

Haki_2_Monograf

by Yulianto Ade Prasetya

Submission date: 15-Feb-2022 02:16AM (UTC+0000)

Submission ID: 1762600568

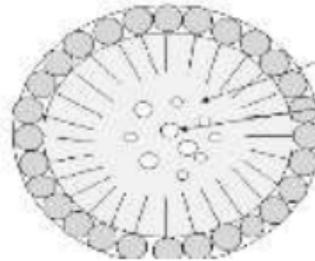
File name: MONOGRAF_YANG_DIHAKI-KAN.pdf_ (705.39K)

Word count: 9699

Character count: 62514

MONOGRAF

AKTIVITAS NANOEMULSI MINYAK LENGKUAS (*Alpinia galanga* L Willd) SEBAGAI ANTIBAKTERI *Helicobacter pylori*



PENYUSUN

Yulianto Ade Prasetya, S.Si., M.Si

PRAKATA

Monograf ini dibuat berdasarkan latar belakang berupa infeksi *Helicobacter pylori* dikaitkan dengan terjadinya karsinoma lambung yang menduduki peringkat kelima kanker terbanyak di dunia dan peringkat ketiga penyebab kematian yang disebabkan oleh kanker. Bakteri ini cukup sulit untuk diobati karena sifatnya yang tahan asam, mampu berpenetrasi ke mukosa lambung manusia, dan resisten terhadap berbagai macam antibiotik, maka diperlukan teknologi baru yakni berupa nanoteknologi. Pencarian alternatif pengobatan terbaru yakni zat aktif dari tumbuhan mulai banyak dikembangkan karena lebih efektif, murah, mudah dalam penggunaan, aman, toksisitas rendah, dan mampu mencegah penyebaran gen resistensi diantara spesies mikroorganisme. Minyak atsiri merupakan salah satu zat aktif dari tumbuhan yang terbukti efektif melawan berbagai macam mikroorganisme. Minyak lengkuas pada penelitian ini akan dibuat dalam ukuran nano droplet, yakni ukuran 20-500 nm dan diharapkan mampu berpenetrasi dalam membran bakteri. Obat berukuran nano memiliki luas permukaan yang tinggi dan reaktivitasnya spesifik sehingga sesuai untuk bahan obat dalam berbagai dosis serta meningkatkan regulasi sistem penghantaran obat dalam tubuh. Belum ada penelitian yang membuat minyak lengkuas dalam bentuk nanoemulsi dan efektifitasnya dalam menghambat *Helicobacter pylori* yakni salah satu bakteri penyebab kanker lambung. Penelitian ini bertujuan untuk membuat nanoemulsi minyak lengkuas dan aktivitasnya dalam menghambat dan membunuh bakteri *Helicobacter pylori*. Pembuatan nanoemulsi dilakukan menggunakan *ultrasonicator* yang kemudian dikarakteristik menggunakan *Particle Size Analyzer* (PSA) dan *Scanning Electron Microscopy* (SEM).

DAFTAR ISI

	Halaman
BAB I Pendahuluan	4
BAB II Potensi minyak atsiri sebagai antibakteri	6
BAB III Minyak Lengkuas Sebagai Antibakteri	9
BAB IV Nanoemulsi	14
BAB V Nanoemulsi Sebagai Antimikroba	20
Bab VI Bakteri Penyebab Infeksi Nosokomial	24
BAB VII Bakteri Multiresisten Dan Pembentuk Biofilm	27
BAB VIII Metode Pembuatan Nanoemulsi Dan Uji Antimikroba	34
BAB IX Karakterisasi Nanoemulsi Dan Antimikroba	37

BAB I PENDAHULUAN

Infeksi *Helicobacter pylori* dikaitkan dengan terjadinya karsinoma lambung yang menduduki peringkat kelima kanker terbanyak di dunia dan peringkat ketiga penyebab kematian yang disebabkan oleh kanker. Sekitar 65-75% Kanker lambung paling sering terjadi di negara berkembang, termasuk di Indonesia yakni sebesar 100% di Jakarta dan 85.7- 93.9% di Surabaya. Bakteri ini cukup sulit untuk diobati karena sifatnya yang tahan asam, mampu berpenetrasi ke mukosa lambung manusia, dan resisten terhadap berbagai macam antibiotik, maka diperlukan teknologi baru yakni berupa nanoteknologi. Pencarian alternatif pengobatan terbaru yakni zat aktif dari tumbuhan mulai banyak dikembangkan karena lebih efektif, murah, mudah dalam penggunaan, aman, toksisitas rendah, dan mampu mencegah penyebaran gen resistensi diantara spesies mikroorganisme. Minyak atsiri merupakan salah satu zat aktif dari tumbuhan yang terbukti efektif melawan berbagai macam mikroorganisme. Minyak lengkuas pada penelitian ini akan dibuat dalam ukuran nano droplet, yakni ukuran 20-500 nm dan diharapkan mampu berpenetrasi dalam membran bakteri. Obat berukuran nano memiliki luas permukaan yang tinggi dan reaktivitasnya spesifik sehingga sesuai untuk bahan obat dalam berbagai dosis serta meningkatkan regulasi sistem penghantaran obat dalam tubuh. Belum ada penelitian yang membuat minyak lengkuas dalam bentuk nanoemulsi dan efektifitasnya dalam menghambat *Helicobacter pylori* yakni salah satu bakteri penyebab kanker lambung. Penelitian ini bertujuan untuk membuat nanoemulsi minyak lengkuas dan aktivitasnya dalam menghambat dan membunuh bakteri *Helicobacter pylori*. Pembuatan nanoemulsi dilakukan menggunakan *ultrasonicator* yang kemudian dikarakteristik menggunakan *Particle Size Analyzer* (PSA) dan *Scanning Electron Microscopy* (SEM). Aktivitas nanoemulsi minyak lengkuas dilakukan dengan menentukan kadar hambat

minimum dan kadar bunuh minimum dengan metode pengenceran bertingkat dan teknik *pour plate*.

Helicobacter pylori merupakan bakteri Gram negatif berbentuk spiral, memiliki flagel lopotrikus, mampu berkolonisasi pada lambung, dan menyebabkan penyakit hampir separuh populasi penduduk di dunia¹. Infeksi *H.pylori* dikaitkan dengan terjadinya karsinoma lambung yang menduduki peringkat kelima kanker terbanyak di dunia dan peringkat ketiga penyebab kematian yang disebabkan oleh kanker². Sekitar 65-75% kanker lambung paling sering terjadi di negara berkembang³, termasuk di Indonesia yakni sebesar 100% di Jakarta dan 85.7- 93.9% di Surabaya⁴. Pengobatan untuk infeksi ini sangat sulit karena membutuhkan terapi kombinasi sedikitnya dua antibiotik dikarenakan adanya *multidrug resistance*. Pencarian alternatif pengobatan terbaru yakni zat aktif dari tumbuhan mulai banyak dikembangkan karena lebih efektif, murah, mudah dalam penggunaan, aman, toksisitas rendah, dan mampu mencegah penyebaran gen resistensi diantara spesies mikroorganisme². Minyak atsiri merupakan salah satu zat aktif dari tumbuhan yang terbukti efektif melawan berbagai macam mikroorganisme.

BAB II POTENSI MINYAK ATISIRI SEBAGAI ANTIBAKTERI

Minyak atsiri adalah senyawa berat molekul rendah yang mudah menguap yang diperoleh dari tanaman aromatik. Minyak atsiri adalah senyawa alami dengan struktur yang kompleks dan biasanya mengandung sekitar 20-60 komponen dengan konsentrasi yang berbeda. Minyak atsiri dikenal memiliki sifat antimikroba dan efektif terhadap berbagai mikroorganisme, seperti bakteri dan jamur. Sifat biologis dari minyak atsiri terutama ditentukan oleh komponen utama mereka, yang terpen dan terpenoid atau aromatik dan konstituen alifatik, yang senyawa fenoliknya bertanggung jawab untuk aktivitas antimikroba. Minyak atsiri mempengaruhi sel jamur dan alga terutama dengan mempengaruhi membran sel dan membuatnya sangat permeabel.

Minyak atsiri yang berasal dari tanaman telah banyak digunakan sebagai agen antimikroba dan penyedap karena variabel terpenoid dan kandungan fenoliknya, dan sebagai hasilnya, aktivitas anti-bakteri dan anti-jamur dari beberapa minyak esensial telah dipelajari dengan baik. Namun, agen antimikroba tradisional terutama dirancang untuk menghambat pertumbuhan sel sering mengakibatkan resistensi obat bakteri, dan dengan demikian, minyak esensial telah dipelajari menggunakan pendekatan perkembangan lainnya, seperti, penghambatan pembentukan biofilm, produksi toksin, penginderaan kuorum bakteri, dan perekat faktor-faktor. Misalnya, carvacrol dan eugenol, limonoid grapefruit, glukosida β -sitosterol dari kulit clementine, asam ginkgolic dari Ginkgo biloba, dan cinnamaldehyde dan eugenol dari minyak kayu manis, yang ditemukan dalam minyak atsiri, telah dilaporkan menghambat pembentukan biofilm EHEC. Namun, beberapa penelitian telah dilakukan untuk membandingkan karakteristik antibiofilm sejumlah besar minyak atsiri (Kim *et al.* 2016).

Penelitian Yussof *et al.* (2011) menyebutkan sejumlah senyawa yang cukup telah diidentifikasi dalam minyak oleh GC-FID dan GC / MS analisis, dengan perbedaan besar dalam

komposisi minyak antara ketiga spesies. Minyak rimpang *Alpinia galanga* kaya dengan 1,8-cineole (29,8%), sedangkan *Alpinia ligulata* dan *Alpinia nieuwenhuizii* keduanya sangat kaya (E) - methyl cinnamate (36,4 dan 67,8%, resp.). Tiga minyak disaring untuk aktivitas antimikroba mereka terhadap tiga bakteri Gram-positif dan tiga Gram-negatif dan dua spesies jamur. Efisiensi penghambatan pertumbuhan *Staphylococcus aureus* ditemukan menurun dalam urutan *A. nieuwenhuizii* > *A. ligulata* > *A. galanga*, sedangkan uji penghambatan bakteri *Escherichia coli* menurun dalam urutan *A. galanga* > *A. nieuwenhuizii* > *A. ligulata*. Hanya minyak lengkuas yang dapat menghambat bakteri lain dan jamur yang diuji.

Menurut penelitian lain dari Quatrin *et al.* (2016), minyak *Eucalyptus globulus* dikarakterisasi dengan kromatografi gas, yang memungkinkan untuk mengamati komponen utamanya, seperti 1-8-Cineol (75,8%), p-Cymene (7,5%), α -Pinene (7,4%) dan Limonene (6,4-Cineol) (%). Aktivitas antimikroba dari nanoemulsi ditentukan dari tes macrodilution dan kurva viabilitas sel, di mana konsentrasi fungisida minimum 0,7 mg / mL untuk *C. albicans* dan 1,4 mg / mL untuk *Candida tropicalis* dan *Candida glabrata* diperoleh. Aksi minyak nanoenkapsulasi terhadap biofilm yang terbentuk dievaluasi dengan mikroskop kekuatan atom dan pewarnaan calcofluor, dan nanoemulsi lebih efisien untuk dua dari tiga spesies *Candida* bila dibandingkan dengan kandungan minyak bebas tanpa metode nanoemulsi.

