkat apabila ditumbuhkan dalam media *Tryptic Soy Broth* (TSB) dengan 1% glukosa dan menurun jika ditumbuhkan dalam TSB yang ditambahkan 3% NaCl (Flahaut dkk., 2008; Fredheim dkk., 2009).

Genom *S. haemolyticus* strain JCSC1435 mengandung kromosom 2.685.015 bp dan tiga plasmid 2.300 bp, 2.366 bp, dan 8.180 bp. Ukuran kromosom sebanding dengan *S. aureus* dan *S. epidermidis*, serta mengandung konten G+C yang serupa. Selain itu, sebagian besar *open reading frames* (ORF) identik pada ketiga spesies tersebut. Namun, *S. haemolyticus* memiliki daerah kromosom unik yang terdistribusi di dekat *oriC* (asal replikasi DNA kromosom), dan daerah ini secara kolektif disebut sebagai “*oriC* environ”. Genom *S. haemolyticus* juga mengandung banyak *insertion sequences* (ISs). Unsur-unsur IS ini dapat mendorong penataan ulang genomik yang sering mempercepat diversifikasi spesies. Secara teoritis, adaptasi ini dapat membantu *S. haemolyticus* mengatasi efek buruk dari paparan bahan kimia yaitu seperti penggunaan antibiotik (Takeuchi dkk., 2005; Bouchami dkk., 2011).

### 2.2.3 Patogenesis *Staphylococcus haemolyticus*

*S. haemolyticus* adalah patogen baru yang dapat menyebabkan infeksi nosokomial. Faktor-faktor yang menyebabkan infeksi dari penyebaran *S. haemolyticus* di rumah sakit masih belum terdefinisi dengan baik. Karakteristik genom *S. haemolyticus* yang menyebabkan infeksi rumah sakit ditandai dengan banyaknya *insertion sequences* (ISs) dan resistensi terhadap beberapa antibiotik (Eltwisy dkk., 2022).

Isolat nosokomial *S. haemolyticus* menunjukkan tingkat resistensi tertinggi terhadap antibiotik di antara sebagian besar anggota CoNS. Peningkatan resistensi antibiotik banyak diamati pada pasien rawat inap, terutama strain *Staphylococcus haemolyticus* yang resisten terhadap metisilin (MRSH). Studi genotipe menunjukkan bahwa *S. haemolyticus*, juga *S. epidermidis*, yang mengkolonisasi saluran pencernaan bayi yang baru lahir menjadi penyebab atas sepsis onset lambat pada neonatus prematur (Soeorg dkk., 2013). Selain itu, strain *S. haemolyticus* yang resisten terhadap vankomisin dan teikoplanin tercatat pada pasien dengan leukemia myelogenous yang menderita episode septik selama dalam penggunaan sitostatika. Selanjutnya, isolat *S. haemolyticus* yang menyebabkan wabah di Italia resisten terhadap linezolid. Bakteri kolonisasi kulit yang resisten terhadap berbagai obat ini tidak hanya berisiko terhadap munculnya dan penyebaran infeksi nosokomial tetapi juga dapat menginfeksi petugas kesehatan dan pengunjung pasien (Eltwisy dkk., 2022).

*S. haemolyticus* dapat menahan paparan bahan kimia seperti saat dilakukan disinfeksi. Tipe molekuler dari infeksi yang disebabkan oleh MRSH yang diteliti selama periode 3 tahun dari ICU neonatal mengungkapkan bahwa *S. haemolyticus* dapat bertahan hidup dalam larutan disinfektan yang akibatnya dapat bertindak sebagai reservoir untuk menginfeksi bayi baru lahir. Faktor-faktor yang mempengaruhi kelangsungan hidup dan penyebaran isolat *S. haemolyticus* yang resisten terhadap berbagai obat di rumah sakit belum diketahui secara pasti. Bouchami dan rekannya melaporkan bahwa *insertion sequence transposition* (terutama *IS1272*) dan proses penataan ulang dan rekombinasi kromosom pada *S. haemolyticus* merupakan salah satu strategi yang membantu dalam evolusi,

adaptasi, patogenesis, dan kelangsungan hidup bakteri di rumah sakit, sehingga menyebabkan infeksi nosokomial (Bouchami dkk., 2011; Mekni dkk., 2012).

### 2.3 Tinjauan tentang *Pseudomonas stutzeri*

#### 2.4.1 Klasifikasi *Pseudomonas stutzeri*

Kerajaan	: Bacteria
Subkerajaan	: Negibacteria
Filum	: Proteobacteria
Kelas	: Gammaproteobacteria
Ordo	: Pseudomonadales
Suku	: Pseudomonadaceae
Marga	: <i>Pseudomonas</i>
Jenis	: <i>Pseudomonas stutzeri</i> (ITIS, 2012)

#### 2.4.2 Sejarah *Pseudomonas stutzeri*

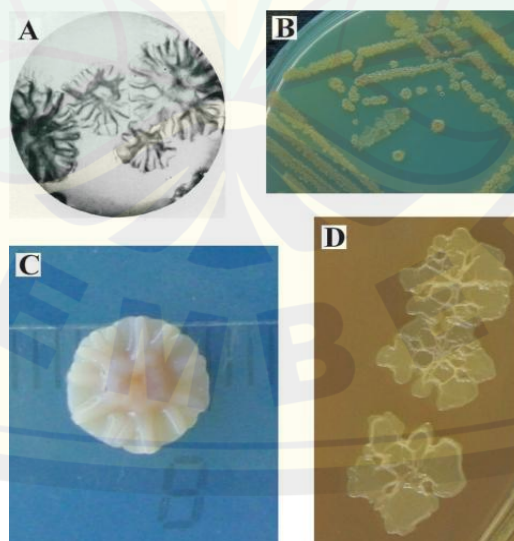
*Pseudomonas stutzeri* pertama kali dijelaskan oleh Burri dan Stutzer pada tahun 1895 sebagai *Bacillus denitrificans II*. Tujuh tahun kemudian pada tahun 1902, Itersen mengembangkan metode isolasi *Pseudomonas stutzeri*, yang dideskripsikan oleh van Niel dan Allen pada tahun 1952. Nama-nama berbeda yang diperoleh denitrifier ini sejak penemuannya didokumentasikan dalam publikasi van Niel dan Allen, di antaranya yaitu *Bacterium stutzeri*, *Bacillus nitrogenes*, *Bacillus stutzeri*, *Achromobacter sewerinii*, *Pseudomonas stutzeri*, dan *Achromobacter stutzeri*. Spesies *Pseudomonas stanieri* diusulkan pada tahun 1966 oleh Mandel untuk strain tersebut dengan kandungan G+C sekitar 62%. Namun, tidak ada perbedaan fenotip antara *P. stutzeri* dan *P. stanieri* (Gomila dkk., 2015).

Media pertumbuhan dengan nitrat 2% dan tartrat dalam kondisi anaerobik pada suhu 37°C menjadi media pertumbuhan populasi dominan *P. stutzeri* dari sampel *Pseudomonas stutzeri* telah berhasil diisolasi dari berbagai asal, seperti cairan spinal, jerami, pupuk kandang, tanah, dan air saluran (Lalucat dkk., 2006; Park dkk., 2013).

### 2.4.3 Karakteristik *Pseudomonas stutzeri*

*Pseudomonas stutzeri* adalah bakteri gram negatif, berbentuk batang yang umumnya memiliki ukuran panjang 1–3  $\mu\text{m}$  dan lebar 0,5–0,8  $\mu\text{m}$ . Hasil tes katalase dan oksidase pada *P. stutzeri* adalah positif. Selain itu, strain *P. stutzeri* didefinisikan sebagai denitrifier. *P. stutzeri* tumbuh optimal pada suhu sekitar 35°C, menjadikannya sebagai organisme mesofilik, meskipun mampu untuk tumbuh pada suhu 4°C–44°C (Lalucat dkk., 2006). Ketika ditumbuhkan pada media Luria Bertani (LB) pada suhu 32 °C, bakteri ini memiliki waktu penggandaan sekitar 53 menit. Ketika suhu inkubasi diturunkan hingga 28°C, waktu penggandaan populasi bakteri ini menjadi lebih lama dan dapat mencapai 72 menit (Sommer dkk., 2017).

Ketika diamati pada media padat, bakteri ini memiliki koloni yang kering dan kaku yang saling menempel begitu erat sehingga seringkali lebih mudah untuk mengambil seluruh koloni dibandingkan hanya sebagian. Warna koloni yang terbentuk biasanya coklat, meskipun dapat beragam tergantung pada media pertumbuhan yang digunakan. Koloni umumnya berbentuk menyerupai struktur karang seperti pada Gambar 2.2. Koloni yang ditumbuhkan pada suhu 30°C dan disimpan pada suhu 4°C selama 24 jam sering menunjukkan morfologi koloni dengan kerutan yang khas.



Gambar 2.2 Morfologi *Pseudomonas stutzeri*  
(Sumber: Lalucat dkk., 2006)

*Pseudomonas stutzeri* tumbuh paling baik pada media yang mengandung NaCl 2%, meskipun bakteri ini dapat mentolerir salinitas berkisar antara 1–5% NaCl. Bakteri ini lebih menyukai pH netral, pH 7, tetapi dapat tumbuh pada pH setinggi 9 (Seip dkk., 2011). *P. stutzeri* memiliki pili tipe IV dan flagel pada satu sisi yang membantu motilitas bakteri ini. Dalam kondisi tertentu, satu atau dua flagel lateral dengan panjang gelombang pendek dapat terlihat pada *Pseudomonas stutzeri* (Mell dan Redfield, 2014).

Spesies yang berkerabat dekat dengan *P. stutzeri* adalah *P. balearica*. Bakteri tersebut memiliki banyak sifat fenotipik dasar yang sama dengan strain *P. stutzeri*, termasuk dalam cabang filogenetik 16S rRNA yang sama. Namun, secara kemotaksonomi dapat dibedakan dari *P. stutzeri* melalui kemampuannya untuk tumbuh di atas 42°C dan dengan beberapa uji biokimia lainnya (Lalucat dkk., 2022).

## 2.4 Metode Pengujian Pembentukan Biofilm

### 2.4.1 Metode Congo Red Agar (CRA)

Deteksi pembentukan biofilm stafilocokus dapat dilakukan dengan menggunakan berbagai metode fenotipik. Pengujian dengan media Congo Red Agar (CRA) yang dikembangkan oleh Freeman dkk. tahun 1989 berdasarkan subkultur strain bakteri pada media brain heart infusion agar (BHIA) yang dilengkapi dengan sukrosa dan pewarna merah Congo. Penelitian dengan metode ini menunjukkan bahwa akurasi rendah, tetapi murah, sederhana, dan mudah dilakukan. Kriteria evaluasi hasil pengujian didasarkan pada analisis visual warna koloni yang tumbuh pada agar (Kaiser dkk., 2013).

Interpretasi hasil menurut metode CRA adalah jika *strain* bakteri menghasilkan koloni hitam pekat, hitam, dan hitam kemerahan, maka bakteri uji tersebut dianggap sebagai bakteri yang dapat menghasilkan *slime* atau *biofilm producer*, sedangkan koloni merah dan kemerahan tergolong sebagai bakteri yang tidak menghasilkan *slime* atau *nonbiofilm producer* (Halim dkk., 2018).

#### 2.4.2 Metode Tabung

Metode tabung merupakan uji kualitatif untuk mendeteksi mikroorganisme penghasil biofilm, dijelaskan oleh Christensen dkk. (1985). Secara sederhana, isolat diinokulasi dalam tabung reaksi polistirena yang berisi TSB dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Isolat yang biofilmnya terbentuk pada dinding tabung reaksi kemudian polistirena diwarnai dengan safranin selama 1 jam, setelah sel planktonik dibuang dengan pembilasan dua kali menggunakan *phosphate buffered saline* (PBS). Kemudian, tabung reaksi polistirena yang diwarnai safranin dibilas dua kali dengan PBS untuk menghilangkan noda. Setelah proses pengeringan tabung uji, terjadinya pembentukan biofilm diamati secara visual, biofilm akan terlihat melapisi dinding pada bagian bawah tabung (Kirmusaoğlu, 2019).

#### 2.4.3 *Microtiter Plate Biofilm Assay*

Uji mikrotiter memungkinkan klasifikasi biofilm yang dihasilkan isolat *staphylococcal* dengan mudah dan kuantitatif. *Microtiter plate assay* mengevaluasi pembentukan biofilm pada dinding dan/atau dasar *microplate*. Metode uji ini telah digunakan untuk menilai pembentukan biofilm awal untuk berbagai macam mikroba, termasuk *pseudomonad*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *staphylococci*, *enterococci*, *mycobacteria*, dan jamur.

Metode ini memiliki keuntungan yang memungkinkan para peneliti menganalisis dengan cepat adhesi beberapa strain bakteri atau kondisi pertumbuhan dalam setiap percobaan. Kekurangan utama dari metode ini adalah kemungkinan inkonsistensi yang dihasilkan oleh parameter penilaian tingkat biofilm pada pengujian; yaitu adsorpsi *kristal violet* dalam larutan *destaining* yang menjadi indikasi jumlah biofilm.

#### 2.4.4 Pengamatan Biofilm secara Mikroskopis

Pemindaian kompleksitas biofilm dapat diamati dengan *biofilm imaging optical technology* yang meliputi mikroskop cahaya, *scanning electron microscope* (SEM), *transmission electron microscope* (TEM), dan *confocal laser*

*scanning microscopy* (CLSM). Teknik mikroskopis ini dapat digunakan untuk memvisualisasikan struktur 3D dan memeriksa keberadaan biofilm yang diperoleh dari perbesaran dan resolusi tinggi (Kırmusaoğlu, 2019).

## **2.5 Tinjauan tentang Produk Ekstraseluler Bakteri Laut**

### **2.5.1 Potensi Bakteri Laut sebagai Agen Antibiofilm**

Saat ini, sekitar 40–50% obat komersial diformulasikan dari bahan kimia alami. Selama beberapa dekade terakhir, banyak penelitian yang memusatkan perhatian pada senyawa bioaktif laut dari berbagai sumber, termasuk mikroorganisme laut (Spellberg dan Shlaes, 2014).

Ekosistem laut merupakan lingkungan yang potensial untuk menghasilkan senyawa bioaktif. Beberapa metabolit alami yang dihasilkan oleh biota laut diteliti efektif dalam mengendalikan biofilm yang merugikan (Xiao dan Zheng, 2016). Bakteri epibiotik laut hidup dalam lingkungan yang sangat kompetitif sehingga lingkungan ekstrem ini memicu pembentukan senyawa bioaktif yang berperan penting dalam ekologi laut. Beberapa senyawa dengan aktivitas antimikroba dan antibiofilm telah berhasil diisolasi dari spons laut, ganggang, ascidia, rumput laut, bintang laut, dan pansy laut. Selain itu juga semakin banyak penelitian untuk membuktikan bahwa bakteri biologis laut berpotensi dalam produksi antimikroba terkait dengan metabolit yang diisolasi dari mikroorganisme tersebut (Dusane dkk., 2013).

Mikroorganisme laut dengan kemampuan adaptasinya terhadap berbagai kondisi ekstrem telah mengembangkan jalur metabolisme yang beragam, termasuk metabolit ekstraseluler aktif yang tidak terdapat dalam ekosistem terestrial. Senyawa bioaktif dari bakteri laut sering diproduksi sebagai metabolit sekunder, seperti alkaloid, steroid, terpenoid, peptida, dan poliketida (Stincione dan Brandelli, 2020).

Kemampuan bakteri laut dengan spesies yang berbeda untuk mensintesis molekul bioaktif dimungkinkan merupakan hasil dari tekanan selektif yang dikenakan pada bakteri ini. Salah satu strategi bertahan hidup yang dikembangkan



dapat diwakili oleh produksi metabolit dengan aktivitas antibiofilm, yang dapat dimanfaatkan untuk melawan persaingan biologis dengan bakteri lain. Penelitian terbaru yang mengamati bahwa bakteri laut Antartika *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125 menghasilkan beberapa senyawa bioaktif termasuk molekul yang mampu menghambat biofilm patogen manusia *Staphylococcus epidermidis* (Papaleo dkk., 2013; Parrilli dkk., 2015). Aktivitas dari senyawa yang diekskresikan bakteri ini dapat mengganggu perkembangan biofilm dan memisahkan biofilm tanpa mempengaruhi viabilitas bakteri, menunjukkan bahwa mekanismenya secara khusus mengarah pada penghancuran biofilm. Pada beberapa penelitian terkait uji aktivitas antibiofilm dari metabolit ekstraseluler bakteri laut seringkali melakukan pengujian awal untuk memastikan bahwa aktivitas antimikroba negatif, karena pengujian negatif pada aktivitas antimikroba merupakan parameter penting untuk menyimpulkan bahwa target penghambatan *quorum sensing* adalah pada pensinyalan bakteri dan tidak terfokus pada aktivitas antibakteri (Magdalena dkk., 2020).

#### 2.5.2 Ekstraksi *Extracellular Polymeric Substances* (EPS)

*Extracellular Polymeric Substances* (EPS) adalah campuran kompleks, terdiri dari polisakarida, protein, asam nukleat, (fosfo)lipid, zat humat dan beberapa polimer antar sel. Zat polimer ini berinteraksi satu sama lain melalui gaya elektrostatis, ikatan hidrogen, gaya ionik yang menarik dan/atau reaksi biokimia untuk membentuk struktur jaringan tersier yang padat (More dkk., 2014).

Berbagai metode diterapkan untuk menghasilkan eksoproduk atau EPS dari mikroorganisme. Namun, karena kompleksitasnya yang beragam, hampir tidak mungkin memproduksi semua komponen EPS dengan metode tunggal. Sampai saat ini, tidak ada satu metode spesifik untuk produksi EPS. Pilihan metode ekstraksi tidak hanya mempengaruhi jumlah total rendemen presipitat yang dihasilkan, tetapi juga komposisi polimer yang diperoleh (Felz dkk., 2016).

Metode ekstraksi EPS terdiri dari metode fisika dan kimia untuk menghasilkan EPS dari berbagai sumber yang beragam, seperti suspensi sel,

biofilm, pengendapan, permukaan padat atau cair. Ekstraksi dengan metode fisika di antaranya yaitu menggunakan sentrifugasi, sonikasi, evaporasi vakum, pemanasan, *freeze-thawing*, ultrafiltrasi, dialisis. Sedangkan metode kimia adalah penggunaan agen kimiawi untuk presipitasi, seperti etanol, aseton, metanol, isopropilalkohol, formaldehid, NaOH, *trichloroacetic acid* (TCA), dan EDTA (Leroy dan De Vuyst, 2016; Andhare dkk., 2017; Rahmadini, 2018; Ziadi dkk., 2018).

Metode yang sering digunakan untuk ekstraksi EPS adalah gabungan dari metode fisika dan kimia. Sentrifugasi dan ultrafiltrasi menjadi metode yang digunakan dalam *pretreatment* sebelum dilakukan presipitasi dengan pelarut organik (etanol atau aseton) dingin untuk menghasilkan presipitat kasar (*crude extract*) eksoproduk mikroorganisme. Purifikasi dilakukan dengan dialisis dan liofilisasi presipitat yang diresuspensi dengan air destilasi atau larutan *buffer* (Bajpai dkk., 2016; Leroy dan De Vuyst, 2016; Wu dkk., 2016; Andhare dkk., 2017).

Pada penelitian ini dipilih metode sentrifugasi, presipitasi etanol, dan presipitasi amonium sulfat. Presipitasi dengan pelarut etanol dipilih karena dilaporkan secara luas bahwa etanol dapat secara efisien mengendapkan beberapa EPS mikroba dengan volume yang dibutuhkan dua—tiga kali atau lebih dari volume supernatan (Osińska-Jaroszuk dkk., 2014; Bajpai dkk., 2016) dan mampu menghasilkan presipitat berupa polimer dengan berat molekul yang tinggi (Ziadi dkk., 2018).

## **2.6 Tinjauan tentang Produk Ekstraseluler *Pseudomonas stutzeri* sebagai Agen Antibiofilm**

Pembentukan biofilm dikaitkan dengan virulensi bakteri patogen dan sel bakteri yang membentuk biofilm umumnya lebih resisten (hingga 1.000 kali lipat) terhadap antibiotik dan disinfektan dibandingkan bakteri yang hidup bebas (sel planktonik). Oleh karena itu, biofilm menjadi perhatian utama dalam bidang kedokteran dan medis. Namun, pembentukan biofilm juga dapat merugikan dan

merupakan sumber kontaminasi bagi manusia dan hewan (industri makanan, menara pendingin, dan pipa air, dll.) atau menyebabkan kerugian ekonomi (*biofouling* perahu dan biokorosi material, dll.). Oleh karena itu, penemuan agen antibiofilm menjadi perhatian utama dan saat ini merupakan bidang penelitian yang penting, utamanya untuk menemukan molekul atau organisme antibiofilm yang ramah lingkungan (Gandhi dkk., 2017).

