

Uji Efektivitas Ekstrak Seledri (*Apium graveolens* L) Sebagai Penghambat Produksi Biofilm Pada *Salmonella typhi*

The Test Effectiveness of Celery Extract (*Apium graveolens* L) As Inhibitor the Production of Biofilm on *Salmonella typhi*

Didik Wahyudi

Akademi Analis Kesehatan Nasional Surakarta, email: didikww@gmail.com

ABSTRAK

Biofilm adalah kumpulan sel-sel bakteri baik sejenis ataupun beberapa jenis yang melekat pada subsrat, jaringan, atau sel yang diselubungi oleh lapisan pengikat polisakarida hasil ekskresi sel-sel bakteri, menyebabkan kerusakan pada permukaan sel, mukosa dan jaringan yang dilekatinya. *Salmonella typhi* yang berada dalam biofilm biasanya resisten terhadap antibiotik dan lebih virulen. Seledri (*Apium graveolens* L) memiliki kandungan apigenin mampu menghambat pembentukan biofilm. Tujuan Penelitian ini adalah untuk mengetahui kemampuan ekstrak seledri (*Apium graveolens* L) fraksi etanol dan etil asetat dalam menghambat pembentukan biofilm *Salmonella typhi*. Penelitian ini diawali dengan ekstraksi tanaman seledri (akar, batang, daun, biji) seledri dengan etanol dan etil asetat menggunakan metode maserasi, kemudian dibuat konsentrasi 0%, 2%, 4%, 6%, 8%, dan 10%. *Salomonella typhi* diisolasi dari pasien demam tifoid, kemudian dilakukan karakterisasi fisiologisnya dan uji sensitifitas antibiotik. Uji penghambatan biofilm *Salmonella typhi* dilakukan dengan metode microtiter plate clorida dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 595nm, Hasil pengukuran produksi biofilm berupa besarnya nilai Optical Density crystal violet, setiap perlakuan menggunakan ulangan tiga kali, data yang didapatkan dianalisis dengan One Way Anova. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak *Apium graveolens* L dengan pelarut etanol mampu menghambat produksi biofilm *Salmonella typhi* pada konsentrasi 6%, dan dengan pelarut etil asetat mampu menghambat pada konsentrasi 4%. Tidak ada perbedaan kemampuan penghambatan biofilm antara esktrak *Apium graveolens* L fraksi etanol dan etil asetat.

Kata kunci : biofilm, *Salmonella typhi*, seledri (*Apium graveolens* L).

ABSTRACT

Biofilms have a collection of cells or some kind of good bacteria attached to subsrat types, tissues, or cells are covered by a layer of binder polysaccharide excretion results of bacterial cells, causing damage to the cell surface, and mucosal tissues. *Salmonella typhi* which are in biofilms are usually resistant to antibiotics and more virulent. Celery (*Apium graveolens* L) contains apigenin could inhibit biofilm formation. The purpose of this study was to determine the ability of extracts of celery (*Apium graveolens* L) of ethanol and ethyl acetate fractions inhibit biofilm formation in *Salmonella typhi*. This research has been carried out by extraction celery plants (roots, stems, leaves, seeds) celery with ethanol and ethyl acetate using maseration methods, then made a concentration of 0%, 2%, 4%, 6%, 8%, and 10%. *Salomonella typhi* has isolated from patients with typhoid fever, and in doing their physiological characterization and antibiotic sensitivity testing. *Salmonella typhi* biofilm inhibition test was conducted using microtiter plate chloride using a spectrophotometer at a wavelength of 595nm, the measurement results of biofilm production in the form of the value of the Optical Density crystal violet, using replicates of each treatment three times, the data obtained were analyzed by One Way Anova. Results showed that the extract of *Apium graveolens* L with ethanol was able to inhibit the production of biofilm *Salmonella typhi* at a concentration of 6%, and the solvent ethyl acetate was able to inhibit at a concentration of 4%. There is no difference between the biofilm inhibition ability *Apium graveolens* L extract fraction of ethanol and ethyl acetate.

Key word : biofilm, *Salmonella typhi*, seledri (*Apium graveolens* L).

PENDAHULUAN

Salmonella typhi merupakan bakteri yang menyebabkan penyakit demam tifoid, bakteri ini menyebabkan infeksi pada manusia melalui makanan dan air. Menyerang sistem saluran cerna pada manusia, dengan gejala demam tinggi,

pusing, muntal, mual, nafsu makan berkurang dan nyeri pada bagian perut. Di Indonesia demam tifoid bisa menyerang balita, anak-anak dan dewasa, dengan prevalensi atau angka kejadian penyakitnya di Indonesia 380 – 780 kasus per 1000 penduduk atau kurang lebih 625.000 – 1,35 juta kasus setiap

tahun dan 75 – 90 % nya adalah anak berusia 2 – 19 tahun. (Dep. Kes, 2009). Beberapa kasus infeksi *tifoid* dilaporkan sering kambuh kembali ada sekitar 5 – 25 % kasus, dilaporkan bahwa kejadian resistensi kuman *Salmonella sp* penyebab demam tifoid mengalami peningkatan sejumlah 35 – 65 % selama 3 tahun terakhir (2009 – 2012). Kasus resistensi bakteri tersebut disebabkan oleh banyak hal, antara lain ketidaktaatan minum obat antibiotik, mutasi bakteri, kesalahan dalam perilaku pengobatan. Penyebab lainnya adalah karena bakteri membentuk biofilm dalam jaringan, sehingga sulit ditembus oleh beberapa antibiotik (Kemen. Kes, 2012).

Biofilm bakteri adalah sebuah komunitas bakteri yang satu spesies maupun beberapa spesies yang berada dalam satu substrat atau jaringan sebanyak 72% bakteri penyebab penyakit infeksi mengalami resistensi terhadap antibiotik dan lebih dari 50% kasus resistensi bakteri disebabkan karena pembentukan biofilm dalam jaringan tubuh (Rasmussen, 2005). Ketika *Salmonella typhi* yang berada dalam jaringan berinteraksi dengan bakteri sejenis ataupun jenis lain yang bisa menyebabkan demam tifoid (*S. paratyphi A*, *S. Paratyhi B*, *S. typhimurium*) maka bakteri tersebut akan berkolonisasi membentuk biofilm, dan pada kondisi tersebut maka akan sulit dimatikan dengan berbagai jenis antibiotik. (Fuqua, 1997 dan Federle, 2003).

