

PENGHAMBATAN PRODUKSI EKSOPTROTEASE DAN BIOFILM PADA *Pseudomonas aeruginosa* OLEH EKSTRAK *Apium graveolens* L

Didik Wahyudi ¹⁾, Yusianti Silviani ²⁾

^{1,2}Akademi Analis Kesehatan Nasional Surakarta

didikww@gmail.com

yusianti.silviani@gmail.com

ABSTRAK

Eksoprotease merupakan enzim yang dihasilkan *Pseudomonas aeruginosa*, yang produksinya berhubungan dengan sistem quorum sensing, yaitu proses yang terjadi pada bakteri dalam mengekspresikan molekul sinyal untuk menjadi patogen. Perilaku bakteri yang diatur sistem quorum sensing antara lain bioluminescen, sekresi virulensi, sporulasi, konjugasi, produksi enzim ekstraseluler, pembentukan biofilm dan produksi pigmen. *Pseudomonas aeruginosa* merupakan patogen oportunistik penyebab utama infeksi nosokomial. Penelitian bertujuan untuk mengetahui kemampuan ekstrak *Apium graveolens* L dalam menghambat quorum sensing *Pseudomonas aeruginosa*, berdasarkan besarnya penghambatan enzim eksoprotease dan produksi biofilmnya. *Pseudomonas aeruginosa* diisolasi dari Rumah Sakit Dr. Moewardi Surakarta; dikarakterisasi sifat sensitivitas terhadap beberapa antibiotik; ekstraksi *Apium graveolens* L menggunakan pelarut etanol; uji kemampuan ekstrak *Apium graveolens* L dalam penghambatan quorum sensing bakteri berdasarkan produksi enzim eksoprotease *Pseudomonas aeruginosa* dengan metode kemampuan menghidrolisis azocasein yang ada di dalam media dan diukur dengan spektrofotometer, dilanjutkan uji pembentukan biofilm pada microtiter plate PVC, dengan metode Optical density. Semua eksperimen dilakukan ulangan tiga kali, analisis data menggunakan satu arah analisis varians (ANOVA) dengan P-nilai 0,05 menggunakan perangkat lunak statistik SPSS. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak *Apium graveolens* L mempunyai kemampuan menghambat produksi enzim eksoprotease *Pseudomonas aeruginosa* pada konsentrasi 20% b/v, dan mampu menghambat produksi biofilm *Pseudomonas aeruginosa* pada konsentrasi 15%.

Kata kunci: *eksoprotease, biofilm, Pseudomonas aeruginosa, Apium graveolens* L.

ABSTRACT

Eksoprotease is an enzyme produced by Pseudomonas aeruginosa, whose production is associated with quorum sensing system, which is a process that occurs in bacteria in the express signaling molecules to become pathogenic. Behavior bacterial quorum sensing system arranged bioluminescen among other things, the secretion of virulence, sporulation, conjugation, the production of extracellular enzymes, biofilm formation and the production of pigments. Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogenic major cause of nosocomial infection. The study aims to determine the ability of Apium graveolens L extract in inhibiting Pseudomonas aeruginosa quorum sensing, based on the amount of enzyme inhibition eksoprotease and production biofilmnya. Pseudomonas aeruginosa was isolated from Hospital Dr. Moewardi Surakarta; characterized the nature of sensitivity to multiple antibiotics; Apium graveolens L extraction using ethanol; test the ability of Apium graveolens extract L in quorum sensing inhibition of bacterial enzyme production by Pseudomonas aeruginosa eksoprotease by hydrolyzing

ability azocasein method that is in the media and are measured with a spectrophotometer, followed by a test on a microtiter plate biofilm formation of PVC, with Optical density method. All experiments were performed three times replay, analysis of data using one-way analysis of variance (ANOVA) with a P-value of 0.05 using SPSS statistical software. The results showed that the extract of *Apium graveolens* L has the ability to inhibit the production of enzymes eksoprotease *Pseudomonas aeruginosa* at a concentration of 20% w / v, and is able to inhibit the production of biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* at a concentration of 15%.