Penelitian dari Rivera *et al.* (2016) menyatakan bahwa komponen utama dalam kedua minyak yaitu Geraniol dan Citral; di *Lippia alba* 18,9% dan 15,9%, masing-masing, dan di *Cymbopogon citratus* 31,3% dan 26,7%. Minyak atsiri *L. alba* mempresentasikan aktivitas eradikasi terhadap biofilm *Streptococcus mutans* sebesar 95,8% dalam konsentrasi 0,01 mg / dL dan minyak atsiri *C. citratus* menunjukkan aktivitas penghilangan sebesar 95,4% pada konsentrasi 0,1, 0,01 mg / dL dan 93,1% pada 0,001 mg / dL konsentrasi, tak satu pun dari konsentrasi kedua minyak esensial menunjukkan toksisitas pada sel CHO selama 24 jam. Minyak atsiri *L. alba* dan *C. citratus* menunjukkan aktivitas eradikasi

terhadap biofilm *S. mutans* dan sitotoksisitas nol, yang membuktikan kebutuhan untuk melakukan penelitian lebih lanjut yang dapat mengidentifikasi komponen aktif mereka dan untuk memandu penggunaan yang aman dalam mengobati dan mencegah biofilm pada karies gigi.

BAB III MINYAK LENGKUAS SEBAGAI ANTIBAKTERI

Minyak atsiri lengkuas (*Alpinia galanga* [L.] Willd.) terbukti sebagai antimikroba, antijamur, dan antiamoeba⁵, dimana minyak ini mengandung metil-sinamat 48%, sineol 20%-30%, eugenol, kamfer 1%, seskuiterpen, δ -pinen, galangin, galangol, dan beberapa senyawa flavonoid⁶. Penelitian Yuharmen dkk. menunjukkan adanya aktifitas penghambatan pertumbuhan mikroba oleh minyak lengkuas⁷. Penelitian⁶ juga membuktikan bahwa rimpang lengkuas memiliki sifat sebagai antibakteri pada *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, dan *Bacillus cereus* dengan metode *disk diffusion test*, namun pemanfaatannya dalam menghambat atau membunuh *Helicobacter pylori* belum pernah dilaporkan sebelumnya. Bakteri ini cukup sulit untuk diobati karena sifatnya yang tahan asam, mampu berpenetrasi ke mukosa lambung manusia, dan resisten terhadap berbagai macam antibiotik, maka diperlukan teknologi baru yakni berupa nanoteknologi. Minyak lengkuas pada penelitian ini akan dibuat dalam ukuran nano droplet, yakni ukuran 20-500 nm dan diharapkan mampu berpenetrasi dalam membran bakteri. Iravani *et al.*⁸ menyatakan bahwa nanopartikel memiliki luas permukaan yang tinggi dan reaktivitasnya spesifik sehingga sesuai untuk bahan obat dalam berbagai dosis serta meningkatkan regulasi sistem penghantaran obat dalam tubuh. Beberapa penelitian nanoemulsi dari minyak atsiri sudah terbukti sebagai antibakteri salah satunya minyak *Cymbopogon flexuosus* sebagai antimikroba pada *Mycobacterium fortuitum*, *M. massiliense*, dan *M. abscessus*⁹ dan nanoemulsi minyak *Eucalyptus globulus* mampu bertindak sebagai menghambat pertumbuhan *Candida albicans*, *C. tropicalis* dan *C. glabrata*



Gambar 3.1 minyak lengkuas (Dokumen Pribadi)

¹ Lengkuas (*Alpinia galanga* [L.] Willd) merupakan anggota familia Zingiberaceae. Rimpang lengkuas mudah diperoleh di Indonesia dan manjur sebagai obat gosok untuk penyakit jamur kulit (panu) sebelum obat-obatan modern berkembang seperti sekarang. Rimpang lengkuas juga digunakan sebagai salah satu bumbu masak selama bertahun-tahun dan tidak pernah menimbulkan masalah. Manfaat rimpang lengkuas telah dipelajari oleh para ilmuwan sejak dulu. Rimpang lengkuas memiliki berbagai khasiat di antaranya sebagai antijamur dan antibakteri. Penelitian menunjukkan adanya aktifitas penghambatan pertumbuhan mikrobial oleh minyak atsiri dan fraksi metanol rimpang lengkuas pada beberapa spesies bakteri dan jamur (Handajani & Purwoko, 2008).

Minyak atsiri dari rimpang lengkuas berkhasiat sebagai antioksidan dan antibakteri. Penelitian yang sudah ada menjelaskan bahwa kandungan minyak atsiri dari rimpang lengkuas mengandung monoterpen yang mampu melawan sejumlah bakteri seperti *Trychophyton mentagrophytes*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *S.sonnei*, dan *E.coli*. minyak atsiri yang diidentifikasi dengan GC-MS menunjukkan banyak mengandung komponen minyak sebesar 93.1% dengan dua siklik terpen tertinggi yakni piperitonone (33.3%) dan limonene (29.6%). Minyak atsiri dari lengkuas bukan hanya mampu menghambat pertumbuhan bakteri penyebab keracunan makanan, namun dapat juga membunuh bakteri tersebut sehingga dapat digunakan sebagai pengawet makanan (Prakatthagomol *et al.*, 2011).



Gambar 3.2. Daun dan Rimpang Lengkuas (*Alpinia galanga* [L.] Willd) (Chan *et al.*, 2011).

¹ Lengkuas (*Alpinia galanga* [L.] Willd) merupakan anggota familia *Zingiberaceae*. Rimpang lengkuas mudah diperoleh di Indonesia dan manjur sebagai obat gosok untuk penyakit jamur kulit (panu) sebelum obat-obatan modern berkembang seperti sekarang. Rimpang lengkuas juga digunakan sebagai salah satu bumbu masak selama bertahun-tahun dan tidak pernah menimbulkan masalah. Manfaat rimpanglengkuas telah dipelajari oleh para ilmuwan sejak dulu. Rimpang lengkuas memiliki berbagai khasiat di antaryasebagai antijamur dan antibakteri. Penelitian Yuharmen dkk. (2002) menunjukkan adanya aktifitas penghambatan pertumbuhan mikrobial oleh minyak atsiri dan fraksi metanol rimpang lengkuas pada beberapa spesies bakteri dan jamur (Handayani dan Purwoko, 2008).

Lengkuas adalah ramuan abadi yang ditemukan di seluruh Ghats Barat, Mysore, Goa, Malabar dan Gujarat, juga ditemukan di negara lain seperti Thailand, Indonesia, Cina, dan Malaysia. Akar bersifat adventif, berkelompok, berserat, menetap di rimpang kering, sekitar 0,5 hingga 2 cm dan berdiameter 0,1 hingga 0,2 cm dan berwarna coklat kekuningan. Rimpang berdiameter silindris, bercabang, berdiameter 2 sampai 8 cm, dipukul secara longitudinal dengan kuitul bulat yang menonjol (sisasisa akar) yang ditandai dengan anoda halus; daun bersisik tersusun melingkar, coklat kemerahan eksternal, oranye oranye internal; bau yang menyenangkan dan aromatik; rasanya pedas dan manis (Chudiwal *et al.*, 2010).

Klasifikasi lengkuas (*Alpinia galanga* [L.] Willd.) menurut Khoerunnisa (2015) ialah

Kerajaan : Plantae
Divisi : Spermatophyta
Kelas : Monocotyledonae
Bangsa : Zingiberales
Suku : Zingiberaceae
Marga : Alpinia
Jenis : *Alpinia galanga* [L.] Willd.
Sinonim : *Languas galanga* L. Merr, *Alpinia pyramidata* Bl, *Alpinia officinarum* Hance, *Languas galanga* L. Stunz, *Languas vulgare* Koenig

Rimpang lengkuas mengandung lebih kurang 1% minyak atsiri berwarna kuning kehijauan yang terutama terdiri dari metil-sinamat 48%, sineol 20%-30%, eugenol, kamfer 1%, seskuiterpen, δ -pinen, galangin, dan lain-lain. Selain itu rimpang juga mengandung resin yang disebut galangol, kristal berwarna kuning yang disebut kaemferida dan galangin, kadinen, heksabidrokadalen hidrat, kuersetin, amilum, beberapa senyawa flavonoid, dan lain-lain. Penelitian yang lebih intensif menemukan bahwa rimpang lengkuas mengandung zat-zat yang dapat menghambat enzim *xanthin oksidase* sehingga bersifat sebagai antitumor, yaitu trans-p-kumari diasetat, transkoniferil diasetat, asetoksi chavikol asetat, asetoksi eugenol asetat, dan 4-hidroksi benzaidehida (Khoerunnisa, 2015).

Pada pengobatan tradisional Cina tumbuhan ini digunakan untuk menghilangkan sakit perut, mengobati flu. Rimpang dan bunga dari tumbuhan ini juga digunakan untuk penambah rasa pada masakan Asia. Rimpang muda dari tumbuhan ini sering digunakan untuk masakan Thailand (Khoerunnisa, 2015) di Indonesia sendiri rimpang ini juga digunakan sebagai bumbu dapur. Minyak atsiri dan ekstrak dari rimpang ini telah dipelajari secara luas dan terbukti sebagai antijamur, antimikroba, anti amoeba, antioksidan (Wei *et al.* 2010). Rimpang lengkuas (*Alpinia galanga* [L.] Willd.) mempunyai aktivitas antibakteri

terhadap *Staphylococcus aureus*, (Oonmetta-aree *et al.* 2005 ; Chan *et al.* 2011 ; Khoerunnisa, 2015). Ekstrak etanol (*Alpinia galanga* [L.] Willd.) secara signifikan sebagai antioksidan dan antidiabet pada model *in vitro* dan *in vivo* (Srividya *et al.*, 2010; Khoerunnisa, 2015).

BAB IV NANOEMULSI

Nanoemulsi didefinisikan sebagai isotropik, stabil secara termodinamika, transparan atau translusen dispersi minyak dan air distabilkan oleh film antarmuka molekul surfaktan yang memiliki ukuran droplet 20 - 500 nm (Debnath *et al.*, 2011). Kemudahan persiapan dan peningkatan, stabilitas dan peningkatan bioavailabilitas adalah fitur dari formulasi ini yang telah menarik perhatian para peneliti (Debnath *et al.*, 2011). Berbagai keuntungan nanoemulsion termasuk:

- Nanoemulsi adalah pendekatan untuk meningkatkan kelarutan air dan bioavailabilitas utama dari obat-obatan lipofilik. Tetesan berukuran nano yang mengarah ke area antarmuka sangat besar yang terkait dengan nanoemulsi akan mempengaruhi sifat transportasi obat, faktor penting dalam pengiriman obat yang berkelanjutan dan ditargetkan (Lawrence *et al.*, 2000).
- Nanoemulsi telah dilaporkan untuk membuat profil konsentrasi plasma dan bioavailabilitas obat lebih dapat direproduksi (Lawrence *et al.*, 2000; Constantinides *et al.*, 1995).
- Tetesan minyak halus kosong dengan cepat dari perut dan meningkatkan distribusi obat yang luas di seluruh saluran usus dan dengan demikian meminimalkan iritasi yang sering dijumpai dengan kontak yang diperluas dari dinding obat dan usus (Pouton *et al.*, 1985).
- Nanoemulsi memiliki kapasitas solubilisasi yang lebih tinggi daripada solusi micellar sederhana dan stabilitas termodinamikanya menawarkan keunggulan dibandingkan dispersi yang tidak stabil seperti emulsi dan suspensi karena dapat diproduksi dengan sedikit input energi (panas atau pencampuran) dan memiliki masa simpan yang lama (Shafiq *et al.*, 2007).
- Mereka juga menyediakan tegangan antarmuka ultra rendah dan area antarmuka yang besar (Shafiq *et al.*, 2007).