Menurut Rukayadi (2010) pembentukan biofilm *Salmonella typhi* dan *Streptococcus mutans* dikendalikan oleh sistem *quorum sensing*. Sistem *quorum sensing* merupakan suatu proses pelepasan molekul sinyal antara bakteri, ketika jumlahnya di dalam lingkungan (jaringan) sudah mencukupi maka bakteri akan mengeluarkan faktor virulensi, setelah mengeluarkan faktor virulensi, apabila bakteri masih terus berkolonisasi maka akan membentuk biofilm yang bisa menyebabkan bakteri resisten terhadap antibiotik (Mustika, 2009). Pada kasus infeksi demam *tifoid*, sering terjadi pada kantung dan cairan empedu, *Salmonella typhi* mengadakan kolonisasi dan membentuk biofilm dalam kantung empedu, hal ini menyebabkan *Salmonella typhi* sulit untuk dimusnahkan dengan antibiotik, dan dalam waktu

yang lama penderita bisa mengeksresikan bakteri ini melalui tinjanya (Janssens, 2008).

Beberapa penelitian antara lain, Kool *et al* (2003), Magdalena dan Yogiara (2006), Wijiono (2009), Rukayadi (2009), menyatakan bahwa biofilm *Streptococcus mutans* (penyebab plak gigi) bisa dihambat oleh beberapa senyawa antara lain xanthorizol, apiin, apigenin, dan tt-farnesol yang diekstrak dari beberapa tanaman obat. Taga *et al* (2005) menyatakan bahwa sistem pengendalian pembentukan biofilm pada *Streptococcus mutans* dan *Salmonella typhi* dikendalikan oleh Gen pengendali yang sama yaitu: LuxS dan AI-2, Hal tersebut diperkuat oleh Lapidot (2006) menyatakan *Salmonella typhi* dan *Streptococcus mutans* memiliki mekanisme produksi dan penghambatan biofilm yang serupa.

Wijiyono (2008) dan Listyawati (2012) menyebutkan bahwa senyawa apigenin dan tt-farnesol mempunyai kemampuan untuk menghambat biofilm *Streptococcus mutans*. Senyawa apigenin terdapat banyak pada tanaman seledri (Gunawandan Mulyani. 2004) Penelitian tentang penghambatan biofilm pada *Streptococcus mutans* sudah cukup banyak, tetapi penelitian tentang penghambatan biofilm pada *Salmonella typhi* oleh ekstrak seledri (*Apium graveolens* L) yang mengandung apiin dan apigenin belum pernah dilakukan.

Seledri (*Apium graveolens* L.) merupakan sayuran yang sering digunakan sebagai bumbu masakan, lalapan dan penyedap sup. Batang, daun dan biji seledri mengandung apiin dan apigenin. Menurut Dalimartha (2000) apigenin yang terdapat dalam seledri bisa diisolasi dengan pelarut etanol maupun etil asetat.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan Penelitian.

Autoclave, inkubator, *Laminar air flow*, *waterbath*, petridish, jarum ose, bunsen, lemari es, pH meter, spektrofotometer, kuvet, *shaker*, *sentrifuge*, mikropipet, jangka sorong, timbangan elektrik, Elenmeyer, *bekerglass*, Aluminium foil, *Rotary evaporator*. Tabung biakan kuman, Rak Tabung Reaksi, vortek, kertas saring.

Tanaman seledri (Akar, batang, daun, bunga, biji, dan buah) *Apium graveolens*, Isolat kuman *Salmonella*

typhi (diisolasi dari Rumah Sakit Dr. Moewardi Surakarta), Medium Luria-Bertani (LB), trichloroacetic acid (TCA), NaOH 0,5 M, buffer fosfat pH 8. Media Trypticase soy broth–0.6% yeast extract (TSBYE), 5% glicerol, *Trypticase soy agar* (TSA), *microtiter plate* PVC, Etanol 70%, Hexane, Aquades steril, crystal violet, glukosa 5%. Media *Brain Heart Infusion* (BHI), *MacConkey* (MC). Media Uji Biokimia: *Kliger Iron Agar* (KIA), *Sulfide Indol Motility* (SIM), Urea, Citrat, *Methyl Red* (MR), *Voges Proskauer* (VP), *Phenyl Alanine Deaminase* (PAD). Media Gula- Gula (Glukosa, Laktosa, Manitol, Maltosa, Sukrosa). NaCl 0,9 % steril. Reagen *Erlich*, *Methyl Red* (MR), Ferri Klorida (FeCl₃) 10 %, Kalium Hidroksida (KOH) 40 %, *Barried*, Cat Gram A, B, C, dan D. disk antibiotik lengkap.

Prosedur Penelitian

Gambar 1 merupakan flow chart rancangan penelitian.