Keywords: eksoprotease, biofilm, *Pseudomonas aeruginosa*, *Apium graveolens*

1. PENDAHULUAN

Eksoprotease merupakan enzim yang dihasilkan oleh *Pseudomonas aeruginosa* yang berhubungan dengan sistem *quorum sensing*. *Quorum sensing* merupakan suatu proses yang memungkinkan bakteri dapat berkomunikasi dengan mensekresikan molekul sinyal yang disebut *autoinducer* atau molekul sinyal sebagai bahasa. Proses ini memungkinkan suatu populasi bakteri dapat mengatur ekspresi gen tertentu. Konsentrasi *autoinducer* di lingkungan sebanding dengan jumlah bakteri yang ada. Dengan mendeteksi *autoinducer*, suatu bakteri mampu mengetahui keberadaan bakteri lain di lingkungannya (Taga *et al.*, 2001). Pada *Pseudomonas aeruginosa autoinducer* tersebut adalah golongan enzim eksoprotease (Rukayadi, 2006).

Sistem *quorum sensing* mengontrol perilaku bakteri melalui perubahan ekspresi gen oleh molekul sinyal. Perilaku bakteri yang diatur sistem *quorum sensing* antara lain: bioluminescen, sekresi faktor virulensi, sporulasi, konjugasi, pembentukan biofilm dan produksi pigmen (Taga *et al.*, 2001).

Penggunaan senyawa antibiotik secara terus menerus dapat meningkatkan frekuensi mutasi, sehingga melahirkan generasi bakteri baru yang resisten (Lewis, 2001), dengan pengetahuan mengenai sistem *quorum sensing*, dapat dikembangkan suatu cara pengendalian bakteri yang tidak terbatas pada pemberantasan bakteri atau antibiosis. Pengendalian infeksi dapat dilakukan dengan mencegah pengumpulan massa bakteri atau dengan merusak sistem komunikasi interseluler bakteri, bakteri tetap hidup selama perilakunya tidak destruktif (Suwanto, 2005).

Pseudomonas aeruginosa merupakan patogen oportunistik, yaitu memanfaatkan kerusakan

pada mekanisme pertahanan inang untuk memulai suatu infeksi. Angka fatalitas kasus (*case fatality rate*) pasien-pasien tersebut adalah 50%, *P. aeruginosa* merupakan penyebab sepsis yang umum dijumpai pada pasien di unit perawatan intensif (Mayasari, 2006).

Penyakit infeksi *P. aeruginosa* dimulai dengan penempelan dan kolonisasi bakteri ini pada jaringan inang, dengan menggunakan fli untuk penempelan sel pada permukaan inang, dapat membentuk biofilm untuk mengurangi keefektifan mekanisme sistem imun inang (Zhang *et al.*, 1998). *P. aeruginosa* memiliki molekul sinyal utama yaitu komponen *homoserin lakton* yang berfungsi sebagai agen kemostatik untuk mengumpulkan sel-sel *P. aeruginosa* yang berdekatan melalui mekanisme *quorum sensing* dan membentuk biofilm (Madigan *et al.*, 2006).

Beberapa penelitian telah dilakukan untuk mengetahui kemampuan penghambatan sistem *quorum sensing* pada ekstrak beberapa jenis bahan alam yang lain terhadap beberapa bakteri, antara lain Fuqua *et al.*, (1997) yang meneliti tentang sistem pengaturan ekspresi gen pada mikroorganisme melalui sistem *quorum sensing*. Rukayadi *et al.*, (2006) meneliti tentang penghambatan produksi faktor virulensi *P. aeruginosa* oleh tanaman vanili. Magdalena dan Yogiara (2006) yang meneliti tentang kemampuan lengkuas dalam menghambat produksi biofilm pada *Streptococcus mutan* penyebab plaq pada gigi. Wahyudi (2011) menyebutkan bahwa Ekstrak *Apium graveolens* L mampu menghambat sistem *quorum sensing* *Pseudomonas aeruginosa*, dan Wahyudi (2014) menyebutkan bahwa *Apium graveolens* mampu menghambat produksi biofilm pada *Salmonella typhi*.