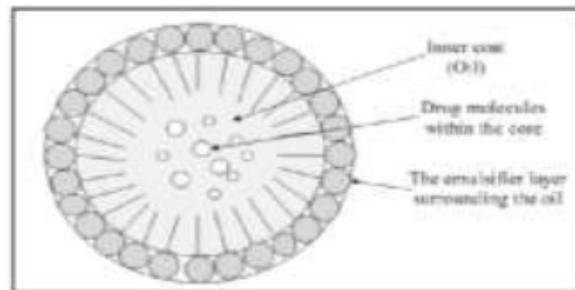
- Mereka juga menawarkan keuntungan dibandingkan dengan sistem pengemulsi diri yang ada dalam hal onset aksi yang cepat (tidak ada waktu ekstra untuk penyebaran) dan mengurangi variabilitas intersubjek dalam hal volume cairan GIT.
- Nanoemulsi mungkin memiliki stabilitas kinetik tinggi dan transparansi optik menyerupai mikroemulsi (Tadros *et al.*, 1983).
- Struktur dalam nanoemulsi jauh lebih kecil daripada panjang gelombang yang terlihat, sehingga sebagian nanoemulsi tampak transparan secara optik, bahkan pada pemuatan besar (Chiesa *et al.*, 2008).
- Nanoemulsions memiliki potensi untuk memberikan peptida yang rentan terhadap hidrolisis enzimatis dalam GIT (Shaji *et al.*, 2005).

Nanoemulsi terbuat dari surfaktan yang disetujui untuk konsumsi manusia dan zat makanan umum yang umumnya diakui aman oleh *Food Drug Association* (FDA). Emulsi ini mudah diproduksi dalam jumlah besar dengan mencampurkan fase minyak yang tidak larut dalam air menjadi fase berair dengan proses ekstrusi mekanis dengan tegangan tinggi yang tersedia di seluruh dunia (Debnath *et al.*, 2011).

Proses emulsifikasi diawali dengan pembuatan emulsi kasar. Surfaktan dilarutkan dalam air dengan *High Shear Homogenization* (HSH) selama 1 menit. Larutan dihomogenisasi kembali selama 5 menit dengan kecepatan 16000 rpm dan dilakukan proses pengecilan droplet dengan tekanan 20000 psi secara berulang sebanyak lima siklus. Setelah proses pengecilan dilakukan pendinginan dan penentuan ukuran droplet emulsi menggunakan alat *Particle Size Analyzer* (PSA) dengan prinsip *Dynamic Light Scattering*. Suspensi sampel diiradiasi oleh laser dan *scattered light* kemudian dihitung dengan formula Stokes - Einstein. Pengukuran sampel dilakukan pada suhu 25^o dan dilakukan dengan 3 kali ulangan (Agustinisari dkk., 2014)

Karena nanoemulsi memiliki rentang ukuran partikel yang sangat kecil, nanoemulsi ini dapat diproduksi paling efektif

menggunakan peralatan bertekanan tinggi. Metode yang paling umum digunakan untuk memproduksi nanoemulsi adalah "Homogenisasi bertekanan tinggi" dan "Microfluidization" yang dapat digunakan pada skala laboratorium dan industri. Metode lain seperti "Ultrasonifikasi" dan "emulsifikasi spontan juga cocok tetapi kebanyakan digunakan di laboratorium. skala dan bukan untuk produksi komersial.



Gambar 3.1 Struktur nanoemulsi (Debnath *et al.*, 2011).

Fase minyak, Pemilihan fase berminyak yang tepat sangat penting karena mempengaruhi pemilihan bahan nanoemulsi lainnya, terutama dalam hal nanoemulsi O / W. Biasanya, minyak yang memiliki potensi pelarutan maksimum untuk kandidat obat terpilih dipilih sebagai fase berminyak untuk formulasi nanoemulsi. Ini membantu untuk mencapai pemuatan obat maksimum dalam nanoemulsi (Tanggal *et al.*, 2008). Minyak dan lemak alami terdiri dari campuran trigliserida yang mengandung asam lemak dengan berbagai panjang rantai dan tingkat ketidakjenuhan. Trigliserida digolongkan sebagai pendek (<5 karbon), sedang (6-12 karbon), atau rantai panjang (> 12 karbon) dan dapat secara sintetik terhidrogenasi untuk menurunkan derajat ketidakjenuhan, sehingga memberi perlawanan terhadap degradasi oksidatif. Pilihan fase berminyak sering merupakan kompromi antara kemampuannya untuk melarutkan obat-obatan dan kemampuannya untuk memfasilitasi pembentukan nanoemulsi karakteristik yang diinginkan. Dengan demikian campuran minyak dapat digunakan untuk memenuhi kedua persyaratan. Sebagai contoh, campuran trigliserida minyak tetap dan rantai menengah digunakan untuk memiliki keseimbangan yang baik antara pemuatan obat dan emulsifikasi (Jumaa *et al.*,

2002). Baik trigliserida rantai panjang dan menengah rantai minyak dengan derajat kejenuhan yang berbeda telah digunakan dalam desain sistem pengiriman obat *self-microemulsifying* (SMEDDS) (Gursoy *et al.*, 2004). Fase minyak yang sesuai lainnya adalah minyak nabati yang dimodifikasi, minyak yang dapat dicerna atau yang tidak dapat dicerna dan lemak seperti minyak zaitun, minyak sawit, minyak jagung, asam oleat, minyak wijen, minyak kedelai, minyak kedelai terhidrogenasi, minyak kacang tanah dan lilin lebah (Debnath *et al.*, 2011)

Surfaktan harus mendukung mikroemulsifikasi fase berminyak dan juga harus memiliki potensi pelarutan yang baik untuk senyawa obat hidrofobik. Pemilihan surfaktan sangat penting untuk formulasi nanoemulsion. Surfaktan dengan nilai keseimbangan hidrofilik lipofilik (HLB) <10 adalah hidrofobik (seperti monoesters sorbitan) dan membentuk tanpa nanoemulsi dimana tinggi HLB (>10) surfaktan seperti polisorbat 80 adalah hidrofilik dan membentuk nanoemulsi. Dalam banyak kasus, campuran lipofilik (HLB rendah) dan surfaktan hidrofilik (HLB tinggi) mungkin diperlukan untuk memperoleh nanoemulsi (Carey *et al.*, 1983). Surfaktan dalam larutan di bawah konsentrasi misel kritis (CMC) mereka meningkatkan kelarutan obat dengan menyediakan daerah untuk interaksi obat hidrofobik dalam larutan. Di atas CMC, surfaktan *self-agregat* dalam orientasi yang ditentukan untuk membentuk misel dengan inti hidrofobik dan permukaan hidrofilik. Inti hidrofobik meningkatkan dosis obat, sehingga dapat meningkatkan kelarutannya. Ketika kadar minyak tinggi, surfaktan berkonsentrasi pada emulsi minyak/antarmuka air membentuk, di mana dalam obat terlarut dalam fase minyak internal. Di sisi lain ketika kandungan minyak rendah, tetesan surfaktan terperangkap minyak menit diproduksi, yang dikenal sebagai nanoemulsi (Narang *et al.*, 2007). Sangat penting untuk menentukan konsentrasi surfaktan dengan baik karena sejumlah besar surfaktan dapat menyebabkan iritasi, ada hubungan antara ukuran tetesan dan konsentrasi surfaktan yang digunakan. Dalam beberapa kasus, meningkatkan konsentrasi surfaktan dapat menyebabkan tetesan yang lebih kecil seperti dalam kasus

campuran gliserol C8-C10 poliglikolat jenuh (Labrafac). Ini dapat dijelaskan oleh stabilisasi tetesan minyak sebagai hasil dari lokalisasi molekul surfaktan pada antarmuka minyak-air. Di sisi lain, dalam beberapa kasus ukuran tetesan rata-rata dapat meningkat dengan meningkatnya konsentrasi surfaktan.

Co-surfaktan, surfaktan saja tidak dapat menurunkan tegangan antarmuka minyak-air secukupnya untuk menghasilkan nanoemulsi yang mengharuskan penambahan molekul rantai pendek atau *co-surfactant amphiphilic* untuk membawa tegangan permukaan mendekati nol. *Co-surfactant* menembus ke monolayer surfaktan memberikan fluiditas tambahan untuk film interfacial dan dengan demikian mengganggu fase kristal cair yang terbentuk ketika film surfaktan terlalu kaku (Date *et al.*, 2008). Biasanya kosurfaktan Hydrophilic - Lipophilic Balance (HLB) sangat rendah digunakan dengan surfaktan HLB tinggi untuk memodifikasi HLB keseluruhan dari sistem. Tidak seperti surfaktan, co-surfaktan mungkin tidak mampu membentuk struktur yang berhubungan dengan diri sendiri seperti misel sendiri. Co-surfaktan hidrofilik lebih disukai alkohol dengan panjang rantai menengah seperti heksanol, pentanol dan oktanol, yang diketahui dapat mengurangi antarmuka minyak/air dan memungkinkan pembentukan nanoemulsi spontan (Shaji *et al.*, 2005).

Co-solven, Produksi SMEDDS yang optimal membutuhkan konsentrasi yang relatif tinggi (umumnya lebih dari 30% b/b) surfaktan. Pelarut organik seperti etanol, gliserol, propilena glikol (PG), polietilen glikol (PEG) cocok untuk pengiriman oral, dan mereka memungkinkan pembubaran sejumlah besar baik surfaktan hidrofilik atau obat dalam basa lipid oleh co-solven dan oleh membuat lingkungan lebih hidrofobik dengan mengurangi konstanta air dielektrik (Gursoy *et al.*, 2004). Alkohol dan co-solven volatil lainnya memiliki kerugian penguapan ke dalam cangkang gelatin lunak atau kapsul gelatin keras dalam SMEDDS konvensional yang mengarah ke pengendapan obat. Dengan demikian, formulasi bebas alkohol telah dirancang (Constantinides., 1995).

Fase encer, Ukuran tetesan dan stabilitas nanoemulsi dipengaruhi oleh sifat fase berair. Oleh karena itu, pH dan kandungan ionik dari fasa berair harus diberikan karena penting saat merancang nanoemulsi. Lingkungan fisiologis memiliki beragam rentang pH bervariasi dari pH 1,2 (pH dalam perut) hingga 7,4 dan lebih besar (pH darah dan usus). Selain itu, kehadiran berbagai ion dalam lingkungan fisiologis juga dapat memiliki efek yang cukup besar pada sifat nanoemulsi. Telah diketahui bahwa elektrolit dapat mempengaruhi karakteristik nanoemulsi, seperti ukuran tetesan dan stabilitas fisik. Oleh karena itu, disarankan untuk mengevaluasi nanoemulsi dan karakteristik dari nanoemulsi yang dihasilkan dalam fasa berair dengan berbagai pH dan / atau konsentrasi elektrolit (tergantung pada jenis aplikasi). Selain air biasa, larutan Ringer, cairan lambung simulasi (pH 1,2), cairan usus simulasi (pH 6,8) dan salin buffer fosfat dapat digunakan sebagai fase air untuk mengevaluasi nanoemulsifikasi spontan SNEDDS. Studi kami menunjukkan bahwa pH fase berair dapat memiliki pengaruh dramatis pada perilaku fase SNEDDS, terutama ketika obat dengan kelarutan tergantung pH dimuat dalam sistem (Debnath *et al.*, 2011).