Tren terbaru dalam penelitian anti infeksi bakteri adalah tentang mekanisme molekuler pembentukan dan produksi biofilm serta pengaturan faktor virulensi pada *S. haemolyticus*. Sehingga penelitian-penelitian terbaru ini membuka jalan bagi pengembangan sejumlah terapi yang bersifat “antibiofilm”. Strategi ini menargetkan molekul fungsional, sistem gen, dan sirkuit pengatur yang mengontrol keseluruhan pembentukan biofilm yang mengarah pada etiologi infeksi terkait perangkat medis. Penelitian saat ini berfokus pada berbagai pendekatan antibiofilm untuk pengobatan dan pencegahan infeksi terkait perangkat medis yang disebabkan bakteri patogen, salah satunya dikarenakan oleh *S. haemolyticus*. Strategi terapeutik ditujukan pada disintegrasi biofilm yang sudah matang dan gangguan pada *quorum sensing* yang mengarah pada penurunan regulasi molekul pada penstabilan struktur biofilm, atau penggunaan enzim untuk meluruhkan matriks biofilm (Hrynyshyn dkk., 2022).

Kondisi laut dengan kedalaman rata-rata 3,8 km, tekanan rata-rata 38MPa (setara dengan 375 atm) dan suhu rata-rata 2°C mengakibatkan keberadaan berbagai habitat laut memiliki kemampuan menyesuaikan kondisi ekstrem pada ekosistem laut dan menjadi alasan bakteri laut seperti *Pseudomonas stutzeri* memiliki komponen produk ekstraseluler, utamanya eksopolisakarida dengan struktur yang khas. Dengan analisis glikosil, eksopolisakarida *P. stutzeri* menunjukkan keberadaan gugus gula dan amino netral pada spektrum IR (Wu dkk., 2016).

Beberapa penelitian terkait pengujian aktivitas antibiofilm yang secara spesifik meneliti penghambatan pembentukan biofilm dan penghancuran atau degradasi biofilm tanpa adanya aktivitas bakterisidal, di antaranya yaitu seperti supernatan kultur *Pseudoalteromonas sp. strain D41*, polisakarida dari supernatan

kultur *E. coli* CFT073, biosurfaktan kultur *Bacillus circulans*, *quorum-sensing inhibitor*, eksopolisakarida supernatan kultur *P. stutzeri* 273, dan supernatan *Vibrio sp.* dan *Pseudomonas sp.* (Dos Santos dan Dias-Souza, 2016; Wu dkk., 2016; Magdalena dkk., 2020).

Komposisi senyawa antibiofilm yang berasal dari bakteri tersebut dapat berasal dari polisakarida, protein, dan asam nukleat (Magdalena dkk., 2020). Apabila senyawa uji sensitif terhadap panas (50°C) dan proteinase K, seperti pada penelitian Dheilily dkk. (2010) dan Klein dkk. (2011) menunjukkan bahwa molekul antibiofilm yang digunakan cenderung mengandung protein.

Supernatan dari beragam *strain* bakteri laut menunjukkan aktivitas antibiofilm dengan senyawa aktifnya mulai dari furanon hingga polisakarida kompleks yang digambarkan sebagai penghambat *quorum sensing* yang potensial. Eksopolisakarida yang dihasilkan dari ekstraksi matriks ekstraseluler *Pseudomonas stutzeri* seperti pada penelitian Wu dkk. (2016), dapat diidentifikasi sebagai molekul asing oleh bakteri patogen karena ukuran atau muatannya yang besar, sehingga eksopolisakarida bakteri laut tidak dapat melewati atau diangkut oleh patogen ke dalam lingkungan mikrokoloni dan akibatnya tidak dapat memberikan efek di dalam sel bakteri patogen, sehingga aktivitas penghambatan pembentukan biofilm yang terjadi pada permukaan abiotik seringkali terjadi tanpa mempengaruhi vitalitas bakteri (Jiang dkk., 2011; Spanò dkk., 2016; Abdalla dkk., 2021).

Dari beberapa penelitian terkait mekanisme antibiofilm dari polisakarida, dapat disimpulkan bahwa polisakarida menunjukkan aktivitas antibiofilm dengan aktif mendispersi pembentukan biofilm. Sedangkan asam nukleat dapat menghambat pembentukan biofilm dengan mencegah penempelan sel planktonik bakteri menempel pada permukaan polimer. Sementara itu, protein seperti peptida antimikroba, dapat mendisintegrasi lipopolisakarida dan mengubah permeabilitas membran, serta mengganggu proses pembelahan sel. Enzim polisakarida lyase dan glikosida hidrolase dapat menghancurkan susunan polisakarida ekstraseluler dari biofilm bakteri patogen, sedangkan DNase I mampu mendigesti DNA

ekstraseluler dalam struktur biofilm (Rendueles dkk., 2013; Roy dkk., 2018; Magdalena dkk., 2020).

### 2.7 Uji Aktivitas Antibiofilm dengan Metode Kolorimetri

Uji aktivitas antibiofilm memiliki dua model studi *in vitro*, yaitu metode *static* dan *flow*. Pada metode *flow*, biofilm ditumbuhkan dengan proses yang berkelanjutan dari penumbuhan kultur pada media segar, sedangkan metode *static* hanya menggunakan kultur batch. Metode *flow* terdiri dari *Kadouri drip-fed*, *Modified Robbins Device (MRD)*, *Tubular Capillary Electrochromatography (CEC)*, *FC270 flow-cell system*, *microfluidic devices*. Sedangkan yang termasuk ke dalam metode *static* adalah metode kolorimetri, fluorometri, dan magnetik (Bueno, 2011).

Penelitian ini menggunakan metode *static* kolorimetri. Pengujian biofilm statis biasanya memungkinkan untuk penggunaan *microplate 96-well* dan perlakuan pada *high-throughput screening*. Kemudahan penggunaan, serta biaya yang relatif rendah menjadikan metode berbasis pewarna (kolorimetri) sering digunakan untuk mengukur pertumbuhan biofilm dalam pengujian pelat mikro statis. Metode berbasis pewarna seperti safranin, serta pewarna metabolik, seperti pewarna berbasis tetrazolium atau pewarna resazurin, dan label fluoresen lainnya dapat juga digunakan untuk proses lanjutan yang bersifat *high-throughput*. Namun, metode pewarnaan dengan kristal violet (KV) yang awalnya dijelaskan oleh O'Toole dan Kolter pada tahun 1998 untuk mengidentifikasi mutan yang kekurangan biofilm saat ini telah menjadi “*gold standard*” untuk mengukur biofilm dalam pelat mikrotiter. Metode ini adalah pengujian yang murah, relatif mudah, dapat digunakan untuk organisme Gram-positif dan Gram-negatif, serta cocok untuk pengukuran kualitatif dan kuantitatif biofilm (Haney dkk., 2018).

Metode konvensional dengan pewarnaan kristal violet (KV) memiliki runtutan prosedur: pencucian, ekstraksi KV, dan pengukuran absorbansi KV pada panjang gelombang 590—595 nm (Bueno, 2011).

## 2.8 Uji Kandungan Produk Ekstraseluler *P. stutzeri* dengan Reagen Lugol dan Bradford

Sel mikroba (bakteri, archaea, mikroeukariotik) di lautan mampu menghasilkan beragam molekul besar yang secara kolektif disebut *extracellular polymeric substances* (EPS) atau ekso-polimer. Sekresi ekso-polimer ini memfasilitasi perlekatan pada permukaan yang mengarah pada pembentukan komunitas “biofilm” yang terstruktur sebagai pertahanan di bawah kondisi lingkungan ekstrem pada perairan terbuka. EPS yang disekresikan bakteri laut dapat mengandung berbagai molekul seperti polisakarida, protein, lipid, dan bahkan asam nukleat. Secara teoritis, berdasarkan penelitian Wu dkk. (2016), ekso-polimer yang dipresipitaskan dari *Pseudomonas stutzeri* menunjukkan adanya senyawa organik protein dan gula pada spektrum FT-IR. Identifikasi polisakarida dan protein pada penelitian ini dilakukan secara kualitatif menggunakan penetesan reagen Lugol dan Bradford.

Lugol iodine, juga dikenal sebagai larutan Lugol merupakan reagen untuk deteksi pati (*starch*) yang digunakan di laboratorium dan tes medis. Larutan ini digunakan sebagai indikator adanya pati dalam senyawa organik. Lugol iodine yang bereaksi dengan pati menghasilkan warna biru kehitaman dari interaksi antara unsur iodine dan polisakarida. Larutan Lugol tidak akan mendeteksi gula sederhana seperti glukosa atau fruktosa (Valls dkk., 2012; Pronk dkk., 2017).

Ada banyak metode yang digunakan untuk menentukan kandungan protein dalam sampel. Di antara metode yang ada, metode yang paling umum digunakan adalah metode Bradford, Lowry, dan *bicinchoninic acid* (BCA). Metode Bradford merupakan metode yang sederhana, terdiri dari penambahan sampel protein dengan volume tertentu pada reagen Bradford asam yang mengandung pewarna Coomassie Brilliant Blue G-250. Sampel dan protein standar ditambahkan ke reagen Bradford dan diinkubasi dalam waktu singkat, yaitu 10–30 menit, pada suhu kamar atau 37°C (untuk mengurangi waktu reaksi yang diperlukan). Selama inkubasi ini, protein mengikat pewarna menghasilkan pergeseran spektral dari coklat (absorbansi sekitar 465 nm) menjadi biru (absorbansi optimal sekitar 595 nm). Sifat kimia yang unik dari pewarna ini memungkinkan reagen Bradford

berinteraksi dengan rantai samping, gugus-R, dan/atau asam amino tertentu. Interpretasi berasal dari korelasi antara adanya warna biru dan jumlah protein dalam sampel: semakin banyak protein, semakin pekat warna biru yang muncul. Kesederhanaan pengujian dengan reagen Bradford memungkinkan hasil diukur secara kualitatif dengan mata atau secara kuantitatif dengan spektrofotometer (Wilson dkk., 2017).

## **2.9 Elektroforesis Protein**

Elektroforesis digunakan untuk memisahkan campuran kompleks protein (misalnya, dari sel, fraksi subseluler, fraksi kolom, atau imunopresipitat), menyelidiki komposisi subunit, memverifikasi homogenitas sampel protein, dan memurnikan protein untuk digunakan dalam penelitian lebih lanjut. Dalam elektroforesis gel poliakrilamida, protein bermigrasi sebagai respons terhadap medan listrik melalui pori-pori dalam matriks gel poliakrilamida; ukuran pori berkurang dengan meningkatnya konsentrasi akrilamida. Kombinasi ukuran pori dan muatan protein, ukuran, dan bentuk menentukan laju migrasi protein (Gallagher, 2012).

**BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN**

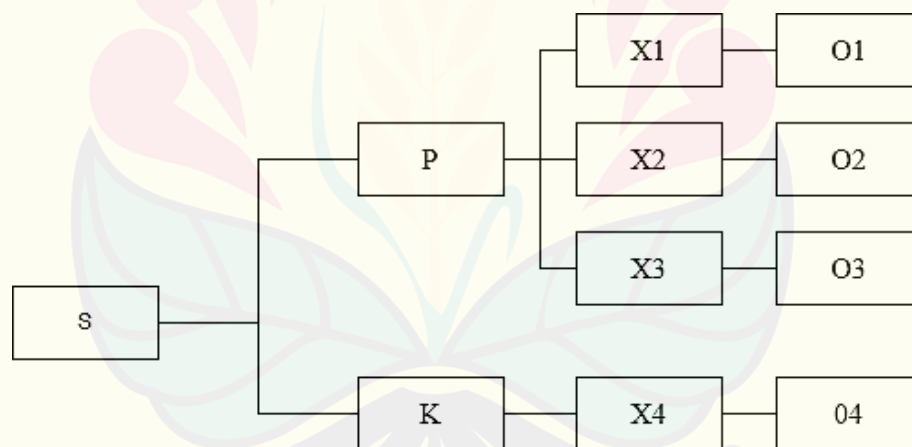
**3.1 Jenis Penelitian**

Uji aktivitas antibiofilm produk ekstraseluler *Pseudomonas stutzeri* terhadap isolat bakteri *S. haemolyticus* ini merupakan penelitian *true experimental laboratories*.

**3.2 Rancangan Penelitian**

Rancangan penelitian yang dipilih pada penelitian ini adalah *post-test only control group design*. Dalam rancangan penelitian ini, baik kelompok perlakuan maupun kelompok kontrol tidak dipilih secara acak.

Rancangan penelitian ditunjukkan pada Gambar 3.1:



Gambar 3.1 Rancangan penelitian

Keterangan:

S = sampel

P = kelompok perlakuan

K = kelompok kontrol

X1 = supernatan bebas sel *P. stutzeri*

X2 = presipitat etanol *P. stutzeri*

X3 = presipitat amonium sulfat *P. stutzeri*

X4 = *buffer* Tris-Cl (kontrol negatif)

O1 = data perlakuan supernatan bebas sel *P. stutzeri*

O2 = data perlakuan presipitat etanol *P. stutzeri*

O3 = data perlakuan presipitat amonium sulfat *P. stutzeri*

O4 = data perlakuan *buffer* Tris-Cl (kontrol negatif)



### 3.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Bagian Biologi Farmasi dan Laboratorium Farmakologi Bagian Farmasi Klinik dan Komunitas Fakultas Farmasi Universitas Jember dimulai pada November 2022–selesai.

### 3.4 Alat dan Bahan Penelitian

Alat yang digunakan adalah alat gelas, cawan petri, *microtube*, jarum ose, *incubated and refrigerated shaker* (ThermoScientific), inkubator (Clifton), autoklaf (ALP CL-32L), mikroskop (Olympus CX21), mikropipet, pinset, jangka sorong, *microplate 96-well plate U*, *microplate 96-well plate flat*, *absorbance microplate reader* (DIALAB), pipet tetes, pembakar spiritus, *object glass*, *yellow tip*, *blue tip*, *white tip*, filter 0,45  $\mu\text{m}$ , membran dialisis (Carolina Biological), plat tetes, spatula logam, *microcentrifuge* (Hermle), *laminar air flow* (Airtech), *Biological Safety Cabinet* (ThermoScientific), neraca analitik, seperangkat alat elektroforesis SDS-PAGE (kaca pencetak gel, alat pencetak sumuran, bejana elektroforesis, *power supplies*) (ThermoFisher Scientific).

Bahan yang digunakan dalam penelitian adalah stok gliserol bakteri *Pseudomonas stutzeri* yang ditumbuhkan pada *Luria Bertani* (LB) Agar dan media pemupuk *LB Broth*. Bahan kimia yang digunakan adalah etanol 96%, akuades steril, amonium sulfat, *buffer Tris-Cl* pH 9, *buffer fosfat* pH 8, kristal violet 0,4%, reagen Lugol, reagen Bradford, *Bovine Serum Albumin*, amilum, *glukosa* 1%, *separating buffer*, *stacking buffer*, akrilamid, bisakrilamid, SDS 10%, TEMED, APS 10%, larutan *staining* (*Coomassie Brilliant Blue G-250*; metanol; asam asetat; akuades), larutan *destaining* (metanol; asam asetat; akuades), *loading buffer*, *Protein Ladder* (*ThermoScientific 10 to 260 kDa Multicolor Broad Range Protein Ladder*), dan *McFarland* 0,5. Bakteri uji yang

digunakan adalah *Staphylococcus haemolyticus*, dengan menggunakan media *Nutrient Agar* dan *Tryptic Soy Broth* (TSB).

### 3.5 Variabel Penelitian

#### 3.7.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah produk ekstraseluler *P. stutzeri* yang terdiri dari supernatan bebas sel, presipitat amonium sulfat, dan presipitat etanol *P. stutzeri* dengan volume uji tiap kelompok 40, 60, dan 80  $\mu\text{L}$ .

#### 3.7.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah absorbansi perlakuan dengan supernatan bebas sel, presipitat amonium sulfat, dan presipitat etanol *P. stutzeri* terhadap *Staphylococcus haemolyticus* pada media TSB+Glukosa 1% menggunakan *microplate reader*.

#### 3.7.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Produksi produk ekstraseluler *Pseudomonas stutzeri*
- b. Media pertumbuhan *Pseudomonas stutzeri*
- c. Media pertumbuhan *Staphylococcus haemolyticus*
- d. Suhu dan waktu inkubasi
- e. Sterilisasi alat dan bahan
- f. Prosedur pengujian
- g. Pengukuran dan pengamatan respon *microplate reader*

### 3.6 Definisi Operasional

Definisi operasional dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. *Pseudomonas stutzeri* diisolasi dari lingkungan Pantai Bandalit, Kabupaten Jember dan telah dilakukan identifikasi secara makroskopis, mikroskopis, biokimia, dan molekuler menggunakan 16S rRNA.
- b. Produk ekstraseluler *P. stutzeri* yang digunakan pada penelitian ini meliputi supernatan bebas sel, presipitat etanol yang telah diuapkan dan diresuspensi dengan *buffer* Tris-Cl (pH 9,0), dan presipitat amonium sulfat yang telah dilakukan dialisis dengan penambahan *buffer* Tris-Cl (pH 9,0).
- c. Volume uji sampel pada perlakuan uji aktivitas antibiofilm menggunakan satuan mikroliter ( $\mu\text{L}$ ) dengan mengambil supernatan bebas sel *P. stutzeri* atau presipitat yang telah diresuspensi menggunakan *buffer* Tris-Cl (pH 9,0).
- d. Uji aktivitas antibiofilm bertujuan untuk menilai potensi sampel (produk ekstraseluler *P. stutzeri*) dalam menghambat pembentukan biofilm dan mendegradasi biofilm yang telah terbentuk melalui *microtiter plate assay* menggunakan instrumen *microplate reader* pada panjang gelombang 595 nm.
- e. Bakteri uji yang digunakan pada penelitian ini adalah isolat klinis *Staphylococcus haemolyticus* yang diambil dari sampel darah pasien NICU RS Paru Jember dan telah dilakukan identifikasi dan uji sensitivitas antibiotik (resisten terhadap 90 jenis antibiotik dan sensitif terhadap 4 jenis antibiotik) terlihat pada Lampiran 1.

### 3.7 Prosedur Penelitian

#### 3.7.1 Peremajaan Isolat Bakteri *Pseudomonas stutzeri*

Isolat bakteri *Pseudomonas stutzeri* dari stok gliserol (-80°C) ditumbuhkan dengan mengambil isolat bakteri sekitar 2 ose dan menggoreskannya secara aseptis di dalam LAF dengan *streak plate* 4 kuadran pada media *LB agar*. Kemudian biakan bakteri diinkubasi pada inkubator dengan pengaturan suhu 37°C selama 48 jam hingga didapatkan koloni tunggal. Jika telah didapatkan koloni tunggal, hasil peremajaan bakteri dapat disimpan pada lemari pendingin (4°C).

#### 3.7.2 Produksi Supernatan Bebas Sel dan Presipitat Produk Ekstraseluler *Pseudomonas stutzeri*

Koloni tunggal *Pseudomonas stutzeri* diinokulasikan pada 5 mL *LB broth* dan disamakan kekeruhannya dengan *McFarland* 0,5 dalam tabung reaksi steril sebagai *starter*, diinkubasi pada *shaking incubator* dengan pengaturan suhu 28°C dan kecepatan 120 rpm selama ±12 jam (*overnight*). *Starter Pseudomonas stutzeri* yang telah tumbuh, ditandai dengan media yang semakin keruh, diambil masing-masing sebanyak 2,5 mL dan dimasukkan ke dalam dua Erlenmeyer 250 mL yang berisi media *LB Broth* 50 mL (1:50) dan diinkubasi dengan pengaturan suhu 28°C dan kecepatan 120 rpm selama ±48 jam untuk produksi presipitat produk ekstraseluler. Supernatan bebas sel dari kultur *Pseudomonas stutzeri* dihasilkan dari dua kali sentrifugasi 12.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C dan dilakukan filtrasi menggunakan pori 0,45 µm (Wu dkk., 2016; Wu dkk., 2017; Magdalena dkk., 2020; Chbel dkk., 2022).