Tujuan penelitian untuk mengetahui apakah ekstrak *Apium graveolens* L mampu menghamb-

bat produksi enzim eksoprotease dan produksi biofilm pada *Pseudomonas aeruginosa* dan berapakah konsentrasi ekstrak *Apium graveolens* L yang paling efektif dalam menghambat produksi eksoprotease dan produksi biofilm pada *Pseudomonas aeruginosa*?

2. METODE PENELITIAN

a. Alat dan bahan

Alat meliputi *rotary evaporator autoclave*, kuvet, *shaker*, inkubator, *laminar air flow*, *waterbath*, petridish, jarum ohse, bunsen, lemari es, ph meter, spektrofotometer, *sentrifuge*, mikropipet, jangka sorong, timbangan elektrik, elenmeyer, *bekerglass*, aluminium foil, tabung biakan kuman, rak tabung reaksi, vortek, kertas saring.

Bahan yang digunakan *Apium graveolens* L, isolat *Pseudomonas aeruginosa*, medium Luria-Bertani (LB), etanol, akuades 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); Azocasein (Sigma), trichloroacetic acid (TCA), NaOH 0,5 M, buffer fosfat pH 8. Media Trypticase soy broth-0.6% yeast extract (TSBYE), 5% glycerol, Trypticase soy agar (TSA), *microtiter plate* PVC, 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.

b. Karakterisasi dan Ekstraksi *Apium graveolens* L

Apium graveolens L (Seledri) yang digunakan dalam penelitian ini akar, batang, dan daunnya, diambil dari perkebunan di daerah Tawangmangu Kabupaten Karanganyar Jawa Tengah berumur 3 bulan,

Pembuatan Fraksi Etanol 70% Seledri dibuat dengan cara sebagai berikut: Herbal Tanaman Seledri yang telah dikeringkan pada suhu 50°C selama 5 hari diambil se-

banyak 2 kg. Setelah kering dilakukan ekstraksi dengan metode maserasi, herbal Seledri dimasukkan ke dalam bejana, kemudian ditambahkan dengan 10 liter etanol 70% ditutup dan dibiarkan selama 5 hari. Diserkai, dan diperas ampasnya. Sari etanol yang diperoleh kemudian dilakukan pemekatan sampai dihasilkan ekstrak etanolik seledri.

c. Isolasi Bakteri Uji dan Persiapan Media

Bakteri *P. aeruginosa* diperoleh dari isolasi dari Rumah Sakit Umum Dr.Moewardi Surakarta Isolasi dilakukan dengan metode uji biokimia, uji fermentasi karbohidrat dan uji sensitivitas antibiotik dilakukan dengan metode difusi agar (Bauer, 1966). Media yang digunakan dalam penelitian ini adalah media Luria-Bertani (LB) dilengkapi dengan 0,5% glukosa dan 2% susu skim (media LB, mengandung 2,5 mg tiamin/liter), semua strain yang diinkubasi pada 37 °C.

d. Pengujian Kuantitatif aktivitas enzim eksoprotease *P. aeruginosa*

Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas enzim eksoprotease *P. aeruginosa* secara kuantitatif pada perlakuan ekstrak *Apium graveolens* L. Prinsip pengujian aktivitas enzim eksoprotease berdasarkan metode Hanlon dan Hodges (1981) yaitu kemampuan enzim protease untuk menghidrolisis *Azocasein*. Residu *azocasein* yang tidak dapat terhidrolisis oleh enzim eksoprotease akan diendapkan oleh *trichloro acetic acid* (TCA). Endapan dipisahkan dengan filtrat, filtrat akan membentuk warna bila direaksikan dengan NaOH. Intensitas warna yang terbentuk diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 440 nm.