BAB V NANOEMULSI SEBAGAI ANTIMIKROBA

Nanoemulsi adalah disinfektan unik dengan populasi yang seragam tetesan energi tinggi mulai dari 100 nm hingga 300 nm. Nanoemulsi memiliki khasiat biosidal yang luas terhadap bakteri, virus yang terbungkus, dan jamur oleh gangguan membran luar mereka. Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa nanoemulsi efektif terhadap biofilm (Ramalingam *et al.*, 2013). Nanoemulsi antimikroba adalah tetesan minyak dalam air yang berkisar antara 200-600 nm. Mereka terdiri dari minyak dan air dan distabilkan oleh surfaktan dan alkohol. Nanoemulsion memiliki aktivitas spektrum luas terhadap bakteri (misalnya, *E. coli*, *Salmonella*, *S. aureus*), virus yang diselimuti (misalnya, HIV, Herpes simplex), jamur (misalnya, *Candida*, *Dermatophytes*), dan spora (misalnya, anthrax). Partikel nanoemulsi termodinamika didorong untuk menyatu dengan organisme yang mengandung lipid. Fusi ini ditingkatkan oleh tarikan elektrostatis antara muatan kationik emulsi dan muatan anionik pada patogen. Ketika cukup nanopartikel menyatu dengan patogen, mereka melepaskan sebagian energi yang terperangkap di dalam emulsi. Baik bahan aktif dan energi yang dilepaskan mengacaukan membran patogen lipid, menghasilkan lisis sel dan kematian. Dalam kasus spora, perkecambahan tambahan dimasukkan ke dalam emulsi. Setelah inisiasi perkecambahan terjadi, spora berkecambah menjadi rentan terhadap tindakan antimikroba dari nanoemulsi (Debnath *et al.*, 2011). Aspek unik nanoemulsi adalah toksisitas selektif mereka terhadap mikroba pada konsentrasi yang tidak mengiritasi kulit. atau selaput lendir. Batas keamanan nanoemulsi adalah karena rendahnya tingkat deterjen di setiap tetesan, namun ketika bertindak bersama, tetesan ini memiliki energi dan surfaktan yang cukup untuk mendestabilisasi mikroba yang ditargetkan tanpa merusak sel yang sehat. Akibatnya, nanoemulsi dapat mencapai tingkat aktivitas antimikroba topikal yang hanya sebelumnya telah dicapai oleh antibiotik sistemik (Debnath *et al.*, 2011).

Nanoemulsi yang mengandung agen aktif farmasi dapat digunakan untuk produksi sediaan farmasi, nanoemulsi yang dicampur, sebagai komponen aktif, dengan kendaraan padat atau cair yang cocok untuk administrasi terapeutik. Jika diinginkan, bentuk galen khusus dapat diberikan ke campuran. Bentuk-bentuk administrasi galen berikut dapat dipertimbangkan, dalam hubungan ini: Ampul, terutama larutan injeksi dan infus steril; solusi, terutama cairan oral, tetes mata dan tetes hidung yang dapat mengandung berbagai zat tambahan selain nanoemulsion, aerosol tanpa fitur pengukuran, dan dosis aerosol, yang dapat mengandung gas propelan dan stabilisator selain nanoemulsi, gel dan salep hidrofilik dan hidrofobik yang mengandung nanoemulsi, o/w atau w/o krim yang mengandung nanoemulsi, lotion dan pasta yang mengandung nanoemulsi (Debnath *et al.*, 2011).

Menurut penelitian dari Ramalingam *et al.* (2013) menyatakan bahwa penggunaan nanoemulsi antimikroba minyak kedelai dan *cetylpyridinium* sebagai metode mengatasi biofilm pada gigi efektif dalam melawan mikroorganisme. Biofilm bakteri pada garis air unit gigi adalah masalah yang tersebar luas dan berpotensi menimbulkan risiko infeksi yang signifikan terhadap staf dan pasien gigi. Penelitian ini menginvestigasi tingkat dan komposisi kontaminasi bakteri dari garis-garis semprotan air kursi gigi dan menyelidiki kemanjuran dari desinfektan nanoemulsi *cetylpyridinium* yang mengandung dalam mengurangi beban bakteri. Biofilm *waterline* yang terpapar nanoemulsi selama 1 jam, 6 jam, 12 jam, 24 jam, 48 jam, dan 72 jam menunjukkan pengurangan koloni yang tinggi, dan jumlah yang sangat rendah setelah 12 jam dan 24 jam (67 unit pembentuk koloni / mL) adalah diamati. Paparan selama 48 jam dan 72 jam menunjukkan tidak ada atau beberapa koloni yang terlihat (2 unit pembentuk koloni / mL). Nanoemulsi yang digunakan meningkatkan kemanjuran melawan mikroorganisme lebih dari komponen yang tidak diemulsikan. Sekuensing DNA menunjukkan bahwa organisme dalam biofilm garis air terutama berasal dari tanah atau air. Temuan menunjukkan bahwa nanoemulsi secara

efektif mendisinfeksi waterlines untuk secara konsisten memenuhi rekomendasi *American Dental Association* (ADA).

Nanoemulsi adalah kelas emulsi dengan ukuran droplet dari 20 nm hingga 100 nm. Karena ukuran tetesan kecil, nanoemulsi tampak transparan atau tembus cahaya dan lebih stabil sehubungan dengan *creaming, coalescence, flokulasi*, dan Ostwald daripada emulsi konvensional. Sifat fisikokimia nanoemulsi menarik untuk aplikasi praktis karena ukuran tetesan kecil dan stabilitas jangka panjang. Nanoemulsi digunakan dalam agrokimia dalam formula pengiriman obat pestisida, dalam kosmetik sebagai pembawa obat untuk perawatan pribadi atau produk perawatan kulit, dan dalam obat-obatan sebagai matriks untuk enkapsulasi senyawa bioaktif, yang diinginkan untuk formulasi bebas alkohol¹⁶. Tetesan nanoemulsi terbaik dalam emulsi disiapkan dengan keseimbangan hidrofilik-lipofilik yang optimal (HLB) dan konsentrasi surfaktan yang optimal. Nilai HLB yang tepat dari surfaktan penting untuk pembentukan emulsi. Nanoemulsi biasanya diformulasikan untuk meningkatkan stabilitas dengan menggunakan surfaktan campuran. Nanoemulsi yang diperkaya vitamin E telah dilaporkan dengan menyesuaikan nilai HLB dari surfaktan dengan Tween 20, 40, 60, 80, dan 85. Nanoemulsi yang mengandung astaxanthin yang dibuat dengan campuran surfaktan memiliki ukuran tetesan yang lebih kecil dan distribusi ukuran yang lebih sempit daripada emulsi biasa¹⁶. Nanoemulsi terbuat dari surfaktan yang disetujui untuk konsumsi manusia dan zat makanan umum yang umumnya diakui aman oleh *Food Drug Association* (FDA). Emulsi ini mudah diproduksi dalam jumlah besar dengan mencampurkan fase minyak yang tidak larut dalam air menjadi fase berair dengan proses ekstrusi mekanis dengan tegangan tinggi yang tersedia di seluruh dunia¹⁷. Proses emulsifikasi diawali dengan pembuatan emulsi kasar. Surfaktan dilarutkan dalam air dengan *High Shear Homogenization* (HSH) selama 1 menit. Larutan dihomogenisasi kembali selama 5 menit dengan kecepatan 16000 rpm dan dilakukan proses pengecilan droplet dengan tekanan 20000 psi secara berulang sebanyak lima siklus. Setelah proses pengecilan dilakukan pendinginan dan

penentuan ukuran droplet emulsi menggunakan alat *Particle Size Analyzer* (PSA) dengan prinsip *Dynamic Light Scattering*. Suspensi sampel diiradiasi oleh laser dan *scattered light* kemudian dihitung dengan formula Stokes - Einstein. Pengukuran sampel dilakukan pada suhu 25^o dan dilakukan dengan tiga kali ulangan. Karena nanoemulsi memiliki rentang ukuran partikel yang sangat kecil, nanoemulsi ini dapat diproduksi paling efektif menggunakan peralatan bertekanan tinggi. Metode yang paling umum digunakan untuk memproduksi nanoemulsi adalah "Homogenisasi bertekanan tinggi" dan "*Microfluidization*" yang dapat digunakan pada skala laboratorium dan industri. Metode lain seperti "Ultrasonifikasi" dan "emulsifikasi spontan juga cocok tetapi kebanyakan digunakan di laboratorium. skala dan bukan untuk produksi komersial

BAB VI BAKTERI PENYEBAB INFEKSI NOSOKOMIAL

6.1. *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori adalah bakteri Gram negatif berbentuk batang spiral. Ciri khas *H. pylori* yakni mempunyai flagel multipel pada satu kutub (lofotrik), bergerak secara aktif, dan merupakan penghasil urease yang kuat. *H. pylori* tumbuh dalam waktu 3-6 hari jika diinkubasi pada suhu 37°C pada lingkungan mikroaerofilik. Koloni yang terbentuk bersifat translusen dan berdiameter 1-2 mm. Bakteri ini berhubungan dengan gastritis antral, penyakit ulkus (peptik) duodenum, ulkus gaster, dan karsinoma lambung¹³. Bakteri ini memiliki kemampuan adaptasi yang sangat baik terhadap kondisi lambung dengan serangkaian langkah yakni masuk, bergerak, dan menetap di dalam mukus, melekat pada sel epitel lambung, menghindari dari respon imun, dan sebagai akibatnya terjadi kolonisasi dan transmisi persisten di lambung¹⁴. Terdapat beberapa strain virulen *H. pylori* sehingga selalu ditemukan pada pasien tukak peptik, gastritis kronik, maupun kanker lambung. Gen Cag A dapat ditemukan pada *H. pylori*, tetapi tidak semuanya menghasilkan sitotoksin. Struktur gen ini sangat heterogen pada strain penghasil sitotoksin sehingga terdapat sekuen signal tertentu. Asosiasi antara gen CagA dengan tukak peptik atau kanker lambung terjadi melalui respons inflamasi yang meningkat terhadap *H. pylori* yang mengandung gen CagA

6.2. *Escherichia coli*

Escherichia coli merupakan flora normal yang terdapat dalam usus. Bakteri tersebut disebut oportunistik karena sering dijumpai dan dapat hidup pada jaringan tubuh makhluk hidup, bahkan dapat dijumpai dalam tanah, sampah, serta air (Kuswiyanto, 2017). *Escherichia coli* merupakan bakteri Gram negatif yang memiliki morfologi kokobasil atau batang pendek, tidak membentuk spora, bermotil dan dapat menghasilkan gas dari glukosa. *Escherichia coli* memiliki ukuran 0,4µm – 0,7µm x 1,4µm

dan memiliki strain yang berkapsul. *Escherichia coli* memiliki kompleks antigen yang terdiri dari antigen O, K, dan H (Jawetz dkk., 2014).

Menurut Jawetz dkk. (2014) mengenai klasifikasi bakteri *Escherichia coli* yaitu:

Kingdom : Bacteria
Fillum : Proteobacteria
Kelas : Gammaproteobacteria
Ordo : Enterobacteriales
Famili : Enterobacteriaceae
Genus : *Escherichia*
Spesies: *Escherichia coli*



Gambar 7.1 *Escherichia coli* (Anonim, 2015).

⁴ *Escherichia coli* pada tubuh manusia bersifat menguntungkan dan patogen bagi tubuh. Fungsi *Escherichia coli* yang menguntungkan untuk tubuh adalah sintesis vitamin K, konversi pigmen-pigmen empedu, asam-asam empedu, dan penyerapan zat-zat makanan (Ganiswarna, 1995). Apabila *Escherichia coli* jumlahnya dalam tubuh berlebihan atau berada diluar usus dapat menimbulkan beberapa penyakit antara lain : infeksi saluran kemih, diare, sepsis, dan meningitis (Jawetz dkk., 2014).

³ Pada patogenesis ekstraintestinal, *Escherichia coli* dapat menyebabkan infeksi saluran kemih, sepsis, dan penyakit lainnya. Pada infeksi saluran kemih, *Escherichia coli* menjadi penyebab tersering dengan prevalensi mencapai 90% terutama pada penderita wanita (Putri, 2016). Gejala dan tanda-tandanya infeksi

saluran kemih yaitu sering berkemih, disuria, hematuria, dan piuria.