Supernatan bebas sel diambil dan ditambahkan etanol 96% dingin sebanyak 2 kali volume supernatan. Campuran diinkubasi semalaman pada suhu 4°C. Setelah didiamkan semalaman, campuran disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Presipitat kemudian dikeringkan dari etanol yang tersisa dengan cara diuapkan untuk mendapatkan presipitat etanol yang digunakan pada penelitian ini (Bajpai dkk., 2016). Presipitat kasar eksoproduk *P. stutzeri* yang diproduksi dengan metode presipitasi amonium sulfat dimulai dari presipitasi supernatan bebas sel dengan amonium sulfat jenuh 80%

sedikit demi sedikit pada suhu 4°C dan pengadukan 150 rpm selama 60 menit, amonium sulfat yang digunakan sesuai dengan tabel presipitasi amonium sulfat yang tertera pada Lampiran 2. Setelah mencapai konsentrasi jenuh, kemudian supernatan yang dipresipitasi tersebut disentrifugasi dan pelet yang dihasilkan dilarutkan dalam 50 mM NaCl dalam 20 mM Tris-HCl (pH 9,0). Selanjutnya, dilakukan dialisis larutan presipitat selama 24 jam dengan penggantian *buffer* Tris-Cl pada jam ke-1, ke-2, dan jam ke-12. Dialisat yang dihasilkan merupakan presipitat eksoproduk atau produk ekstraseluler *P. stutzeri* dengan metode presipitasi amonium sulfat (Duong-Ly dan Gabelli, 2014; Wu dkk., 2016; Ulfa dkk., 2017).

### 3.7.3 Pembuatan Larutan Uji

Volume larutan uji yang dibuat sebesar 10 mL. Larutan uji terdiri dari supernatan bebas sel hasil sentrifugasi kultur *P. stutzeri* serta presipitat etanol dan amonium sulfat *P. stutzeri* yang telah diresuspensikan dengan *buffer* Tris-Cl (pH 9,0) dengan volume 100—150 µL (Wu dkk., 2016).

### 3.7.4 Sterilisasi Alat dan Bahan

Semua alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian sebelumnya dilakukan sterilisasi. Proses sterilisasi dimulai dengan mempersiapkan alat yang akan disterilisasi dan dibungkus dengan kertas kayu. Kemudian alat dan bahan dimasukkan ke dalam autoklaf yang telah diatur pada suhu 121°C tekanan 15 psi selama 15 menit. Alat yang tidak tahan panas dapat disterilisasi dengan direndam alkohol. Jarum ose disterilkan melalui pemijaran api. *Microplate* yang digunakan untuk *microtiter plate biofilm assay* dicuci dengan disinfektan cair dan disinari ultraviolet selama ±30 menit di dalam LAF.

### 3.7.5 Penyiapan Bakteri Uji *Staphylococcus haemolyticus*

#### 1) Peremajaan *Staphylococcus haemolyticus*

Bakteri *Staphylococcus haemolyticus* diperoleh dari isolat klinis sampel darah pasien NICU RS Paru Jember. Peremajaan bakteri dilakukan dengan mengambil biakan murni bakteri (*Blood Agar*) menggunakan ose

steril dan diinokulasikan dalam media *Nutrient Agar*, lalu diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam.

2) Pembuatan Suspensi Bakteri *Staphylococcus haemolyticus*

Bakteri *S. haemolyticus* hasil subkultur dibuat suspensi dalam media TSB tanpa glukosa dan dengan 1% glukosa (b/v) setara dengan standar McFarland 0,5 untuk uji pembentukan biofilm dan pengujian aktivitas antibiofilm (Magdalena dkk., 2020).

3) Pemeriksaan Makroskopis *Staphylococcus haemolyticus*

Diambil satu ose koloni bakteri *S. haemolyticus* hasil peremajaan untuk ditumbuhkan pada media *Blood Agar*. Bakteri kemudian diinkubasi pada inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam. Setelah diinkubasi, diamati morfologi bakteri dan hemolisis yang terlihat pada permukaan media tumbuh.

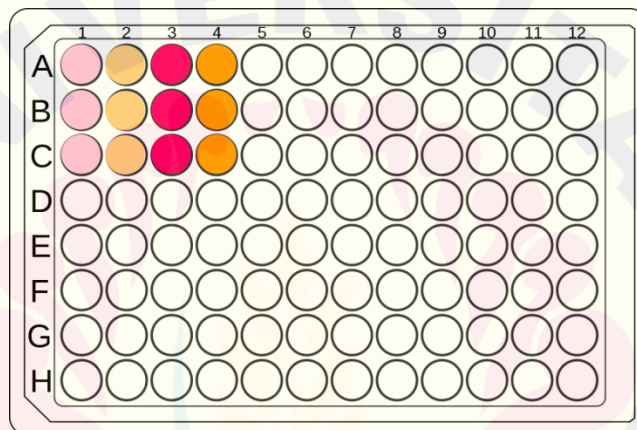
4) Pemeriksaan Makroskopis *Staphylococcus haemolyticus*

Pewarnaan Gram bertujuan untuk mengamati morfologi sel *S. haemolyticus* dan mengetahui kemurnian sel bakteri. Dengan menggunakan ose steril, diambil sebagian koloni *S. haemolyticus* untuk dilakukan pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram dilakukan dengan mencampurkan satu ose koloni bakteri dan NaCl fisiologis yang telah ditetaskan pada *object glass*, kemudian dibuat preparat apus setipis mungkin, dikeringkan, dan difiksasi di atas pembakar spiritus. Preparat apus ditetesi pertama dengan kristal violet selama 2 menit, lalu dicuci dengan air. Selanjutnya preparat ditetesi Lugol selama 1 menit, kemudian dilunturkan dengan alkohol 95% selama 10 detik. Selanjutnya alkohol dicuci dengan air dan diberi pewarna kedua dengan larutan safranin selama 30 detik, lalu dicuci dengan air kemudian preparat dikeringkan dan diamati morfologi sel, serta warnanya di bawah mikroskop perbesaran 1000x.

### 3.7.6 Uji Pembentukan Biofilm

Uji pembentukan biofilm menggunakan menggunakan *microtiter plate assay* (MPA). Pembuatan media pembentukan biofilm yang terdiri dari TSB dan glukosa 1% (TSBG) dimulai dengan melarutkan 3 gram media TSB dalam 100 mL akuades. Media TSB kemudian disterilisasi dengan autoklaf. Setelah media TSB yang telah disterilkan dingin, ditambahkan glukosa 1% dalam media.

Suspensi bakteri uji dalam media TSB+glukosa 1%, suspensi bakteri uji dalam media TSB, dan media TSB dimasukkan ke dalam *microplate 96-well* masing-masing sebanyak 100  $\mu$ L seperti pada Gambar 3.2.



Keterangan:

- : kontrol negatif TSB
- : kontrol negatif TSB + 1% Glukosa (TSBG)
- : suspensi bakteri *S. haemolyticus* + TSB
- : suspensi bakteri *S. haemolyticus*+ TSBG

Gambar 3.2 Denah penggunaan *microplate 96-wells* pada uji pembentukan biofilm *S. haemolyticus*

Kemudian dilakukan inkubasi selama 48 jam pada inkubator suhu 37°C. Setelah diinkubasi, *microplate* dicuci dengan air dan dikeringkan pada suhu ruang. Kemudian diberi pewarna kristal violet 0,4% sebanyak 125  $\mu$ L dan diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit sebelum dibilas kembali dengan air. Ditambahkan etanol 96% sebanyak 200  $\mu$ L dan dilakukan pengukuran *optical density* (OD) menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 595 nm (Utami, 2021).

Kriteria yang digunakan untuk menilai pembentukan biofilm pada isolat klinis menurut Singh dkk. (2017) adalah dengan membandingkan OD<sub>cut</sub> dan OD<sub>perlakuan</sub>. Kontrol negatif dapat berisikan kontrol media atau suspensi bakteri *non-biofilm producer*. Perhitungan OD<sub>cut</sub> adalah sebagai berikut:

$$OD_{cut} = OD \text{ kontrol negatif} + (3 \times \text{standar deviasi OD kontrol negatif})$$

Setelah mendapatkan nilai OD<sub>cut</sub>, OD<sub>cut</sub> dibandingkan dengan OD<sub>perlakuan</sub> yang merupakan nilai OD bakteri dalam media yang telah disuplementasi dengan glukosa 1%. Kemudian hasil tersebut dimasukkan dalam kriteria pengelompokan berikut:

$$OD_{perlakuan} \leq OD_{cut} = \text{Non-biofilm-former}$$

$$OD_{cut} < OD_{perlakuan} \leq 2 \times OD_{cut} = \text{Weak biofilm-former}$$

$$2 \times OD_{cut} < OD_{perlakuan} \leq 4 \times OD_{cut} = \text{Moderate biofilm-former}$$

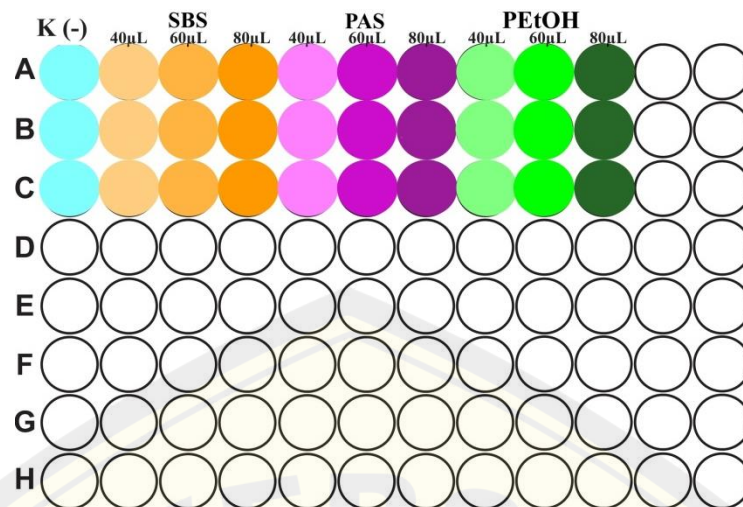
$$OD_{perlakuan} > 4 \times OD_{cut} = \text{Strong biofilm-former}$$

### 3.7.7 Uji Aktivitas Antibiofilm

#### 1) Uji Penghambatan Pembentukan Biofilm

Pengujian dilakukan dengan menginkubasi larutan uji supernatan bebas sel dan presipitat produk ekstraseluler *P. stutzeri* dan akuades steril (kontrol negatif), serta injeksi gentamisin (kontrol positif) dalam media TSBG bersamaan dengan suspensi bakteri. Pertama-tama, suspensi bakteri *S. haemolyticus* dalam media TSBG digunakan sebanyak 50 µL, kemudian dilanjutkan pemipetan masing-masing larutan uji dan kontrol dalam *microplate* sesuai dengan kelompok volume yang telah ditetapkan (40, 60, dan 80 µL) dan ditambahkan media TSBG hingga volume total masing-masing perlakuan 200 µL. Penempatan suspensi uji dilakukan seperti pada Gambar 3.3.





Keterangan: **K(-)** (kontrol negatif); **SBS** (supernatan bebas sel); **PAS** (presipitat amonium sulfa); **PEtOH** (presipitat etanol)

Gambar 3.3 Denah penggunaan *microplate* 96-wells pada uji penghambatan pembentukan biofilm dan degradasi biofilm

Suspensi uji yang telah dimasukkan dalam sumuran kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Kemudian, *microplate* dicuci dengan air mengalir sebanyak tiga kali, ditambahkan 125 µL kristal violet 0,4% pada tiap *well* dan didiamkan pada suhu ruang selama 15 menit sebelum dicuci kembali dengan air mengalir sebanyak tiga kali. Setelah dicuci, ditambahkan etanol 96% dengan volume 200 µL ke dalam tiap *well* untuk melarutkan kristal violet yang tersisa, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit. Selanjutnya dilakukan pembacaan absorbansi untuk mengetahui aktivitas penghambatan pembentukan biofilm menggunakan *microplate reader* pada OD 595 nm (Pratiwi dkk., 2015; Ulyah dkk., 2015; Gumilar, 2020).

## 2) Uji Degradasi Biofilm

Pengujian untuk menilai degradasi biofilm memiliki prosedur yang mirip dengan uji penghambatan pembentukan biofilm, tetapi aktivitas antibiofilm dilihat dari potensi sampel menghancurkan biofilm yang sudah terbentuk. Sehingga perbedaan pengujian terdapat pada waktu inkubasi suspensi bakteri uji. Suspensi bakteri uji terlebih dahulu diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Kemudian *microplate* diambil dari inkubator dan dilakukan pemipetan sampel pada sumuran

sesuai volume uji yang ditentukan (40, 60, dan 80  $\mu\text{L}$ ) seperti pada Gambar 3.3 sebelum diinkubasi kembali selama 60 menit.

Kemudian, *microplate* dicuci dengan air mengalir sebanyak tiga kali, ditambahkan 125  $\mu\text{L}$  kristal violet 0,4% pada tiap *well* dan didiamkan pada suhu ruang selama 15 menit sebelum dicuci kembali dengan air mengalir sebanyak tiga kali. Setelah dicuci, ditambahkan etanol 96% dengan volume 200  $\mu\text{L}$  ke dalam tiap *well* untuk melarutkan kristal violet yang tersisa, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit. Selanjutnya dilakukan pembacaan absorbansi untuk mengetahui aktivitas penghambatan pembentukan biofilm menggunakan *microplate reader* pada OD 595 nm (Pratiwi dkk., 2015; Ulyah dkk., 2015; Gumilar, 2020).

#### 3.7.8 Skrining Protein dengan Reagen Bradford

Masing-masing larutan uji pada kelompok perlakuan supernatan bebas sel dan presipitat eksoproduk *P. stutzeri*, akuades (kontrol negatif), dan *Bovine Serum Albumin* (kontrol positif) diambil sekitar 40—50  $\mu\text{L}$  menggunakan mikropipet dan diteteskan pada *microplate*. Kemudian ditambahkan 10  $\mu\text{L}$  reagen Bradford pada tiap sumuran dan diinkubasi pada suhu ruang sekitar 5 menit. Kemudian diamati masing-masing perubahan warna yang terjadi. Reaksi antara reagen Bradford dan protein akan menghasilkan perubahan warna sampel menjadi biru, sedangkan reaksi dengan nonprotein akan menyebabkan warna menjadi oranye.

#### 3.7.9 Skrining Polisakarida dengan Reagen Lugol

Masing-masing larutan uji pada kelompok perlakuan supernatan bebas sel, presipitat etanol, dan presipitat amonium sulfat *P. stutzeri*, akuades (kontrol negatif), dan amilum (kontrol positif) diambil dengan pipet dan diteteskan sebanyak lima tetes pada plat tetes. Kemudian ditambahkan lima tetes reagen Lugol pada tiap sumuran plat tetes dan diaduk. Kemudian diamati masing-masing perubahan warna yang terjadi (Belwood dkk., 2019). Lugol iodine yang bereaksi dengan polisakarida menghasilkan warna biru kehitaman.

### 3.7.10 Elektroforesis SDS-PAGE

Pengujian elektroforesis SDS-PAGE untuk mengamati profil pita protein dari sampel produk ekstraseluler *P. stutzeri* dilakukan seperti prosedur yang dikembangkan oleh Neha dkk. (2017). Gel yang digunakan pada penelitian ini yaitu gel 10% dengan menggunakan akrilamid/bisakrilamid 40%, serta bahan-bahan dan reagen pada Lampiran 9. Terdapat dua jenis gel yang terdapat pada gel SDS-PAGE, yaitu *separating gel* yang berada pada lapisan bawah, serta *stacking gel* pada lapisan atas yang dibuat secara bergantian pada cetakan gel sesuai dengan komposisi terlampir pada Lampiran 8.

Setelah gel sudah memadat, dilakukan preparasi sampel dengan mencampurkan 20  $\mu\text{L}$  produk ekstraseluler *P. stutzeri* dengan 5  $\mu\text{L}$  *loading buffer* ke dalam *microtube*. Campuran ini kemudian dipanaskan sekitar 5 menit pada air mendidih untuk membantu proses denaturasi protein sebelum *loading* sampel pada gel. Gel yang siap digunakan kemudian dimasukkan dalam alat elektroforesis yang ditambahkan *running buffer*. Kemudian 20  $\mu\text{L}$  sampel dimasukkan dalam sumuran yang tercetak oleh sisir menggunakan bantuan mikropipet, setelah itu dimasukkan *protein ladder* sejumlah 7  $\mu\text{L}$  pada sumuran. Setelah dipastikan tidak ada kebocoran, proses *running* elektroforesis dapat dimulai dengan mengatur tegangan sebesar 80 volt yang berlangsung  $\pm 3$  jam. Ketika proses elektroforesis sudah selesai, gel dapat dilepas dari cetakan untuk diberi larutan *staining* dan direndam sekitar 30 menit. Setelah itu, gel dituangi dengan larutan *destaining* dan dilakukan penggojogan menggunakan *shaker* selama  $\pm 18$  jam atau semalaman. Kemudian, pita yang terlihat dapat diamati dan didokumentasikan menggunakan *scanner* untuk ditentukan profil pita atau berat molekul dengan bantuan *protein ladder* yang tampak.

### 3.8 Analisis Data

Data yang diperoleh dari pengujian antibiofilm diperoleh dari pembacaan absorbansi *microplate reader* yang kemudian dikonversi menjadi persen penghambatan dan persen degradasi. Rumus yang digunakan dalam menghitung

aktivitas penghambatan dan degradasi biofilm adalah sebagai berikut (Chaerunisa, 2015; Gumilar, 2020):

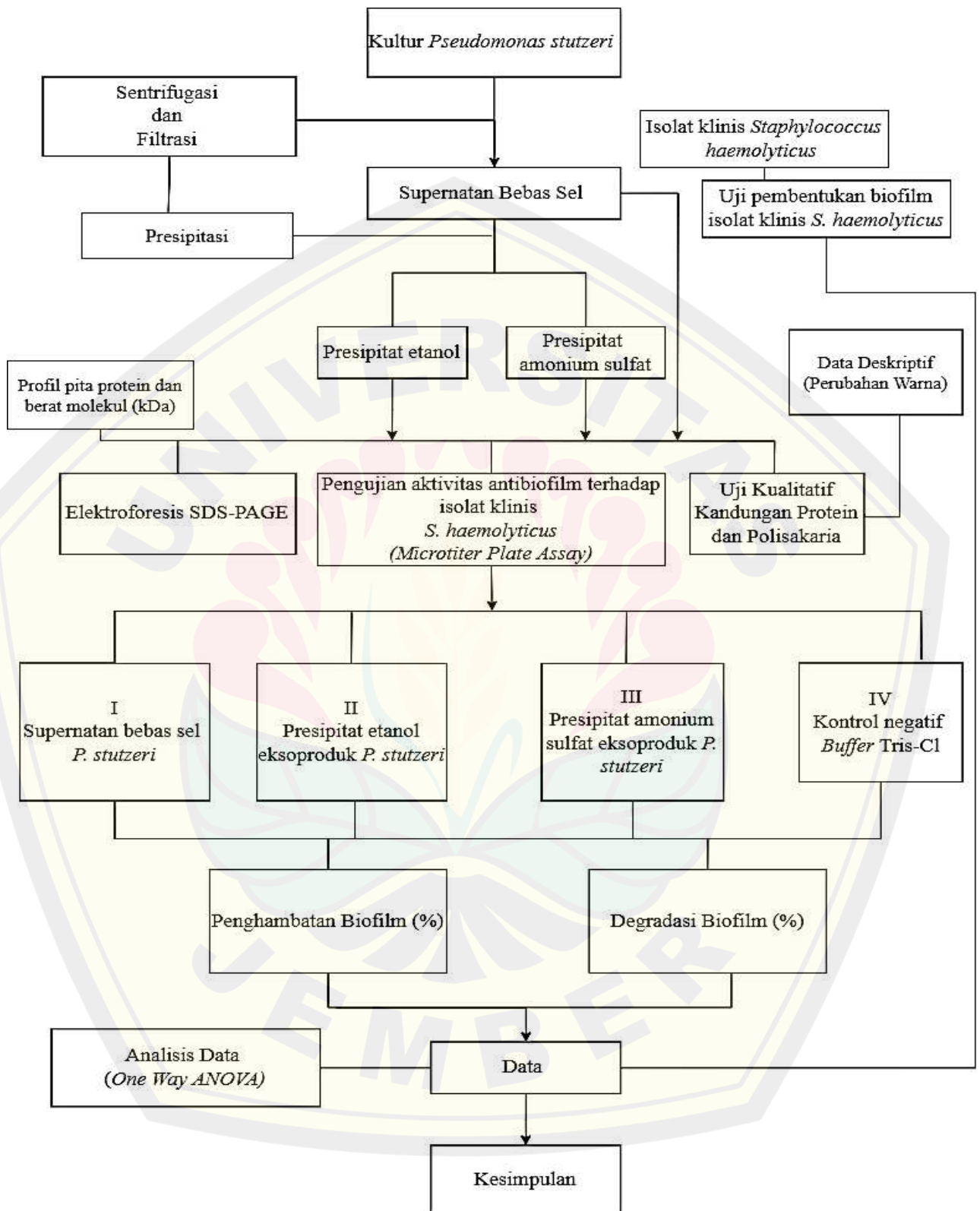
$$\text{aktivitas penghambatan (\%)} = \frac{OD \text{ kontrol negatif} - OD \text{ perlakuan}}{OD \text{ kontrol negatif}} \times 100\%$$

$$\text{aktivitas degradasi (\%)} = \frac{OD \text{ kontrol negatif} - OD \text{ perlakuan}}{OD \text{ kontrol negatif}} \times 100\%$$

Data yang didapatkan dari uji antibiofilm berupa persen penghambatan pembentukan biofilm dan degradasi biofilm dilakukan diuji pada program *Statistical Product Service Solution* (SPSS 25) dengan melihat normalitas (*Shapiro-Wilk*) dan homogenitas (*Levene*) untuk menilai data telah terdistribusi normal ( $p > 0,05$ ) dan homogen ( $p > 0,05$ ). Selanjutnya data dilakukan pengujian *One-Way ANOVA* dengan derajat kemaknaan 95% ( $p < 0,05$ ) dilanjutkan dengan uji *Least Significant Difference (LSD) post hoc test* untuk mengetahui perbedaan antar kelompok. Apabila data pengujian tidak memenuhi asumsi yang sesuai (data tidak homogen dan tidak normal), maka dapat dilakukan uji nonparametrik *Kruskal-Wallis* sebagai uji alternatif yang dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* jika terdapat perbedaan yang bermakna ( $p < 0,05$ ) (Yuliandari, 2015; Wedarti dkk., 2020).