Sepuluh ml suspensi bakteri yang telah diukur pertumbuhannya di sentrifuge dengan kecepatan 10.000 g selama 10 menit, filtratnya diambil sebanyak 1 ml. lalu dimasukkan dalam tabung reaksi yang telah berisi 3 ml larutan buffer fosfat (pH 8). campuran ini kemudian diletakkan di atas penangas air hingga suhunya mencapai 37°C. Setelah itu ditambahkan 2 ml *Azocasein* yang sebelumnya telah dipanaskan pada penangas

air hingga suhunya mencapai 37°C. Selanjutnya ditambahkan 4 ml *trichloro acetic acid* (TCA) 10% sehingga terbentuk endapan kuning yang dipisahkan dengan sentrifuge. Filtrat sebanyak 5 ml diambil lalu ditambahkan dengan 5 ml larutan NaOH 0,5 M, kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 440nm.

Pengukuran aktivitas enzim dilakukan setiap 2 jam selama 24 jam sebanyak 3 kali ulangan satu unit, aktivitas enzim eksoprotease didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat menghasilkan kenaikan pengukuran absorbansi sebesar 0,01 setiap jam pada kondisi pengukuran. Unit aktivitas enzim eksoprotease yang digunakan dalam penelitian ini dinyatakan dalam U/ml dengan rumus Hanlon dan Hodges (1981) sebagai berikut:

Unit aktivitas / ml sampel (U/ml) = (absorbansi; 0,01) x 2

- e. Uji Pembentukan Biofilm dengan *Microtiter Plate Polivinil Klorida*. (Djordjevic et al, 2002; Rukayadi dan Hwang, 2006)

Pseudomonas aeruginosa pada media LB segar yang mengandung ekstrak *Apium graveolens* pada konsentrasi 0% (sebagai kontrol) 5%, 10%, 15%, 20% dan 25%, 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. Kemudian 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 40 jam. Setiap plate termasuk delapan sumur MWB tanpa *P. aeruginosa* sebagai kontrol. Kekeuhan 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 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. Seratus microliters dari masing-masing dipindahkan ke microtiter plate baru dan OD ungu kristal yang ada diukur pada 595 nm. Uji biofilm dengan microtiter plate dilakukan tiga kali ulangan.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil Isolasi, Karakterisasi dan Uji Sensitivitas Antibiotik.

Karakteristik *P. aeruginosa* hasil isolasi dari Rumah Sakit Dr. Moewardi Surakarta sebagai berikut: pada media TSIA tidak memfermentasikan media glukosa, manitol, sakarosa, maltose, dan laktosa, hal ini terlihat dari media yang berwarna merah baik pada dasar maupun pada lereng permukaan media agarnya. Bakteri ini menghasilkan hasil negatif pada uji indol, *Merah Metil*, dan *Voges-Proskauer*. Bakteri tersebut mampu memproduksi katalase, oksidase, dan amonia dari arginin, dapat menggunakan sitrat sebagai sumber karbonnya. Koloni yang dibentuk halus, bulat dengan warna fluoresensi kehijauan. Strain *P. aeruginosa* menghasilkan pigmen yang berfluoresensi antara lain: pioverdin (warna hijau), piorubin (warna merah gelap), piomelanin (hitam). *Pseudomonas aeruginosa* yang berasal dari koloni yang berbeda mempunyai aktivitas biokimia, enzimatik dan kepekaan antimikroba yang berbeda pula. *P. aeruginosa* yang digunakan dalam penelitian ini memiliki sifat-sifat terhadap antibiotik (Tabel 1).

Hasil isolasi *P. aeruginosa* hasil isolasi dari Rumah Sakit Dr. Moewardi Surakarta sudah re-

sisten berbagai antibiotik, hal ini menyebabkan sulit diobati jika bakteri tersebut menimbulkan infeksi. Adanya resistensi tersebut dikarenakan beberapa hal antara lain adanya mutasi ataupun rekombinasi struktur gen yang terjadi di dalam sel bakteri. Namun mengingat *P. aeruginosa* adalah patogen oportunistik maka untuk menyebabkan infeksi perlu adanya faktor predisposisi, salah satunya adalah harus memenuhi jumlah tertentu terlebih dahulu ($10^7 - 10^8$ sel), yang merupakan syarat sistem *quorum sensing* bisa berjalan.

