

Original Research

Ekstrak Kasar Isolat *Bacillus* sp Sebagai Agen Peluruh Biofilm

Mangihot Tua Gultom^{1*}, William Thamrin¹, Mariana Wahjudi¹, Suhartono²

¹ Fakultas Teknobiologi, Universitas Surabaya, Surabaya-Indonesia

² Department of Biology, Faculty of Mathematics and Sciences, Syiah Kuala University, Aceh-Indonesia

* corresponding author: ihot_gultom@staff.ubaya.ac.id

Abstract—Biofilms play an important role in the distribution and pathogenicity of bacteria. In our previous research, we demonstrated that our isolated *Bacillus* sp. (collection of Microbiology Lab, Universitas Surabaya) exhibited *in vitro* antibiofilm activity. *Bacilli* generally produce cellulase, which is one of the enzymes responsible for bacterial biofilm degradation. Based on this fact, this study aimed (1) to determine whether or not the crude extract of our *Bacillus* sp. isolate is able to degrade biofilms formed by *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and water-crane bacteria, and (2) to determine whether such crude extract contains active cellulase. The research steps began with the preparation of *Bacillus* sp. crude extract, biofilm degradation assay, cellulase activity assay on CMC Agar, and cellulase detection by SDS-PAGE and electrophoresis zymogram. The crude extract of *Bacillus* sp. effectively degraded the biofilm 30 min after contact. The crude extract decreased biofilms of *Escherichia coli* 23,56%, *Staphylococcus aureus* 27,78%, and water-crane bacteria 37,98%. Based on the zymogram result, it was shown that the crude extract contained active cellulase, with a size of approximately 35 kDa. It was concluded that the crude extract of *Bacillus* sp. has potential as an anti-biofilm agent and exhibits active cellulase activity.

Keywords: *Bacillus* sp., crude extract, biofilm, SDS-PAGE, zymogram

Abstrak—Biofilm mempunyai peran penting dalam penyebaran dan sifat patogenitas bakteri patogen. Pada penelitian sebelumnya telah dibuktikan bahwa isolat *Bacillus* sp. (koleksi Laboratorium Mikrobiologi, Universitas Surabaya) mempunyai aktivitas anti-biofilm secara *in vitro*. *Bacillus* umumnya menghasilkan selulase sedangkan selulase diketahui dapat meluruhkan biofilm bakteri. Berdasarkan hal di atas, penelitian ini bertujuan (1) untuk mengetahui apakah ekstrak kasar isolat *Bacillus* sp. ini dapat meluruhkan biofilm *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*, dan bakteri air keran; dan (2) untuk mengetahui apakah dalam ekstrak kasar terdapat selulase. Metode penelitian ini meliputi penyiapan ekstrak kasar sel *Bacillus* sp., pengujian aktifitas meluruhkan biofilm, uji aktivitas selulase pada Agar CMC, dan analisis keberadaan aktivitas selulase pada ekstrak kasar *Bacillus* sp. menggunakan SDS-PAGE dan elektroforesis zymogram. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kasar isolat *Bacillus* sp. bekerja paling baik pada perlakuan 30 menit setelah kontak dengan biofilm bakteri. Pemberian ekstrak kasar dapat menurunkan biofilm *Escherichia coli* sebesar 23,56%; dan biofilm bakteri *Staphylococcus aureus* sebesar 27,78%, dan biofilm bakteri air keran sebesar 37,98%. Berdasarkan hasil zymogram, terlihat bahwa ekstrak kasar isolat *Bacillus* sp. memiliki selulase aktif dengan ukuran sekitar 35 kDa. Dapat disimpulkan bahwa ekstrak kasar isolat *Bacillus* sp. berpotensi sebagai agen peluruh biofilm dan memiliki selulase aktif.

Kata kunci: *Bacillus* sp., ekstrak kasar, biofilm, SDS-PAGE, zymogram

PENDAHULUAN

Biofilm merupakan hasil sekresi dari sel mikroorganisme, seperti mukopolisakarida, lipid, protein, bersifat adhesif, berada di suatu permukaan (habitat/substrat), dan karena karakter-karakter tersebut, biofilm menjadi tempat hidup yang baik bagi berbagai jenis mikroorganisme yang menempel padanya. Pembentukan dan pematangan biofilm bakteri telah dilaporkan berbagai artikel ilmiah [1]. Dampak pembentukan biofilm adalah memberikan perlindungan yang baik pada sel mikroorganisme yang tergabung di dalam komunitas biofilm sehingga mikroorganisme tersebut menjadi sukar untuk dibasmi. Tentu saja, bagi mikroorganisme yang bersifat merugikan, pembentukan biofilm merupakan hal yang tidak diinginkan.