1. Karakterisasi dan Ekstraksi *Apium graveolens* L

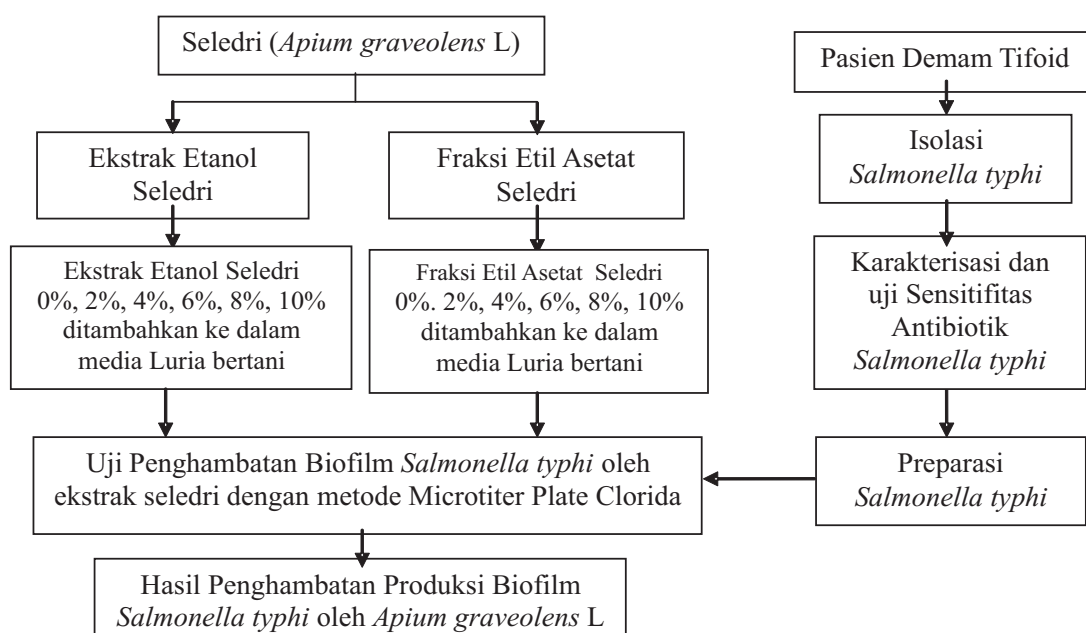
Apium graveolens L (seledri) yang digunakan dalam penelitian ini adalah jenis yang biasa digunakan untuk memasak berumur 3 bulan, yang didapatkan dari Perkebunan Tanaman Sayur dan Obat di Kecamatan Karangpandan, Kabupaten

Karanganyar, Provinsi Jawa Tengah. Pembuatan fraksi etanol 70% seledri dibuat dengan cara sebagai berikut, herbal tanaman seledri yang telah dikeringkan pada suhu 50°C selama 5 hari diambil sebanyak 2 kg. Setelah kering dilakukan ekstraksi dengan metode maserasi, herbal seledri dimasukkan ke dalam bejana, kemudian ditambahkan dengan 10 L etanol 70% ditutup dan dibiarkan selama 5 hari. Diserkai, dan diperas ampasnya. Sari dari fraksi etanol yang diperoleh kemudian dilakukan pemekatan sampai dihasilkan ekstrak etanolik seledri.

Pembuatan fraksi etil asetat seledri dilakukan dengan cara sebagai berikut, seratus gram ekstrak etanolik seledri disuspensi dengan air panas sebanyak 100 mL kemudian diekstraksi dengan mempergunakan larutan n-hexane 50 ml sebanyak dua kali. Air hasil ekstraksi tersebut kemudian dilakukan ekstraksi ulang dengan menggunakan pelarut etil asetat 50 ml sebanyak dua kali. Hasil yang didapatkan dari fraksi etil asetat tersebut selanjutnya dilakukan pemekatan.

2. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Uji

Bakteri *Salmonella typhi* diperoleh dari isolasi dari pasien Rumah Sakit Umum Dr. Moewardi



Gambar 1. Rancangan Penelitian Uji efektifitas Ekstrak *Apium graveolens* L dalam menghambat produksi biofil *Salmonella typhi*

di Surakarta. Karakterisasi dilakukan dari sampel darah yang didapatkan dari penderita demam tifoid dimasukkan ke dalam media BHI secara aseptis kemudian dihomogenkan dan diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam. Kemudian diinokulasi ke media *Mac Conkey* agar, digunakan ohse bulat secara goresan dengan aseptis, kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam. Setelah itu dilanjutkan uji biokimia. Dan uji sensitivitas antibiotik lengkap dengan metode difusi agar (Bauer, 1966). Dengan cara diambil beberapa koloni *Salmonella typhi* dari pertumbuhan 24 jam pada agar, disuspensikan ke dalam 0,5 mL BHI cair, diinkubasikan 4 jam pada suhu 37°C. Suspensi yang telah terbentuk tersebut ditambahkan aquades steril hingga kekeruhan tertentu, yang sama dengan standar konsentrasi kuman 10⁸ CFU pel ml (CFU = *Coloni Forming Unit*). Sebanding dengan setengah Mc Farland, kemudian kapas lidi steril dicelupkan ke dalam suspensi kuman lalu ditekan-tekan pada dinding tabung hingga kapasitasnya tidak terlalu basah, kemudian kapas lidi tersebut dioleskan pada permukaan media agar hingga rata. Setelah itu diletakkan beberapa disk antibiotik yang ingin diujikan di atas media, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 – 24 jam.

Pembacaan hasil dilakukan berdasarkan adanya diameter zona radikal, yaitu daerah di sekitar disk antibiotik yang sama sekali tidak ditemukan adanya pertumbuhan bakteri, kemudian diameter yang telah diukur dibandingkan dengan standar pada masing-masing antibiotik.

3. Uji Pembentukan Biofilm dengan Microtiter Plate Polivinil Klorida.

(Djordjevic *et al*, 2002; Rukayadi dan Hwang, 2006)

Kultur *Salmonella typhi* pada media LB segar yang mengandung ekstrak *Apium graveolens* pada konsentrasi 0% (sebagai kontrol) 2%, 4%, 6%, 8% dan 10%, kemudian diinkubasi dalam 10 mL media diperkaya TSBYE, pada suhu 32°C semalam. Tes produksi biofilm dilakukan dengan media Luria Bertani. Kultur semalam di TSBYE dipindahkan (0,1 mL) ke 10 mL Luria Bertani dan divortex.

Setelah divortex, 100µL dialihkan ke dalam delapan pelat PVC microtiter (Becton Dickinson

Labware, Franklin Lakes, NJ), sebelumnya dibilas dengan 70% etanol dan udara kering. *Plate* tersebut dibuat dalam rangkap dua, diinkubasi, dan ditutup pada 32°C selama 20 dan 40 jam. Setiap *plate* termasuk delapan sumur MWB tanpa *P. aeruginosa* sebagai kontrol. Kekeruhan sel dipantau menggunakan pembaca piring microtiter (Bio-Rad, Richmond, Calif), dengan densitas optik 595 nm (OD595), dan dicatat pada interval waktu yang berbeda.

