UJI KEPEKAAN SEL BIOFILM *Pseudomonas aeruginosa* TERHADAP CIPROFLOXACIN DAN AMIKACIN SECARA IN VITRO

SUSCEPTIBILITY TEST OF *Pseudomonas aeruginosa* BIOFILM AGAINST CIPROFLOXACIN AND AMIKACIN IN VITRO

Didik Wahyudi^{1,2}, Abu Tholib Aman³, Niken Satuti Nur Handayani¹, Endang Sutariningsih Soetarto^{1*},

¹Fakultas Biology, Universitas Gadjah Mada. Jl. Teknik Selatan, Sekip Utara, Sleman 55281, Yogyakarta, Indonesia.

Tel.: +62-274-580839, * email: annisah-endang@ugm.ac.id (Corresponding author).

²Program studi Teknologi Laboratorium Medis, Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional. Jl. Yos Sudarso 334, Surakarta 57155, Indonesia. Tel.: +62-271-5723399, email: didikww@gmail.com

³Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada. Jl. Sekip Utara, Sleman 55281, Yogyakarta, Indonesia.

Abstrak

Pseudomonas aeruginosa merupakan bakteri batang Gram negatif bersifat oportunistik patogenik dan penyebab utama infeksi nosokomial, mampu membentuk biofilm pada jaringan yang diinfeksi, dan ditemukan resisten terhadap beberapa antibiotik. Ciprofloxacin dan amikacin merupakan antibiotik yang sering digunakan untuk mengatasi infeksi bakteri tersebut. Tujuan Penelitian ini adalah mengetahui kepekaan sel biofilm *P. aeruginosa* terhadap antibiotik ciprofloxacin dan amikacin secara invitro dan mengetahui *Minimum Biofilm Reduction Concentration* 50 (MBRC 50). Penelitian ini diawali dengan purifikasi Isolat *P. aeruginosa*, yang didapatkan dari sampel klinik, sampai didapatkan biakan murni. Uji kepekaan sel biofilm dilakukan dengan metode *microtiter plate culture* dengan media *Trypticase Soy Broth* secara invitro, konsentrasi antibiotik ciprofloxacin dan amikacin masing-masing 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 dan 128 µg/ml dengan ulangan 4 kali. Pengukuran viabilitas sel biofilm dilakukan dengan uji MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide), pembacaan hasil menggunakan ELISA reader pada panjang gelombang 570 nm. Hasil penelitian menunjukkan sel biofilm *P. aeruginosa* dapat dihambat dengan ciprofloxacin dan amikacin, pada konsentrasi ciprofloxacin 64 µg/ml dan amikacin 16 µg/ml mampu mereduksi jumlah sel biofilm *P. aeruginosa* sebanyak 50%. Kesimpulan penelitian ini adalah ciprofloxacin dapat mencapai MBRC50 pada konsentrasi 64 µg/ml, dan amikacin 16 µg/ml untuk sel biofilm *P. aeruginosa*.

Kata Kunci: *Pseudomonas aeruginosa*, biofilm, ciprofloxacin, amikacin.

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is a Gram-negative rod- shape bacterium that is opportunistic pathogen and the main cause of nosocomial infections, *P. aeruginosa* is able to form biofilms in infected tissues, and is found to be resistant to several antibiotics. Ciprofloxacin and amikacin are antibiotics that are often used to treat these bacterial infections. The aims of this study was to determine the sensitivity of *P. aeruginosa* biofilm cells to ciprofloxacin and amikacin antibiotics in vitro and to know the *Minimum Biofilm Reduction Concentration* 50 (MBRC 50). This study began with the purification of *P. aeruginosa* isolates, which were obtained from clinical samples, until pure cultures were obtained. Biofilm cell sensitivity test was carried out by microtiter plate culture method with invitro *Trypticase Soy Broth* media, ciprofloxacin and amikacin antibiotic concentrations 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 and 128 µg / ml respectively with 4 replications. Biofilm cell viability

measurements were carried out by MTT test (3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2, 5-diphenyltetrazolium bromide), reading the results using an ELISA reader at a wavelength of 570 nm. The results show *P. aeruginosa* biofilm cells could be inhibit by ciprofloxacin and amikacin, at a concentration of ciprofloxacin 64 µg / ml and amikacin 16 µg / ml capable of reducing the number of *P. aeruginosa* biofilm cells by 50%. The conclusion of this study, ciprofloxacin can achieve MBRC50 at a concentration of 64 µg / ml, and amikacin 16 µg / ml for *P. aeruginosa* biofilm cells.