Cara menghilangkan biofilm biasanya dengan kombinasi cara fisik-kimiawi, misalnya dengan digosok bersama dengan cairan pembersih (klorin, peroksida atau fenol) yang sayangnya cara ini sering dianggap kurang “ramah lingkungan”. Bioteknologi menawarkan solusi alternatif yang lebih ramah lingkungan untuk mengatasi biofilm, misalnya menggunakan enzim untuk menghancurkan struktur kimiawi biofilm [2]. Namun, semakin murni perolehan suatu enzim akan berpengaruh pada mahalnya biaya produksi enzim dan mahalnya harga

“produk penghilang biofilm berbahan dasar enzim” ini nantinya. Oleh karena itu, diperlukan penelitian untuk mengetahui seberapa berpengaruh enzim dalam bentuk ekstrak kasar terhadap peluruhan biofilm, serta untuk mengetahui jenis enzim peluruh yang dikandung ekstrak kasar tersebut.

Penelitian yang dilakukan oleh Stiefel dkk. [3] dengan menggunakan enzim jenis baru *endoscope cleaner* dapat menghilangkan biofilm dari *Staphylococcus aureus* sebesar 95% dan *Pseudomonas aeruginosa* sebesar 90%. Johansen dkk. [4] melaporkan bahwa dengan mencampur oksidoreduktase dengan enzim penghidrolisis polisakarida dapat memberikan aktivitas bakterisidal serta penghancuran dari biofilm.

Penelitian Kurniawan [5] melaporkan kemampuan ekstrak kasar isolat *Bacillus* sp. menghambat pembentukan struktur eksopolisakarida penyusun biofilm *Burkholderia cenocepacia* H111, dengan penurunan persentase biofilm sebesar 71%. Hingga dilakukan penelitian ini, belum diketahui kemampuan ekstrak kasar *Bacillus* sp. di atas dalam meluruhkan biofilm dari mikroorganisme lain. Penelitian ini akan semakin memberikan informasi potensi ekstrak kasar isolat *Bacillus* sp. sebagai bahan anti-biofilm.

METODE

Bahan

Bakteri yang dijadikan sumber ekstrak kasar enzim dalam penelitian ini adalah *Bacillus* sp. [5]. Bakteri pembentuk biofilm diperoleh dari air keran PDAM Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Teknobiologi Universitas Surabaya, serta isolat *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* koleksi kultur Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Teknobiologi Universitas Surabaya. Bahan lainnya meliputi tip 0,5-10 µL (Biologic®); tip 10-100 µL (Biologic®); tip 100-1000 µL (Biologic®); filter membran 0,2 µm; *mikroplate*, Luria Bertani *Broth* (Merck®), Luria Bertani *Agar* (Merck®), *Gram Staining Kit*, *Difco™ Agar* (BD), HCl, NaOH, Natrium *Carboxymethyl Cellulose* (Na-CMC), Triton X-100, Tris (Merck®), 0,05M Buffer Phospahte Saline (PBS) pH 7,4 (NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄), 0,05M Buffer *Potassium Phosphate* pH 6,5 (K₂HPO₄, KH₂PO₄), *Congo Red* (Sigma), *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS) (Merck®), Glycin (Merck®), Acrylamide/bis (Merck®), Amonium Persulfat (APS) (Merck®), TEMED (Merck®), *Pre-stained Protein Ladder* (GangNam-STAIN™), *running buffer SDS-PAGE* (Merck®), *Sample Buffer 2X* (Merck®), alkohol 70%, alkohol 96%, akuades.

Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah mikropipet 0,5-10 µL (Biorad), mikropipet 10-100 µL (Biorad), mikropipet 100-1000 µL (Biorad), mikroskop (Olympus), mikrosentrifugasi (Thermoscientific), laminar air flow chamber (Omega), oven (Memmert), sonikator (Biologic), autoklaf, *shaker incubator* (LM-420D), set elektroforesis (Biorad), spektrofotometer UV-VIS (Genesys), tabung reaksi, cawan petri, silinder cup, jarum ose, kaca preparat, bunsen, tabung mikrosentrifugasi 1,5 mL (Eppendorf), dan peralatan gelas.