Set *plate* pertama digunakan untuk pembentukan biofilm pengukuran setelah 40 jam pembentukan biofilm. OD rata-rata dari sumur kontrol itu dikurangkan dari OD dari semua tes sumur. Setelah 40 jam periode inkubasi, media telah dihilangkan dari sumuran, dan sumur *microtiter plate* dicuci lima kali dengan air suling steril untuk menghilangkan bakteri yang tidak terikat kuat.

Plate dikeringkan di udara selama 45 menit dan masing-masing dilakukan pewarnaan dengan 150 µL dari kristal violet 1% larutan dalam air selama 45 menit. Setelah pewarnaan, *plate* yang dicuci dengan air suling steril lima kali. Pada kondisi ini, biofilm yang terlihat sebagai cincin ungu yang terbentuk di sisi masing-masing dengan baik. Analisis kuantitatif produksi biofilm dilakukan dengan menambahkan 200 µL dari 95% etanol ke dalam sumur. Sebanyak 100 µL dari masing-masing dipindahkan ke microtiter *plate* baru dan OD ungu kristal yang ada diukur dengan spektrofotometer pada 595 nm. Uji biofilm dengan microtiter *plate* dilakukan tiga kali ulangan.

4. Analisis statistik

Penurunan produksi biofilm pada *Salmonella typhi* dilihat dari hasil uji produksi biofilm dengan metode *Microtiter Plate Polivinil Klorida* pada media Luria bertani yang telah ditambahkan ekstrak etanol dan etil asetat pada masing-masing konsentrasi 0%, 2%, 4%, 6%, 8% dan 10%. Hasil pengukuran produksi biofilm berupa besarnya nilai Optical Density ungu kristal yang ada diukur pada 595 nm.

Semua eksperimen dilakukan dengan ulangan tiga kali. Data dianalisis menggunakan analisis varians (ANOVA) satu arah dengan P-nilai 0,05,

menggunakan perangkat lunak statistik paket SPSS versi 16 for Window's.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Bakteri Uji, *Salmonella typhi*.

Salmonella typhi merupakan patogen utama bagi manusia yang kadang-kadang mengkoloni pada manusia dan menimbulkan infeksi yang sering disebut sebagai demam *typhoid* atau tifus abdominalis. Setelah dilakukan identifikasi secara biokimia pada media gula-gula (fermentasi karbohidrat) didapatkan hasil karakteristik *Salmonella typhi* hasil isolasi dari Rumah Sakit Dr. Moewardi Surakarta sebagai berikut: pada media TSIA terlihat *Alkali Acid* (memfermentasikan glukosa tetapi tidak memfermentasikan laktosa, hal ini terlihat dari media yang berwarna kuning pada dasar dan merah pada lereng permukaan media agarnya, dengan menghasilkan H₂S, Pada Media SIM terlihat *Salmonella typhi* Motil, dengan indol negative, dan menghasilkan H₂S. Pada uji biokimia terlihat bahwa urea (-), *methilen red* (+), *citrat* (-), *Voges-Proskauer* (-), *phenil alanin* Deaminase (-). Pada media Uji fermentasi karbohidrat terlihat bahwa *Salmonella typhi* memfermentasikan glukosa, maltose dan manitol, tetapi tidak memfermentasikan laktosa dan sakarosa. Setelah dilakukan uji sensitivitas tes terhadap *Salmonella typhi* ditemukan bahwa dari 27 tes antibiotik yang ada 13 antibiotik (48%) sudah resisten terhadap *Salmonella typhi*.

Hasil isolasi *Salmonella typhi* hasil isolasi dari Rumah Sakit Dr. Moewardi Surakarta sudah resisten multi obat hal ini menyebabkan sulit diobati jika bakteri tersebut menimbulkan infeksi (Tabel 1). Adanya resistensi tersebut bisa dikarenakan beberapa hal antara lain adanya mutasi ataupun rekombinasi struktur gen yang terjadi di dalam sel bakteri. Beberapa bakteri secara alami memang resisten terhadap antibiotik tipe tertentu. Mekanisme resisten bakteri terhadap suatu antibiotik bisa melalui dua cara yaitu: 1) dengan mutasi genetika atau 2) dengan mendapatkan resistensi dari bakteri lainnya. (Kievit dan Iglewsski, 2000 dan Todar, 2004)

Mutasi merupakan perubahan spontan yang jarang terjadi pada materi genetis bakteri, diperkirakan

terjadi pada satu dari satu juta hingga satu dari sepuluh juta sel. Mutasi genetis yang berbeda akan menghasilkan tipe resistensi yang berbeda juga. Beberapa mutasi mengakibatkan bakteri dapat menghasilkan zat kimia (enzim) yang cukup untuk menonaktifkan antibiotika, ada juga tipe mutasi yang dapat menghilangkan organel atau bagian sel yang menjadi target serangan antibiotika, sedangkan mekanisme mutasi jenis lain bisa terjadi dengan cara menutup “gerbang” tempat masuknya antibiotika ke dalam sel, ada juga yang menghasilkan mekanisme pemompa yang dapat mengirim antibiotika keluar sel sehingga antibiotika tersebut tidak akan pernah dapat mencapai sasarannya (Mustika, 2009).

Bakteri bisa mendapatkan gen-gen resisten terhadap antibiotika dari bakteri lain dengan beberapa cara. Dengan melakukan proses perkawinan sederhana yang disebut “konjugasi,” bakteri dapat mentransfer materi genetis, termasuk kode-kode genetis yang resisten terhadap antibiotika (ditemukan dalam plasmid dan transposon) dari satu bakteri ke bakteri yang lainnya (Mustika, 2009).

Hasil penelitian uji sensitivitas (Tabel 1) antibiotik terhadap *Salmonella typhi* hasil isolasi dari bahan klinis tersebut, sejalan dengan hasil penelitian dan pernyataan yang dikemukakan oleh Lapidot *et al* (2006), bahwa *Salmonella typhi* hasil isolasi dari pasien cenderung resisten terhadap beberapa jenis antibiotik.