Data yang dihasilkan dari skrining biokimia dengan reagen Lugol dan reagen Bradford berupa data deskriptif yang dihasilkan dari pengamatan perubahan warna secara visual. Sedangkan profil pita protein dari pengujian elektroforesis SDS-PAGE berupa berat molekul protein dalam satuan kilo Dalton (kDa) yang ditentukan perhitungannya menggunakan *software GelAnalyzer*.

3.9 Skema Penelitian



Gambar 3.4 Skema penelitian

## BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Hasil Identifikasi Bakteri Uji (*Staphylococcus haemolyticus*)

Identifikasi isolat klinis *S. haemolyticus* yang dilakukan pada penelitian ini yaitu uji makroskopis dan uji mikroskopis menggunakan pewarnaan Gram.

#### a. Uji Makroskopis

Uji makroskopis dilakukan dengan mengamati koloni bakteri yang tumbuh pada media padat (*Blood Agar*). Dari uji makroskopis terhadap isolat klinis *S. haemolyticus* yang dikultur pada media *Blood Agar* menunjukkan koloni bakteri yang berbentuk bulat, berwarna putih, tepi koloni yang rata dan halus, serta elevasi cembung.



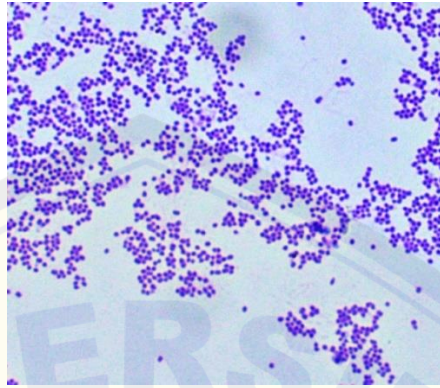
Gambar 4.1 Pertumbuhan bakteri *S. haemolyticus* pada media *Blood Agar*

Pada hasil pengamatan yang dapat dilihat pada Gambar 4.1, tidak terlihat adanya zona bening di sekitar koloni *S. haemolyticus*, sehingga bakteri ini dapat dikategorikan memiliki sifat  $\gamma$ -hemolisis. Gamma hemolisis adalah kurangnya hemolisis yang terjadi di daerah sekitar koloni bakteri.

#### b. Uji Mikroskopis (Pewarnaan Gram)

Uji mikroskopis yang dilakukan untuk mengidentifikasi isolat *Staphylococcus haemolyticus* pada penelitian ini adalah dengan penggunaan pewarnaan Gram. Dari hasil pewarnaan Gram yang dilakukan, dihasilkan bakteri

berbentuk kokus berpasang-pasangan yang tersusun seperti buah anggur dan berwarna ungu di bawah pengamatan mikroskop perbesaran 1000x.



Gambar 4.2 Hasil pewarnaan Gram bakteri *S. haemolyticus* dengan mikroskop perbesaran 1000x

Seperti yang terlihat pada Gambar 4.2, *S. haemolyticus* digolongkan sebagai bakteri Gram positif. Bakteri Gram positif memiliki dinding sel yang mengandung lapisan peptidoglikan yang tebal, zat yang membentuk dinding sel banyak bakteri. Peptidoglikan yang tebal menjadi komponen utama dari dinding sel bakteri Gram positif sehingga bakteri tampak berwarna biru keunguan pada pewarnaan Gram (Thairu dkk., 2014).

#### 4.2 Hasil Uji Pembentukan Biofilm Isolat *Staphylococcus haemolyticus*

Hasil uji pembentukan biofilm pada isolat *Staphylococcus haemolyticus* dapat dilihat pada data pengukuran *Optical Density* (OD) pada panjang gelombang 595 nm dengan *microplate reader* yang terlihat pada Tabel 4.1.

Tabel 4.1 Hasil uji pembentukan biofilm *S. haemolyticus*

Perlakuan	Rata-rata OD	SD	Kriteria Pembentukan Biofilm
TSB	0,136	0,010	-
TSB + Glukosa 1%	0,129	0,004	-
TSB + <i>S. haemolyticus</i>	0,419	0,040	Sedang
TSB + Glukosa 1% + <i>S. haemolyticus</i>	0,684	0,172	Kuat

Dari hasil pengujian tersaji pada Tabel 4.1, dapat terlihat bahwa hasil pertumbuhan biofilm *S. haemolyticus* lebih baik pada media TSB yang ditambahkan glukosa konsentrasi 1% dibandingkan ditumbuhkan pada media TSB tanpa suplementasi glukosa. Terlampir pada data Lampiran 3, bakteri *S. haemolyticus* tergolong sebagai bakteri penghasil biofilm sedang atau moderat ( $2 \times OD_{cut} < OD_{perlakuan} \leq 4 \times OD_{cut}$ ) jika ditumbuhkan pada media TSB. Apabila bakteri *S. haemolyticus* ditumbuhkan pada media TSB yang disuplementasi dengan glukosa konsentrasi 1%, maka pembentukan biofilm mengalami peningkatan hingga menjadi kelompok penghasil biofilm yang kuat ( $OD_{perlakuan} > 4 \times OD_{cut}$ ). Hasil yang diperoleh ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Fredheim dkk. (2009), yang menyimpulkan bahwa peningkatan pertumbuhan biofilm dari *Staphylococcus haemolyticus* dipengaruhi oleh penambahan glukosa pada media TSB. Pembuktian bahwa bakteri uji memiliki kemampuan membentuk biofilm penting dilakukan untuk uji lanjutan yaitu uji aktivitas antibiofilm. Selain itu, uji pembentukan biofilm ini digunakan untuk pemilihan media yang tepat. Disimpulkan bahwa media TSB



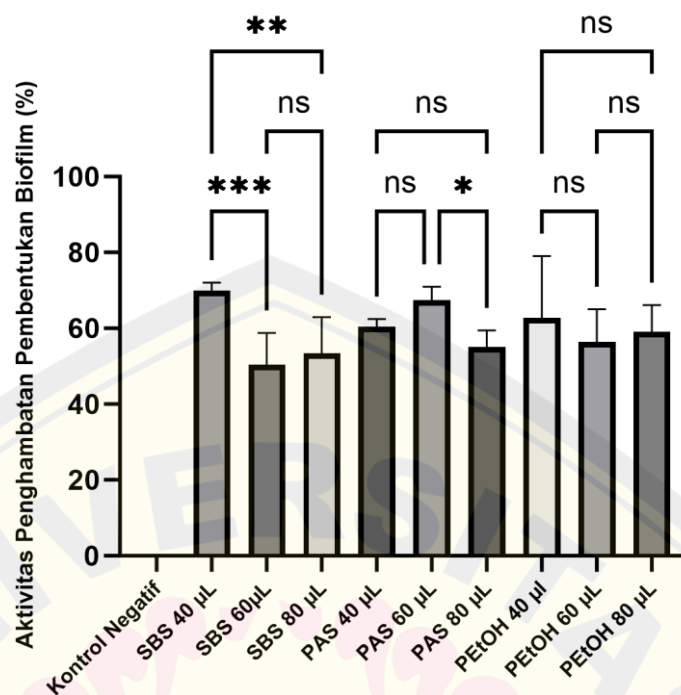
yang disuplementasi dengan 1% glukosa yang membuat isolat *S. haemolyticus* menjadi penghasil biofilm kuat akan dijadikan media yang digunakan untuk tahapan penelitian selanjutnya.

#### **4.3 Hasil Uji Aktivitas Antibiofilm *Staphylococcus haemolyticus* oleh Produk Ekstraseluler *Pseudomonas stutzeri***

Sampel yang diujikan untuk aktivitas antibiofilm pada penelitian ini yaitu produk ekstraseluler yang terdiri dari supernatan bebas sel, presipitat etanol, dan presipitat amonium sulfat dari presipitasi kultur bakteri *Pseudomonas stutzeri* dalam media LB cair yang diinkubasi selama 48 jam. Presipitasi dilakukan ketika bakteri sudah memasuki fase stationer, sesuai dengan penelitian Zheng dkk. (2018) yang menyimpulkan bahwa *P. stutzeri strain 273* mencapai fase stationer sekitar 10—20 jam setelah diinkubasi tanpa adanya tekanan dari luar. Ketika konsentrasi nutrisi tidak cukup untuk mempertahankan kebutuhan untuk pertumbuhan yang stabil, maka bakteri yang memiliki kemampuan bertahan tanpa adanya nutrisi, menghadapi kondisi tersebut dengan memasuki keadaan yang disebut fase stasioner. Selama fase ini, bakteri dapat menghasilkan metabolit sekunder yang memiliki potensi bioaktif yang beragam (Navarro Llorens dkk., 2010). Uji aktivitas antibiofilm sampel penelitian ini meliputi uji penghambatan pembentukan biofilm dan uji degradasi biofilm.

##### **4.3.1 Hasil Uji Aktivitas Penghambatan Biofilm *Staphylococcus haemolyticus* oleh Produk Ekstraseluler *Pseudomonas stutzeri***

Pengujian aktivitas penghambatan pembentukan biofilm dilakukan untuk mengetahui potensi produk ekstraseluler *P. stutzeri* dalam menghambat pembentukan biofilm *Staphylococcus haemolyticus* sebagai bakteri uji. Hasil pengujian penghambatan pembentukan biofilm dapat dilihat pada Lampiran 4. Data hasil pengukuran *Optical Density* (OD) yang telah diubah menjadi persentase aktivitas penghambatan biofilm disajikan pada Gambar 4.3.



Keterangan: **SBS** (supernatan bebas sel), **PAS** (presipitat amonium sulfat), **PEtOH** (presipitat etanol), **ns** (tanda bahwa data tidak berbeda signifikan  $p > 0,05$ ), **\*** (tanda bahwa data menunjukkan  $p \leq 0,05$ ), **\*\*** (tanda bahwa data menunjukkan  $p \leq 0,01$ ), **\*\*\*** (tanda bahwa data menunjukkan  $p \leq 0,001$ )

Gambar 4.3 Grafik aktivitas penghambatan pembentukan biofilm *S. haemolyticus* oleh produk ekstraseluler *P. stutzeri*

Dari pengamatan grafik aktivitas penghambatan pembentukan biofilm *S. haemolyticus* oleh produk ekstraseluler *P. stutzeri* ditunjukkan bahwa aktivitas penghambatan biofilm terbesar diberikan oleh sampel supernatan bebas sel dengan volume perlakuan 40 µL (70%), sedangkan aktivitas penghambatan pembentukan biofilm paling rendah ditunjukkan oleh supernatan bebas sel dengan volume perlakuan 60 µL (50%). Sedangkan untuk sampel lainnya memiliki nilai aktivitas yang mirip, berkisar di antara 50—60% penghambatan pembentukan biofilm, tidak bergantung pada besaran volume perlakuan pada pengujian ini.

Data persentase aktivitas penghambatan pembentukan biofilm yang diperoleh kemudian dilakukan analisis statistika menggunakan program *IBM SPSS Statistics 25*. Hasil uji statistika yang dilakukan terlampir pada Lampiran 5. Uji normalitas menunjukkan bahwa data persentase penghambatan pembentukan

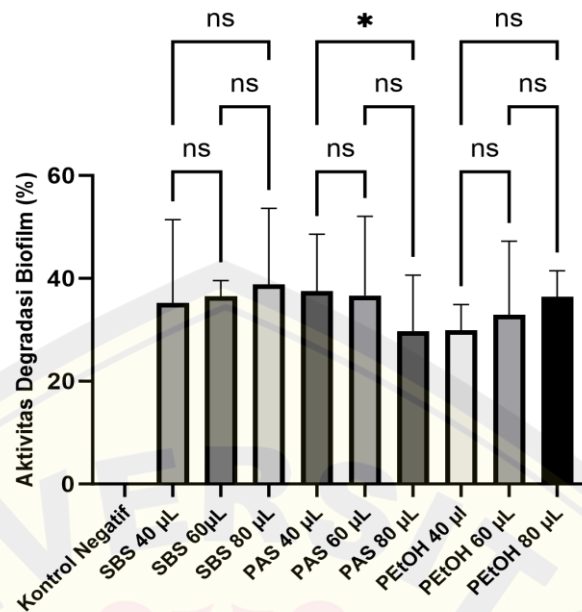
biofilm terdistribusi normal ( $p \geq 0,05$ ) dan homogen ( $p \geq 0,05$ ). Sehingga analisis data dapat dilanjutkan menggunakan uji *One-Way ANOVA*. Hasil pengujian dengan *One-Way ANOVA* menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna pada data uji penghambatan pembentukan biofilm *S. haemolyticus* ( $p \text{ value} = 0,000$ ), sehingga dilakukan uji *Post-Hoc* berupa *LSD* untuk mendapatkan data kelompok perlakuan yang memiliki perbedaan signifikan pada pengujian.

Berdasarkan uji *Post-Hoc* (*LSD*) yang dilakukan, dapat dinyatakan bahwa terdapat aktivitas penghambatan pembentukan biofilm yang signifikan dari tiga kelompok sampel produk ekstraseluler *P. stutzeri* dengan volume uji yang berbeda-beda (40, 60, dan 80  $\mu\text{L}$ ), tetapi besarnya aktivitas yang ditunjukkan tidak bergantung pada volume sampel yang diujikan.

Faktor yang memengaruhi tren data ekstrem dari aktivitas penghambatan pembentukan biofilm yang dihasilkan oleh sampel produk ekstraseluler *P. stutzeri* dapat berasal dari kurangnya prosedur penentuan homogenitas yang dapat memastikan kandungan metabolit secara kuantitatif pada sampel, seperti ketidaklengkapan prosedur pemeriksaan densitas *starter culture P. stutzeri* menggunakan spektrofotometer UV-Vis, preparasi sampel yang membuat sampel uji menjadi tidak homogen setiap replikasi pengujian, serta *human error* dari ketidakteelitian yang mungkin terjadi pada prosedur penelitian.

#### **4.3.2 Hasil Uji Aktivitas Degradasi Biofilm *Staphylococcus haemolyticus* oleh Produk Ekstraseluler *Pseudomonas stutzeri***

Pengujian aktivitas penghancuran atau degradasi biofilm dilakukan untuk mengetahui potensi produk ekstraseluler *P. stutzeri* dalam menghancurkan biofilm *Staphylococcus haemolyticus* yang sudah terbentuk setelah diinkubasi 48 jam. Hasil uji degradasi biofilm *S. haemolyticus* oleh produk ekstraseluler *P. stutzeri* dapat dilihat pada Lampiran 6. Data hasil pengukuran *Optical Density* (OD) dari uji degradasi biofilm ini diubah menjadi persentase aktivitas degradasi biofilm yang disajikan pada Gambar 4.4.



Keterangan: **SBS** (supernatan bebas sel), **PAS** (presipitat amonium sulfat), **PEtOH** (presipitat etanol), **ns** (tanda bahwa data tidak berbeda signifikan;  $p > 0,05$ ), \* (tanda bahwa data menunjukkan  $p \leq 0,05$ ), \*\* (tanda bahwa data menunjukkan  $p \leq 0,01$ ), \*\*\* (tanda bahwa data menunjukkan  $p \leq 0,001$ )

Gambar 4.4 Grafik aktivitas degradasi biofilm *S. haemolyticus* oleh produk ekstraseluler *P. stutzeri*

Dari pengamatan grafik aktivitas degradasi biofilm *S. haemolyticus* oleh produk ekstraseluler *P. stutzeri*, terlihat bahwa aktivitas degradasi atau penghancuran biofilm ditunjukkan oleh sampel supernatan bebas sel dengan volume perlakuan 80 µL (39%), sedangkan aktivitas degradasi biofilm paling rendah pada pengujian ini ditunjukkan oleh presipitat etanol *P. stutzeri* dengan volume perlakuan 40 µL (30%) dan presipitat amonium sulfat *P. stutzeri* dengan volume perlakuan 80 µL (30%). Aktivitas degradasi biofilm dari kelompok perlakuan lainnya memiliki nilai aktivitas degradasi biofilm yang serupa, berkisar di antara 30—39%.

Data persentase aktivitas degradasi biofilm yang diperoleh kemudian dilakukan analisis statistika seperti terlihat pada Lampiran 7. Uji normalitas menunjukkan bahwa data persentase degradasi biofilm terdistribusi normal ( $p \geq 0,05$ ) dan homogen ( $p \geq 0,05$ ). Sehingga analisis data pengujian ini dapat dilanjutkan menggunakan uji *One-Way ANOVA*. Hasil pengujian dengan *One-*

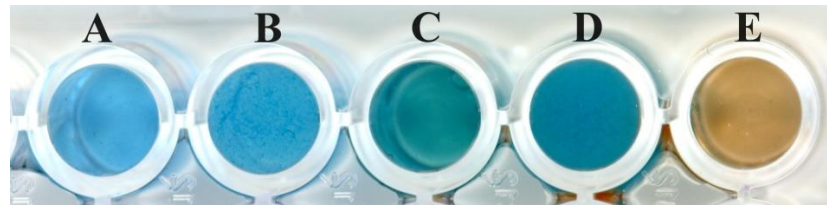
Way ANOVA menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna pada data uji degradasi biofilm *S. haemolyticus* ( $p$  value = 0,000), sehingga dilakukan uji *Post-Hoc* berupa LSD untuk mendapatkan rincian dari data kelompok perlakuan yang memiliki perbedaan signifikan pada pengujian.

Berdasarkan Gambar 4.4, terlihat bahwa terdapat aktivitas degradasi biofilm yang signifikan dari tiga kelompok sampel produk ekstraseluler *P. stutzeri* dengan volume uji yang berbeda-beda (40, 60, dan 80  $\mu$ L), sedangkan aktivitas degradasi biofilm yang ditunjukkan tidak linier seiring penambahan volume uji. Data yang tidak linier seperti contoh data yang ditunjukkan dari sampel supernatan bebas sel 40  $\mu$ L yang tidak memiliki perbedaan signifikan dibandingkan dengan supernatan bebas sel 60  $\mu$ L dan supernatan bebas sel 80  $\mu$ L ( $p \geq 0,05$ ) di mana persentase degradasi biofilm yang ditunjukkan masing-masing yaitu 35%, 37%, dan 39%.

Data hasil pengujian aktivitas degradasi biofilm menunjukkan adanya aktivitas yang tidak jauh berbeda, sehingga dimungkinkan ketiga sampel produk ekstraseluler *P. stutzeri* (supernatan bebas sel, presipitat etanol, presipitat amonium sulfat) memiliki mekanisme serupa dalam penghancuran biofilm dan zat bioaktif yang bertanggungjawab pada proses penghancuran biofilm tersebut dapat berasal dari sumber yang sama.