Tahapan Penelitian

Penanganan Kultur Bakteri Dan Penyiapan Ekstrak Kasar *Bacillus* sp

Isolat *Bacillus* sp., *E. coli* dan *S. aureus* koleksi Laboratorium diremajakan dari stok gliserol dan diinokulasikan pada media Luria-Bertani (LB) agar dan diinkubasikan pada suhu 37 °C selama 24 jam. Kemudian, kultur diinokulasikan ke dalam media LB *broth* dan diinkubasi di dalam *shaker incubator* pada kecepatan 120 rpm dengan suhu 37 °C selama 24 jam. Bakteri pembentuk biofilm diisolasi air keran Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Teknobiologi Universitas Surabaya, setelah diencerkan lalu diinokulasikan ke media LB agar dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Tahap konfirmasi semua bakteri dilakukan dengan uji pengecatan Gram dan pengamatan mikroskopis [6].

Kultur *Bacillus* sp. fase stasioner disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit untuk pemanenan sel, lalu dibilas dengan buffer PBS 0,1 M, kemudian disentrifugasi

ulang. Pelet sel kemudian disuspensikan dalam larutan buffer PBS 0,1 M dengan perbandingan volume 1:4 (gram pelet sel:mililiter PBS 0,1M), disonikasi [7] pada amplitude 20-30% untuk mendapatkan ekstrak kasar yang tembus cahaya, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 10.000 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C lalu disimpan pada suhu -20°C hingga digunakan.

Pembuatan Biofilm Bakteri Air Kran, *E. coli*, *S. aureus*

Sebanyak 10 µL inokulum bakteri dengan nilai OD₆₀₀ sebesar 0,1 dan 90 µL media LB dimasukkan ke dalam *microplate* 96 sumur dan diinkubasi pada suhu 25 °C selama 48 jam tanpa agitasi. Setelah itu, media dibuang secara perlahan dan lapisan biofilm diberikan perlakuan 130 µL ekstrak kasar *Bacillus* sp. selama waktu kontak 0 menit, 15 menit, 30 menit. Sebanyak 130 µL media LB digunakan sebagai kontrol negatif. Sebanyak 10 µL sel-sel planktonik diambil untuk diukur densitas dan viabilitasnya, sedangkan sisa cairan kultur dibuang. Lapisan biofilm difiksasi dengan 130 µL metanol dan dibiarkan selama 10 menit. Selanjutnya larutan metanol dibuang, *microplate* dikeringudarkan, diwarnai dengan 130 µL larutan kristal violet 1% dan dibiarkan selama 30 menit. Sumur-sumur *microplate* kemudian dibilas dengan ddH₂O, *microplate* dikeringudarkan, dan absorbansi kristal violet dibaca pada panjang gelombang 590 nm (berdasarkan hasil optimasi). Hasil yang didapatkan adalah nilai absorbansi yang menandakan seberapa besar biofilm yang terbentuk [6].

Analisis Aktivitas Selulase Ekstrak Kasar *Bacillus* sp. Menggunakan SDS-PAGE dan Elektroforesis Zymogram

Analisis selulase ekstrak kasar *Bacillus* sp. dilakukan dengan cara membuat media Difco™ Agar (BD) yang berisi Natrium *Carboxymethyl Cellulose* (Na-CMC) 0,1%. *Cylinder cup* diletakkan di atas agar berisi Na-CMC. Kemudian sampel ekstrak kasar dengan kadar 3,677 µg/µL dan sebanyak 100 µL standar protein selulase (kontrol positif) dengan kadar 1,4 mg/ml diinokulasikan ke dalam *silinder cup* dan diinkubasi pada suhu 25 °C selama 24 dan 48 jam. Elektroforesis sampel ekstrak kasar *Bacillus* sp. dilakukan dengan metode elektroforesis Zimogram, dilakukan dengan menggunakan 12,5% poliakrilamida sebagai gel pemisah (*Separating Gel*) dan 3% poliakrilamida sebagai gel penahan (*Stacking Gel*). Sampel ekstrak kasar dan standar protein (kontrol positif) dengan konsentrasi dan total protein yang sudah diukur dalam 2X *buffer* sampel di tabung mikrosentrifus kemudian dimasukkan ke dalam sumur gel penahan dengan volume bervariasi (antara 1-10 µL). Gel dipasang pada tangki elektroforesis, *buffer* elektroforesis 1X dituang pada tempatnya, dan elektroforesis dijalankan selama 1 jam pada tegangan 110V. Setelah selesai, gel dilepas dan jarak migrasi diukur dari batas atas gel pemisah. Setelah elektroforesis gel dipisahkan dengan dipotong dimana sebagian gel akan dilakukan pewarnaan menggunakan Coomassie Blue R-250 dan sebagian lainnya akan digunakan untuk proses zimogram, dimana gel direnaturasi dengan merendam gel di dalam 2,5% Triton X-100 selama satu jam sambil diaduk. Gel ditiriskan dan direndam dalam 0,05M buffer kalium fosfat pH 6,5 selama 24 dan 48 jam sambil diaduk perlahan (*shaker incubator* pada suhu 37°C). Kemudian gel diwarnai dengan kongo merah 0,3% selama 15 menit, direndam dengan NaCl 1M selama 1 jam (2 kali), dan diberikan larutan *counterstain* (asam asetat 5%) hingga pita bening muncul. Zona bening di sekitar pita dibandingkan dengan penanda berat molekul untuk mengetahui berat molekul protein ekstrak kasar *Bacillus* sp.. Zona bening tersebut mengindikasikan bahwa protein ekstrak kasar *Bacillus* sp. dapat menghidrolisis substrat sodium karboksimetilselulosa (Na-CMC) pada gel akrilamida.