Keywords : *Pseudomonas aeruginosa*, biofilm, ciprofloxacin, amikacin

Pendahuluan

Pseudomonas aeruginosa merupakan patogen oportunistik, dan bakteri penyebab utama infeksi nosocomial, beberapa ditemukan menyebabkan infeksi pada saluran pernafasan, saluran urin, luka bakar, sistik fibrosis, dan beberapa infeksi yang lain (Adersson, 2009). *P. aeruginosa* telah berhasil diisolasi dari berbagai sampel klinis dan memiliki kecenderungan resisten terhadap beberapa jenis antibiotik (Catterjee *et al.*, 2016). *Pseudomonas aeruginosa* mampu membentuk biofilm, sehingga menyebabkan pengobatan menjadi sulit. Kejadian resistensi terhadap antibiotik, infeksi kronis, dan reinfeksi bakteri pada tubuh sering dikaitkan dengan proses pembentukan biofilm (Deligianni *et al.*, 2010).

Biofilm adalah kumpulan sel mikroorganisme (bakteri) baik sejenis ataupun beberapa jenis yang melekat pada substrat, jaringan ataupun bahan yang diselubungi oleh lapisan pengikat terdiri dari polisakarida atau matrik ekstraseluler hasil ekskresi sel bakteri (O'toole, 2000; Andersson 2009; Wei dan Luyan, 2013). Produksi matriks ekstraseluler diperlukan dalam pembentukan biofilm. Matriks biofilm umumnya terdiri dari 97% air, 2-5% sel mikroba, 3-6% substansi polimer ekstraseluler (*Extracellular Polymeric Substances*/EPS) dan ion-ion. Polimer Ekstraseluler umumnya terdiri dari 40-95% polisakarida, 1-60% protein, 1-10% asam nukleat dan 1-40% lipid. Komposisi EPS ini bervariasi, tergantung pada komposisi dalam konsorsia mikrobial dan kondisi lingkungan (Andersson, 2009).

Pseudomonas aeruginosa menjadi lebih resisten ketika berada atau membentuk biofilm di dalam jaringan, bakteri dalam biofilm akan membentuk matrik ekstraseluler yang melindungi bakteri dari daya invasi sel imun, kondisi lingkungan yang ekstrim, dan senyawa-senyawa pengganggu termasuk antibiotik (Taylor *et al.*, 2014). Sel planktonik akan lebih mudah dimusnahkan daripada sel dalam biofilm, beberapa bakteri memiliki ketahanan yang lebih terhadap antibiotik ketika berada dalam biofilm. (O'Neill *et al.*, 2007).

Pembentukan biofilm *P. aeruginosa* dikendalikan melalui 3 sistem yang kompleks, yaitu sistem *quorum sensing*, c-di GMP, dan sistem GacS/GacA dan RetS/LadS (Wei dan Luyan, 2013 dan Rasamiravaka *et al.*, 2015). *P. aeruginosa* memiliki karakter fisiologi, biokimiawi, dan genetis yang bervariasi. Tingkat keparahan infeksi, lokasi jaringan yang terinfeksi, lama infeksi, faktor fisik dan kimiawi bisa mempengaruhi kemampuan pembentukan biofilm *P. aeruginosa*. (Wahyudi, *et al.*, 2019).

Ciprofloxacin dan amikacin merupakan antibiotik pilihan yang dipakai untuk mengatasi infeksi *P. aeruginosa*, Ciprofloxacin termasuk dalam golongan antibiotik fluoroquinolone generasi kedua, memiliki spektrum aktivitas yang lebar mampu menembus jaringan, sehingga proses penyembuhan infeksi bisa lebih cepat. Amikacin merupakan golongan antibiotik [aminoglikosida](#), yang masih sangat efektif untuk mengatasi infeksi beberapa jenis bakteri.

Metode Penelitian

1. Alat dan bahan.

Medium Luria-Bertani (LB), trichloroacetic acid (TCA), NaOH 0,5 M, buffer fosfat pH 8. Media Trypticase soy broth-0.6%, 5% glycerol, Trypticase soy agar (TSA), glukosa 5%, *MacConkey* (MC). Media Uji Biokimia: *Kliger Iron Agar* (KIA), *Sulfide Indol Motility* (SIM), Urea, Citrat, *Methyl Red* (MR), *Voges Proskauer* (VP), *Phenyl Alanine Deaminase* (PAD). Media Gula-Gula (Glukosa, Laktosa, Manitol, Maltosa, Sukrosa), NaCl 0,9 % steril, *Erich*, *Methyl Red* (MR), erri Klorida (FeCl₃) 10%, Kalium Hidroksida (KOH) 40 %, *Barried*, crystal violet.