Tabel 1 Hasil Uji Sensitivitas Antibiotik terhadap *P. aeruginosa* hasil isolasi dari RSU Dr. Moewardi Surakarta, Jawa Tengah.

RESISTEN TERHADAP		SENSITIF TERHADAP	
Nama Obat	(μ gram)	Nama Obat	(μ gram)
Amoxycillin	10	Cefriaxone	30
Amoxycillin Clav.Acid	30	Fosfomycin	50
Ceffazidime	2	Meropenem	30
Clindamisin	5	Imipenem	30
Ciprofloxacin	5	Gentamycin	10
Penicillin G	30	Netilmycin	15
Sulfamethaxazole	100	Cefepime	30
Trimethoprim	5	Coumpounds	300
Streptomycin	10	Piperacillin	100
Nalidic Acid	30		
Amikacin	300		
Cloramphenicol	30		
Novobiocin	5		
Cephalothin	20		
Cefuroxime	30		
Kanamycin	15		
Cefoxitin	30		
Ofloxacin	30		

Penghambatan Produksi enzim Eksoprotease *P. aeruginosa* oleh ekstrak *Apium graveolens* L.

Hasil penghambatan produksi Enzim eksoprotease *Pseudomonas aeruginosa* oleh ekstrak *Apium graveolens* L di dapatkan hasil aktivitas enzim berdasarkan optical densitynya didapatkan hasil seperti pada Tabel 2.

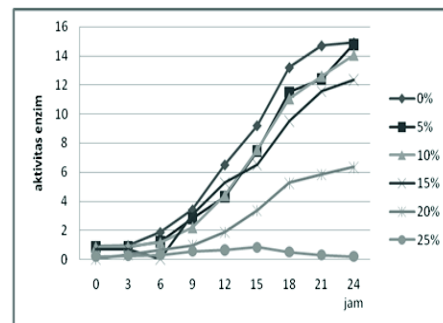
Gambar 1 menunjukkan bahwa pada konsentrasi 0 – 15 % produksi eksoprotease *Pseudomonas aeruginosa* cenderung tidak berbeda, namun pada konsentrasi 20% dan 25% terlihat adanya penurunan yang cukup drastis, besarnya

aktivitas enzim pada grafik mengikuti kurva pertumbuhannya (kurva sigmoid); terlihat bahwa enzim eksoprotease ini diproduksi pada fase eksponensial akhir.

Tabel 2. Unit aktivitas enzim eksoprotease pada *P. aeruginosa* yang dihambat dengan beberapa konsentrasi *apiumgroviolens* L

jam ke	unit aktivitas enzim eksoprotease <i>P. aeruginosa</i>					
	0%	5%	10%	15%	20%	25%
0	0,89	0,84	0,85	0,67	0,32	0,2
3	0,93	0,85	0,88	0,65	0,3	0,25
6	1,85	1,2	1,15	1,00	0,6	0,3
9	3,4	2,8	2,2	3,05	0,95	0,55
12	6,5	4,3	4,4	5,25	1,85	0,65
15	9,2	7,45	7,55	6,5	3,35	0,83
18	13,2	11,5	11,05	9,5	5,25	0,5
21	14,7	12,4	12,6	11,55	5,85	0,3
24	14,9	14,8	14,05	12,35	6,35	0,2
Rerata	7,29^a	6,24^a	6,08^a	6,19^a	3,06^b	0,42^c

Ket: Huruf yang sama menunjukkan tidak berbeda signifikan secara statistik pada taraf kepercayaan 5%



Gambar 1. Kurva produksi enzim eksoprotease *P. aeruginosa* yang dihambat dengan beberapa konsentrasi *Apium graveolens* L

Hasil penelitian diatas, sejalan dengan beberapa penelitian sebelumnya (Smith dan Iglewski, 2003; Hentzer *et al.*, 2003; Rukayadi dan Hwang, 2006; Adonizio, 2008; Mustika, 2009) Hasil penelitian beberapa peneliti tersebut menyatakan bahwa sistem *quorum sensing* bakteri bisa dihambat oleh ekstrak tanaman obat tertentu pada konsentrasi rendah dengan indikator adalah produksi enzim protease yang terhambat, namun pada konsentrasi tersebut beberapa dari ekstrak tanaman obat tersebut belum tentu menghambat pertumbuhan selnya.