Analisis Data

Penelitian ini menggunakan sistem Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan replikasi sebanyak empat kali. Pada penelitian ini, tahapan yang dilakukan uji statistika adalah pengujian ekstrak kasar *Bacillus* sp. terhadap pembentukan biofilm, pengukuran kuantitas biofilm berdasarkan kuantitas kristal violet yang mewarnai biofilm (absorbansi dibaca pada λ = 590 nm, A590, nilai A590 menandakan jumlah kristal violet yang menempel pada lapisan

biofilm yang terbentuk). Uji statistik *two-way analysis of variance* (ANOVA) dilakukan menggunakan *software* Minitab 17, dengan didahului uji normalitas dan homogenitas-nya, sesudahnya diuji lanjut dengan uji Tukey (*multiple comparisons*).

HASIL

Pembentuk Biofilm

Uji konfirmasi terhadap kemurnian dan tipe Gram semua bakteri percobaan menunjukkan hasil yang benar. Hasil yang unik yaitu pada bakteri air keran terlihat bahwa ditemukan beberapa bentuk sel seperti monobasil, diplobasil, dan streptobasil. Bakteri air keran juga terdiri atas bermacam-macam sel dengan tipe Gram berbeda, hal ini menunjukkan bahwa pada air keran terdapat berbagai macam bakteri yang membentuk komunitas. Pewarnaan Gram pada *E. coli* memberikan hasil bahwa bakteri ini berbentuk koko-basil dan merupakan bakteri Gram negatif. Sel *S. aureus* memiliki bentuk kokus/bulat dan merupakan bakteri Gram positif, demikian pula *Bacillus* sp juga merupakan sel bertipe Gram positif namun berbentuk basil.

Uji peluruhan biofilm dilihat dari nilai absorbansi kultur sel bakteri pembentuk biofilm setelah diberikan perlakuan ekstrak kasar *Bacillus* sp. dengan waktu yang ditentukan. Hasil pengukuran absorbansi biofilm dan densitas sel dari bakteri air kran yang didapatkan disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1

Hasil Pengukuran Absorbansi Biofilm dan Densitas Sel dari Bakteri Air Kran

Jenis Perlakuan	Waktu Inkubasi		
	0 Menit	15 Menit	30 Menit
Uji Biofilm			
Kontrol Negatif	1,230 ± 0,046 ^a	0,953 ± 0,034 ^{bc}	0,787 ± 0,039 ^d
Ekstrak Kasar	1,040 ± 0,052 ^b	0,872 ± 0,041 ^{cd}	0,645 ± 0,014 ^e
Uji Viabilitas dan Densitas Sel			
Densitas Sel (kontrol negatif)	0,145 ± 0,022 ^e	0,294 ± 0,008 ^d	0,382 ± 0,019 ^c
Densitas Sel (ekstrak kasar)	0,397 ± 0,031 ^c	0,509 ± 0,032 ^b	0,590 ± 0,009 ^a

Keterangan: Perbedaan signifikan dilihat dari perbedaan dari huruf abjad yang tertera di sebelah atas nilai angka.