Beberapa jenis antibiotik yang sering dipakai dalam pengobatan penyakit infeksi cenderung resisten terhadap *Salmonella typhi* (misalnya amoxicilin, trimethoprim, penicilin G, ciprofloxacin) (Tabel 1), tetapi justru beberapa antibiotik yang jarang digunakan pada dunia medis beberapa sensitive terhadap *P. aeruginosa*, misalnya fosfomycin, meropenem, imipenem, gentamycin, piperacillen, hal ini disebabkan karena *Salmonella typhi* maupun beberapa bakteri penyebab infeksi yang lain jarang terpapar dengan antibiotik tersebut sehingga bakteri tidak membentuk zat anti terhadap beberapa antibiotik tersebut. Hal tersebut justru memberikan peluang untuk pengobatan beberapa penyakit infeksi, namun hal ini tidak menjamin penggunaan antibiotik tersebut secara terus-menerus, karena kasus resistensi antibiotik akan terus berkembang.

Tabel 1. Hasil Uji Sensitivitas antibiotik terhadap *Salmonella typhi* Hasil Isolasi dari RSUD Dr. Moewardi Jawa Tengah.

NO	NAMA OBAT	KODE	POTENSI OBAT (μ GRAM)	HASIL
1	Amoxycillin	AML	10	Resisten
2	Amoxycillin Clav.Acid	AMC	30	Sensitif
3	Cefriaxone	CRO	30	Sensitif
4	Ceffazidime	CAZ	2	Resisten
5	Clindamisin	DA	5	Resisten
6	Ciprofloxacin	CIP	5	Resisten
7	Penicillin G	P	30	Resisten
8	Sulfamethaxazole	SXT	100	Sensitif
9	Fosfomicin	FOS	50	Sensitif
10	Trimethoprim	W	5	Resisten
11	Streptomycin	SXT	10	Sensitif
12	Meropenem	MEM	30	Sensitif
13	Imipenem	IPM	30	Sensitif
14	Nalidic Acid	NA	30	Resisten
15	Amikacin	AK	300	Resisten
16	Cloramphenicol	C	30	Sensitif
17	Gentamycin	CN	10	Sensitif
18	Netilmicin	NET	15	Sensitif
19	Novobiocin	NV	5	Resisten
20	Cephalothin	KF	20	Resisten
21	Cefuroxime	CXM	30	Resisten
22	Kanamycin	KF	15	Resisten
23	Cefepime	FEP	30	Sensitif
24	Cefoxitin	FOX	30	Resisten
25	Compounds	CMP	300	Sensitif
26	Ofloxacin	OFL	30	Sensitif
27	Piperacillin	PPR	100	Sensitif

Pembentukan Biofilm dengan *Microtiter Plate Polivinil Klorida*

Biofilm adalah suatu istilah yang digunakan untuk menggambarkan suatu lingkungan kehidupan yang khusus dari sekelompok mikroorganisme, yang melekat ke suatu permukaan padat dalam lingkungan perairan. Hal ini menjadi mikrolingkungan yang unik dimana mikroorganisme dalam biofilm berbeda secara struktural maupun fungsional dengan yang hidup bebas atau planktonik (Bauman, 2009). Ada lima tahap perkembangan biofilm pada *Salmonella typhi*, yaitu (1). *initial attachment*, (2). *irreversible attachment*, (3). *maturation I*. (4). *maturation II*. (5). *dispersion* (Allison, 2000).

Bakteri yang berada di sebuah biofilm dapat memiliki sifat sangat berbeda dari bakteri yang hidup bebas. Sebagai lingkungan yang padat dan dilindungi dalam lapisan film memungkinkan mereka untuk bekerja sama dan berinteraksi dengan berbagai cara. Apabila suatu bakteri telah membentuk biofilm dan berkolonisasi dalam suatu jaringan atau organ biasanya sudah resisten terhadap beberapa jenis antibiotik (Adonizio, 2008) hal ini sejalan dengan hasil penelitian ini,

yang dapat dilihat pada Tabel 1 bahwa *Salmonella typhi* yang diisolasi dari sampel penderita demam tifoid resisten terhadap beberapa antibiotik.

Setelah dilakukan pengujian penghambatan Biofilm *Salmonella typhi* oleh ekstrak *Apium graveolens* L dengan pelarut etanol dan etil asetat didapatkan hasil di Tabel 2.

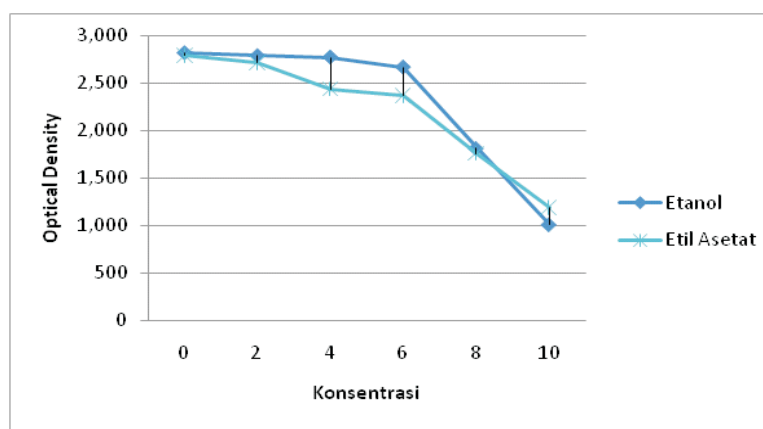
Pada hasil pengujian biofilm pada *Salmonella typhi* terlihat bahwa semakin besar konsentrasi ekstrak *Apium graveolens* L maka semakin besar pula penghambatan produksi biofilm pada *Salmonella typhi*, baik pada ekstrak dengan pelarut etanol dan etil asetat memiliki kemampuan menghambat produksi biofilm yang dihasilkan *Salmonella typhi*.

Uji Penghambatan Biofilm *Salmonella typhi* Oleh Ekstrak *Apium graveolens* L dengan Pelarut Etanol

Hasil uji normalitas menunjukkan nilai signifikannya semua di atas 0,05 sehingga bisa disimpulkan bahwa data normal, demikian juga untuk uji homogenitas didapat nilai signifikannya 0,068 atau lebih dari 0,05, sehingga data homogen, dari hasil uji tersebut bisa dilakukan uji One Way

Tabel 2. Hasil Optical density pada Uji daya hambat Biofilm *Salmonella typhi* oleh ekstrak *Apium graveolens* L dengan pelarut atanol dan etil asetat.