2. Persiapan kultur *Pseudomonas aeruginosa*.

Isolat bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Pseudomonas aeruginosa* yang isolasi dari sampel klinis dari Rumah Sakit di Surakarta Jawa tengah, Indonesia. Dilakukan purifikasi sampai didapatkan biakan murni. Pemiakan *P. aeruginosa* dilakukan pada media TSB, dan dibuat suspensi bakteri dengan konsentrasi 10⁸ CFU / ml. Pembuatan suspensi bakteri dilakukan dengan cara menambahkan karutan NaCl steril sampai kekeruhannya sebanding dengan larutan

standar McFarland 0,5. Suspensi *P. aeruginosa* diambil 20 ul menggunakan micropipet dan dimasukkan ke dalam microtiter plate yang sebelumnya sudah diisi 18 ul TSB (*Tritycase Soy Broth*). Kemudian microtiter plate diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37^o C. Isolat *P. aeruginosa* yang dipergunakan pada penelitian ini adalah isolat yang memiliki kemampuan biofilm kuat (Wahyudi *et al*, 2019 dan Hassan *et al*, 2011).

3. Uji kepekaan sel biofilm *P. aeruginosa* terhadap antibiotik ciprofloxacin dan amikacin.

Bakteri hasil inkubasi di *microtiter plate* diambil dan dicuci dengan PBS steril sebanyak 3 kali. Pada bagian lain dilakukan pengenceran antibiotik ciprofloxacin di plate lain. Konsentrasi antibiotik yang digunakan adalah 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, dan 128 ug/ml. Pada masing-masing konsentrasi ciprofloxacin diambil 200µl menggunakan micropipet lalu dimasukkan ke plate berisi biofilm hasil inkubasi. Microtiter plate diinkubasi kembali selama 24 jam pada suhu 37C.

Pengukuran viabilitas sel biofilm dengan MTT, dengan cara microtiter plate hasil inkubasi diambil kemudian medium cair yang mengandung antibiotik tersebut dibuang dan dicuci tiga kali dengan PBS 200µl dan dibuang, kemudian tambahkan MTT sebanyak 100µl, dan dibiarkan dalam suhu ruang dan ruang gelap selama 30 menit. Setelah itu dicuci dengan akuades sebanyak 5 sampai 7 kali (menggunakan pipet), resuspensi cat dengan 200µl acid isopropanol 5 %, selanjutnya amati absorbansinya dengan ELISA reader pada panjang gelombang 570nm. Dengan cara dan metode yang sama juga dilakukan untuk antibiotik amikacin.

MBRC50 (*Minimum Biofilm Reduction Concentration 50*) adalah konsentrasi antibiotik dimana pembacaan kolorimetrik terdeteksi penurunan 50% absorbansi dibandingkan dengan kontrol positifnya. Kontrol positif adalah suspensi bakteri *P. aeruginosa* dalam medium TSB, sedangkan kontrol negatif hanya berisi media TSB saja. Kontrol positif dan negatif mendapat perlakuan yang sama.

$$\text{MBRC50} = [50\% \times (\text{rerata Kontrol positif} - \text{rerata kontrol negatif})] + \text{Rerata kontrol negatif}$$

Hasil dan Pembahasan

Hasil uji kepekaan sel biofilm *P. aeruginosa* terhadap antibiotik ciprofloxacin terdapat pada tabel 1, dan gambar 1. Berdasarkan tabel 1 didapatkan rerata kontrol positif adalah 0,581, dan rerata kontrol negatif adalah 0,054. Sehingga MBR50 dihitung :

$$\begin{aligned} &= (50\% \times (\text{rerata control positif} - \text{rerata control negatif}) + \text{control negatif} \\ &= (50 \times 0,581) + 0,054 \\ &= 0,318. \end{aligned}$$

Berdasarkan hasil tersebut, maka nilai absorbansi sampel < 0,318 dikatakan sebagai MBRC50.

Hasil uji kepekaan sel biofilm *P. aeruginosa* terhadap antibiotik amikacin terdapat pada tabel 2, dan gambar 2, dari tabel 2 didapatkan rerata kontrol positif adalah 0,556, dan rerata kontrol negatif adalah 0,049. Sehingga MBR50 dihitung :

$$\begin{aligned} &= (50\% \times (\text{rerata control positif} - \text{rerata control negative}) + \text{control negative} \\ &= (50 \times 0,556) + 0,049 \end{aligned}$$

$$= 0,303.$$

Berdasarkan hasil tersebut, maka nilai absorbansi sampel < 0,303 dikatakan sebagai MBRC50.