Dapat dilihat dari hasil Tabel 1 bahwa semakin lama waktu inkubasi absorbansi semakin menurun yang menandakan bahwa biofilm telah diluruhkan. Perlakuan ekstrak kasar terlihat lebih banyak meluruhkan daripada kontrol negatif, yakni ekstrak kasar memiliki nilai absorbansi sebesar 1,040 pada perlakuan 0 menit sedangkan kontrol negatif memiliki nilai absorbansi lebih besar yaitu 1,230. Kemudian hasil analisis viabilitas dan densitas sel pada 0 menit menunjukkan bahwa ekstrak kasar memiliki nilai OD₆₀₀ yang lebih besar daripada kontrol negatif dengan nilai OD₆₀₀ sebesar 0,397, pada kontrol negatif sebesar 0,145. Hal ini menandakan bahwa sel planktonik biofilm perlakuan ekstrak kasar lebih banyak terlepas daripada sel planktonik biofilm kontrol negatif yang cenderung stabil formasi biofilm-nya. Dari perlakuan waktu kontak 0 menit, 15 menit, dan 30 menit dapat dilihat bahwa waktu terbaik adalah pada pemberian ekstrak kasar selama 30 menit pada bakteri air kran.

Untuk hasil pengukuran absorbansi biofilm dan densitas sel dari bakteri *E. coli* yang didapatkan disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2

Hasil Pengukuran Absorbansi Biofilm dan Densitas Sel dari Bakteri E. Coli

Jenis Perlakuan	Waktu Inkubasi		
	0 Menit	15 Menit	30 Menit
Uji Biofilm			
Kontrol Negatif	1,820 ± 0,045 ^a	1,740 ± 0,058 ^a	1,416 ± 0,073 ^b
Ekstrak Kasar	1,719 ± 0,108 ^a	1,691 ± 0,066 ^a	1,314 ± 0,104 ^b
Uji Viabilitas dan Densitas Sel			
Densitas Sel (kontrol negatif)	0,078 ± 0,004 ^d	0,384 ± 0,007 ^c	0,481 ± 0,010 ^b
Densitas Sel (ekstrak kasar)	0,381 ± 0,026 ^c	0,492 ± 0,027 ^b	0,567 ± 0,040 ^a

Keterangan: Perbedaan signifikan dilihat dari perbedaan dari huruf abjad yang tertera di sebelah nilai angka.

Tabel 2 menunjukkan bahwa pada *E. coli* ekstrak kasar pada perlakuan 0 menit lebih meluruhkan daripada kontrol negatif dengan nilai absorbansi 1,719 yang lebih kecil daripada nilai absorbansi kontrol negatif yaitu 1,820. Hasil uji viabilitas dan densitas sel pada 0 menit juga menunjukkan bahwa ekstrak kasar lebih banyak meluruhkan biofilm sehingga sel planktonik yang terlepas lebih banyak, dengan nilai OD₆₀₀ yaitu 0,381. Kontrol negatif memiliki nilai OD₆₀₀ sebesar 0,078, lebih kecil daripada ekstrak kasar. Dengan demikian, pada *E. coli*, perlakuan waktu kontak sel dengan ekstrak kasar yang terbaik adalah 30 menit.

Kemudian untuk hasil pengukuran absorbansi biofilm dan densitas sel dari bakteri *S. aureus* yang didapatkan disajikan pada Tabel 3. Pada *S. aureus*, ekstrak kasar lebih meluruhkan biofilm dengan nilai absorbansi 1,735 sedangkan kontrol negatif memiliki nilai absorbansi sebesar 1,982 pada perlakuan 0 menit. Pada hasil uji viabilitas dan densitas sel yang juga sama pada 0 menit, menunjukkan nilai OD₆₀₀ pada ekstrak kasar lebih besar daripada kontrol negatif dengan nilai 0,372 dan 0,166. Dengan demikian dapat dilihat bahwa perlakuan waktu kontak sel dengan ekstrak kasar terbaik pada *S. aureus* adalah pada waktu perlakuan 30 menit.

Tabel 3

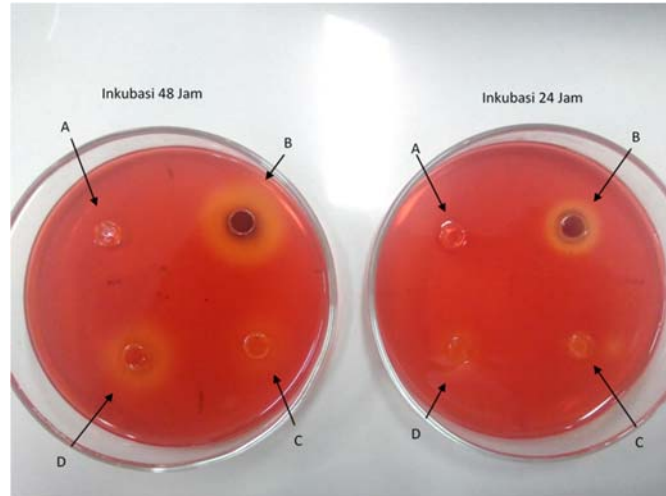
Hasil Pengukuran Absorbansi Biofilm dan Densitas Sel dari Bakteri S. aureus