Pelarut	0	2	4	6	8	10
Etanol	2,793	2,832	2,773	2,667	1,837	1,004
	2,814	2,773	2,786	2,668	1,776	1,023
	2,853	2,766	2,767	2,675	1,832	0,976
Rata-rata	2,820	2,790	2,775	2,670	1,815	1,014
Etil Asetat	2,776	2,674	2,511	2,324	1,854	1,167
	2,763	2,758	2,474	2,405	1,784	1,154
	2,846	2,705	2,330	2,386	1,635	1,239
Rata-rata	2,795	2,712	2,438	2,372	1,758	1,187



Gambar 2. Nilai Optical Density penghambatan biofilm *Salmonella typhi* oleh ekstrak *Apium graveolens* L dengan pelarut Etanol dan Etil asetat.

Tabel 3. Uji One way Anova kemampuan penghambatan Ekstrak *Apium graveolens* L terhadap produksi biofilm *Salmonella typhi*.

Optical Density	ANOVA				
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8.386	5	1.677	2.478E3	.000
Within Groups	.008	12	.001		
Total	8.394	17			

Anova karena memenuhi persyaratan normalitas dan homogenitas data. Uji One Way Anova untuk uji penghambatan biofilm *Salmonella typhi* oleh ekstrak *Apium graveolens* L dengan pelarut etanol didapatkan hasil di Tabel 3.

Hasil uji One Way Anova didapatkan nilai signifikannya 0,000 (kurang dari 0,05), sehingga bisa disimpulkan bahwa ada minimal dua kelompok data yang berbeda nyata, sehingga perlu dilanjutkan dengan uji Post Hoc Tes (Tabel 4).

Uji Penghambatan Biofilm *Salmonella typhi* Oleh Ekstrak *Apium graveolens* L dengan Pelarut Etil Asetat.

Hasil uji normalitas menunjukkan nilai

signifikannya semua di atas 0,05 sehingga bisa disimpulkan bahwa data normal, demikian juga untuk uji homogenitas didapat nilai signifikannya 0,068 atau lebih dari 0,05, sehingga data homogen, dari hasil uji tersebut bisa dilakukan uji One Way Anova karena memenuhi persyaratan normalitas dan homogenitas data. Uji One Way Anova untuk uji penghambatan biofilm *Salmonella typhi* oleh ekstrak *Apium graveolens* dengan pelarut etanol didapatkan hasil di Tabel 5.

Hasil uji One Way Anova didapatkan nilai signifikannya 0,000 (kurang dari 0,05), sehingga bisa disimpulkan bahwa ada minimal dua kelompok data yang berbeda nyata, sehingga perlu dilanjutkan dengan uji Post Hoc Tes (Tabel 6).

Tabel 4. Hasil Uji posh hock Produksi Biofilm *Salmonella typhi* pada beberapa konsentrasi ekstrak *Apium graveolens* L dengan pelarut etanol.

Konsentrasi	0	2	4	6	8	10
Etanol	2.793	2.832	2.773	2.667	1.837	1.004
	2.814	2.773	2.786	2.668	1.776	1.023
	2.853	2.766	2.767	2.675	1.832	0.976
Rata-rata	2.820 ^a	2.790 ^a	2.775 ^a	2.670 ^b	1.815 ^c	1.014 ^d

Ket : Huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda nyata.

Tabel 5. Uji One way Anova kemampuan penghambatan Ekstrak *Apium graveolens* L terhadap produksi biofilm *Salmonella typhi*.

ANOVA					
Optical_density					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.774	5	1.155	236.132	.000
Within Groups	.059	12	.005		
Total	5.833	17			

Tabel 6. Hasil Uji posh hock Produksi Biofilm *Salmonella typhi* pada beberapa konsentrasi ekstrak *Apium graveolens* L dengan pelarut etanol.

Pelarut	0	2	4	6	8	10
Etil Asetat	2.776	2.674	2.511	2.324	1.854	1.167
	2.763	2.758	2.474	2.405	1.784	1.154
	2.846	2.705	2.330	2.386	1.635	1.239
Rata-rata	2.795 ^a	2.712 ^a	2.438 ^b	2.372 ^b	1.758 ^c	1.187 ^d

Ket : Huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda Nyata

Tabel 7. Hasil Uji Kemampuan Ekstrak *Apium graveolens* L dengan pelarut Etanol dan Etil Asetat.

	Optical_Density
Mann-Whitney U	123.000
Wilcoxon W	294.000
Z	-1.234
Asymp. Sig. (2-tailed)	.217
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.226 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: Pelarut

Hasil Uji Kemampuan Ekstrak *Apium graveolens* L dengan pelarut Etanol dan Etil Asetat.

Hasil uji statistik kemampuan ekstrak *Apium graveolens* L dengan pelarut etanol dan etil asetat menunjukkan bahwa nilai signifikan kemampuan ekstrak etanol dan etil asetat tidak berbeda nyata hal ini ditunjukkan dengan nilai signifikannya 0,217 (lebih besar dari 0,05). Seperti hasil uji Mann-Whitney di tabel 7.

Hasil uji kemampuan ekstrak *Apium graveolens* L pelarut etanol dan etil asetat terlihat sama dari hasil uji statistik di atas, walaupun pada konsentrasi 2 – 8 % terlihat kemampuan ekstrak dengan pelarut etil asetat dalam menghambat biofilm *Salmonella typhi* lebih

baik, namun pada konsentrasi 10 % terlihat kemampuan ekstrak dengan pelarut etanol terlihat lebih baik.