Penelitian uji kepekaan sel biofilm isolat klinik *P. aeruginosa* yang mampu membentuk biofilm dengan kategori kuat, memberikan hasil bahwa konsentrasi ciprofloxacin yang mampu mereduksi jumlah sel biofilm *P. aeruginosa* hingga 50% merupakan konsentrasi yang lebih rendah dari cut-off MBRC 50, pada grafik tersebut ditemukan pada konsentrasi 64µg/ml. Jika dibandingkan dengan penelitian Agarwal *et al* (2005) yang melakukan penelitian kepekaan bakteri *P. aeruginosa* pada penderita kistik fibrosis terhadap ciprofloxacin dan gentamicin pada sel planktonik. Sel biofilm memiliki resistensi yang lebih besar dibandingkan dengan sel planktonik.

Ada peningkatan resistensi pada *P. aeruginosa* terhadap ciprofloxacin, beberapa faktor penyebabnya antara lain adanya impermeabilitas, resistensi aditif, modifying enzyme, alginate, DNA ekstraseluler (Poole, 2005; Aspe *et al*, 2012; Kumar *et al*, 2013). Resistensi

bakteri *P. aeruginosa* merupakan gabungan faktor permeabilitas membrane luar yang rendah sehingga menurunkan influx antibiotik, dan pompa efflux yang secara efektif mengeluarkan antibiotik dari dalam sel, ada beberapa sistem efflux pada *P. aeruginosa*, yaitu MexAb-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY, MexJK, MexGHI-opmD (Aendekerk *et al.*, 2002). Sistem pompa MexXY merupakan protein membrane periplasma yang menyatu dengan MexY yang merupakan druf-proton antiporter membrane dalam, MexXY dapat bekerja sama dengan OprA atau OprM sebagai komponen membran luarnya (Morita *et al.*, 2012).

Ciprofloxacin memiliki sistem berkerja yang berbeda dengan penisilin, sefalosporin, aminoglikosida, makrolida, dan tetrasiklin, sehingga bakteri yang resisten terhadap golongan antibiotik tersebut mungkin masih sensitif terhadap ciprofloxacin. Resistensi ciprofloxacin bisa terjadi terutama oleh mutasi pada girase DNA, penurunan permeabilitas membran luar, atau efflux obat. Resistensi *P. aeruginosa* in vitro terhadap ciprofloxacin berkembang perlahan dengan mutasi melalui beberapa tahap. Resistensi terhadap ciprofloxacin biasanya timbul sebagai akibat dari perubahan pada enzim target (DNA gyrase dan topoisomerase IV) dan perubahan masuknya efflux (Cotton *et al.*, 2009).

Sel biofilm *P. aeruginosa* lebih resisten terhadap antibiotik ciprofloxacin dikarenakan matrik ekstraseluler pada biofilm yang mengganggu penetrasi ciprofloxacin ke dalam sel bakteri, dalam matrik ekstraseluler biofilm terdapat beberapa polisakarida, antara lain pelikel, polisakarida A, aliginat, DNA ekstraseluler, dan polimer penyusun biofilm, yang mampu menjadi pelindung sel biofilm, sehingga membentuk micro-niche sendiri, yang menyebabkan perubahan karakter fisiologis dan biokimia yang berbeda dengan ketika *P. aeruginosa* sebagai sel planktonik (Aspe *et al.*, 2012).

Uji kepekaan sel biofilm *P. aeruginosa* terhadap amikacin memberikan hasil bahwa konsentrasi Amikacin yang mampu mereduksi jumlah sel biofilm *P. aeruginosa* hingga 50% merupakan konsentrasi yang lebih rendah dari cut-off MBRC 50, pada grafik tersebut ditemukan pada konsentrasi 16 µg/ml, jika dibandingkan dengan kemampuan ciprofloxacin maka amikacin memiliki kemampuan yang lebih kuat untuk menghambat sel biofilm *P. aeruginosa*.

Amikacin merupakan golongan antibiotik aminoglikosid yang memiliki spectrum terluas dibandingkan dengan aminoglikosida yang lain, mampu mengatasi kelompok bakteri batang gram negatif yang telah resisten terhadap gentamisin (Levinson, 2012).