Jenis Perlakuan	Waktu Inkubasi		
	0 Menit	15 Menit	30 Menit
Uji Biofilm			
Kontrol Negatif	1,982 ± 0,024 ^a	1,763 ± 0,066 ^b	1,432 ± 0,104 ^c
Ekstrak Kasar	1,735 ± 0,078 ^b	1,565 ± 0,056 ^c	1,253 ± 0,043 ^d
Uji Viabilitas dan Densitas Sel			
Densitas Sel (kontrol negatif)	0,166 ± 0,009 ^d	0,369 ± 0,019 ^c	0,480 ± 0,006 ^b
Densitas Sel (ekstrak kasar)	0,372 ± 0,004 ^c	0,477 ± 0,009 ^b	0,538 ± 0,027 ^a

Keterangan: Perbedaan signifikan dilihat dari perbedaan dari huruf abjad yang tertera di sebelah nilai angka.

Analisis Keberadaan Aktivitas Selulase Pada Ekstrak Kasar *Bacillus* sp. Menggunakan SDS-PAGE dan Elektroforesis Zymogram

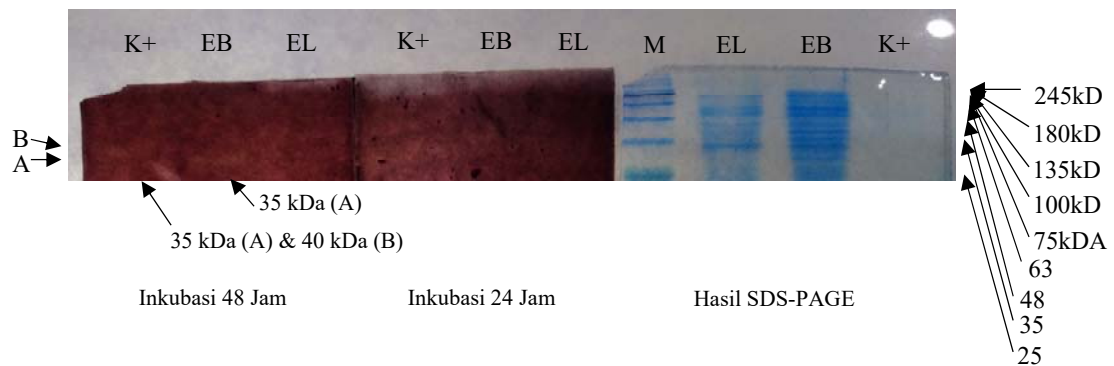
Uji awal untuk mendeteksi dari keberadaan selulase dalam ekstrak kasar *Bacillus* sp. adalah mengetes kerja ekstrak kasar pada media Difco™ Agar (BD) berisi Na-CMC sebesar 0,1%. Kontrol positif dan ekstrak kasar diinokulasikan ke dalam silinder cup dan setelah diinkubasi selama 24 dan 48 jam, hasil tampak pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil uji awal keberadaan dari enzim selulase pada ekstrak kasar *Bacillus* sp. menggunakan agar berisi Na-CMC.

Keberadaan selulase dibuktikan dengan membesarnya zona bening setelah inkubasi 24 jam dan 48 jam. Ekstrak yang segar (baru dibuat), B, memiliki diameter zona bening sebesar 1,25 cm setelah inkubasi 24 jam dan setelah inkubasi 48 jam diameter zona bening menjadi 2 cm. Kemudian pada ekstrak yang telah disimpan, C, pada inkubasi 24 jam memiliki diameter zona bening sebesar 0,9 cm dan setelah inkubasi 48 jam diameter zona bening menjadi 1,2 cm. Pada D waktu inkubasi 24 jam memiliki diameter zona bening sebesar 1 cm dan setelah inkubasi 48 jam diameter zona bening menjadi 1,5 cm (Gambar 1).

Kemudian untuk hasil SDS-PAGE dan zimogram, sebagian gel yang sudah dielektroforesis diberi pewarnaan oleh Coomassie Blue R-250 dan sebagian lagi diberikan perlakuan dengan pewarnaan oleh Kongo Merah 0,3% terlebih dahulu sebelum proses zimogram. Berikut pada Gambar 2 merupakan hasil yang didapatkan.