Ada beberapa faktor yang menentukan pembentukan biofilm suatu bakteri, bakteri dalam biofilm berkomunikasi melalui pesan kimia untuk membantu mengatur dan membentuk struktur tiga dimensi. Arsitektur suatu biofilm menyediakan perlindungan daripada bakteri yang berenang bebas. Sebagai contoh pada saat kadar oksigen rendah di bagian dalam biofilm maka akan lebih mengaktifkan zat antibiotik. Lebih dari itu, kehadiran begitu banyak jenis bakteri dalam biofilm akan meningkatkan kemungkinan bakteri dalam komunitas biofilm dalam melawan dan menjadi kebal terhadap pemberian

antibiotik. (Bauman, 2009). Seperti terlihat pada penelitian ini *Salmonella typhi* yang digunakan ternyata telah kebal dengan beberapa antibiotik.

Metode pemeriksaan pembentukan biofilm pada *Salmonella typhi* tersebut mengacu pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Djordjevic *et al* (2002) secara prinsip hasil penelitian yang diperoleh bisa menjadi acuan bahwa pembentukan biofilm dipengaruhi oleh banyak faktor, terutama zat kimia penghambat, lamanya inkubasi, jenis bakteri yang diuji, dan terutama diawali dari sistem *quorum sensing*. Sistem *quorum sensing* diawali dari terpenuhinya jumlah minimal suatu bakteri di lingkungan, kemudian pelepasan molekul sinyal (bahasa), setelah konsentrasinya di lingkungan bakteri terpenuhi, akan memicu pengeluaran faktor virulensinya, dan tahapan selanjutnya adalah pembentukan biofilm. Sehingga untuk menghambat pembentukan biofilm suatu bakteri bisa dilakukan dengan cara menghambat sistem *quorum sensing*nya.

Ekstrak *Apium graveolens* L diharapkan mampu mencegah patogenitas *Salmonella typhi* sehingga infeksi bisa dicegah dan pengobatan bisa berlangsung dengan lebih cepat. Sistem *quorum sensing* bisa menjadi jawaban atas permasalahan di atas, dengan cara mencegah bakteri mengekspresikan gen yang mensandi pembentukan faktor virulensi, pembentukan toksin, dan pelepasan antigen dengan mekanisme *competitive inhibition*, yaitu senyawa yang struktur kimiawinya homolog dengan molekul sinyal yang digunakan bakteri untuk berkomunikasi baik antar maupun inter spesies.

Hasil penelitian juga bisa diterapkan dalam industri pengawetan bahan makanan dan minuman, beberapa bakteri sering mengkontaminasi makanan atau minuman terutama bakteri pembusuk, akan berkolonisasi pada substrat makanan ataupun minuman tersebut yang pada akhirnya bisa mengeluarkan toksin yang bisa merusak produk makanan atau minuman, ekstrak *Apium graveolens* L diharapkan mampu mengontrol atau menghambat produksi biofilm bakteri melalui penghambatan *quorum sensing*, sehingga pencegahan pengumpulan massa dan *autoinducer* pada substrat bisa dihambat dan produksi toksin dan faktor virulensinya bisa dicegah.

Seperti telah kita ketahui, bahwa dalam Standar

Nasional Indonesia (SNI) untuk produk-produk makanan maupun minuman secara bakteriologi pada bahan makanan mentah tetap dicantumkan batas maksimal jumlah total bakteri yang masih diperbolehkan, padahal kalau bahan makanan tersebut dipanaskan seharusnya mikroorganisme pencemarnya akan mati, tetapi hal tersebut tetap diberlakukan karena untuk mencegah terbentuknya biofilm yang memicu bakteri untuk enterotoksin yang bersifat tahan panas, sehingga walaupun dipanaskan toksinnya akan tetap bisa bekerja merusak jaringan tubuh, disinilah peran sistem *quorum sensing* dan pembentukan biofilm pada bakteri bisa dimaksimalkan, dengan memanfaatkan sistem komunikasi pada bakteri ini banyak manfaat yang akan diperoleh yang perlu terus dikaji lagi sehingga bisa muncul penemuan-penemuan baru untuk kehidupan yang lebih baik di masa yang akan datang.

KESIMPULAN

Ekstrak *Apium graveolens* L dengan pelarut etanol dan etil asetat mampu menghambat pembentukan biofilm *Salmonella typhi*. Ekstrak *Apium graveolens* L dengan pelarut etanol konsentrasi 6 % mampu menghambat produksi biofilm *Salmonella typhi*, sedangkan pelarut etil asetat pada konsentrasi 4 %. Tidak ada perbedaan antara ekstrak *Apium graveolens* L dengan pelarut etanol dan etil asetat dalam menghambat produksi biofilm *Salmonella typhi*.

DAFTAR PUSTAKA

- Annous, B. A., Solomon, E. B., Cooke, P. H. and Burke, A. 2005. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on cantaloupe melons. *Journal of Food Safety* 25: 276-287.
- Bauman, 2009., biofilm, *Pseudomonas putida*, *Streptococcus mutans*., <http://biobakteri.wordpress.com/2009/06/07/8-biofilm/>. (4 November 2012).
- Borucki, M. K., Peppin, J. D., White, D., Loge, F. and Call, D. R. 2003. Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 7336-7342.
- Chavant, P., Gaillard-Martinie, B., Talon, R., Hebraud, M. and Bernardi, T. 2007. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *Journal of Microbiological Methods* 68: 605-612.
- Chia, T. W. R., Goulter, R. M., McMeekin, T., Dykes, G. A. and Fegan, N. 2009. Attachment of different *Salmonella* serovars to materials commonly used in a poultry processing plant. *Food Microbiology* 26: 853-859.
- DepKes, 2009. Penelitian Epidemiologi Beberapa Penyakit Infeksi Daerah Khusus Ibu Kota Jakarta, Penerbit Departemen Kesehatan DKI Jakarta tahun 2010
- Djordjevic D, Wiedmann M, McLandsborough LA. 2002. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm

- formation. *Appl Environ Microbiol* 68:2950-2958. de Kievit TR, Iglewski BH. 2000, Bacterium quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect Immun*; 68(9):4839-49
- Kool, DH, Mitzuarees MJ, Bassler BL. 2003, Interspecies communication in bacteria. *J Clin Invest* 2003; 112:1291-9
- Fuqua, C., Winans, S. C. & Greenberg, E. P. (1997). Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* 176, 269-275
- Gunawan, D. dan S. Mulyani. 2004. Ilmu Obat Alam (Farmakognosi) Jilid 1. Penebar Swadaya. Jakarta. 140 hlm.
- Janssens, J. C. A., Steenackers, H., Robijns, S., Gellens, E., Levin, J., Zhao, H., Hermans, K., Coster, D. D., Verhoeven, T. L., Marchal, K., Vanderleyden, J., Vos, D. E. D. and Keersmaecker, S. C. J. D. 2008. Brominated furanones inhibit biofilm formation by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Applied and Environmental Microbiology* 74 (21): 6639-6648.
- Jawetz, Melnick, Adelberg, 2008, Mikrobiologi Kedokteran (Medical Microbiology) Ed. 22., EGC, Jakarta
- Kemenkes RI, (2012); Laporan Epidemiologi beberapa kasus infeksi Endemis di Indonesia tahun 2012, *Cermin Dunia Kedokteran* Vol. 35, No.5, Edisi Januari -Maret 2013.
- Koo H, B. Schobel, K. Scott-Anne, G. Watson, W. H. Bowen, J. A. Cury, P. L. Rosalen, and Y. K. Park, 2005., Apigenin and *tt*-Farnesol with Fluoride on *S. mutans* Biofilm and Dental Caries., *J Dent Res*. Author manuscript; available in PMC 2006 July 10., Published in final edited form as: *J Dent Res*. 2005 November; 84(11): 1016-1020., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1490022> (Diunduh 03 desember 2013)
- Kroupitski, Y., Pinto, R., Brandl, M., Belausov, E. and Sela, S. (2009) Interactions of *Salmonella enterica* with lettuce leaves. *Journal of Applied Microbiology* 106: 1876-1885.
- Lapidot, A., Romling, U. and Yaron, S. 2006. Biofilm formation and the survival of *Salmonella* Typhimurium on parsley. *International Journal of Food Microbiology* 109: 229-233.
- Listyasari, NA., 2012, Pengaruh pasta gigi dengan kandungan propolis terhadap pembentukan plak, e-journal Media Medica Muda FK - Universitas Diponegoro. <http://ejournal-s1.undip.ac.id/index.php/medico/article/viewFile/1924/1922> (diunduh 6 Desember 2013).
- Magdalena, dan Yogiara, 2006., *Screening of Bioactive Compound from Plant Extract Inhibiting Biofilm Formation*". Prosiding PERMI tahun 2006.
- Manijeh, M., Mohammad, J. and Roha, K. K. 2008. Biofilm formation by *Salmonella enteritidis* on food contact surfaces. *Journal of Biological Sciences* 8 (2):502-505.
- Mustika F., 2009., Isolation and screening of Biofilm forming bacteria for optimization of biofilm production by addition of sugar and antibiotics variation and its concentration in Nile tilapia oral vaccines development (*Oreochromis niloticus* Lac), School of Life Sciences and Technology- ITB
- Oliveira, K., Oliveira, T., Teixeira, P., Azeredo, J., Henriques, M. and Oliveira, R. 2006. Comparison of the adhesion ability of different *Salmonella* Enteritidis serotypes to materials used in kitchens. *Journal of Food Protection* 69: 2352-2356.
- Pui, C. F., Wong, W. C., Chai, L. C., Lee, H. Y., Nillian, E., Ghazali F. M., Cheah, Y. K., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M. and Radu, S. 2011. Simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Typhimurium in sliced fruits using multiplex PCR. *Food Control* 22: 337-342.
- Rahayu DE., 1999., Kandungan Kimiawi Tanaman Obat Indonesia, Penerbit Pelita Karya Pustaka., Surabaya - Indonesia.
- Rasmussen TB, Thomas Bjarnsholt, Mette Elena Skindersoe, Morten Hentzer, Peter Kristoffersen, Manuela Ko'te, John Nielsen, Leo Eberl, and Michael Givskov, 2005., Screening for Quorum-Sensing Inhibitors (QSI) by Use of a Novel, Genetic System, the QSI Selector *Journal of Bacteriology*, Mar. 2005, p. 1799-1814 Vol. 187, No. 5 0021-9193/05/\$08.00_0 doi:10.1128/JB.187.5.1799-1814.2005., American Society for Microbiology. All Rights Reserved.
- Rukayadi Y, Hwang JK. 2006. Effect of xanthorrhizol on *Streptococcus mutans* biofilm in vitro. *J Mikrobiol Indones* (11):40-43.
- Rukayadi Y dan Hwang Jae Kwan, 2009., Pencegahan Quorum Sensing: Suatu pendekatan baru untuk mengatasi infeksi bakteri., *Cermin Dunia Kedokteran* Vol. 22, No.1, Edisi Maret - Mei 2009.
- Soewito, DS.M., 2009. Memanfaatkan Lahan-6 : Bercocok Tanam Seledri. Titik Terang, Jakarta.
- Suwanto, A., 2005 Strategi Baru Mengendalikan Penyakit Infeksi, <http://www.kompas.com/kompas-cetak/0211/081/iptek/mema36.htm> (20 Mei 2011).
- Taga ME, Semmelhack JL, Bassler BL, 2005., The LuxS-dependent autoinducer AI-2 controls the expression of an ABC transporter that functions in AI-2 uptake in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 2005; (42):77-93
- Wahyudi D., Sutarno, Pangastuti A, 2010 *Penghambatan Sistem Quorum Sensing Pseudomonas aeruginosa Oleh ekstrak Lengkuas (Alpinia galangga L)*, Simposium Penelitian bahan Obat Alami XV; UNS Press.
- White, A.P., Gibson, D.L., Collinson, S.K., Banser, P.A., Kay, W. W., 2003. Extracellular polysaccharides associated with thin aggregative fimbriae of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *J. Bacteriol.* 185, 5398-5407.
- Wijiono, 2009, Pencegahan Biofilm Ggigi dengan Apigenin dan *tt*-farnesol, Penerbit Universitas Sumatra Utara
- Zogaj, X., Nimtz, M., Rohde, M., Bokranz, W., Romling, U., 2001. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol. Microbiol.* 39, 1452-1463.