Hal tersebut juga sejalan dengan dua penelitian sebelumnya yaitu Lestari (2005) dan Aini (2006) yang meneliti tentang penghambatan eksoprotease pada *Aeromonas hydrophyla* dengan ekstrak rimpang temulawak dan tomat ditemukan bahwa ekstrak rimpang temulawak dan tomat tersebut menghambat produksi eksoprotease pada konsentrasi 4%, dan pada konsentrasi tersebut tidak mempengaruhi pertumbuhan selnya.

Hasil Uji Pembentukan Biofilm *Pseudomonas aeruginosa* dengan *Microtiter Plate Polivinil Klorida*.

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 3 bahwa *Pseudomonas aeruginosa* yang diisolasi dari sampel pasien resisten terhadap beberapa antibiotik.

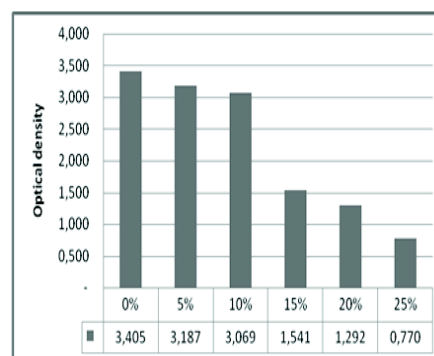
Tabel 3. Hasil Optical density pada Uji daya hambat Biofilm *Pseudomonas aeruginosa* oleh ekstrak *Apium graveolens L* dengan pelarut atanol dan etil asetat

Ulangan	Konsentrasi					
	0%	5%	10%	15%	20%	25%
1	3,425	3,120	3,111	1,426	1,327	0,786
2	3,389	3,225	3,098	1,637	1,291	0,658
3	3,402	3,216	2,997	1,559	1,257	0,753
Rerata	3,405 ^a	3,187 ^a	3,069 ^a	1,541 ^b	1,292 ^b	0,770 ^c

Pada hasil pengujian biofilm pada *Pseudomonas aeruginosa* terlihat bahwa semakin besar konsentrasi ekstrak *Apium graveolens L* maka semakin besar pula penghambatan produksi biofilm pada *Pseudomonas aeruginosa*. Pada hasil penghambatan biofilm *Pseudomonas aeruginosa* terlihat bahwa pada konsentrasi ekstrak 15 % sudah terlihat berbeda nyata secara signifikan berdasarkan perhitungan statistiknya, pada konsentrasi 15 % dan 20% terlihat tidak ada perbedaan kemampuan penghambatan biofilm *Pseudo-*

nas aeruginosa oleh ekstrak *Apium graveolens L*, namun pada konsentrasi 25% terlihat bahwa kemampuan penghambatannya berbeda secara signifikan dengan pada konsentrai 25%.

Hasil penelitian ini sejalan penelitian sebelumnya, (Wahyudi, 2011) bahwa ekstrak seledri (*Alpinia galanga L*) mampu menghambat produksi biofilm pada *Pseudomonas aeruginosa* pada konsentrasi 8%, sedangkan *Salmonella typhi* terhambat produksi biofilmya pada konsentrasi ekstrak *Alpinia galanga* 6% (Wahyudi, 2014).