#### **4.4 Hasil Uji Kualitatif Kandungan Protein dan Polisakarida Produk Ekstraseluler *P. stutzeri* menggunakan Reagen Bradford dan Lugol**

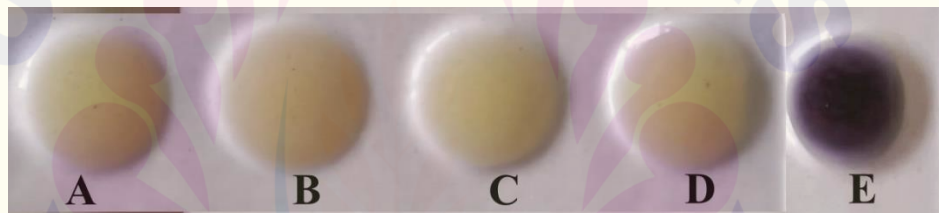
Pengujian kualitatif menggunakan reagen Bradford dilakukan untuk menguji kandungan protein yang terdapat dalam sampel. Apabila sampel berwarna biru ketika diberi reagen Bradford, maka sampel tersebut positif mengandung protein. Sedangkan hasil negatif pada penelitian ini menunjukkan adanya warna kuning atau oranye pada sampel. Hasil penelitian kualitatif kandungan protein dengan reagen Bradford seperti terlihat pada Gambar 4.5.



Keterangan: **A** (presipitat etanol); **B** (presipitat amonium sulfat); **C** (supernatan bebas sel); **D** (kontrol positif BSA 200 mg/mL); **E** (kontrol negatif akuades)

Gambar 4.5 Hasil penetesan reagen Bradford pada sampel produk ekstraseluler *P. stutzeri* (uji kualitatif kandungan protein)

Penelitian kualitatif lainnya dilakukan dengan penetesan reagen Lugol untuk melihat kandungan polisakarida pada sampel produk ekstraseluler *P. stutzeri* seperti pada Gambar 4.6. Dari kedua pengujian kualitatif ini dapat disimpulkan bahwa sampel produk ekstraseluler *P. stutzeri* mengandung protein dan tidak mengandung polisakarida.

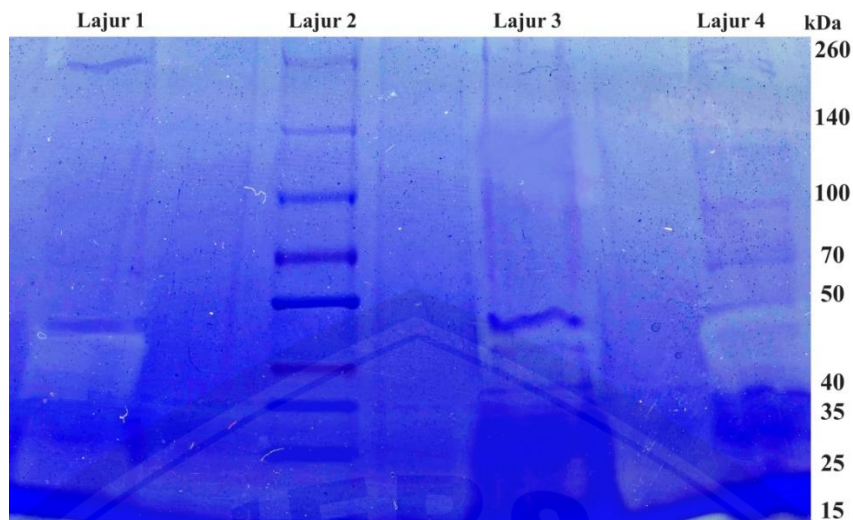


Keterangan: **A** (presipitat etanol); **B** (presipitat amonium sulfat); **C** (supernatan bebas sel); **D** (kontrol negatif akuades); **E** (kontrol positif amilum)

Gambar 4.6 Hasil penetesan reagen Lugol pada sampel produk ekstraseluler *P. stutzeri* (uji kualitatif kandungan polisakarida)

#### 4.5 Hasil Elektroforesis SDS-PAGE Sampel Produk Ekstraseluler *P. stutzeri*

Profil protein yang diperoleh dari sampel produk ekstraseluler yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan metode elektroforesis SDS-PAGE dengan komposisi bahan-bahan yang digunakan merujuk pada protokol yang dilakukan oleh Neha dkk. (2017). Elektroforesis SDS-PAGE dapat memisahkan memisahkan protein berdasarkan ukuran molekul karena keberadaan *sodium dodecyl sulfate* (SDS) yang mendenaturasi protein saat protein bergerak melalui matriks gel poliakrilamida menuju anoda (Gallagher, 2012).



Keterangan: **Lajur 1** (presipitat etanol); **Lajur 2** (*protein ladder*); **Lajur 3** (presipitat amonium sulfat); **Lajur 4** (supernatan bebas sel)

Gambar 4.7 Hasil elektroforesis SDS-PAGE sampel produk ekstraseluler *P. stutzeri* dan *protein ladder*

Dari profil pita yang tampak pada gel hasil elektroforesis SDS-PAGE, dapat disimpulkan bahwa metode presipitasi protein menggunakan agen kimiawi seperti etanol dan amonium sulfat mampu mempresipitasikan protein sehingga dihasilkan protein yang lebih murni dibandingkan supernatan bebas sel yang masih terdapat banyak jenis protein terlihat pada Gambar 4.7. Masing-masing dari sampel yang dilakukan elektroforesis SDS-PAGE menghasilkan pita dengan berat molekul yang berbeda-beda, seperti tertera pada Tabel 4.2.

Tabel 4.2 Hasil analisis profil pita protein (SDS-PAGE) produk ekstraseluler *P. stutzeri* menggunakan *software GelAnalyzer*

<i>Jenis Sampel</i>	<i>Pita</i>	<i>MW (kDa)</i>
supernatan bebas sel	1	252
supernatan bebas sel	2	91
supernatan bebas sel	3	64
supernatan bebas sel	4	50
supernatan bebas sel	5	29
presipitat amonium sulfat	1	47
presipitat amonium sulfat	2	33
presipitat etOH	1	252
presipitat etOH	2	45
presipitat etOH	3	29

Dari ketiga jenis sampel produk ekstraseluler *P. stutzeri* terdapat kemiripan ukuran protein di mana pita 1 presipitat amonium sulfat (~47 kDa), pita 2 presipitat etanol (~45 kDa), dan pita 4 supernatan bebas sel (~50 kDa) dimungkinkan berasal dari jenis protein yang sama. Protein dengan berat molekul 48—50 kDa ini menunjukkan pita paling tebal pada lajur sampel presipitat amonium sulfat, sehingga terdapat kemungkinan bahwa protein ini paling banyak diperoleh ketika presipitasi produk ekstraseluler *P. stutzeri* dilakukan dengan metode presipitasi amonium sulfat. Profil pita protein yang tampak dengan berat molekul 45—50 kDa dapat ditunjukkan oleh enzim lipase alkali yang sebelumnya berhasil diproduksi oleh bakteri laut *Pseudomonas* sp. (MSI057) pada penelitian oleh Kiran dkk. (2008) dengan berat molekul 50 kDa atau enzim fosfatase alkali dari *Pseudomonas asiatica strain ZKB1* pada penelitian Bagewadi dkk. (2022) yang menunjukkan karakteristik protein dengan berat molekul ~45 kDa. Terdapat penelitian dari Balabanova dkk. (2017), yang menunjukkan bahwa enzim nukleolitik fosfatase alkali yang diproduksi dari bakteri laut *C. amphilecti KMM 296* menunjukkan aktivitas inhibisi yang kuat (> 70% aktivitas inhibisi biofilm) sehingga menurunkan kemampuan isolat bakteri uji untuk membentuk biofilm baru dengan mekanisme penghilangan pili atau pilus serta zat antarsel dari bakteri uji (Balabanova dkk., 2017; Gutiérrez, 2018).

Selain itu, pita protein dengan berat molekul serupa juga ditunjukkan oleh pita 5 supernatan bebas sel (~29 kDa), pita 2 presipitat amonium sulfat (~33 kDa), dan pita 3 presipitat etanol (~29 kDa). Pita yang menunjukkan berat molekul protein pada rentang 29—33 kDa ini dimungkinkan berasal dari enzim kitinase yang berhasil diproduksi oleh berbagai *Pseudomonas* sp. dan *Pseudomonas stutzeri* dengan berat molekul berkisar antara 30—68 kDa (Wang dkk., 2008; Wang dkk., 2010; Suganthi dkk., 2015; Chalidah dkk., 2018; Khairah dkk., 2023). Bakteri mampu menghasilkan kitinase untuk memasok nitrogen dan karbon sebagai sumber nutrisi atau prekursor serta mendukung parasitisme. Kitinase yang sangat melimpah di ekosistem laut digunakan untuk mendegradasi kitin dan dimanfaatkan sebagai sumber energi (Rathore dan Gupta, 2015). Kitinase termasuk dalam hidrolase glikosida yang memiliki kemampuan menghancurkan



matriks EPS biofilm, menghambat pembentukan biofilm, dan memfasilitasi dispersi dari biofilm yang telah terbentuk. Segera setelah matriks biofilm terdegradasi secara enzimatik, sel bakteri kemudian dilepaskan sebagai sel planktonik yang mudah dihilangkan oleh berbagai agen antibakteri, disinfektan, fag, atau sistem kekebalan tubuh (Donelli, 2014; Muhammad dkk., 2020).



## BAB 5. KESIMPULAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilaksanakan, kesimpulan yang didapatkan adalah:

1. Produk ekstraseluler *P. stutzeri* memiliki aktivitas penghambatan pembentukan biofilm terhadap *S. haemolyticus* dan menghasilkan nilai 50—70% aktivitas penghambatan pembentukan biofilm dengan supernatan bebas sel sebagai sampel penghambat biofilm terbesar.
2. Produk ekstraseluler *P. stutzeri* memiliki aktivitas degradasi biofilm terhadap *S. haemolyticus* dan menghasilkan nilai 30—39% aktivitas degradasi biofilm dengan supernatan bebas sel sebagai sampel penghancur biofilm terbesar.
3. Produk ekstraseluler *P. stutzeri* menunjukkan hasil positif mengandung protein dan tidak mengandung polisakarida pada skrining kualitatif Bradford dan Lugol.
4. Profil protein yang dihasilkan dari produk ekstraseluler *P. stutzeri* yaitu adanya protein dengan rentang berat molekul 29—252 kDa.

### 5.2 Saran

Saran yang dapat digunakan untuk penelitian selanjutnya adalah sebagai berikut:

1. Produk ekstraseluler *P. stutzeri* perlu dilakukan analisis komponen, serta analisis kuantitatif untuk menentukan kadar protein dan total gula pada sampel.
2. Aktivitas antibiofilm yang dihasilkan oleh produk ekstraseluler *P. stutzeri* perlu diamati secara mikroskopis menggunakan *Scanning Electron Microscopy* (SEM).
3. Fraksinasi atau purifikasi dari protein yang memiliki aktivitas antibiofilm.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abdalla, A. K., M. M. Ayyash, A. N. Olaimat, T. M. Osaili, A. A. Al-Nabulsi, N. P. Shah, dan R. Holley. 2021. Exopolysaccharides as Antimicrobial Agents: Mechanism and Spectrum of Activity. *Frontiers in Microbiology*. 2021.
- Andhare, P., D. Goswami, C. Delattre, G. Pierre, P. Michaud, dan H. Pathak. 2017. Edifying the strategy for the finest extraction of succinoglycan from rhizobium radiobacter strain cas. *Applied Biological Chemistry*
- Bagewadi, Z. K., D. A. Yaraguppi, S. I. Mulla, dan S. H. Deshpande. 2022. Response surface methodology based optimization, partial purification and characterization of alkaline phosphatase isolated from pseudomonas asiatica strain zkb1 and its application in plant growth promotion. *Molecular Biotechnology*. 64(9):984–1002.
- Bajpai, V. K., R. Majumder, I. A. Rather, dan K. Kim. 2016. Extraction, isolation and purification of exopolysaccharide from lactic acid bacteria using ethanol precipitation method. *Bangladesh Journal of Pharmacology*
- Balabanova, L., A. Podvolotskaya, L. Slepchenko, M. Eliseikina, Y. Noskova, O. Nedashkovskaya, O. Son, L. Tekutyeva, dan V. Rasskazov. 2017. Nucleolytic enzymes from the marine bacterium cobetia amphilecti kmm 296 with antibiofilm activity and biopreservative effect on meat products. *Food Control*. 78:270–278.
- Belwood, J., R. Brandy, dan C. Jason. 2019. Foundations of biology lab manual. 83.
- Bouchami, O., W. Achour, M. A. Mekni, J. Rolo, dan A. Ben Hassen. 2011. Antibiotic resistance and molecular characterization of clinical isolates of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci isolated from bacteremic patients in oncohematology. *Folia Microbiologica*. 56(2):122–130.
- Bowler, P., C. Murphy, dan R. Wolcott. 2020. Biofilm Exacerbates Antibiotic Resistance: Is This a Current Oversight in Antimicrobial Stewardship?

Antimicrobial Resistance and Infection Control. 2020.

Bueno, J. 2011. Anti-biofilm drug susceptibility testing methods: looking for new strategies against resistance mechanism. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*. s3

Cavanagh, J. P., C. Klingenberg, A. M. Hanssen, E. A. Fredheim, P. Francois, J. Schrenzel, T. Flægstad, dan J. E. Sollid. 2012. Core genome conservation of staphylococcus haemolyticus limits sequence based population structure analysis. *Journal of Microbiological Methods*. 89(3):159–166.

Chaerunisa, R. 2015. Pengujian aktivitas penghancuran biofilm staphylococcus aureus oleh seduhan daun teh putih (*Camellia Sinensis* (L.) Kuntze). UIN Syarif Hidayatullah Jakarta.

Chalidah, N., I. N. Khotimah, A. R. Hakim, B. A. Meata, I. D. Puspita, P. S. Nugraheni, U. Ustadi, dan S. Pudjiraharti. 2018. Chitinase activity of pseudomonas stutzeri pt5 in different fermentation condition. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 139(1)

Chbel, A., J. Rodriguez-Castro, J. Quinteiro, M. Rey-Méndez, A. S. Delgado, A. Soukri, dan B. El Khalfi. 2022. Isolation, molecular identification and antibacterial potential of marine bacteria from deep atlantic ocean of morocco. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*. 14(3):206–215.

Christensen, G. D., W. A. Simpson, J. J. Younger, L. M. Baddour, F. F. Barrett, D. M. Melton, dan E. H. Beachey. 1985. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology*.

de Araujo, G. L., L. R. Coelho, C. B. de Carvalho, R. M. Maciel, A. Z. Coronado, R. Rozenbaum, B. Teixeira Ferreira-Carvalho, A. M. Sá Figueiredo, dan L. A. Teixeira. 2006. Commensal isolates of methicillin-resistant staphylococcus epidermidis are also well equipped to produce biofilm on polystyrene surfaces. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 57(5):855–864.

- De Vos, P., G. George M, D. Jones, K. Noel R., L. Wolfgang, R. Fred A., S. Karl-Heinz, dan W. William B. 2009. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition Volume Three, The Firmicutes*. Springer US.
- Dheilly, A., E. Soum-Soutéra, G. L. Klein, A. Bazire, C. Compère, D. Haras, dan A. Dufour. 2010. Antibiofilm activity of the marine bacterium *pseudoalteromonas* sp. strain 3j6. *Applied and Environmental Microbiology*. 76(11).
- Donelli, G. 2014. Microbial biofilms, methods and protocols edited. *Springer*. 1147:203–213.
- Dos Santos, V. L. dan M. V. Dias-Souza. 2016. *Strategies Based on Microbial Enzymes and Surface-Active Compounds Entrapped in Liposomes for Bacterial Biofilm Control. Nanobiomaterials in Antimicrobial Therapy: Applications of Nanobiomaterials*.
- Duong-Ly, K. C. dan S. B. Gabelli. 2014. Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation. *Methods in Enzymology*. 541(March):85–94.
- Dusane, D. H., S. R. Damare, Y. V. Nancharaiah, N. Ramaiah, V. P. Venugopalan, A. R. Kumar, dan S. S. Zinjarde. 2013. Disruption of microbial biofilms by an extracellular protein isolated from epibiotic tropical marine strain of *bacillus licheniformis*. *PLoS ONE*.
- Eltwisy, H. O., H. O. Twisy, M. H. R. Hafez, I. M. Sayed, dan M. A. El-Mokhtar. 2022. Clinical infections, antibiotic resistance, and pathogenesis of *staphylococcus haemolyticus*. *Microorganisms*. 10(6).
- Felz, S., S. Al-Zuhairy, O. A. Aarstad, M. C. M. van Loosdrecht, dan Y. M. Lin. 2016. Extraction of structural extracellular polymeric substances from aerobic granular sludge. *Journal of Visualized Experiments*.
- Flahaut, S., E. Vinogradov, K. A. Kelley, S. Brennan, K. Hiramatsu, dan J. C. Lee. 2008. Structural and biological characterization of a capsular polysaccharide produced by *staphylococcus haemolyticus*. *Journal of Bacteriology*. 190(5):1649–1657.

- Flemming, H. C., J. Wingender, U. Szewzyk, P. Steinberg, S. A. Rice, dan S. Kjelleberg. 2016. Biofilms: An Emergent Form of Bacterial Life. *Nature Reviews Microbiology*. 2016.
- Fredheim, E. G. A., C. Klingenberg, H. Rohde, S. Frankengerger, P. Gaustad, T. Flægstad, dan J. E. Sollid. 2009. Biofilm formation by staphylococcus haemolyticus. *Journal of Clinical Microbiology*. 47(4):1172–1180.
- Gallagher, S. R. 2012. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (sds-page). *Current Protocols in Essential Laboratory Techniques*. 2012(SUPPL.6):1–28.
- Gandhi, A. D., D. K. Vizhi, K. Lavanya, V. N. Kalpana, V. Devi Rajeswari, dan R. Babujanathanam. 2017. In vitro anti- biofilm and anti-bacterial activity of sesbania grandiflora extract against staphylococcus aureus. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 12(October):193–197.
- Gomila, M., A. Peña, M. Mulet, J. Lalucat, dan E. García-Valdés. 2015. Phylogenomics and systematics in pseudomonas. *Frontiers in Microbiology*. 6(MAR)
- Gumilar, K. 2020. AKTIVITAS penghambatan pembentukan dan penghancuran biofilm ekstrak metanol daun jambang (syzigium cumini l.skeels) terhadap bakteri staphylococcus aureus. *Universitas Sanata Dharma Yogyakarta*
- Gutiérrez, T. J. 2018. *Antibiofilm Enzymes as an Emerging Technology for Food Quality and Safety*. Elsevier Inc. *Enzymes in Food Biotechnology: Production, Applications, and Future Prospects*.
- Gwisai, T., N. R. Hollingsworth, S. Cowles, N. Tharmalingam, E. Mylonakis, B. B. Fuchs, dan A. Shukla. 2017. Repurposing niclosamide as a versatile antimicrobial surface coating against device-associated, hospital-acquired bacterial infections. *Biomedical Materials (Bristol)*. 12(4)
- Halim, R. M. A., N. N. Kassem, dan B. S. Mahmoud. 2018. Detection of biofilm producing staphylococci among different clinical isolates and its relation to methicillin susceptibility. *Open Access Macedonian Journal of Medical*

*Sciences*

Haney, E. F., M. J. Trimble, J. T. Cheng, Q. Vallé, dan R. E. W. Hancock. 2018. Critical assessment of methods to quantify biofilm growth and evaluate antibiofilm activity of host defence peptides. *Biomolecules*. 8(2)

Hrynyshyn, A., M. Simões, dan A. Borges. 2022. Biofilms in surgical site infections: recent advances and novel prevention and eradication strategies. *Antibiotics*. 11(1)

ITIS. 2012. *Pseudomonas* Stutzeri. [https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=965301#null](https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=965301#null) [Diakses pada Desember 11, 2022].

Jiang, P., J. Li, F. Han, G. Duan, X. Lu, Y. Gu, dan W. Yu. 2011. Antibiofilm activity of an exopolysaccharide from marine bacterium vibrio sp. qy101. *PLoS ONE*

Kaiser, T. D. L., E. M. Pereira, K. R. N. dos Santos, E. L. N. Maciel, R. P. Schuenck, dan A. P. F. Nunes. 2013. Modification of the congo red agar method to detect biofilm production by staphylococcus epidermidis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*

Khairah, M., N. R. Mubarik, dan L. A. Manaf. 2023. Bacterial selection and characterization of chitinase enzyme from bacteria controlling fusarium proliferatum. *Biodiversitas*. 24(3):1926–1933.