Gambar 2. Hasil SDS-PAGE dan zimogram dari ekstrak kasar *Bacillus* sp dengan inkubasi selama 24 dan 48 jam. Keterangan : Dari kiri hingga kanan adalah hasil zimogram inkubasi 48 jam: K+ (kontrol positif), EB (Ekstrak Kasar baru), EL (Ekstrak kasar lama), gambar ditengah adalah hasil zimogram inkubasi 24 jam yaitu : K+ (kontrol positif), EB (Ekstrak Kasar baru), EL (Ekstrak kasar lama).

Hasil SDS-PAGE pada kanan yaitu: M (Marker), EL (Ekstrak kasar lama), EB (Ekstrak Kasar baru), K+ (kontrol positif). Hasil yang didapatkan adalah pada kode A, dimana terdapat pita dengan zona bening pada hasil zimogram inkubasi 48 jam di dalam ekstrak kasar baru (EB)

dengan ukuran pita sekitar 35 kDa. Kontrol positif (selulase murni) memberikan hasil yang sama pada sekitar 35 kDa namun terdapat zona bening kedua yaitu pada sekitar 40kDa (kode B). Sedangkan ekstrak kasar lama (EL) tidak didapatkan pita dengan zona bening.

BAHASAN

Uji konfirmasi menunjukkan *Bacillus* sp., *E. coli*, *S. aureus*, hasil pengecatan Gram-nya sesuai dan benar, sedangkan bakteri air kran menunjukkan hasil adanya campuran bakteri Gram negatif dan positif namun sel Gram negatif sepertinya lebih dominan. Maryanti dkk. [8] melaporkan hasil penelitiannya bahwa air kran dapat mengandung bermacam bakteri seperti *S. aureus*, *Bacillus* sp., *E. coli*, dan *Klebsiella* sp., yang diketahui bahwa jenis yang disebutkan terakhir (dan juga kebanyakan genus anggota Enterobacteriaceae lainnya) diketahui adalah salah satu bakteri yang efektif membentuk biofilm. Biofilm di toilet dan kamar mandi, seperti dilaporkan Mori dkk. [9] tersusun dari ratusan jenis bakteri yang secara bertahap mengolonisasi dan spesies yang mendominasi dapat berganti-ganti.

Peluruhan biofilm yang dilakukan pada suhu ruang 21°C selama 30 menit pada bakteri air keran memberikan hasil pengurangan biofilm sebesar 37,98%. Nagraj dan Gokhale [10] menggunakan isolat *Penicillium janthinellum* EU2D-21 yang menghasilkan enzim ekstraseluler kompleks yang dapat meluruhkan biofilm *E. coli* sebesar 85.5%, *Salmonella enterica* sebesar 79.72%, *Pseudomonas aeruginosa* sebesar 88.76%, dan *S. Aureus* sebesar 87.42% dalam waktu inkubasi 1 jam pada suhu 50°C. Stiefel *et al* [3] yang menggunakan enzim novel *endoscope cleaner* yang dapat menghilangkan biofilm dari *S. Aureus* sebesar 95% dan *P. Aeruginosa* sebesar 90%. Persentase peluruhan yang dilakukan oleh ekstrak kasar isolat *Bacillus* sp. tidak terlalu tinggi dibandingkan dengan hasil penelitian oleh Nagraj dan Gokhale dan Stiefel *et al*. Ekstrak kasar isolat *Bacillus* sp. pada *E. Coli* meluruhkan biofilm sebesar 23,56% sedangkan Nagraj dan Gokhale menggunakan enzim ekstraseluler kompleks yang meluruhkan biofilm *E. Coli* sebesar 85,5%. Perlakuan ekstrak kasar *Bacillus* sp. pada *S. Aureus* hanya memberikan peluruhan sebesar 27,78% sedangkan enzim ekstraseluler kompleks Nagraj dan Gokhale meluruhkan sebesar 87,42% dan enzim novel *endoscope cleaner* Stiefel *et al* dapat meluruhkan biofilm *S. Aureus* sebesar 95%. Lebih rendahnya kemampuan peluruhan biofilm oleh ekstrak *Bacillus* sp pada penelitian ini dapat disebabkan keragaman enzim ekstraseluler yang dikandung lebih sedikit dan juga mungkin dikarenakan aktivitas selulase yang tidak optimal. Walaupun ekstrak kasar isolat *Bacillus* sp. tidak memiliki tingkat peluruhan sebesar hasil penelitian lainnya, ekstrak kasar tersebut memiliki potensi untuk dibuat menjadi “bahan anti-biofilm” namun masih memerlukan penelitian dan pengembangan lebih lanjut.