Amikacin bekerja dengan merubah bentuk bagian 30S pada ribosom prokaryotic 70S sehingga sintesis protein bakteri terganggu, sehingga proses translasi (pembacaan kodon mRNA) menjadi keliru (Tortora *et al.*, 2013). Secara keseluruhan berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa ciprofloxacin maupun amikacin masih efektif untuk mengatasi sel biofilm *P. aeruginosa*, untuk beberapa waktu ke depan perlu dievaluasi kembali, karena sistem pemberian dan pengobatan perlu dilakukan dengan cermat agar resistensi bakteri terhadap antibiotik tersebut bisa dikendalikan.

Kesimpulan

Sel biofilm *P. aeruginosa* isolat klinis dapat dihambat dengan ciprofloxacin dan amikacin, dengan MBRC50 ciprofloxacin pada konsentrasi 64 µg/ml, dan MBRC50 amikacin pada konsentrasi 16 µg/ml.

Ucapan Terima kasih

Penelitian mengucapkan terima kasih kepada Kementerian Riset, Teknologi, dan Perguruan Tinggi Republik Indonesia, yang telah mendanai penelitian ini melalui Dana Hibah Penelitian Disertasi Doktor tahun 2018, dengan SK No. 0045 / E3 / LL / 2018 and Perjanjian Kontrak No. 092 / K6 / KM / SP2H / PENELITIAN / 2018

Daftar Pustaka

- Aendekerk, S., Ghysels, B., Cornelis, P., Baysse, C. Characterization of a new efflux pump, MexGHI-OpmD, from *Pseudomonas aeruginosa* that confers resistance to vanadium, *Microbiology* 2002;148: 2371-81
- Andersson, S, 2009, Characterization of bacterial biofilm from wastewater treatment, stockholm, royal Institute of Technology, School of Biotechnology.
- Agarwal, G., Kapil, A., Kabra, SK., Das BK., Dwivedi, SN, 2005. In vitro efficacy of ciprofloxacin and gentamicin against biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* and its free-living forms. *THE NATIONAL MEDICAL JOURNAL OF INDIA* Vol. 18, No.4 2005.
- Aspe, M., Jensen, L., Melegrito, J., Sun, M. 2012. The Role of Alginate and Extracellular DNA in Biofilm-Mediated *Pseudomonas aeruginosa* Gentamicin Resistance. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology (JEMI)* Vol.16: 42-48.
- Chatterjee M, C.P. Anju, Lalitha Biswas, V. Anil Kumar, C. Gopi Mohan, Raja Biswas, 2016. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*