Khan, H. A., F. K. Baig, dan R. Mehboob. 2017. Nosocomial infections: epidemiology, prevention, control and surveillance. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 7(5):478–482.

Kiran, G. S., S. Shanmughapriya, J. Jayalakshmi, J. Selvin, R. Gandhimathi, S. Sivaramakrishnan, M. Arunkumar, T. Thangavelu, dan K. Natarajaseenivasan. 2008. Optimization of extracellular psychrophilic alkaline lipase produced by marine pseudomonas sp. (msi057). *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 31(5):483–492.

Kırmusaoğlu, S. 2019. *The Methods for Detection of Biofilm and Screening Antibiofilm Activity of Agents*. Dalam Antimicrobials, Antibiotic Resistance, Antibiofilm Strategies and Activity Methods

Klein, G. L., E. Soum-Soutéra, Z. Guede, A. Bazire, C. Compère, dan A. Dufour. 2011. The anti-biofilm activity secreted by a marine pseudoalteromonas strain. *Biofouling*. 27(8)

Koriem, K. M. M. 2017. A Lipidomic Concept in Infectious Diseases. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2017.

Lalucat, J., A. Bennisar, R. Bosch, E. García-Valdés, dan N. J. Palleroni. 2006. Biology of pseudomonas stutzeri . *Microbiology and Molecular Biology Reviews*

Lalucat, J., M. Gomila, M. Mulet, A. Zaruma, dan E. García-Valdés. 2022. Past, Present and Future of the Boundaries of the Pseudomonas Genus: Proposal of Stutzerimonas Gen. Nov. *Systematic and Applied Microbiology*. 2022.

Leroy, F. dan L. De Vuyst. 2016. Advances in production and simplified methods for recovery and quantification of exopolysaccharides for applications in food and health. *Journal of Dairy Science*

Li, Zhiling, Z. Xiao, Zhiping Li, Q. Zhong, Y. Zhang, dan F. Xu. 2013. 116 cases of neonatal early-onset or late-onset sepsis: a single center retrospective analysis on pathogenic bacteria species distribution and antimicrobial susceptibility. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 6(8):693–699.

Liu, D. 2014. *Enterotoxin-Producing Staphylococcus Aureus*. Elsevier Ltd. *Molecular Medical Microbiology*.

Magdalena, S., N. Rustandi, dan Yogiara. 2020. THE in vitro antibiofilm activity of bacteria isolated from waterfall and marine environment against human bacterial pathogens. *Al-Kaunyah: Jurnal Biologi*. 13(2):250–262.

Mah, T. F. 2012. Biofilm-Specific Antibiotic Resistance. *Future Microbiology*.



2012.

Mekni, M. A., O. Bouchami, W. Achour, dan A. Ben Hassen. 2012. Strong biofilm production but not adhesion virulence factors can discriminate between invasive and commensal staphylococcus epidermidis strains. *Apmis*. 120(8):605–611.

Melander, R. J., A. K. Basak, dan C. Melander. 2020. Natural products as inspiration for the development of bacterial antibiofilm agents. *Natural Product Reports*. 37(11):1454–1477.

Mell, J. C. dan R. J. Redfield. 2014. Natural Competence and the Evolution of DNA Uptake Specificity. *Journal of Bacteriology*. 2014.

Merritt, J. H., D. E. Kadouri, dan G. A. O'Toole. 2011. Growing and analyzing static biofilms. *Current Protocols in Microbiology*

More, T. T., J. S. S. Yadav, S. Yan, R. D. Tyagi, dan R. Y. Surampalli. 2014. Extracellular polymeric substances of bacteria and their potential environmental applications. *Journal of Environmental Management*. 144:1–25.

Muhammad, M. H., A. L. Idris, X. Fan, Y. Guo, Y. Yu, dan X. Jin. 2020. Beyond risk : bacterial biofilms and their regulating approaches. 11(May):1–20.

Navarro Llorens, J. M., A. Tormo, dan E. Martínez-García. 2010. Stationary phase in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 34(4):476–495.

Neha; Sarkar, A. ; dan A. Singh. 2017. An undergraduate cell biology lab: western blotting to detect proteins from drosophila eye. *Biotechnology Commons*. (November 2019):236.

Nuryastuti, T. 2018. Staphylococcus epidermidis : how to turn from commensal to be a pathogen lifestyle. *Journal of Thee Medical Sciences (Berkala Ilmu Kedokteran)*. 50(01)

- Osińska-Jaroszuk, M., M. Jaszek, M. Mizerska-Dudka, A. Błachowicz, T. P. Rejczak, G. Janusz, J. Wydrych, J. Polak, A. Jarosz-Wilkolazka, dan M. Kandefer-Szerszeń. 2014. Exopolysaccharide from *ganoderma applanatum* as a promising bioactive compound with cytostatic and antibacterial properties. *BioMed Research International*
- Otto, M. 2012. Molecular basis of staphylococcus epidermidis infections. *Seminars in Immunopathology*. 34(2):201–214.
- Papaleo, M. C., R. Romoli, G. Bartolucci, I. Maida, E. Perrin, M. Fondi, V. Orlandini, A. Mengoni, G. Emiliani, M. L. Tutino, E. Parrilli, D. de Pascale, L. Michaud, A. Lo Giudice, dan R. Fani. 2013. Bioactive volatile organic compounds from antarctic (sponges) bacteria. *New Biotechnology*
- Park, S. W., J. H. Back, S. W. Lee, J. H. Song, C. H. Shin, G. E. Kim, dan M. J. Kim. 2013. Successful antibiotic treatment of pseudomonas stutzeri-induced peritonitis without peritoneal dialysis catheter removal in continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Kidney Research and Clinical Practice*. 32(2)
- Parrilli, E., R. Papa, S. Carillo, M. Tilotta, A. Casillo, F. Sannino, A. Cellini, M. Artini, L. Selan, M. M. Corsaro, dan M. L. Tutino. 2015. Anti-biofilm activity of pseudoalteromonas haloplanktis tac125 against staphylococcus epidermidis biofilm: evidence of a signal molecule involvement? *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*
- Pereira-Ribeiro, P. M. A., B. R. Sued-Karam, Y. V. Faria, B. A. Nogueira, S. S. Colodette, S. E. L. Fracalanza, J. L. M. B. Duarte, R. H. Júnior, dan A. L. Mattos-Guaraldi. 2019. Influence of antibiotics on biofilm formation by different clones of nosocomial staphylococcus haemolyticus. *Future Microbiology*. 14(9):789–799.
- Potter, A., H. Ceotto, M. Giambiagi-deMarval, K. R. N. dos Santos, I. F. Nes, dan M. do C. de F. Bastos. 2009. The gene bap, involved in biofilm production, is present in staphylococcus spp. strains from nosocomial infections. *Journal of Microbiology*. 47(3):319–326.
- Pratiwi, S. U. T., E. L. Lagendijk, S. de Weert, R. Idroes, T. Hertiani, dan C. Van den Hondel. 2015. Effect of cinnamomum burmannii nees ex bl. and massoia aromatica becc. essential oils on planktonic growth and biofilm formation of pseudomonas aeruginosa and staphylococcus aureus in vitro. *International*

*Journal of Applied Research in Natural Products*

- Pronk, M., T. R. Neu, M. C. M. van Loosdrecht, dan Y. M. Lin. 2017. The acid soluble extracellular polymeric substance of aerobic granular sludge dominated by *defluviicoccus* sp. *Water Research*. 122:148–158.
- Rahmadini, S. 2018. Formulasi dan uji aktivitas antibakteri masker gel eksopolisakarida dari kefir susu sapi pasteurisasi terhadap bakteri *Propionibacterium acnes*. UIN Syarif Hidayatullah Jakarta.
- Rathore, A. S. dan R. D. Gupta. 2015. Chitin bacteria to human. 2015:1–9.
- Rendueles, O., J. B. Kaplan, dan J. M. Ghigo. 2013. Antibiofilm Polysaccharides. *Environmental Microbiology*. 2013.
- Ribeiro, M., F. J. Monteiro, dan M. P. Ferraz. 2012. Infection of orthopedic implants with emphasis on bacterial adhesion process and techniques used in studying bacterial-material interactions. *Biomatter*. 2(4):176–194.
- Roy, R., M. Tiwari, G. Donelli, dan V. Tiwari. 2018. Strategies for combating bacterial biofilms: a focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*. 9(1):522–554.
- Sambanthamoorthy, K., M. Hickman, N. Pattabiraman, T. Palys, dan E. J. Wagar. 2015. Modulating *acinetobacter baumannii* biofilm development with molecules containing 3,4,5-trimethoxy-n,n',n'-trimethylbenzohydrazide moiety. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*
- Seip, B., E. A. Galinski, dan M. Kurz. 2011. Natural and engineered hydroxyectoine production based on the *pseudomonas stutzeri* ectabcd-ask gene cluster. *Applied and Environmental Microbiology*
- Sharma, D., L. Misba, dan A. U. Khan. 2019. Antibiotics versus Biofilm: An Emerging Battleground in Microbial Communities. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*. 2019.
- Silva, P. V., R. Souza Cruz, L. S. Keim, G. R. de Paula, B. T. Ferreira Carvalho, L. R. Coelho, M. C. da Silva Carvalho, J. M. C. da Rosa, A. M. S. Figueiredo, dan L. A. Teixeira. 2013. The antimicrobial susceptibility,

biofilm formation and genotypic profiles of staphylococcus haemolyticus from bloodstream infections. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 108(6):812–816.

Singh, A., P. Prakash, A. Achra, G. Singh, A. Das, dan R. Singh. 2017. Standardization and classification of in vitro biofilm formation by clinical isolates of staphylococcus aureus. *Journal of Global Infectious Diseases*

Soeorg, H., K. Huik, Ü. Parm, M. L. Ilmoja, N. Metelskaja, T. Metsvaht, dan I. Lutsar. 2013. Genetic relatedness of coagulase-negative staphylococci from gastrointestinal tract and blood of preterm neonates with late-onset sepsis. *Pediatric Infectious Disease Journal*. 32(4):389–393.

Sommer, M., H. Xie, dan H. Michel. 2017. Pseudomonas stutzeri as an alternative host for membrane proteins. *Microbial Cell Factories*

Spanò, A., P. Laganà, G. Visalli, T. L. Maugeri, dan C. Gugliandolo. 2016. In vitro antibiofilm activity of an exopolysaccharide from the marine thermophilic bacillus licheniformis t14. *Current Microbiology*. 72(5):518–528.

Spellberg, B. dan D. Shlaes. 2014. Prioritized Current Unmet Needs for Antibacterial Therapies. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 2014.

Stincone, P. dan A. Brandelli. 2020. Marine Bacteria as Source of Antimicrobial Compounds. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2020.

Suganthi, M., S. Arvinth, dan R. R. Kumar. 2015. Detection of chitinase activity and its characterization from pseudomonas fluorescens of tea rhizosphere. *Journal of Plantation Crops*. 43(3)

Szczuka, E., K. Grabska, dan A. Kaznowski. 2015. In vitro activity of rifampicin combined with daptomycin or tigecycline on staphylococcus haemolyticus biofilms. *Current Microbiology*. 71(2):184–189.

Takeuchi, F., S. Watanabe, T. Baba, H. Yuzawa, T. Ito, Y. Morimoto, M. Kuroda, L. Cui, M. Takahashi, A. Ankai, S. I. Baba, S. Fukui, J. C. Lee, dan K. Hiramatsu. 2005. Whole-genome sequencing of staphylococcus haemolyticus uncovers the extreme plasticity of its genome and the evolution of human-colonizing staphylococcal species. *Journal of Bacteriology*.

187(21):7292–7308.

Thairu, Y., Y. Usman, dan I. Nasir. 2014. Laboratory perspective of gram staining and its significance in investigations of infectious diseases. *Sub-Saharan African Journal of Medicine*. 1(4):168.

Ulfa, E. U., E. Utarti, I. Afkarina, S. Arimurti, dan K. Senjarini. 2017. Deteksi aktivitas fibrinolitik isolat bakteri wu 021055\* asal perairan pantai papuma jember menggunakan zimografi. *Global Medical & Health Communication (GMHC)*. 5(2):97.

Ulyah, H., E. U. Ulfa, dan E. Puspitasari. 2015. Uji aktivitas antibakteri dan antibiofilm minyak atsiri rimpang bengle (*zingiber purpureum roscoe*) terhadap bakteri *staphylococcus epidermidis*. *E-Jurnal Pustaka Kesehatan*. 3(2):267–271.

Utami, D. W. 2021. *Uji Aktifitas Antibiofilm Aspergillus Terreus Terhadap Biofilm Klebsiella Pneumoniae*

Valls, C., C. Rojas, G. Pujadas, S. Garcia-Vallve, dan M. Mulero. 2012. Characterization of the activity and stability of amylase from saliva and detergent: laboratory practicals for studying the activity and stability of amylase from saliva and various commercial detergents. *Biochemistry and Molecular Biology Education*. 40(4):254–265.

van Seventer, J. M. dan N. S. Hochberg. 2016. *Principles of Infectious Diseases: Transmission, Diagnosis, Prevention, and Control*. Dalam *International Encyclopedia of Public Health*

Vestby, L. K., T. Grønseth, R. Simm, dan L. L. Nesse. 2020. Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease. *Antibiotics*. 9(2)

Wang, S. L., S. J. Chen, dan C. L. Wang. 2008. Purification and characterization of chitinases and chitosanases from a new species strain *pseudomonas* sp. tku015 using shrimp shells as a substrate. *Carbohydrate Research*. 343(7):1171–1179.

Wang, S. L., B. S. Lin, T. W. Liang, C. L. Wang, P. C. Wu, dan J. R. Liu. 2010. Purification and characterization of chitinase from a new species strain, *pseudomonas* sp. tku008. *Journal of Microbiology and Biotechnology*.

20(6):1001–1005.

Wedarti, Y. R., L. I. Loekito, F. Pangabdian, dan D. Andriani. 2020. <p>Potensi kitosan kepiting rajungan (portunus pelagicus) dalam penghambatan pembentukan biofilm porphyromonas gingivalis dan pertumbuhan candida albicans</p><p>potential of flower crab (portunus pelagicus) chitosan in the inhibition of porphyromonas ging. *Padjadjaran Journal of Dental Researchers and Students*

Wilson, C., R. Lukowicz, S. Merchant, H. Valquier-Flynn, J. Caballero, J. Sandoval, M. Okuom, C. Huber, T. D. Brooks, E. Wilson, B. Clement, C. D. Wentworth, dan A. E. Holmes. 2017. Quantitative and qualitative assessment methods for biofilm growth: a mini-review. *Research & Reviews. Journal of Engineering and Technology*. 6(4)

Wolden, R., M. Pain, R. Karlsson, A. Karlsson, E. G. Aarag Fredheim, dan J. P. Cavanagh. 2020. Identification of surface proteins in a clinical staphylococcus haemolyticus isolate by bacterial surface shaving. *BMC Microbiology*. 20(1):1–18.

Wu, S., G. Liu, W. Jin, P. Xiu, dan C. Sun. 2016. Antibiofilm and anti-infection of a marine bacterial exopolysaccharide against pseudomonas aeruginosa. *Frontiers in Microbiology*

Wu, S., R. Zheng, Z. Sha, dan C. Sun. 2017. Genome sequence of pseudomonas stutzeri 273 and identification of the exopolysaccharide eps273 biosynthesis locus. *Marine Drugs*

Xiao, R. dan Y. Zheng. 2016. Overview of microalgal extracellular polymeric substances (eps) and their applications. *Biotechnology Advances*. 34(7):1225–1244.

Yin, W., Y. Wang, L. Liu, dan J. He. 2019. Biofilms: the microbial “protective clothing” in extreme environments. *International Journal of Molecular Sciences*. 20(14)

Yuliandari, R. 2015. Uji aktivitas antibiofilm sari buah belimbing wuluh (averhoa bilimbi l) terhadap biofilm pseudomonas aeruginosa secara in vitro. *UIN Syarif Hidayatullah*

Zheng, R., S. Wu, N. Ma, dan C. Sun. 2018. Genetic and physiological adaptations of marine bacterium *pseudomonas stutzeri* 273 to mercury stress. *Frontiers in Microbiology*. 9(APR):1–14.

Ziadi, M., T. Bouzaiene, S. M’Hir, K. Zaafouri, F. Mokhtar, M. Hamdi, dan C. Boisset-Helbert. 2018. Evaluation of the efficiency of ethanol precipitation and ultrafiltration on the purification and characteristics of exopolysaccharides produced by three lactic acid bacteria. *BioMed Research International*



## LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil identifikasi bakteri dan uji sensitivitas isolat *Staphylococcus haemolyticus*

### RS. PARU JEMBER Microorganism Test Report

Name:	Specimen No.: 202387	Admission No.: 23001959
Sex: Male	Specimen source: Blood	Bed No.:
Age: 0	Ordering physician:	Department: NICU
Collection time: 2023-04-15 11:47	Ordering time: 2023-04-15 13:47	
Diagnosis:		
Culture purpose: Normal culture&identify&susceptibility		

**Organism(001): Staphylococcus haemolyticus**  
**Resistance Phenotype:MRS Resistance Statistics:MDR**

Antibiotic Name	Group	MIC (µg/mL)	Report Result	Note	Antibiotic Name	Group	MIC (µg/mL)	Report Result	Note
Penicillin	A	>=1	R	80,T17	Cefuroxime			R	T17
Oxacillin	A	>=8	R	80,T17	Cefamandole			R	T17
Erythromycin	A	>=8	R	T03	Ceforanide			R	T17
Azithromycin	A	>=8	R	T03	Cefdinir			R	T17
Compound-Sulfamethoxazole	A	>=8/152	R		Ceftazidime			R	T17
Clindamycin	A	>=4	R		Ceftizoxime			R	T17
Rifampicin	B	>=4	R	24	Cefixime			R	T17
Tetracycline	B	>=16	R		Ceftibuten			R	T17
Doxycycline	B	>=16	R		Cefodizime			R	T17
Vancomycin	B	<=1	S		Cefuzonam			R	T17
Daptomycin	B	<=0.5	S		Cefoperazone			R	T17
Linezolid	B	<=4	S		Ceftriaxone			R	T17
Gentamycin	C	>=16	R		Cefotaxime			R	T17
Levofloxacin	C	>=8	R	50,T04	Cefpiramide			R	T17
Moxifloxacin	C	>=2	R	50	Cefetamet			R	T17
Teicoplanin	Inv	<=2	S		Cefteram			R	T17
Gatifloxacin	O	>=4	R	50	Cefpodoxime			R	T17
Nitrofurantoin	U	<=32	*		Cefditoren			R	T17
Amoxicillin			R	T17	Cefminox			R	T17
Ampicillin			R	T17	Cefepime			R	T17
Methicillin			R	T17	Cefpirome			R	T17
Nafcillin			R	T17	Loracarbef			R	T17
Dicloxacillin			R	T17	Cefoxitin		>=16	R	80
Cloxacillin			R	T17	Latamoxef			R	T17
Carbenicillin			R	T17	Meropenem			R	T17
Ticarcillin			R	T17	Ertapenem			R	T17
Mecillinam			R	T17	Panipenem			R	T17
Azlocillin			R	T17	Imipenem			R	T17

Print time: 5/3/2023 1:09:32 PM



Piperacillin	R	T17	Doripenem	R	T17
Mezlocillin	R	T17	Faropenem	R	T17
Cefalexin	R	T17	Aztreonam	R	IR
Cephadrine	R	T17	Piperacillin/Tazobactam	R	T17
Cefroxadine	R	T17	Piperacillin/Sulbactam	R	T17
Cefadroxil	R	T17	Ticarcillin/Clavulanate	R	T17
Cephapirin	R	T17	Amoxicillin/Clavulanate	R	T17
Cephacetrile	R	T17	Amoxicillin/Sulbactam	R	T17
Cefaloridne	R	T17	Ampicillin/Sulbactam	R	T17
Cefathiamidine	R	T17	Cefoperazone/Sulbactam	R	T17
Cephalothin	R	T17	Mezlocillin/Sulbactam	R	T17
Cefazolin	R	T17	Ceftazidime/Clavulanate	R	T17
Ceftazole	R	T17	Cefotaxime/Clavulanate	R	T17
Cefbuperazone	R	T17	Ceftolozane-tazobactam	R	T17
Cefonicid	R	T17	Clarithromycin	R	T03
Cefotetan	R	T17	Nalidixic Acid	R	IR
Cefaclor	R	T17	Ciprofloxacin	R	T04
Cefprozil	R	T17	Colistin	R	IR
Cefotiam	R	T17	Polymyxin B	R	IR
Cefmetazole	R	T17			

**Note**

80: For *Staphylococcus* sp. with Oxacillin R, All penicillins, cephalosporins (except Ceftaroline), carbapenems, and other beta-lactams may appear active in vitro, but are not effective clinically.