Analisis keberadaan selulase ekstrak kasar *Bacillus* sp. terlihat dari adanya aktivitas selulase pada ekstrak kasar, berukuran di sekitar 35 kDa (inkubasi 48 jam), munculnya zona bening ini pada sampel ekstrak kasar yang baru. Hal sebaliknya terjadi pada ekstrak kasar yang telah lama diekstrak zona bening tidak nampak. Pada hasil zimogram dengan inkubasi 24 jam masih tidak terlihat aktivitas selulase pada kontrol positif, ekstrak kasar baru dan ekstrak kasar lama, hal tersebut dikarenakan kinerja dari enzim/ekstrak kasar yang masih belum tampak. Hal ini dibuktikan dengan hasil uji coba awal ketika zona bening lebih besar setelah inkubasi 48 jam daripada 24 jam pada media Difco™ agar Na-CMC.

SIMPULAN

Ekstrak kasar isolat *Bacillus* sp. meluruhkan biofilm dari bakteri air kran sebesar 37,98%, *E. coli* sebesar 23,56% dan *S. aureus* sebesar 27,78%. Perlakuan ekstrak kasar terbaik tersebut adalah dengan waktu kontak 30 menit. Terdapat aktivitas enzim selulase pada ekstrak kasar isolat *Bacillus* sp., yang terlihat pada ukuran berat molekul sekitar 35 kDa, yang dapat dilihat dengan munculnya zona bening pada sekitar pita yang muncul.

PUSTAKA ACUAN

1. Srinivasan, R., Santhakumari, S., Poonguzali, P., Getha, M., Dyavaiah, M. 2021. Bacterial Biofilm Inhibition: A Focused Review on Recent Therapeutic Strategies for Combating The Biofilm Mediated Infection. *Fronti in Microbiol.* 12 Article 676458.
2. Clayton, G.E., Thorn, R.M.S., Reynolds, D.M. 2021. The Efficacy of Chlorine-Based Disinfectants Against Planctonic And Biofilm Bacteria For Decentralised Point-Of-Use Drinking Water. *Nat. Portof.J.* Article 48.
3. Stiefel, P., Mauerhofer, S., Schneider, J., Maniura-Weber, K., Rosenberg, U., Ren, Q. 2016. Enzymes enhance biofilm removal efficiency of cleaners. *Antimicrob Agents Chemother* 60:3647–3652.
4. Johansen, C., Falholt, P., Gram, L. 1997. Enzymatic Removal and Disinfection of Bacterial Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 63, No. 9, p. 3724–3728.
5. Kurniawan, W.D. 2017. Penghambat Sistem Quorum Sensing *Burkholderia cenocepacia* H111 Oleh Ekstrak Kasar Dari Isolat Bakteri Lingkungan. Surabaya: Universitas Surabaya.
6. Wahyudi, M., Murugappan, S., Van Merkerk, R., Eissens, A.C., Visser, M.R., Hinrichs, W.L.J., Quax, W.J. 2013. Development of A Dry, Stable, And Inhalable Acyl-Homoserine-Lactone-Acylase Powder Formulation For The Treatment of Pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Eur. J. Pharm. Sci.* 48: 637-643.
7. Conceicao, D.P., Dos Passos, C.T., Jaques, R.D.S., Bento, F.M., Simonetti, A.B., Camargo, F.A.O. 2009. A Novel Chromate Reductase From *Bacillus* sp ES29: Characterisation And Partial Purification. *Rev. Cien. Ex. E. Nat.* 11 (2), p. 237-256.
8. Maryanti, R., Suharti, N., Amir, A. 2019. Gambaran Bakteri pada Kran Air dan Tombol Flush Kloset Duduk di Toilet Umum Lingkungan Fakultas Kedokteran Universitas Andalas Tahun 2018. *Jurnal Kesehatan Andalas.* 8. 33. 10.25077/jka.v8i2S.956.
9. Mori, M., Gomi, M., Matsumune, M., Niizeki, K., Sakagami, Y. 2013. Biofilm-Forming Activity of bacteria Isolated From Toilet Bowl Biofilms And The Bactericidal Activity Of Disinfectants Against The Isolates. *Biocontrol Sci.* 18 (3) 129-35.
10. Nagraj, A.K. and Gokhale, D. 2018. Bacterial Biofilm Degradation Using Extracellular Enzymes Produced by *Penicillium janthinellum* EU2D-21 under Submerged Fermentation. *Advances in Microbiology*, 8, 687-698.