Pada infeksi saluran kemih yang letaknya di bagian atas maka akan timbul pula gejala nyeri pinggang dan demam yang sangat tinggi yaitu mencapai lebih sama dengan 39°C. Antigen yang cukup berperan dalam infeksi saluran kemih bagian atas yaitu antigen K, sedangkan antigen O hampir berperan pada seluruh infeksi. Antigen H berperan pada kejadian nefropatogenik akibat infeksi *Escherichia coli* (Putri, 2016). Selain infeksi saluran kemih, *Escherichia coli* juga dapat menyebabkan sepsis yang dapat mengancam nyawa *Escherichia coli* menjadi penyebab sepsis nosokomial yang cukup tinggi yaitu prevalensinya mencapai 15%. Sepsis akibat *Escherichia coli* sebagian besar diakibatkan oleh endotoksin kelompok sepsis enteropatogenik *Escherichia coli* (EPEC) yang rata-rata menunjukkan resistensi. Pada infeksi lainnya, *Escherichia coli* dapat pula menyebabkan infeksi vesica vellea serta duktus, apendisitis dan meningitis pada bayi prematur (Jawetz dkk., 2014).

Escherichia coli adalah bakteri Gram negatif berbentuk batang yang menyebabkan sejumlah besar infeksi nosokomial dan komunitas seperti infeksi saluran kemih (ISK) dan prostatitis. Bakteri ini memiliki kemampuan untuk mengeluarkan racun, polisakarida dan dapat membentuk biofilm. Itu juga dapat membentuk biofilm *in vitro* (Jamal *et al.*, 2015). Kapsul *Escherichia coli* adalah molekul dengan berat molekul tinggi dan melekat pada permukaan sel. Kapsul *Escherichia coli* memainkan peran tidak langsung dalam biofilm dengan melindungi adhesi permukaan bakteri. Kondisi lingkungan yang berbeda mempengaruhi kemampuan *Escherichia coli* untuk membentuk biofilm. Ketebalan biofilm *Escherichia coli* mungkin ratusan mikron dan menimbulkan kesulitan dalam pengobatan dengan antibiotik karena adanya eksopolisakarida (Jamal *et al.*, 2015).

BAB VII BAKTERI MULTIRESISTEN DAN PEMBENTUK BIOFILM

7.1 Bakteri Multiresisten

Multidrug Resistant organism (MDRO) merupakan mikroorganisme yang memiliki ketahanan terhadap beberapa golongan antibiotik. Salah satu bakteri yang sering menyebabkan MDRO pada instansi kesehatan adalah bakteri golongan *Enterobacteriaceae* yang telah resisten terhadap antibiotik golongan betalaktam *Extended Spectrum β -Lactamases* (ESBLs) (Arcci, 2012). *Beta - Lactamase* merupakan enzim yang dapat merusak antibiotik khususnya golongan beta-laktam dengan memecah struktur cincinnya. Akibat pemecahan cincin beta-laktam, antibiotik tidak dapat bekerja dalam membunuh mikroorganisme. Mengatasi hal diatas, ditemukan sefalosporin jenis baru yang tahan terhadap beta-laktam, namun pada tahun 1980, ditemukan bakteri penghasil *beta-lactamase* jenis baru yang dapat merusak golongan sefalosporin jenis baru, dimana mikroorganisme tersebut merupakan penghasil *beta-lactamase* yang dikategorikan sebagai ESBLs (Struthers, 2003).

Resistensi bakteri terhadap antibiotik kelompok betalaktam seperti penisilin G, ampicilin dan amoksisilin dapat terjadi melalui dua mekanisme yaitu bakteri mengubah reseptor yang dimilikinya atau memproduksi enzim β laktamase yang dapat menghidrolisis obat tersebut. Enzim β laktamase pertama kali diidentifikasi pada bakteri *Escherichia coli*. Enzim β laktamase tersebut diberi nama TEM. Pada eksplorasi selanjutnya terbukti bahwa TEM disandi oleh gen resisten antibiotik yang berlokasi di plasmid. Selain pada *Escherichia coli*, saat ini enzim TEM juga ditemukan pada *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* dan *Neisseria gonorrhoeae*. Enzim β laktamase lainnya yaitu SHV disandi oleh gen resisten antibiotik yang berlokasi di kromosom. Enzim ini pertama kali diisolasi dari *Klebsiella pneumoniae*. Diperkirakan galur (*strain*) resisten produsen β laktamase ini terbentuk terutama akibat penggunaan antibiotik yang tidak tepat (Yuwono, 2011).

7.2. Bakteri Pembentuk Biofilm

Biofilm adalah kelompok atau mikroorganisme di mana mikroba menghasilkan zat polimer ekstraseluler (EPS) seperti protein (<1-2%) termasuk enzim), DNA (<1%), polisakarida (1-2%) dan RNA (<1%), dan di samping komponen-komponen ini, air (hingga 97%) adalah bagian utama dari biofilm yang bertanggung jawab untuk aliran nutrisi di dalam matriks biofilm. Permukaan biofilm terdiri dari dua komponen utama yaitu saluran air untuk transportasi nutrisi dan wilayah padat. Sel mikroba dengan biofilm diatur dengan fisiologi dan sifat fisik yang berbeda. Biofilm bakterial biasanya di luar akses antibiotik dan sistem kekebalan tubuh manusia. Mikroorganisme yang menghasilkan biofilm telah meningkatkan potensi untuk menanggung dan menetralkan agen antimikroba dan menghasilkan perawatan yang lama. Bakteri pembentuk biofilm mengaktifkan beberapa gen yang mengaktifkan ekspresi gen stres yang pada gilirannya beralih ke fenotip resisten karena perubahan tertentu misalnya. kepadatan sel, nutrisi atau suhu, kepadatan sel, pH dan osmolaritas. Ketika saluran biofilm air dibandingkan dengan sistem sirkulasi menunjukkan bahwa biofilm dianggap organisme multiseluler primitif. Berbagai komponen biofilm menandakan integritas biofilm dan membuatnya tahan terhadap berbagai faktor lingkungan (Jamal *et al.*, 2015).

Pembentukan biofilm adalah proses yang sangat kompleks, di mana sel-sel mikroorganisme berubah dari planktonik ke mode pertumbuhan bertangkai. Juga telah dikemukakan bahwa pembentukan biofilm tergantung pada ekspresi gen spesifik yang memandu pembentukan biofilm (Jamal *et al.*, 2015). Proses pembentukan biofilm terjadi melalui serangkaian kejadian yang mengarah ke adaptasi di bawah kondisi gizi dan lingkungan yang beragam. Model biofilm umum untuk pembentukan biofilm bakteri dapat dijelaskan. Singkatnya, proses terdiri dari lima langkah yang berbeda secara genetik:

- (1) Perlekatan bakteri awal,
- (2) Pembentukan permukaan dari monolayer bakteri,

- (3) Migrasi bakteri untuk membentuk mikrokoloni,
 - (4) Peningkatan produksi matriks ekstraseluler dan
 - (5) Pematangan arsitektur 3 dimensi dari biofilm dan penyebaran
- (Beaudoin and Waters, 2016).

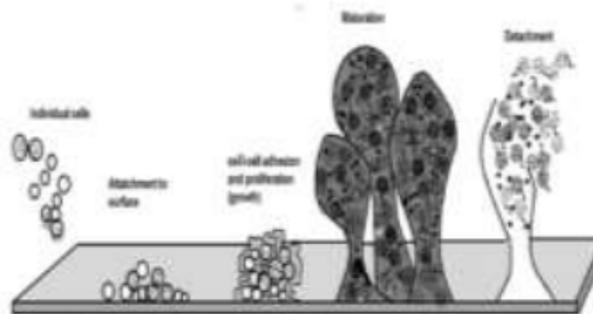


Figure 1. The biofilm life cycle in three steps: attachment, growth of colonies (micro-colony formation and formation of these dimensional structures) and detachment in clumps.

Gambar 7.3 Proses pembentukan Biofilm (Jamal *et al.*, 2015).

Proses pembentukan biofilm :

1. Penempelan, ketika sel bakteri mencapai ke dekat beberapa permukaan / dukungan begitu dekat sehingga gerakannya sangat lambat, itu membuat koneksi yang dapat dibalik dengan permukaan dan / atau sudah melekat mikroba lain ke permukaan. Untuk pembentukan biofilm, sistem antarmuka padat - cair dapat memberikan lingkungan yang ideal untuk mikro-organisme untuk melekat dan tumbuh (misalnya darah, air) (Jamal *et al.*, 2015). Untuk pemasangan yang paling sering dan pembentukan biofilm permukaan kasar, hidrofilik dan dilapisi akan memberikan lingkungan yang lebih baik. Penambahan lapisan koloni juga dapat terjadi peningkatan tetapi tidak melebihi tingkat kritis pada kecepatan aliran, suhu air atau konsentrasi nutrisi. Adanya struktur lokomotor pada permukaan sel seperti flagella, pili, fimbri, protein atau polisakarida juga penting dan mungkin dapat memberikan kemudahan proses penempelan (Jamal *et al.*, 2015).

2. Pembentukan koloni mikro terjadi setelah bakteri melekat pada permukaan fisik / jaringan biologis dan pengikatan ini kemudian menjadi stabil yang menghasilkan pembentukan koloni mikro. Perkalian bakteri dalam biofilm dimulai sebagai hasil dari sinyal kimia. Mekanisme genetik produksi eksopolisakarida diaktifkan ketika intensitas sinyal melewati batas tertentu. Jadi dengan cara ini menggunakan sinyal kimia seperti itu, divisi sel bakteri terjadi dalam matriks eksopolisakarida yang tertanam, yang akhirnya menghasilkan pembentukan koloni mikro (Jamal *et al.*, 2015).
3. Setelah tahap pembentukan koloni mikro dari biofilm, ekspresi gen terkait biofilm tertentu terjadi. Produk-produk gen ini diperlukan untuk EPS yang merupakan bahan struktur utama biofilm. Dilaporkan bahwa perlekatan bakteri dengan sendirinya dapat memicu pembentukan matriks ekstraseluler. Pembentukan matriks diikuti oleh formasi saluran berisi air untuk mengangkut nutrisi dalam biofilm. Peneliti telah mengusulkan bahwa saluran air ini seperti sistem sirkulasi, mendistribusikan nutrisi yang berbeda untuk dan membuang bahan limbah koloni mikro dari biofilm (Jamal *et al.*, 2015).
4. Setelah pembentukan biofilm, para peneliti sering memperhatikan bahwa bakteri meninggalkan biofilm itu sendiri secara teratur. Dengan melakukan hal ini, bakteri dapat mengalami multiplikasi dan penyebaran cepat. Detasemen sel bakteri planktonik dari biofilm adalah detasemen terprogram, memiliki pola alami. Kadang-kadang karena beberapa bakteri stres mekanik terlepas dari koloni ke sekitarnya. Namun dalam banyak kasus beberapa bakteri menghentikan produksi EPS dan terlepas ke lingkungan. Dispersi sel biofilm terjadi baik dengan detasemen sel-sel yang terbentuk baru dari sel-sel yang tumbuh atau dispersi agregat biofilm karena efek mengalir atau karena *quorum sensing* (QS). Dalam biofilm sel dihilangkan karena aksi enzim yang menyebabkan pencernaan alginat. Karakter fenotipik organisme tampaknya dipengaruhi oleh mode

dispersi biofilm. Sel-sel yang tersebar dari biofilm memiliki kemampuan untuk mempertahankan sifat-sifat tertentu dari biofilm, seperti antibiotik dalam sensitivitas. Sel-sel yang terdispersi membentuk biofilm sebagai hasil pertumbuhan dapat kembali dengan cepat ke fenotip planktonik normalnya (Jamal *et al.*, 2015).