T17: For *Staphylococcus*, S to penicillin are predictably S to all B-lactam antibiotics; S to oxacillin are predictably S to all re-B-lactam antibiotics; R to oxacillin are predictably R to B-lactam antibiotics (except Ceftaroline).

T03: Azithromycin, Clarithromycin and Erythromycin have almost identical spectrum of activity.

24: Rifampin should not be used alone for antimicrobial therapy.

50: *Staphylococcus* spp. may become R within three to four days after initiation of therapy with quinolones. Testing of repeat isolates may be warranted.

T04: Ciprofloxacin and Levofloxacin have almost identical spectrum of activity.

**Remark:****Note:**

S: Susceptible; I: Intermediate; R: Resistant; S-DD: Susceptible-dose dependent; IR: Intrinsic Resistance; \*: The bacterium has no judgment point for this drug; A: Preferred drugs and routine treatment; B: Preferred drugs and optional treatment; C: Replacement or supplemental drugs; U: Preferred urinary tract drugs; O: Other report; Inv: Under research drugs;

MDR: Multi-Drug resistant; MRS: Methicillin-resistant staphylococci;

Technologist: 1

Reviewer:

Test time: 2023-04-15

\*The report is only responsible for our system, the results for the doctor's reference only.

Lampiran 2. Tabel presipitasi amonium sulfat

Initial concentration of ammonium sulfate (percentage saturation at 0 °C)	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
	Solid ammonium sulfate (grams) to be added to 100 ml of solution																
0	10.6	13.4	16.4	19.4	22.6	25.8	29.1	32.6	36.1	39.8	43.6	47.6	51.6	55.9	60.3	65.0	69.7
5	7.9	10.8	13.7	16.6	19.7	22.9	26.2	29.6	33.1	36.8	40.5	44.4	48.4	52.6	57.0	61.5	66.2
10	5.3	8.1	10.9	13.9	16.9	20.0	23.3	26.6	30.1	33.7	37.4	41.2	45.2	49.3	53.6	58.1	62.7
15	2.6	5.4	8.2	11.1	14.1	17.2	20.4	23.7	27.1	30.6	34.3	38.1	42.0	46.0	50.3	54.7	59.2
20	0	2.7	5.5	8.3	11.3	14.3	17.5	20.7	24.1	27.6	31.2	34.9	38.7	42.7	46.9	51.2	55.7
25		0	2.7	5.6	8.4	11.5	14.6	17.6	21.1	24.5	28.0	31.7	35.5	39.5	43.6	47.8	52.2
30			0	2.8	5.6	8.6	11.7	14.8	18.1	21.4	24.9	28.5	32.3	36.2	40.2	44.5	48.8
35				0	2.8	5.7	8.7	11.8	15.1	18.4	21.8	25.4	29.1	32.9	36.9	41.0	45.3
40					0	2.9	5.8	8.9	12.0	15.3	18.7	22.2	25.8	29.6	33.5	37.6	41.8
45						0	2.9	5.9	9.0	12.3	15.6	19.0	22.6	26.3	30.2	34.2	38.3

Lampiran 3. Hasil uji pembentukan biofilm *S. haemolyticus*

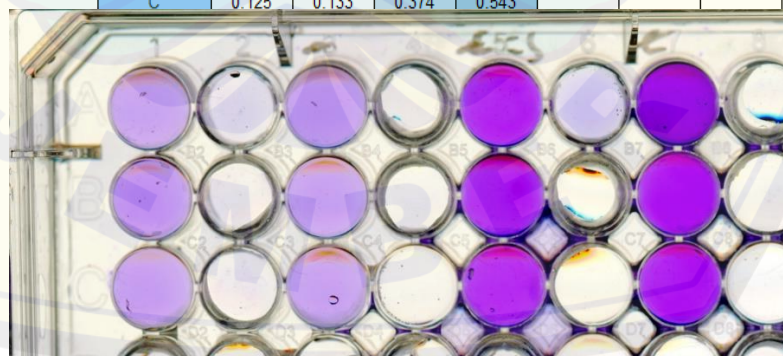
Perlakuan	Optical Density (OD)			Rata-rata	SD	ODcut
	Ulangan ke-1	2	3			
kontrol negatif TSB	0,137	0,145	0,125	0,136	0,010	0,166
kontrol negatif TSB + 1% glukosa	0,126	0,127	0,133	0,129	0,004	0,140
suspensi <i>S. haemolyticus</i> + TSB	0,450	0,432	0,374	0,419	0,040	0,538
$2 \times OD_{cut} < OD_{perlakuan} \leq 4 \times OD_{cut}$				Moderate biofilm-former		
suspensi <i>S. haemolyticus</i> + TSB + 1% glukosa	0,876	0,634	0,543	0,684	0,172	1,201
$OD_{perlakuan} > 4 \times OD_{cut}$				Strong biofilm-former		

**Procedure Details**

Plate Type: 96 WELL PLATE  
 Absorbance Endpoint: A1..C7  
 Wavelengths: 595  
 Read Speed: Normal

**Results**

	TSB	TSBG	TSBB	TSBGB	8	9	10	11	12
A	0.137	0.126	0.45	0.876					
B	0.145	0.127	0.432	0.634					
C	0.125	0.133	0.374	0.543					



Lampiran 4. Hasil uji penghambatan pembentukan biofilm *S. haemolyticus*

	k-	super40	super60	super80	AS40	AS60	AS80	et40	et60	et80
A	0.256	0.083	0.152	0.12	0.099	0.085	0.124	0.113	0.133	0.084
B	0.257	0.077	0.115	0.095	0.098	0.074	0.103	0.08	0.089	0.114
C	0.239	0.067	0.107	0.134	0.1	0.086	0.11	0.087	0.106	0.109
%inhibisi	0	67.578	40.625	53.125	61.328	66.797	51.563	55.859	48.047	67.188
	0	70.039	55.253	63.035	61.868	71.206	59.922	68.872	65.370	55.642
	0	71.967	55.230	43.933	58.159	64.017	53.975	63.598	55.649	54.393
	x	69.861	50.369	53.364	60.452	67.340	55.153	62.776	56.355	59.074
stddev	1.796	6.890	7.800	1.636	2.960	3.513	5.344	7.090	5.760	
rata-rata kelompok		57.865			60.982			57.880		
stddev		10.49650019			6.11			3.223016341		



Lampiran 5. Hasil analisis statistika dari uji penghambatan pembentukan biofilm *S. haemolyticus*

**Tests of Normality**

Kelompok Uji	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statisti	df	Sig.	Statisti	df	Sig.
%	kontrol negatif		.	3		.
penghambatan	supernatan 40µL		.199	3		.995
	supernatan 60µL		.384	3		.751
	supernatan 80µL		.178	3		1.000
	presipitat ammonium sulfat 40µL		.336	3		.857
	presipitat ammonium sulfat 60µL		.226	3		.983
	presipitat ammonium sulfat 80µL		.275	3		.944
	presipitat etOH 40µL		.217	3		.988
	presipitat etOH 60µL		.199	3		.995
	presipitat etOH 80µL		.353	3		.822

a. Lilliefors Significance Correction

**Test of Homogeneity of Variances**

		Levene			
		Statistic	df1	df2	Sig.
% penghambatan	Based on Mean	1.964	9	20	.100
	Based on Median	.654	9	20	.739
	Based on Median and with adjusted df	.654	9	9.451	.732
	Based on trimmed mean	1.852	9	20	.120

**ANOVA**

% penghambatan

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10522.913	9	1169.213	31.516	.000
Within Groups	741.970	20	37.098		
Total	11264.882	29			

**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: % penghambatan

LSD

(I) Kelompok Uji	(J) Kelompok Uji	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
kontrol negatif	supernatan 40µL	-69.861333*	4.973160	.000
	supernatan 60µL	-50.369333*	4.973160	.000
	supernatan 80µL	-53.364333*	4.973160	.000
	presipitat ammonium sulfat 40µL	-60.451667*	4.973160	.000
	presipitat ammonium sulfat 60µL	-67.340000*	4.973160	.000
	presipitat ammonium sulfat 80µL	-55.153333*	4.973160	.000
	presipitat etOH 40µL	-62.776333*	4.973160	.000
	presipitat etOH 60µL	-56.355333*	4.973160	.000
	presipitat etOH 80µL	-59.074333*	4.973160	.000
	supernatan 40µL	kontrol negatif	69.861333*	4.973160
supernatan 60µL		19.492000*	4.973160	.001
supernatan 80µL		16.497000*	4.973160	.003
presipitat ammonium sulfat 40µL		9.409667	4.973160	.073

	presipitat ammonium sulfat 60µL	2.521333	4.973160	.618
	presipitat ammonium sulfat 80µL	14.708000*	4.973160	.008
	presipitat etOH 40µL	7.085000	4.973160	.170
	presipitat etOH 60µL	13.506000*	4.973160	.013
	presipitat etOH 80µL	10.787000*	4.973160	.042
supernatan 60µL	kontrol negatif	50.369333*	4.973160	.000
	supernatan 40µL	-19.492000*	4.973160	.001
	supernatan 80µL	-2.995000	4.973160	.554
	presipitat ammonium sulfat 40µL	-10.082333	4.973160	.056
	presipitat ammonium sulfat 60µL	-16.970667*	4.973160	.003
	presipitat ammonium sulfat 80µL	-4.784000	4.973160	.348
	presipitat etOH 40µL	-12.407000*	4.973160	.021
	presipitat etOH 60µL	-5.986000	4.973160	.243
	presipitat etOH 80µL	-8.705000	4.973160	.095
supernatan 80µL	kontrol negatif	53.364333*	4.973160	.000
	supernatan 40µL	-16.497000*	4.973160	.003
	supernatan 60µL	2.995000	4.973160	.554
	presipitat ammonium sulfat 40µL	-7.087333	4.973160	.170
	presipitat ammonium sulfat 60µL	-13.975667*	4.973160	.011
	presipitat ammonium sulfat 80µL	-1.789000	4.973160	.723
	presipitat etOH 40µL	-9.412000	4.973160	.073
	presipitat etOH 60µL	-2.991000	4.973160	.554
	presipitat etOH 80µL	-5.710000	4.973160	.264
presipitat ammonium sulfat 40µL	kontrol negatif	60.451667*	4.973160	.000
	supernatan 40µL	-9.409667	4.973160	.073
	supernatan 60µL	10.082333	4.973160	.056
	supernatan 80µL	7.087333	4.973160	.170
	presipitat ammonium sulfat 60µL	-6.888333	4.973160	.181
	presipitat ammonium sulfat 80µL	5.298333	4.973160	.299

	presipitat etOH 40µL	-2.324667	4.973160	.645
	presipitat etOH 60µL	4.096333	4.973160	.420
	presipitat etOH 80µL	1.377333	4.973160	.785
presipitat ammonium sulfat 60µL	kontrol negatif	67.340000*	4.973160	.000
	supernatan 40µL	-2.521333	4.973160	.618
	supernatan 60µL	16.970667*	4.973160	.003
	supernatan 80µL	13.975667*	4.973160	.011
	presipitat ammonium sulfat 40µL	6.888333	4.973160	.181
	presipitat ammonium sulfat 80µL	12.186667*	4.973160	.024
	presipitat etOH 40µL	4.563667	4.973160	.370
	presipitat etOH 60µL	10.984667*	4.973160	.039
	presipitat etOH 80µL	8.265667	4.973160	.112
presipitat ammonium sulfat 80µL	kontrol negatif	55.153333*	4.973160	.000
	supernatan 40µL	-14.708000*	4.973160	.008
	supernatan 60µL	4.784000	4.973160	.348
	supernatan 80µL	1.789000	4.973160	.723
	presipitat ammonium sulfat 40µL	-5.298333	4.973160	.299
	presipitat ammonium sulfat 60µL	-12.186667*	4.973160	.024
	presipitat etOH 40µL	-7.623000	4.973160	.141
	presipitat etOH 60µL	-1.202000	4.973160	.811
	presipitat etOH 80µL	-3.921000	4.973160	.440
presipitat etOH 40µL	kontrol negatif	62.776333*	4.973160	.000
	supernatan 40µL	-7.085000	4.973160	.170
	supernatan 60µL	12.407000*	4.973160	.021
	supernatan 80µL	9.412000	4.973160	.073
	presipitat ammonium sulfat 40µL	2.324667	4.973160	.645
	presipitat ammonium sulfat 60µL	-4.563667	4.973160	.370
	presipitat ammonium sulfat 80µL	7.623000	4.973160	.141
	presipitat etOH 60µL	6.421000	4.973160	.211
	presipitat etOH 80µL	3.702000	4.973160	.465
presipitat etOH 60µL	kontrol negatif	56.355333*	4.973160	.000
	supernatan 40µL	-13.500000*	4.973160	.013

	supernatan 60µL	5.986000	4.973160	.243
	supernatan 80µL	2.991000	4.973160	.554
	presipitat ammonium sulfat 40µL	-4.096333	4.973160	.420
	presipitat ammonium sulfat 60µL	-10.984667*	4.973160	.039
	presipitat ammonium sulfat 80µL	1.202000	4.973160	.811
	presipitat etOH 40µL	-6.421000	4.973160	.211
	presipitat etOH 80µL	-2.719000	4.973160	.591
presipitat etOH 80µL	kontrol negatif	59.074333*	4.973160	.000
	supernatan 40µL	-10.787000*	4.973160	.042
	supernatan 60µL	8.705000	4.973160	.095
	supernatan 80µL	5.710000	4.973160	.264
	presipitat ammonium sulfat 40µL	-1.377333	4.973160	.785
	presipitat ammonium sulfat 60µL	-8.265667	4.973160	.112
	presipitat ammonium sulfat 80µL	3.921000	4.973160	.440
	presipitat etOH 40µL	-3.702000	4.973160	.465
	presipitat etOH 60µL	2.719000	4.973160	.591

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

### Correlations

		Kelompok Uji	% penghambatan
Kelompok Uji	Pearson Correlation	1	.459*
	Sig. (2-tailed)		.011
	N	30	30
% penghambatan	Pearson Correlation	.459*	1
	Sig. (2-tailed)	.011	
	N	30	30

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



Lampiran 6. Hasil uji degradasi biofilm *S. haemolyticus*

	k-	s40	s60	s80	am40	am60	am80	etoh40	etoh60	etoh80	
A	0.211	0.146	0.131	0.14	0.121	0.146	0.142	0.151	0.154	0.139	595
B	0.227	0.13	0.145	0.142	0.147	0.129	0.171	0.161	0.152	0.141	595
C	0.236	0.16	0.152	0.129	0.154	0.151	0.161	0.16	0.145	0.148	595
% degradasi		0	30.806	37.915	33.649	42.654	30.806	32.701	28.436	27.014	34.123
		0	42.731	36.123	37.445	35.242	43.172	24.670	29.075	33.040	37.885
		0	32.203	35.593	45.339	34.746	36.017	31.780	32.203	38.559	37.288
	x		35	37	39	38	37	30	30	33	36
stdev		6.519	1.216	5.963	4.429	6.208	4.395	2.016	5.774	2.022	
rata-rata kelompok		36.867			35			33			
stdev		1.80			4.28891			3.26827			



Lampiran 7. Hasil analisis statistika dari uji degradasi biofilm *S. haemolyticus*

**Tests of Normality**

Kelompok Uji	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
% degradasi						
	kontrol negatif	.	3	.	3	.
	supernatan 40µL	.346	3	.837	3	.205
	supernatan 60µL	.302	3	.910	3	.420
	supernatan 80µL	.257	3	.961	3	.619
	presipitat ammonium sulfat 40µL	.365	3	.797	3	.107
	presipitat ammonium sulfat 60µL	.208	3	.992	3	.827
	presipitat ammonium sulfat 80µL	.347	3	.835	3	.201
	presipitat etOH 40µL	.326	3	.873	3	.304
	presipitat etOH 60µL	.178	3	.999	3	.952
	presipitat etOH 80µL	.331	3	.866	3	.283

a. Lilliefors Significance Correction

**Test of Homogeneity of Variances**

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
% degradasi	Based on Mean	2.228	9	20	.065
	Based on Median	.625	9	20	.763
	Based on Median and with adjusted df	.625	9	11.554	.756
	Based on trimmed mean	2.069	9	20	.084

**ANOVA**

% degradasi

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3540.593	9	393.399	19.816	.000
Within Groups	397.048	20	19.852		
Total	3937.641	29			

**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: % degradasi

LSD

(I) Kelompok Uji	(J) Kelompok Uji	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.
kontrol negatif	supernatan 40µL	-35.246785*	3.637984	.000
	supernatan 60µL	-36.543753*	3.637984	.000
	supernatan 80µL	-38.811069*	3.637984	.000
	presipitat ammonium sulfat 40µL	-37.547361*	3.637984	.000
	presipitat ammonium sulfat 60µL	-36.664814*	3.637984	.000
	presipitat ammonium sulfat 80µL	-29.716895*	3.637984	.000
	presipitat etOH 40µL	-29.904765*	3.637984	.000

	presipitat etOH 60µL	- 32.871063 <sup>*</sup>	3.637984	.000
	presipitat etOH 80µL	- 36.432274 <sup>*</sup>	3.637984	.000
supernatan 40µL	kontrol negatif	35.246785 <sup>*</sup>	3.637984	.000
	supernatan 60µL	-1.296969	3.637984	.725
	supernatan 80µL	-3.564284	3.637984	.339
	presipitat ammonium sulfat 40µL	-2.300576	3.637984	.534
	presipitat ammonium sulfat 60µL	-1.418029	3.637984	.701
	presipitat ammonium sulfat 80µL	5.529889	3.637984	.144
	presipitat etOH 40µL	5.342019	3.637984	.158
	presipitat etOH 60µL	2.375722	3.637984	.521
	presipitat etOH 80µL	-1.185489	3.637984	.748
supernatan 60µL	kontrol negatif	36.543753 <sup>*</sup>	3.637984	.000
	supernatan 40µL	1.296969	3.637984	.725
	supernatan 80µL	-2.267315	3.637984	.540
	presipitat ammonium sulfat 40µL	-1.003607	3.637984	.785
	presipitat ammonium sulfat 60µL	-.121061	3.637984	.974
	presipitat ammonium sulfat 80µL	6.826858	3.637984	.075
	presipitat etOH 40µL	6.638987	3.637984	.083
	presipitat etOH 60µL	3.672691	3.637984	.325
	presipitat etOH 80µL	.111480	3.637984	.976

supernatan 80µL	kontrol negatif	38.811069 <sup>†</sup>	3.637984	.000
	supernatan 40µL	3.564284	3.637984	.339
	supernatan 60µL	2.267315	3.637984	.540
	presipitat ammonium sulfat 40µL	1.263708	3.637984	.732
	presipitat ammonium sulfat 60µL	2.146255	3.637984	.562
	presipitat ammonium sulfat 80µL	9.094173 <sup>†</sup>	3.637984	.021
	presipitat etOH 40µL	8.906302 <sup>†</sup>	3.637984	.024
	presipitat etOH 60µL	5.940006	3.637984	.118
	presipitat etOH 80µL	2.378795	3.637984	.521
presipitat ammonium sulfat 40µL	kontrol negatif	37.547361 <sup>†</sup>	3.637984	.000
	supernatan 40µL	2.300576	3.637984	.534
	supernatan 60µL	1.003607	3.637984	.785
	supernatan 80µL	-1.263708	3.637984	.732
	presipitat ammonium sulfat 60µL	.882546	3.637984	.811
	presipitat ammonium sulfat 80µL	7.830465 <sup>†</sup>	3.637984	.044
	presipitat etOH 40µL	7.642594 <sup>†</sup>	3.637984	.049
	presipitat etOH 60µL	4.676298	3.637984	.213
	presipitat etOH 80µL	1.115087	3.637984	.762
presipitat ammonium sulfat 60µL	kontrol negatif	36.664814 <sup>†</sup>	3.637984	.000
	supernatan 40µL	1.418029	3.637984	.701
	supernatan 60µL	.121061	3.637984	.974
	supernatan 80µL	-2.146255	3.637984	.562

	presipitat ammonium sulfat 40µL	- .882546	3.637984	.811
	presipitat ammonium sulfat 80µL	6.947919	3.637984	.071
	presipitat etOH 40µL	6.760048	3.637984	.078
	presipitat etOH 60µL	3.793752	3.637984	.309
	presipitat etOH 80µL	.232541	3.637984	.950
presipitat ammonium sulfat 80µL	kontrol negatif	29.716895 <sup>†</sup>	3.637984	.000
	supernatan 40µL	-5.529889	3.637984	.144
	supernatan 60µL	-6.826858	3.637984	.075
	supernatan 80µL	-9.094173 <sup>†</sup>	3.637984	.021
	presipitat ammonium sulfat 40µL	-7.830465 <sup>†</sup>	3.637984	.044
	presipitat ammonium sulfat 60µL	-6.947919	3.637984	.071
	presipitat etOH 40µL	-.187871	3.637984	.959
	presipitat etOH 60µL	-3.154167	3.637984	.396
	presipitat etOH 80µL	-6.715378	3.637984	.080
presipitat etOH 40µL	kontrol negatif	29.904766 <sup>†</sup>	3.637984	.000
	supernatan 40µL	-5.342019	3.637984	.158
	supernatan 60µL	-6.638987	3.637984	.083
	supernatan 80µL	-8.906302 <sup>†</sup>	3.637984	.024
	presipitat ammonium sulfat 40µL	-7.642594 <sup>†</sup>	3.637984	.049
	presipitat ammonium sulfat 60µL	-6.760048	3.637984	.078

		presipitat ammonium sulfat 80µL	.187871	3.637984	.959
		presipitat etOH 60µL	-2.966296	3.637984	.424
		presipitat etOH 80µL	-6.527507	3.637984	.088
presipitat 60µL	etOH	kontrol negatif	32.871063 <sup>*</sup>	3.637984	.000
		supernatan 40µL	-2.375722	3.637984	.521
		supernatan 60µL	-3.672691	3.637984	.325
		supernatan 80µL	-5.940006	3.637984	.118
		presipitat ammonium sulfat 40µL	-4.676298	3.637984	.213
		presipitat ammonium sulfat 60µL	-3.793752	3.637984	.309
		presipitat ammonium sulfat 80µL	3.154167	3.637984	.396
		presipitat etOH 40µL	2.966296	3.637984	.424
		presipitat etOH 80µL	-3.561211	3.637984	.339
presipitat 80µL	etOH	kontrol negatif	36.432274 <sup>*</sup>	3.637984	.000
		supernatan 40µL	1.185489	3.637984	.748
		supernatan 60µL	-.111480	3.637984	.976
		supernatan 80µL	-2.378795	3.637984	.521
		presipitat ammonium sulfat 40µL	-1.115087	3.637984	.762
		presipitat ammonium sulfat 60µL	-.232541	3.637984	.950
		presipitat ammonium sulfat 80µL	6.715378	3.637984	.080
		presipitat etOH 40µL	6.527507	3.637984	.088