Gambar 2. Nilai Optical Density penghambatan biofilm *Pseudomonas aeruginosa* oleh ekstrak *Apium graveolens L* dengan pelarut Etanol

Hasil beberapa penelitian tersebut menyatakan bahwa untuk penghambatan produksi biofilm bakteri, dalam hal ini *Pseudomonas aeruginosa* dan *Salmonella typhi* membutuhkan konsentrasi ekstrak bahan alam yang rendah kurang dari 20 %, namun pada konsentrasi tersebut belum mampu mengambat pertumbuhan bakteri. Sehingga untuk mencegah bakteri membentuk biofilm hanya membutuhkan sejumlah kecil bahan aktif yang ada di dalam ekstrak *Apium graveolens L*, hal ini disebabkan karena untuk menghambat produksi biofilm suatu bakteri, sebenarnya yang dibutuhkan adalah menghambat enzim ataupun molekul protein yang menjadi sinyal (autoindcer) untuk bakteri berkolonisasi, kemudian mengekspresikan faktor virulensi dan akhirnya membentuk biofilm yang dapat menyebabkan bakteri menjadi resisten terhadap berbagai jenis antibiotik. Mekanisme penghambatan produksi biofilm ini bisa digunakan untuk acuan pembuatan bahan pengawet, salep, dan produk-produk lain yang bertujuan untuk mencegah

bakteri menjadi patogen, sehingga bisa menyebabkan penyakit, atau menghasilkan racun pada beberapa produk makanan.

5. KESIMPULAN

Ekstrak *Apium graveolens* L mempunyai kemampuan untuk menghambat produksi enzim eksoprotease *P. aeruginosa* pada konsentrasi 20% berat/vol, dan mampu menghambat produksi biofilm *Pseudomonas aeruginosa* pada konsentrasi 15%.

6. REFERENSI

- Adonizio Allison L., 2008., *Anti-quorum sensing Agents From South Florida Medicinal Plants and Their Attenuation of Pseudomonas aeruginosa Pathogenicity.*, FIU Electronic Theses and Dissertations, Florida International University.
- Allison, D. (2000). *Community Structure and Co-Operation in Biofilms*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Aini N, 2006., *Penurunan produksi enzim eksoprotease aeromonas hydrophila oleh ekstrak buah tomat (lycopersicon esculentum mill.)* UNS-Solo Indonesia.
- Aree JO., T Suzuki, P. Gasaluck, G. Eumkeb., 2006., *Antimicrobial properties and action of galangal (Apium graveolens Linn.) on Staphylococcus aureus.*, LWT Food Science and Technology Volume 39, Issue 10, December 2006, page 1214-1220
- Bauman, 2009. *Biofilm, Pseudomonas putida, Streptococcus mutans.*, <http://biobakteri.wordpress.com/2009/06/07/8-biofilm/>. (1 Februari 2010). Boel, Trelia, 2004, *Pseudomonas aeruginosa*, [http:// library.usu.ac.id](http://library.usu.ac.id);
- Catherine Y(2002). *Hoodoo Herb and Root Magic: A Materia Magica of African-American Conjure, and Traditional Formulary*. Lucky Mojo Curio.
- Choo JH, Rukayadi Y, Hwang JK. 2006, *Inhibition of bacterial quorum sensing by vanilla extract*. *Lett Appl Microbiol*; (42):637-41
- De Kievit TR, Iglewski BH. 2000, *Bacterium quorum sensing in pathogenic relationships*. *Infect Immun*; 68(9):4839-49
- Djordjevic D, Wiedmann M, McLands borouggh L A., 2002., *Microtiter Plate assay for Assessment of Listeria monocytogenes Biofilm Formation.*, Applied and Enviromental Microbiology., America Society For Micribiology.
- Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. 1994., *Quorum sensing in bacteria-the LuxRLuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators*. *J Bacteriol* 1994; 176(2):269-75
- Fuqua, C. & Greenberg, E. P. (1999). *Self perception in bacteria: quorum sensing with acylated homoserine lactones*. *Curr Opin Microbiol* 1, 183-189.
- 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
- Hentzer M, Wu H, Andersen JB, Riedel K, Rasmussen TB, Bagge N, et al., 2003, *Attenuation of Pseudomonas aeruginosa virulence by quorum sensing inhibitors*. *The EMBO J* 2003; 22(15):3803-15
- Hentzer, M and M. Givskov, 2003, *Pharmalogical Inhibitor, of Quorum Sensing For The Treatment Of Chronic Bacterial Infection*, *J Clint Invest*
- Lewis, K, 2001., *Riddle of Biofilm Resistance, Antimicrob Agent Chemotherapy*.
- Madigan MT, Martinko JM, Brock TD. 2006. *Brock Biology of Microorganisms*. 11th Ed. New Jersey: *Pearson Prentice Hall*. Hal: 617-619.
- Magdalena, dan Yogiara, 2006., *Screening of Bioactive Compound from Plant Extract Inhibiting Biofilm Formation*. Proseding PERMI tahun 2006.
- Mayasari, E, 2006, *Pseudomonas aeruginosa; Karakteristik, Infeksi, dan Penanganan*, Departemen Mikrobiologi FK-USU.
- Miller MB, Bassler BL., 2001, *Quorum sensing in bacteria*. *Annual Review Microbiology* 2001;55:165-99
- Murray. R.K., D.K Granner., P.A Mayes, V. W Rodwell, 1997. *Biokimia Harper* (diter-