5. Selama pembentukan biofilm banyak spesies bakteri dapat berkomunikasi satu sama lain melalui mekanisme yang disebut *quorum sensing* (QS) (Jamal *et al.*, 2015). Ini adalah sistem stimulus untuk mengoordinasikan ekspresi gen dengan sel-sel lain dan tanggapan yang terkait dengan kepadatan populasi lokal mereka. Selama molekul sinyal pengindera kuorum melekat pada reseptor bakteri baru dan membantu dalam transkripsi gen dalam satu spesies bakteri serta antara spesies bakteri yang berbeda (Jamal *et al.*, 2015). Sistem QS memungkinkan komunikasi antara intraspecies dan antarspecies yang melibatkan dalam formasi biofilm, kekurangan makanan dan kondisi stres lingkungan, seperti disinfektan, antibiotik, kolonisasi bakteri, identifikasi spesies yang mengganggu, pembentukan flora usus yang normal serta pencegahan flora usus yang berbahaya. Banyak bakteri yang terkait secara klinis menggunakan QS untuk pengaturan produksi kolektif faktor virulensi.

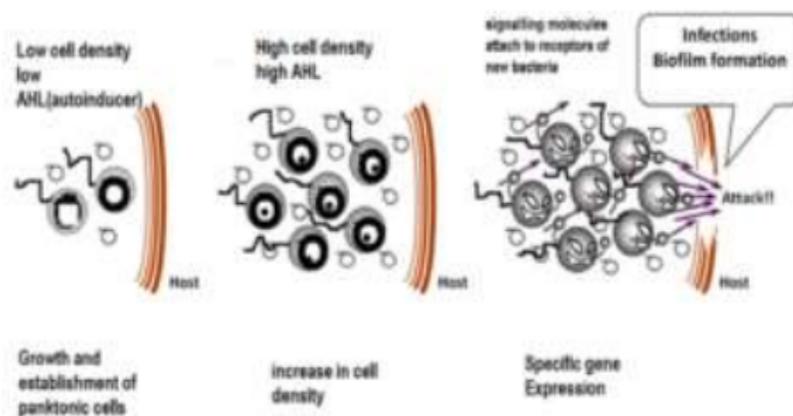


Figure 2. Cell density dependent gene expression in quorum sensing.

Gambar 7.8 Langkah-langkah berbeda dalam siklus kehidupan biofilm (Jamal *et al.*, 2015)

Biofilm adalah perhatian khusus untuk dokter terutama karena mereka berkontribusi secara signifikan terhadap resistensi antimikroba, membuat infeksi ini sulit diobati. Banyak penelitian telah menunjukkan bahwa biofilm bakteri memiliki kemampuan untuk bertahan hidup setelah terpapar berbagai antibiotik tingkat tinggi. Ini telah dikaitkan dengan sejumlah faktor termasuk interaksi antibiotik dengan matriks ekstraseluler, peningkatan ekspresi selama penempelan awal bakteri dan pertumbuhan lambat bakteri di dalam area biofilm. Akibatnya, biofilm hingga 1000 kali lebih resisten terhadap pengobatan antibiotik bila dibandingkan dengan pengujian kerentanan planktonik tradisional. Selain itu, beberapa penelitian telah mencatat ketidakmampuan sel imun pejamu untuk membasmi infeksi biofilm, menghasilkan koloni untuk infeksi berulang (Beaudoin and Waters, 2016).

Perangkat medis, termasuk kateter (saluran kemih dan intravaskular) dan endotrakeal, serta alat bedah implan, adalah sumber kolonisasi mikroba dan infeksi biofilm. Dalam satu penelitian, kejadian infeksi aliran darah yang berhubungan dengan kateter dan infeksi saluran kemih terkait kateter di unit perawatan intensif pediatrik dilaporkan setinggi 10,6% dan 26%, masing-masing. Berbagai macam patogen telah dikaitkan dengan perangkat medis yang tinggal termasuk *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* dan *Staphylococcus sp.* ini dapat berasal dari flora komensal atau didapat di rumah sakit. Implan prostetik, seperti batang tulang belakang, juga rentan terhadap infeksi oleh organisme penghasil biofilm. Kolonisasi paska operasi dari perangkat yang ditanam melalui pembedahan dapat terjadi sebagai akibat dari bakteremia, karena alat ini menawarkan permukaan yang dapat menghindari adanya bakteri saat dilakukan prosedur untuk masukkan perangkat. Metode pencegahan dan pengobatan baru,

termasuk biomaterial antibiofilm, saat ini sedang dipelajari termasuk bahan baru yang menggunakan bahan anti-perekat (seperti rantai polimer hidrogel atau superhidrofobik) atau diinfus dengan agen bakterisida yang terikat langsung ke perangkat (Beaudoin and Waters, 2016).

Biofilm berkembang secara istimewa pada permukaan inert atau pada jaringan mati, dan terjadi pada perangkat medis dan fragmen jaringan mati seperti sequestra tulang mati; mereka juga dapat terbentuk pada jaringan hidup, seperti pada kasus endokarditis. Sel bakteri sessile melepaskan antigen dan menstimulasi produksi antibodi, tetapi antibodi tidak efektif dalam membunuh bakteri dalam biofilm dan dapat menyebabkan kerusakan kompleks imun pada jaringan di sekitarnya. Bahkan pada individu dengan reaksi imun seluler dan humoral yang sangat baik, infeksi biofilm jarang diselesaikan oleh mekanisme pertahanan tuan rumah (Jamal *et al.*, 2015).

Lebih dari separuh penyakit menular yang menyerang individu dengan gangguan ringan melibatkan spesies bakteri yang memiliki komensal dengan tubuh manusia atau umum di lingkungan kita. Permukaan peralatan medis telah menjadi fokus infeksi terkait perangkat yang menunjukkan keberadaan sejumlah besar bakteri yang terbungkus lendir sebagaimana dibuktikan oleh mikroskop elektron. Bahkan jaringan yang diambil dari infeksi kronis yang tidak terkait alat juga menunjukkan adanya pembentukan biofilm. Infeksi biofilm ini dapat disebabkan oleh satu spesies atau oleh campuran spesies bakteri atau jamur (Beaudoin and Waters, 2016)

BAB VIII
METODE PEMBUATAN NANOEMULSI DAN UJI ANTIMIKROBA

8.1. Minyak atsiri (¹*Alpinia galanga* [L] Willd) Yang Digunakan Minyak atsiri lengkuas (*Alpinia galanga* [L] Willd) dibeli di CV. Nusaroma Jakarta dan dikarakterisasi menggunakan *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS) di Laboratorium Instrumentasi Jurusan Kimia Universitas Brawijaya Malang.

8.2. Pembuatan Kurva Pertumbuhan *Helicobacter pylori*
Bakteri ditumbuhkan dalam medium *Brucella Agar Plate* dengan penambahan serum domba 8% selama 3 hari pada suhu 37 °C dalam inkubator. Sebanyak satu koloni bakteri yang tumbuh diinokulasikan pada 50 ml *Brucella broth* dalam Erlenmeyer pada *rotary shaker* dan inkubasikan suhu 37 °C selama 3 hari. Sebanyak 1 ml kultur kerja diencerkan dengan 9 ml aquadest steril kemudian ukur kepadatan sel dengan spektrofotometer (OD=570 nm). Lakukan kegiatan ini selang waktu 5 jam selama 3 hari. Buat kurva pertumbuhan yang terbentuk dengan sumbu x menunjukkan waktu, y menunjukkan turbiditas bakteri (*Optical Density*). Tentukan waktu inkubasi (t) yang menunjukkan pertengahan fase log/eksponensial¹⁹.

8.3. Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri Uji Lain
Pembuatan kurva pertumbuhan bakteri dilakukan bertujuan untuk mendapatkan masa inkubasi terbaik yaitu pada pertengahan fase log yakni fase yang tepat dimana bakteri tumbuh dengan baik, isolat tersebut yang akan digunakan untuk menumbuhkan biofilm bakteri. Isolat bakteri *Escherichia coli* ditumbuhkan pada agar miring *Nutrient agar* (NA - sefotaksim 0,002 mg/ml) dalam tabung reaksi selama 24 jam suhu 37°C di inkubator (Vandepitte, 2010). Satu ose koloni *Escherichia coli* yang tumbuh kemudian diinokulasikan dalam 50 ml medium *Nutrient Broth* (NB) di Erlenmeyer 100 ml. Inkubasikan kultur dalam *rotary shaker* selama 24 jam dalam suhu kamar. Sebanyak 1 ml kultur kerja diencerkan dengan 9 ml aquadest steril dan

dihomogenkan, kemudian diukur kerapatan optik dengan panjang gelombang 600 nm. Pengukuran dilakukan mulai dari jam ke-0 sampai jam ke-24 selang waktu 1 jam. Buat kurva pertumbuhan dengan sumbu x sebagai waktu (t) dan sumbu y sebagai absorbansi (a). Bakteri yang ditumbuhkan dalam waktu (t¹) inkubasi dengan pengenceran bertingkat menggunakan *pour plate* ini mengetahui jumlah koloni bakteri.

Pembuatan starter bakteri *Escherichia coli* dengan cara mengambil satu ose koloni *Escherichia coli* diinokulasikan pada 50 ml NB dalam Erlenmeyer 100 ml dan diinkubasi suhu kamar dalam *rotary shaker* selama 24 jam (stok kultur). Buat starter dengan menginokulasikan 5 ml kultur kerja dalam 100 ml NB dan digoyang-goyangkan dalam *rotary shaker* selama (t¹) jam (kurva pertumbuhan) kemudian disebut sebagai starter dan diinkubasi selama 17 jam. Selanjutnya dilakukan pengenceran bertingkat yakni 10⁻¹, 10⁻³, 10⁻⁵ dan 10⁻⁷ dengan pengambilan sebanyak 100 µl. Pada pengenceran 10⁻⁵ dan 10⁻⁷ ditumbuhkan pada media *Nutrient agar* dengan metode *pour plate* untuk diamati banyaknya jumlah koloni yang tumbuh dalam kisaran 30 - 300 koloni (Cappuchino dan Sherman, 2014).

8.4. Pembuatan Nanoemulsi Minyak Lengkuas

Pembuatan nanoemulsi berdasarkan metode¹⁰ dengan modifikasi. Fase organik terdiri dari minyak lengkuas 5% dan Span 80 2% sedangkan fase cair terdiri dari Tween 80 dan aquadest steril 25 ml. Kedua fase dilarutkan secara terpisah menggunakan *magnetic stirrer*. Fase minyak ditambahkan secara perlahan-lahan pada fase cair dalam Erlenmeyer dan disonikasi menggunakan *ultrasonic prosessor* dengan amplitudo 40% selama 15-20 menit. Nanoemulsi yang terbentuk disimpan pada suhu kamar dan wadah steril. Karakterisasi nanoemulsi dilakukan dengan *Particle Size Analyzer* (PSA) untuk mengetahui ukuran nanoemulsi dan *Transmission Electron Microscopy* (TEM) untuk menganalisa morfologinya.

Nanoemulsi yang terbentuk kemudian dianalisis ukurannya menggunakan *Particel Size Analyzer* (PSA) sedangkan

analisa morfologi droplet nanoemulsi dilakukan dengan *Scanning Electron Microscopy* (SEM).