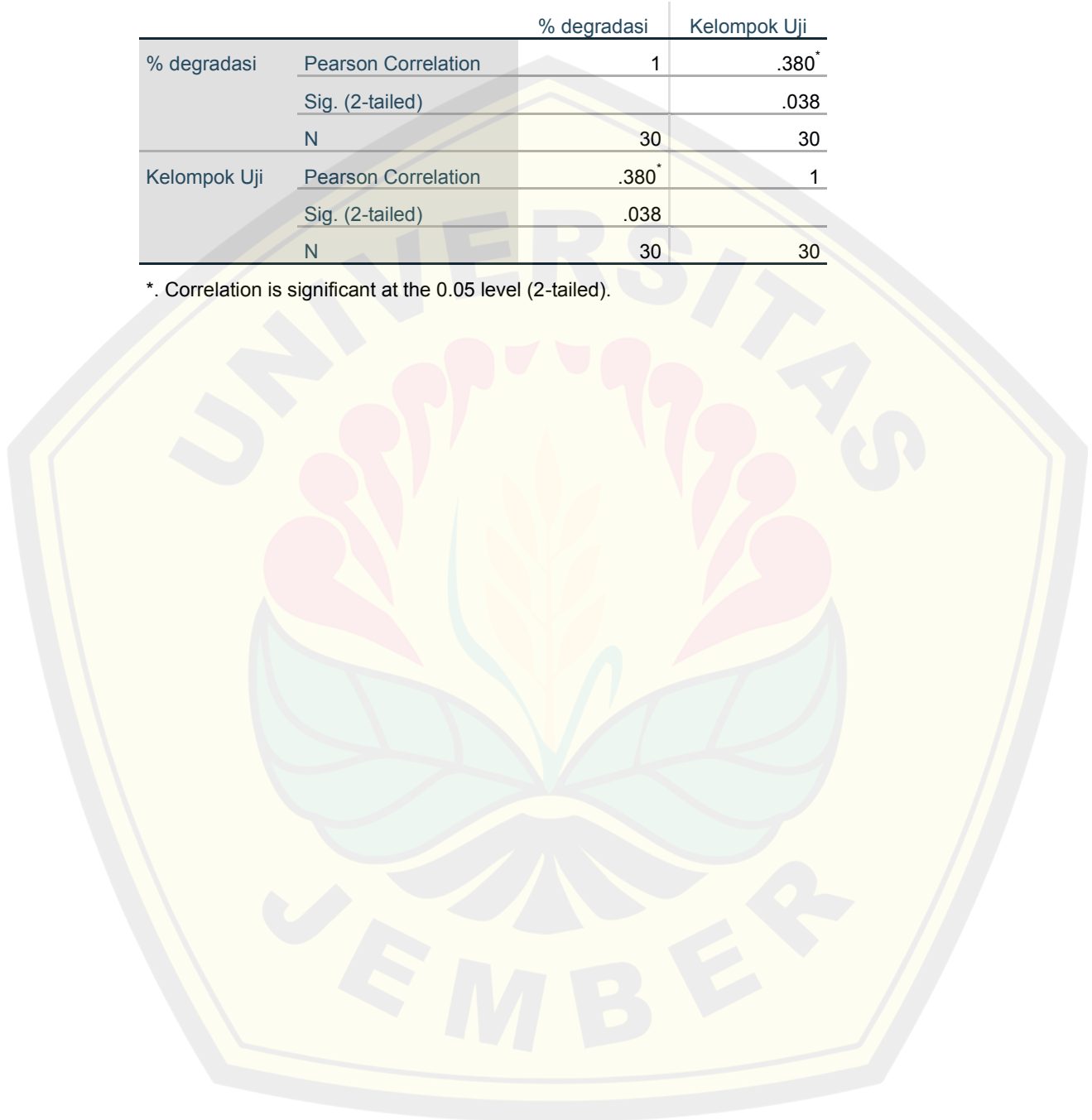
presipitat 60µL	etOH	3.561211	3.637984	.339
--------------------	------	----------	----------	------

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

### Correlations

		% degradasi	Kelompok Uji
% degradasi	Pearson Correlation	1	.380*
	Sig. (2-tailed)		.038
	N	30	30
Kelompok Uji	Pearson Correlation	.380*	1
	Sig. (2-tailed)	.038	
	N	30	30

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



Lampiran 8. Bahan yang dibutuhkan untuk pembuatan 10% gel SDS-PAGE

4X Separating Gel	Volume
40% Acryalmide/bisacrylamide (29:1)	1,25 mL
4X separation buffer	1,25 mL
Akuades steril	2,5 mL
10%APS	50 $\mu$ L
TEMED	5 $\mu$ L

4X Separating Gel	Volume
40% Acryalmide/bisacrylamide (29:1)	0,25 mL
4X stacking buffer	0,625 mL
Akuades steril	1,625 mL
10%APS	25 $\mu$ L
TEMED	2,5 $\mu$ L

Lampiran 9. Perhitungan bahan dalam pembuatan *buffer* elektroforesis SDS-PAGE

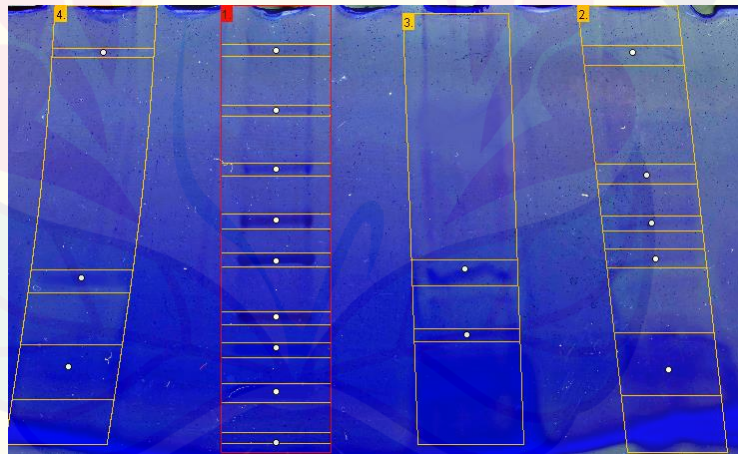
Larutan	Volume	Komposisi	Preparasi
4X Separation buffer	100 mL	<ul style="list-style-type: none"> <li>18 g Tris Base</li> <li>0,4 SDS</li> </ul>	Adjust pH hingga 8,8 dengan HCl ad hingga 100 mL menggunakan akuades steril
4X Stacking buffer	100 mL	<ul style="list-style-type: none"> <li>6,05 g Tris Base</li> <li>0,4 SDS</li> </ul>	Adjust pH hingga 8,8 dengan HCl ad hingga 100 mL menggunakan akuades steril
Running buffer	1 L	<ul style="list-style-type: none"> <li>10X Tris/Glisin/SDS Buffer</li> <li>900 mL akuades</li> </ul>	100 mL 10X Tris/Glisin/SDS Buffer dilarutkan dalam 900 mL akuades steril

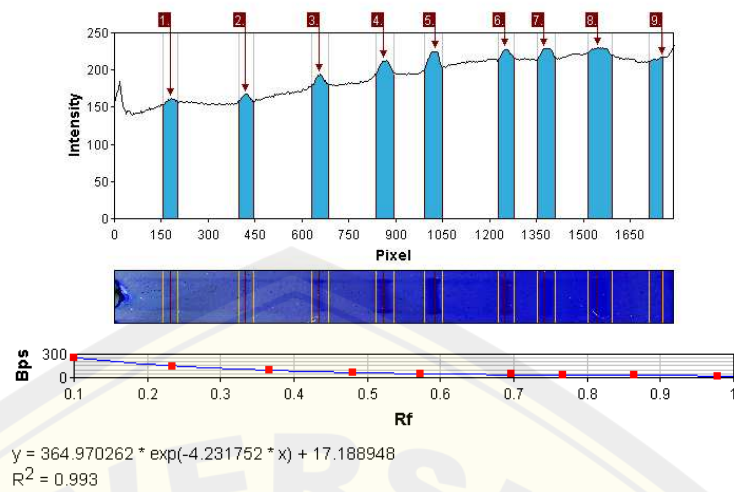


10% APS ( <i>ammonium persulfate</i> )	1 mL	• steril	0,1 g APS	0,1 g APS dilarutkan
		• 1 mL	akuades	dalam 1 mL akuades
			steril	steril
40% Acrylamide/bisacrylamide (29:1)	1 L			

---

Lampiran 10. Kurva kalibrasi *protein ladder* untuk perhitungan berat molekul profil pita protein produk ekstraseluler *P. stutzeri* menggunakan *GelAnalyzer*





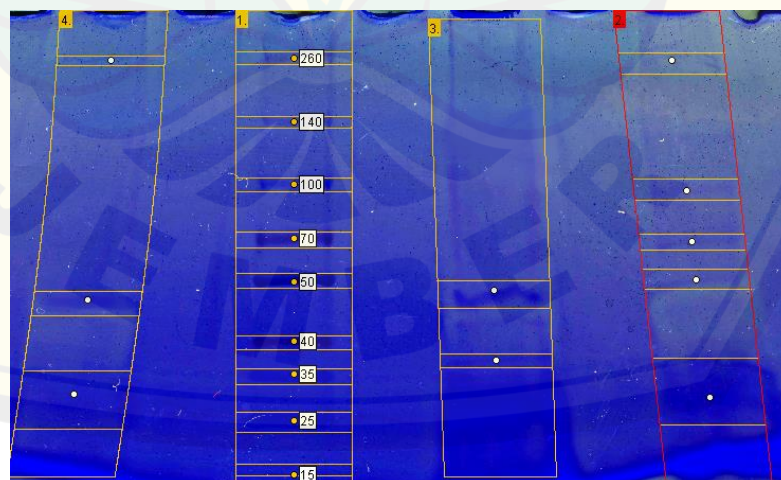
Analysis info - Lane #1

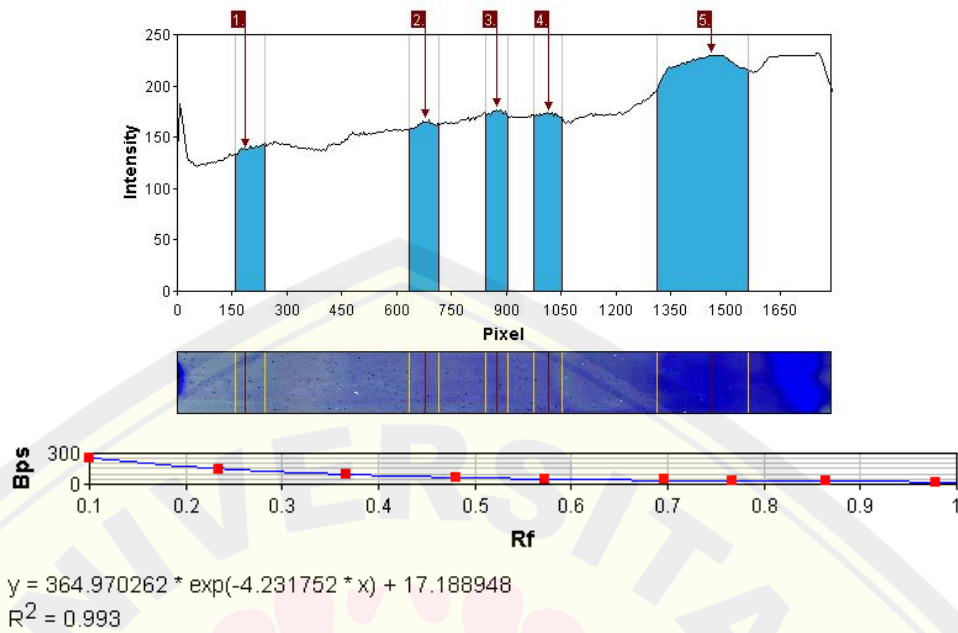
Show

Lane #	Band #	Rf	Raw volume	Cal. volume	MW
1.	1.	0.101	7618	-	260
1.	2.	0.234	7824	-	140
1.	3.	0.366	10286	-	100
1.	4.	0.481	12125	-	70
1.	5.	0.573	12571	-	50
1.	6.	0.697	11335	-	40
1.	7.	0.767	13006	-	35
1.	8.	0.864	17924	-	25
1.	9.	0.979	9651	-	15

Lampiran 11. Perhitungan berat molekul profil pita protein produk ekstraseluler *P. stutzeri* menggunakan *GelAnalyzer*

- 1) Perhitungan berat molekul pita protein pada sampel supernatan bebas sel *P. stutzeri*

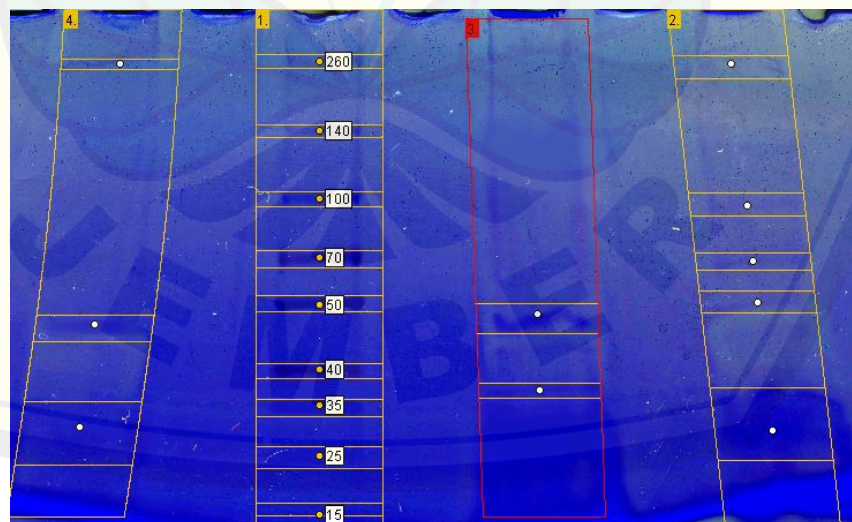


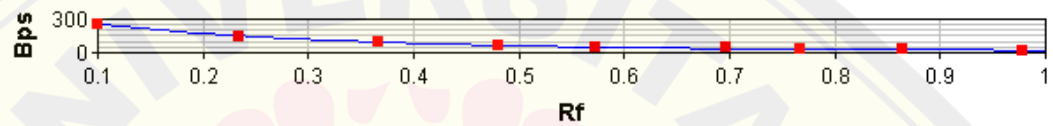
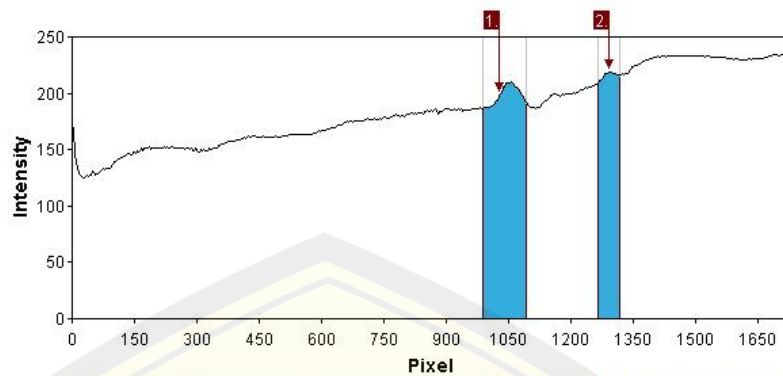


Analysis info - Lane #2

Lane #	Band #	Rf	Raw volume	Cal. volume	MW
2.	1.	0.104	11304	-	252
2.	2.	0.379	13327	-	91
2.	3.	0.487	10785	-	64
2.	4.	0.567	13424	-	50
2.	5.	0.816	55695	-	29

2) Perhitungan berat molekul pita protein pada sampel presipitat amonium sulfat *P. stutzeri*





$$y = 364.970262 * \exp(-4.231752 * x) + 17.188948$$

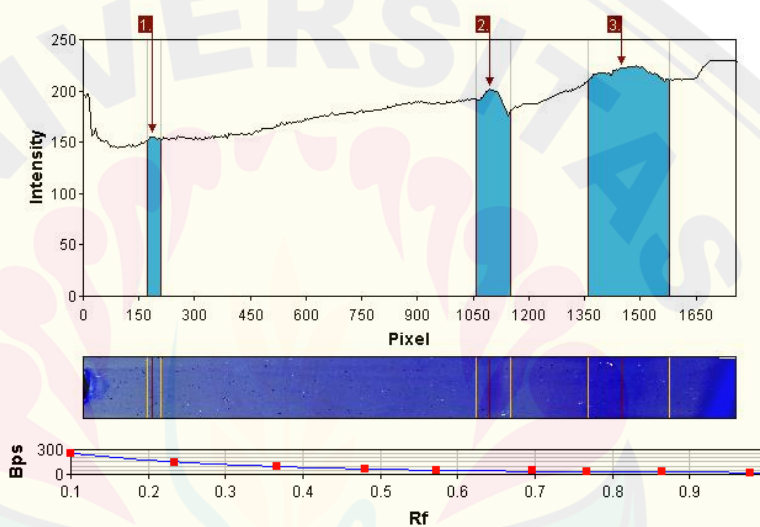
$$R^2 = 0.993$$

Analysis info - Lane #3

Show

Lane #	Band #	Rf	Raw volume	Cal. volume	MW
3.	1.	0.591	20835	-	47
3.	2.	0.738	11459	-	33

- 3) Perhitungan berat molekul pita protein pada sampel presipitat etanol *P. stutzeri*



Analysis info - Lane #4						
Show						
Lane #	Band #	Rf	Raw volume	Cal. volume	MW	
4.	1.	0.104	5853	-	252	
4.	2.	0.611	18122	-	45	
4.	3.	0.809	47984	-	29	

Lampiran 12. Hasil Produksi Produk Ekstraseluler *P. stutzeri*



- (a) supernatan bebas sel;
- (b) presipitat amonium sulfat;
- (c) presipitat etanol