- jemahkan oleh A. Hartono). Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- 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
- Nealson KH, Platt T, Hasting JW., 1970 Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol* 1970; 104(1):313-22
- Ni N, Li M, Wang J, Wang B., 2009, Inhibitors and antagonists of bacterial quorum sensing. *Med Res Rev* 2009; 29(1):65-124
- Parsek, M.R, D, L. Val., B. L. Hanzeika., J. E Cronan Jr., and E.P. Greenberg, 1999, Acyl Homoserin Lactone Quorum Sensing Signal Generation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* (96): 4360-4365.
- Raffa RB, Iannuzzo JR, Leine DR, Saeid KK, Schwartz RC, Sucic NT, et al, 2005, Bacterial communication ("quorum sensing") via ligands and receptors: a novel pharmacologic target for the design of antibiotic drugs. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 312(2):417-423
- 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 Koite, 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 00219193/05/\$08.00_0 doi:10.1128/JB.187.5.1799–1814.2005., American Society for Microbiology.
- Rukayadi Y, Choo JH, Hwang JK. 2006, *Vanillin inhibits quorum sensing – regulated virulence factors production of Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Microbiol* (In press)
- Rukayadi Y, Hwang JK. 2006. Effect of xanthorhizol on Streptococcus mutans biofilm in vitro. *J Mikrobiol Indones* (11):40-43.
- Rukayadi Yaya 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
- Smith KM, Bu Y, Suga H., 2003, *Induction and inhibition of Pseudomonas aeruginosa quorum sensing by synthetic autoinducer analogs*. *Chem Biol* 2003; 10:81-9
- Smith Roger S, Barbara H Iglewski, 2003., *Pseudomonas aeruginosa quorum sensing as a potential antimicrobial target*, *Journal of Clinical Investigation*; Nov 2003; 112, 10; *ProQuest Biology Journals* pg. 1460
- Sinaga E., 2004., *Apium graveolens L.*, Pusat Penelitian dan pengembangan Tumbuhan Obat UNAS/P3TO UNAS.
- Suwanto, A., 2005 *Strategi Baru Mengendalikan Penyakit Infeksi*, <http://www.kompas.com/kompas-cetak/0211/081/iptek/mema36.htm>(20Mei 2010).
- Taga ME, Semmelhack JL, Bassler BL, 2001., The LuxS-dependent autoinducer AI-2 controls the expression of an ABC transporter that functions in AI-2 uptake in *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 2001; (42):77-93.
- Wahyudi, 2011, *Penghambatan Quorum Sensing Pada Pseudomonas aeruginosa oleh Ekstrak Alpinia galangal L*. Prosiding Perhipba tahun 2011, UNS press.
- Wahyudi, 2014, Uji Efektifitas Ekstrak Seledri (*Alpinia galangal L*) sebagai penghambat Produksi Biofilm pada *Pseudomonas aeruginosa*, *Jurnal Biomedika* Volume 7 Universitas Setia Budi, Surakarta.
- Zhang XQ, Bishop PL, Kupferle MJ. 1998. Measurement of polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers. *Water Sci Technol* 37, 345-348.