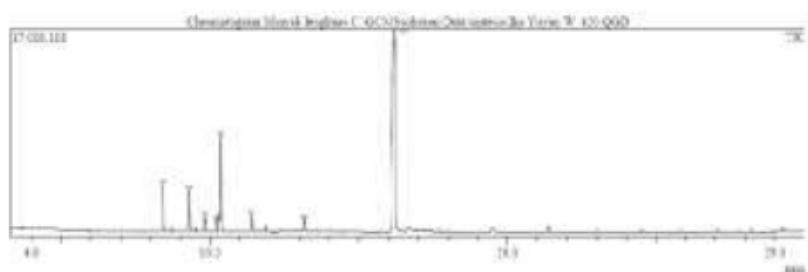
8.5. Uji Nanoemulsi Minyak Lengkuas Terhadap *Helicobacter pylori*

Uji Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM) dilakukan dengan teknik seri pengenceran bertingkat yang dilanjutkan dengan metode *pour plate* untuk mengetahui jumlah koloni bakteri yang tumbuh. Suspensi distandarisasi dengan metode *McFarland* 0.5 yang terdiri dari 9.95 ml H₂SO₄ 1% dan 0.05 ml BaCl₂ 1.175% yang setara dengan kepadatan sel bakteri 10⁸ CFU/ml. Sebanyak 2 ml nanoemulsi minyak lengkuas sesuai konsentrasi yang ditentukan dimasukkan ke dalam tabung reaksi steril yang pertama dan dilakukan pengenceran hingga tabung reaksi terakhir sesuai konsentrasi yang dikehendaki. Masing-masing tabung reaksi ditambahkan 1ml bakteri uji dan media brucella broth dan darah domba 8% hingga volume total mencapai 5 ml. Masing-masing tabung kemudian diinkubasi selama 3 hari, suhu 37°C, dan CO₂ 10%²⁰. Suspensi biakan kemudian ditumbuhkan dalam media *Brucella agar plate* dengan teknik *pour plate* selama 3 hari, suhu 37°C, dan CO₂ 10%. KHM didefinisikan sebagai konsentrasi terkecil yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri, sedangkan KBM didefinisikan sebagai konsentrasi terkecil yang mampu membunuh bakteri (tidak ada pertumbuhan bakteri uji sama sekali). Konsentrasi nanoemulsi yang digunakan yakni 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, dan 0 %. Kontrol negatif yang digunakan yakni media saja sedangkan kontrol positif yang digunakan adalah bakteri uji dengan media yang digunakan. Perlakuan dilakukan dengan tiga kali ulangan.

BAB X
KARAKTERISASI NANOEMULSI DAN ANTIMIKROBA

10.1 Karakterisasi Minyak Lengkuas (*Alpinia galanga* [L.] Willd.) dengan GCMS

Hasil karakterisasi minyak lengkuas (*Alpinia galanga* [L.] Willd.) dengan GCMS di Laboratorium Sentral Ilmu Hayati Universitas Brawijaya Malang disajikan dengan menggunakan kromatogram dibawah ini.



Gambar 10.1 Kromatogram Karakterisasi Minyak lengkuas

Tabel 10.1 Hasil Analisis GCMS Komponen Kimia Minyak Lengkuas

No	Waktu Retensi	Area (%)	Tinggi (%)	Komponen
1	8,418	5,14	10,80	Pinene
2	9,299	4,84	9,58	Beta-Pinene
3	9.822	1,58	3,24	p-metha-1.5-diena
4	10,207	1,01	2,05	1-Methyl-2-isopropilbenzene
5	10,300	0,60	1,24	Limonene
6	10,356	9,69	20,41	Zineol
7	11,409	1,72	3,43	1.3.3-Trimethylnorcamphor
8	13,166	1,47	2,67	Cyclohexene-1-methyl-4-(2-propanol)
9	16,213	73,94	46,48	Cinnamic Acid

Berdasarkan hasil kromatogram karakterisasi minyak lengkuas dengan menggunakan *Gas Chromatography-Mass Spectrophotometry* (GC-MS) yang ditunjukkan pada tabel 4.1 tersebut ialah nampak kandungan tertinggi pada nomor 9, dimana hampir 46,48% yang artinya nomor 9 mendominasi hampir keseluruhan kandungan minyak lengkuas. Puncak nomor 9

menurut hasil uji *Gas Chromatography-Mass Spectrophotometry* (GC-MS) ialah metil sinamat. Puncak tertinggi kedua terdapat pada nomor 6 sebesar 20,41%, yang kandungannya ialah 1,8 - cineole, dan puncak tertinggi ketiga dengan persentase sebesar 10,80% yakni α -Pinene. Kandungan - kandungan tersebut yang diduga bersifat antibakteri, antifungi dan antibiofilm. Berdasarkan hasil uji dengan *Gas Chromatography-Mass Spectrophotometry* (GC-MS) tersebut didukung menurut literatur dari penelitian Yussof *et al.* (2011) menganalisis minyak dengan *Gas Chromatography-Mass Spectrophotometry* (GC-MS) pada golongan genus *Alpinia* terdapat perbedaan besar dalam komposisi minyak antara ketiga spesies. Minyak rimpang *Alpinia galanga* kaya dengan 1,8-cineole (29,8%), sedangkan *Alpinia ligulata* dan *Alpinia nieuwenhuizii* keduanya sangat kaya (E) - methyl cinnamate (36,4% dan 67,8%, resp.), dari ketiga minyak tersebut bersifat antibakteri terbukti dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*, khusus minyak lengkuas (*Alpinia galanga*) dapat menghambat bakteri lain dan jamur yang diuji. Penelitian lain dari Quatrin *et al.* (2016), minyak *Eucalyptus globulus* dikarakterisasi dengan kromatografi gas, terdapat kandungan seperti 1-8-Cineol (75,8%), p-Cymene (7,5%), α -Pinene (7,4%) dan Limonene (6,4-Cineol) 13% kandungan tersebut teruji bersifat antibakteri dan antibiofilm. Penelitian lain menyebutkan hampir sama dengan karakterisasi yang dilakukan pada penelitian ini dimana kandungan tertinggi minyak lengkuas ialah metil sinamat.

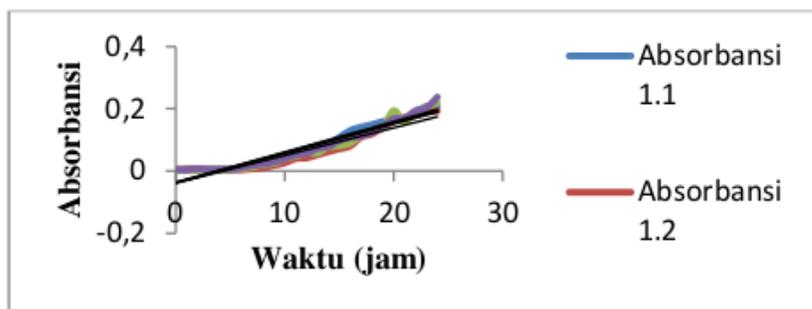
Berdasarkan hasil karakterisasi minyak lengkuas dengan *Gas Chromatography-Mass Spectrophotometry* (GC-MS) dan literatur tersebut, maka kandungan minyak lengkuas dapat dijadikan alternatif sebagai pengujian antibakteri dan antibiofilm pada penelitian ini.

10.2 Kurva pertumbuhan bakteri dan pembuatan starter bakteri

Pertumbuhan adalah peningkatan jumlah semua komponen organisme dengan teratur. Perkalian sel adalah

konsekuensi dari pembelahan sel organisme uniseluler, pertumbuhan mengarah pada peningkatan jumlah bakteri tunggal yang membentuk populasi, yang disebut sebagai kultur. Studi pertumbuhan populasi bakteri memerlukan inokulasi sel yang layak ke dalam media kaldu steril dan inkubasi kultur di bawah suhu optimal, pH, dan kondisi gas. Di bawah kondisi ini, sel akan bereproduksi dengan cepat dan dinamika pertumbuhan mikroba dapat dipetakan dalam kurva pertumbuhan populasi, yang dibangun dengan memplot peningkatan jumlah sel versus waktu inkubasi. Kurva dapat digunakan untuk menggambarkan tahapan siklus pertumbuhan. Ini juga memfasilitasi pengukuran jumlah sel dan laju pertumbuhan organisme tertentu dalam kondisi standar seperti yang dinyatakan oleh waktu generasi, waktu yang diperlukan untuk populasi mikroba untuk menggandakan (Jawetz *et al*, 2013).

Hubungan antara jumlah sel dengan waktu pertumbuhan dapat dinyatakan dalam kurva pertumbuhan. Pada penelitian ini, kurva pertumbuhan bakteri isolat *Escherichia coli* penghasil ESBLs yakni 1.1, 1.2, 3.4, 4.4 dilakukan dengan mengamati tingkat kekeruhan (*Optical Density*) dengan spektrofotometer Uv-vis dengan panjang gelombang yang digunakan dalam pengukuran ini adalah 600 nm guna melihat densitas dari media. Pengukuran dilakukan tiap 1 jam sekali selama 24 jam dan menggunakan perhitungan kamar hitung untuk mengetahui jumlah sel tiap 2 jam sekali selama 24 jam. Hal tersebut dilakukan untuk mengetahui pertumbuhan bakteri yang disajikan dalam bentuk kurva. Pertumbuhan isolat bakteri *Escherichia coli* penghasil ESBLs ditunjukkan pada gambar 4.3 kurva pertumbuhan bakteri.



Gambar 10.2 Kurva pertumbuhan bakteri selama 24 jam

Menurut literatur dari Cappuccino dan Sherman (2014) menyatakan bahwa kurva pertumbuhan bakteri dibagi dalam 4 fase, yakni : fase lag, fase log, fase eksponensial (diam) dan fase kematian. Berdasarkan kurva pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* selama 24 jam pada keempat isolat yakni 1.1, 1.2, 3.4, dan 4.4 hanya terdapat fase lag dan log. Pada fase stasioner dan mati tidak terjadi sebab pengamatan hanya dilakukan selama 24 jam. Hasil pengamatan 24 jam keempat isolat mengalami kenaikan yang signifikan baik jumlah sel dan absorbansinya. Pembuatan kurva pertumbuhan bakteri dilakukan bertujuan untuk mendapatkan masa inkubasi terbaik yaitu pada pertengahan fase log yakni fase yang tepat dimana bakteri tumbuh dengan baik, isolat tersebut yang akan digunakan untuk menumbuhkan biofilm bakteri. Fase log dipilih sebab bakteri sedang aktif – aktifnya tumbuh dan paling konstan. Sehingga ketika dilakukan pengujian, bakteri akan tumbuh stabil dan tidak terpengaruh akibat berkurangnya nutrisi. Hal tersebut sesuai dengan literatur dari Jawetz *et al* (2013) fase log atau fase eksponensial ialah fase dimana sel-sel berada dalam keadaan stabil. Bahan sel baru sedang disintesis pada tingkat yang konstan, tetapi material baru itu sendiri bersifat katalitik, dan massa meningkat secara eksponensial. Literatur lain menyebutkan menurut Kosim dan Putra (2010) pada fase eksponensial, bakteri mengalami pertumbuhan secara cepat. Selain itu, kebutuhan akan energi bagi bakteri pada fase eksponensial lebih tinggi dibandingkan pada fase lag (adaptasi), stasioner dan kematian. Pada fase eksponensial sel banyak menghasilkan zat – zat metabolit yang

dibutuhkan dalam rangka memenuhi kebutuhannya untuk pertumbuhan.

Tabel 4.2 Pembuatan starter bakteri

isolat	pengenceran	jumlah koloni	CFU/ml
1.1	10^5	200	2×10^8
	10^7	135	$1,35 \times 10^8$
1.2	10^5	113	$1,13 \times 10^8$
	10^7	100	1×10^8
3.4	10^5	50	5×10^7
	10^7	49	$4,9 \times 10^7$
4.4	10^5	90	9×10^7
	10^7	36	$3,6 \times 10^7$

Pembuatan starter bakteri bertujuan untuk meremajakan isolat bakteri sebelum dilakukan uji selanjutnya, agar isolat bakteri yang ditumbuhkan sudah murni tanpa tercampur bakteri lain. Hasil pembuatan starter bakteri ialah memenuhi syarat yakni 30 – 300 koloni. Hal tersebut sesuai literatur menurut Cappuchino dan Sherman (2014) yaitu piring (plate) yang cocok untuk penghitungan harus mengandung tidak kurang dari 30 atau lebih dari 300 koloni. Jumlah plat yang valid secara statistik hanya diperoleh dari pengenceran sel bakteri yang menghasilkan antara 30 dan 300 koloni. Piring dengan lebih dari 300 koloni tidak dapat dihitung dan ditetapkan terlalu banyak untuk dihitung - TNTC; lempeng dengan kurang dari 30 koloni ditetapkan terlalu sedikit untuk dihitung – TFTC. Hitung hanya piring yang berisi antara 30 dan 300 koloni. Sedangkan pembuatan starter bakteri menggunakan antibiotik hasilnya ialah pertumbuhan koloni sangat sedikit dan beberapa isolat ada yang tidak tumbuh. Hal tersebut dikarenakan adanya antibiotik yang menghambat pertumbuhan bakteri, sehingga pada pembuatan starter menggunakan antibiotik dapat dinyatakan tidak memenuhi syarat.