- and alternative therapeutic options, *International Journal of Medical Microbiology* **306**, 48–58
- Chugani S and E. P. Greenberg, 2010, LuxR homolog independent gene regulation by acyl-homoserine lactones in *Pseudomonas aeruginosa*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**, 10673–10678.
- Cotton, LA., Graham, RJ., Lee, RJ. 2009. The Role of Algininate in *P. aeruginosa* PAO1 Biofilm Structural Resistance to Gentamicin and Ciprofloxacin. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology (JEMI)* Vol. 13: 58–62
- Deligianni E, Sally P., Daniel B, Nigel G T, Richard W H, John E M., Stuart J E, James SG D, 2010, *Pseudomonas aeruginosa* Cystic Fibrosis isolates of similar RAPD genotype exhibit diversity in biofilm forming ability in vitro, *BMC Microbiology* **10**:38.
- Dieppo G., V. Ducret, O. Caille, K. Perron., 2012., The Transcriptional Regulator CzcR Modulates Antibiotic Resistance and Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*, Microbiology Unit, Department of Botany and Plant Biology, Sciences III, University of Geneva, Switzerland, *journal.pone*. **038**; 148.
- Hassan A, Javaid U, Fatima K, Maria O, Ali K, Muhammad I., 2011, Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates., Department of Microbiology National University of Sciences and Technology, Islamabad, Army Medical College, Rawalpindi, Pakistan., Elsevier
- Hostacka A, I Cizar, M. Stefkovcova, 2010, Temperature and pH Affect The Production of Bacteria Biofilm, *Folia Microbial* **55** (1) 75 – 78.
- Kim S.K. and Joon-Hee Lee, 2016, Biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* *Journal of Microbiology*. **54**, No. 2, pp. 71–85.
- Kumar, P., Easwer, H., & Nandkumar, M. 2013, Multiple drug resistant bacterial biofilms on implanted catheter – a reservoir of infection, *Journal Association Physicians India*, 61(10).
- Levinson, W., 2012. Review of Medical Microbiology and Immunology 12th ed., The McGraw-Hill Companies Inc.
- Morita, Y., Tomida, J., Kawamura, Y. 2012. Primary mechanisms mediating aminoglycoside resistance in the multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate PA7. *Microbiology* (2012), 158, 1071–1083.
- O’toole, G., Kaplan, HB., Kolter, R. 2000. Biofilm Formation As Microbial Development. *Annu. Rev. Microbiol*, **54** : 49–79.
- Periasamy S, Hari krishnan A.S.Nair, Kai W.K.Lee, Jolene Ong, Jie Q.J.Goh Staffan Kjelleberg and Scott A.Rice, 2015, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 exopolysaccharides are important for mixed species biofilm community development and stress tolerance, Original research. published: 20 August 2015.
- Poole, K., Krebes, K., McNally, C., Neshat, S. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* evidence for involvement of an efflux operon. *J Bacteriol* 1993; 175: 7363–72
- Rasamiravaka T, Quentin Labtani, Pierre Duez, and Mondher El Jaziri¹, 2015, The Formation of Biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms, Hindawi Publishing Corporation *BioMed Research International* Volume-17.
- Sakuragi Y and R. Kolter, 2007 “Quorum-sensing regulation of the biofilm matrix genes (*pel*) of *Pseudomonas aeruginosa*,” *Journal of Bacteriology*, vol. **189**, no. 14, pp. 5383–5386, 2007.
- Taylor P, Amy T.Y. Yeung, Robert E.W. Hancock, 2014, Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: Towards the development of novel anti-biofilm therapies, *Journal Bacteriology*, **191**; 131–140
- Tortora, G., Funke, B & Case, C., 2013. Microbiology an introduction 11th ed., Pearson Education, Inc.
- Wahyudi D, Abu T.A, Niken S.N.H, Endang S.S. 2019. Differences among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in their capability of forming biofilms and their susceptibility to antibiotics. *Biodiversitas Journal*, Vol 20 (5). May 2019.
- Wei Q dan Luyan ZM, 2013, Biofilm Matrix and Its Regulation in *Pseudomonas aeruginosa*, *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 20983–21005.

LAMPIRAN

Tabel 1. Optical density sel biofilm *P. aeruginosa* setelah terpapar ciprofloxacin

Konsentrasi ciprofloxacin (µg/ml)	kontrol Positif	Kontrol Negatif	Replikasi				Rerata sel Biofilm	SD
			1	2	3	4		
1	0.575	0.064	0.637	0.665	0.672	0.724	0.675	0.036
2	0.518	0.048	0.678	0.623	0.683	0.647	0.658	0.028
4	0.572	0.053	0.581	0.482	0.548	0.523	0.534	0.042
8	0.567	0.048	0.443	0.486	0.502	0.535	0.492	0.038
16	0.606	0.056	0.397	0.435	0.396	0.412	0.410	0.018
32	0.631	0.061	0.384	0.329	0.332	0.385	0.358	0.031
64	0.583	0.048	0.324	0.223	0.255	0.248	0.263	0.043
128	0.597	0.053	0.184	0.176	0.228	0.197	0.196	0.023
Rerata	0.581	0.054

Gambar 1. Grafik pengaruh ciprofloxacin terhadap isolat *P. aeruginosa* dengan uji MTT.

Tabel 2. Optical density sel biofilm *P. aeruginosa* setelah terpapar amikacin

Konsentrasi Amikacin (µg/ml)	kontrol Positif	Kontrol Negatif	Replikasi				Rerata Sel Biofilm	Sd
			1	2	3	4		
1	0.582	0.054	0.529	0.559	0.664	0.523	0.569	0.065
2	0.498	0.053	0.648	0.563	0.643	0.597	0.613	0.040
4	0.569	0.052	0.451	0.472	0.448	0.503	0.469	0.025
8	0.483	0.043	0.315	0.348	0.375	0.383	0.355	0.031
16	0.528	0.045	0.288	0.307	0.275	0.268	0.285	0.017
32	0.628	0.051	0.283	0.239	0.223	0.295	0.260	0.034
64	0.578	0.052	0.232	0.154	0.148	0.153	0.172	0.040
128	0.582	0.043	0.095	0.112	0.082	0.123	0.103	0.018

Rerata 0.556 0.049

Gambar 2. Grafik pengaruh Amikacin terhadap isolat *P. aeruginosa* dengan uji MTT