10.3. Pembuatan Nanoemulsi Minyak Lengkuas dan Hasil PSA

Berdasarkan hasil pembuatan nanoemulsi minyak lengkuas (*Alpinia galanga* [L.] Willd.) ialah nampak berwarna putih susu, hal tersebut sama dengan gambar literatur nanoemulsi. Nanoemulsi yang dibuat pada penelitian ini merupakan jenis O/W dimana minyaknya ada didalam air, sebab mengacu pada prosedur pembuatannya, saat peencampuran bahan khususnya fase minyak diteteskan pada akhir pembuatan. Selain itu, menurut literatur dari Debnath et al, (2011) menyatakan bahwa nanoemulsi jenis O/W Biasanya, minyak memiliki potensi pelarutan maksimum untuk kandidat obat terpilih dipilih sebagai fase berminyak untuk formulasi nanoemulsi. Ini membantu untuk mencapai pemuatan obat maksimum dalam nanoemulsi. Minyak dan lemak alami terdiri dari campuran trigliserida yang mengandung asam lemak dengan berbagai panjang rantai dan tingkat ketidakjenuhan. Trigliserida digolongkan sebagai pendek (<5 karbon), sedang (6-12 karbon), atau rantai panjang (> 12 karbon) dan dapat secara sintetik terhidrogenasi untuk menurunkan derajat ketidakjenuhan, sehingga memberi perlawanan terhadap degradasi oksidatif. Pilihan fase berminyak sering merupakan kompromi antara kemampuannya untuk melarutkan obat-obatan dan kemampuannya untuk memfasilitasi pembentukan nanoemulsi karakteristik yang diinginkan. Sedangkan hasil rata - rata pengukuran nanoemulsi dengan menggunakan *Particle Size Analyzer* (PSA) ialah 124,95 μm atau setara dengan 124,95 $\times 10^3$ nm. Menurut literatur dari Debnath *et al*, (2011) nanoemulsi didefinisikan sebagai isotropik, stabil secara termodinamika, transparan atau translusen dispersi minyak dan air distabilkan oleh film antarmuka molekul surfaktan yang memiliki ukuran droplet 20 - 500 nm. Sehingga berdasarkan hasil pembuatan nanoemulsi dengan literatur tidak sesuai yakni ukuran nanoemulsi terlalu besar. Hal ini disebabkan oleh alat yang digunakan untuk mengukur nanoemulsi yakni *Particle Size Analyzer* (PSA) memiliki batas ukuran 0,04 μm - 500 μm , sehingga tidak dapat untuk mengukur partikel yang berukuran nano.

Kesalahan ukuran pembuatan nanoemulsi ini kemungkinan disebabkan oleh formulasi nanoemulsi yang kurang sesuai sehingga menyebabkan nanoemulsi berwarna agak keruh. Hal tersebut sesuai literatur menurut Sharma. *et al* (2010) formulasi nanoemulsi yang tidak tepat dapat mempengaruhi ketidakstabilan nanoemulsi yang berimbas pada ukuran droplet nanoemulsi. Tetesan kecil dengan jari-jari kelengkungan tinggi diubah menjadi tetesan besar dengan jari-jari kelengkungan rendah. Dua droplet menyebar dan menjadi satu droplet besar. Dengan demikian, setelah penyimpanan untuk periode waktu yang lama, distribusi ukuran tetesan bergeser ke ukuran besar dan transparansi nanoemulsi menjadi keruh. Pengaruh rasio pencampuran surfaktan pada stabilitas nanoemulsi ketika metode transisi inversi fase digunakan sebagai metode persiapan nanoemulsi. Pembentukan nanoemulsi O/W dengan metode emulsifikasi PIT dalam air/campuran surfaktan /sistem minyak nonionik dipelajari. Sifat hidrofilik-lipofilik dari surfaktan divariasikan dengan mencampurkan polyoxyethylene 4-lauryl ether (C12E14) dan polyoxyethylene 6-lauryl ether (C12E6). Emulsifikasi dilakukan dalam sampel dengan konsentrasi minyak konstan (20% berat) dengan pendinginan cepat dari suhu HLB yang sesuai hingga 25 ° C. Nanoemulsi dengan radius droplet 60–70 nm dan 25–30 nm diperoleh pada konsentrasi surfaktan total masing-masing 4 dan 8% berat. Nanoemulsi dengan rasio surfaktan 8% menunjukkan stabilitas tinggi di atas nanoemulsi dengan konsentrasi surfaktan 4%. Dalam studi lain Sher L. *et al* berhasil menunjukkan efek variabel proses atas ukuran droplet nanoemulsi yang selanjutnya mengarah pada stabilitas nanoemulsi. Hasil dari pekerjaan ini dengan jelas menunjukkan bahwa ukuran tetesan nanoemulsi tergantung pada berbagai variabel proses seperti pemanasan dan suhu pendinginan formulasi dan suhu akhir dimana campuran didinginkan setelah fase inversi.

DAFTAR PUSTAKA

1. Pinho, S.S., S. Carvalho, R. Marcos-Pintos, A. Mangalhaes, C. Oliveira, and J.Gu. 2013. Gastric cancer: adding glycosylation to the equation. *Trends Molecular Medicine*. 19(11): 664-676.
2. Parreira, P., B.I.G. Soares, C.S.R Freire, A.J.D Silvestre, C.A. Reis, M.C.L. Martins, and M.F. Duarte. 2017. *Eucalyptus* spp. outer bark extracts inhibit *Helicobacter pylori* growth: in vitro studies.
3. Clark, J.H. and F.E.J. Deswarte. 2008. The Biofinery concept an intregrated approach. *Intoduction to Chemical from Biomass*. 1-20.
4. Damayanti, L., B.E. Putranto, and U. Sadhana. 2015. Ekspresi Anti-*Helicobacter pylori* pada Gastritis kronis, lesi prakanker, dan karsinoma gaster. *Biomedika*. 7(2): 20-26.
5. Hsu, Wei-Yea, A. Simonne, A. Weissman and Kim J. 2010. Antimicorbial activity of greater galanga (*Alpinia galangal* [Linn] Swartz] flowers. *Food Science an Biotechnology*. 19(4): 873-880.
6. Khoerunnisa, U. 2015. Studi Farmakognosi Rimpang dan Uji Aktivitas Antimikroba Minyak Atsiri Rimpang Lengkuas (*Alpinia galanga* L). ADLN-Perpustakaan Universitas Airlangga.
7. Yuharmen, Y. Eryanti, dan Nurbalatif. 2002. Uji Aktifitas Antimikroba Minyak Atsiri Dan Ekstrak Metanol Lengkuas *Alpinia galanga* Jurusan Kimia. Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Riau.
8. Iravani, S., H. Korbekandi, S.V. Mirmohammadi, and B. Zolfaghari, 2014, Synthesis of Silver Nanoparticles: Chemical, Physical, and Biological Methods, *Research in Pharmaceutical Sciences*, 9 (6): 385 - 406.
9. Rossi, G.G., K.B. Guterres, P.C. Bonez, S.S. Gundel, V.A. Aggertt, F.S. Siqueira, A.F. Ourique, R. Wagnerd, B. Klein, R.C.V. Santoz, and M.M.A. Campos. 2017. *Microbial Pathogenesis*. 113 (2017): 335-341.
10. Quantrin, P.M., C.M. Verdi, M.E. de Souza, S.N.de Gogol, B. Klein, A. Gundel, R. Wagner, R. D. Vaucher, A.F. Ourique, and R.C.V. Santos. 2017. Antimicrobial and Antibiofilm Activities of Nanoemulsions containing *Eucalyptus globulus* oil against *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida* sp. *Microbial Pathogenesis*. 4010(17): 310975-5.

11. Bisset, N.G and M.Wichtl. 2001. Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals 2nd Edition. Medpharm Scientific Publishers. Germany.
12. Sumayani, K. Rahayu, dan C. Yudi. 2008. Antibacterial Activity of Galangal Rhizome Juice In Different Concentration To The Growth of Aeromonas Hydrophila With In Vitro Method. *Berkala Ilmiah Perikanan*. 3(1).
13. Jawet, Adelberg, and Melnick. 2002. *Mikrobiologi Kedokteran*. EGC. Jakarta.
14. Rani, A.A. 2000. Helicobacter pylori infection related gastroduodenal diseases in Indonesia. *Journal of Helicobacter Reasearch*. 2 (4): 1324.
15. Solnick, J.V. and J. Siddiqui. 2002. *Helicobacter pylori*. In: *Current Diagnosis and Treatment in Infectious Disease*. Lange Medical Books/McGrawHill. New York.
16. Lu, W.C., H. Da-Wei, W. Chiun-C.R., Y. Ching-Hua, T. Jen-Chieh, H. Yu-Ting, and L. Po-Hsien. 2018. Preparation, Characterization, and Antimicrobial Activity Of Nanoemulsions Incorporating Citral Essential Oil. *Journal of food and drug analysis*. 26: 82–89.
17. Debnath S, Satayanarayana and Kumar G V. 2011. Nanoemulsion A Method To Improve The Solubility Of Lipophilic Drugs. *PHARMANEST - An International Journal of Advances In Pharmaceutical Sciences*. Andhra Pradesh, India. 2(2):2 – 3.
18. Agustinisari I, Purwani EY, Harimurti N, Yuliani S. 2014. Aktivitas Antimikroba Nanoemulsi Minyak Biji Pala. *Artikel Penelitian*. Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Pascapanen Pertanian, Bogor. 11(1):1 – 8.

Haki_2_Monograf

ORIGINALITY REPORT

8%

SIMILARITY INDEX

8%

INTERNET SOURCES

1%

PUBLICATIONS

2%

STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1

[docobook.com](#)

Internet Source

2%

2

[text-id.123dok.com](#)

Internet Source

2%

3

[digilib.unhas.ac.id](#)

Internet Source

2%

4

[merinsach.blogspot.com](#)

Internet Source

1%

5

[eprints.unsri.ac.id](#)

Internet Source

1%

Exclude quotes On

Exclude matches < 100 words

Exclude bibliography On

Haki_2_Monograf

GRADEMARK REPORT

FINAL GRADE

GENERAL COMMENTS

/15

Instructor

PAGE 1

PAGE 2

PAGE 3

PAGE 4

PAGE 5

PAGE 6

PAGE 7

PAGE 8

PAGE 9

PAGE 10

PAGE 11

PAGE 12

PAGE 13

PAGE 14

PAGE 15

PAGE 16

PAGE 17

PAGE 18

PAGE 19

PAGE 20

PAGE 21

PAGE 22

PAGE 23

PAGE 24

PAGE 25

PAGE 26

PAGE 27

PAGE 28

PAGE 29

PAGE 30

PAGE 31

PAGE 32

PAGE 33

PAGE 34

PAGE 35

PAGE 36

PAGE 37

PAGE 38

PAGE 39

PAGE 40

PAGE 41

PAGE 42

PAGE 43

PAGE 44

PAGE 45
