

Aktivitas Nanoemulsi Minyak Lengkuas (*Alpinia galanga* [L] Willd) Dalam Menghambat Bakteri *Escherichia coli* Penghasil *Extended Spectrum Beta Lactamases* (ESBLs)

Yulianto Ade Prasetya*; Khoirun Nisya; Eviomitta Rizki Amanda

Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Rumah Sakit Anwar Medika,
Jalan Raya By Pass Krian Km.33 Sidoarjo, Jawa Timur, Indonesia

*E-mail: yuliantoadeprasetya@gmail.com

Abstrak - *Escherichia coli* merupakan bakteri yang mampu mendegradasi antibiotik golongan beta laktam generasi ketiga, keempat serta monobaktam. Bakteri *E.coli* penghasil ESBLs membuat pilihan antibiotik menjadi semakin terbatas untuk pengobatan sehingga bertanggungjawab terhadap peningkatan angka kesakitan, kematian, dan biaya kesehatan. Minyak lengkuas merupakan tanaman asli Indonesia yang terbukti mampu melawan bakteri patogen namun penelitian untuk bakteri penghasil ESBLs belum pernah dilaporkan. Minyak atsiri dalam bentuk nano mampu meningkatkan luas permukaan sehingga lebih efektif dan efisien untuk pengobatan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas nanoemulsi minyak lengkuas dalam menghambat bakteri *E.coli* penghasil ESBLs. Nanoemulsi dibuat dengan bantuan sonikator amplitudo 20% dan dikarakterisasi menggunakan Particle Size Analyzer (PSA). Nanoemulsi yang dibuat kemudian diujikan aktivitasnya pada *E.coli* penghasil ESBLs dengan spektrofotometer panjang gelombang 600nm dengan seri pengenceran 0.35, 0.7, 1.4, 2.8, 5.6, 11.2, dan 22.5 µg/ml. Hasil penelitian menunjukkan bahwa Nanoemulsi dengan ukuran 490,3 mampu menghambat bakteri uji pada konsentrasi 0.7 µg/ml. dengan waktu inkubasi 24 jam dan 11.2 µg/ml.

Kata Kunci: Nanoemulsi, Minyak Lengkuas, *Escherichia coli*, ESBLs

1. PENDAHULUAN

Escherichia coli merupakan patogen oportunistik yang selain menduduki posisi tertinggi penyebab insidensi infeksi saluran kemih, juga menduduki tertinggi bakteri penghasil ESBLs. *E.coli* penghasil ESBLs bertanggung jawab terhadap wabah infeksi nosokomial, peningkatan morbiditas dan mortalitas, serta peningkatan biaya kesehatan (Prasetya, 2017). *Extended Spectrum Beta Lactamases* (ESBLs) adalah kumpulan enzim yang dihasilkan oleh bakteri Gram negatif pembentuk biofilm dan bertanggung jawab terhadap resistensi antibiotik golongan β-laktam. Berdasarkan studi cross-sectional yang dilakukan menggunakan rekam medik pasien rawat inap di instalasi awat inap penyakit dalam RSUD Dr. Soetomo, Surabaya oleh Nadhya et al. (2015), bakteri yang terbanyak didapatkan pada isolat klinis ialah *E.coli* (49.3%). Prevalensi *E.coli* penghasil ESBL adalah 75% dan 38.5% pada *Klebsiella pneumoniae*. Penemuan senyawa berbasis bahan alam dibutuhkan untuk mengobati penyakit infeksi dan resistensi bakteri (Quave et al., 2008). Bahan alam dari minyak atsiri akhir-akhir ini menarik perhatian, hal ini disebabkan karena sifatnya sebagai antibakteri dan antijamur. Minyak atsiri dari lengkuas terbukti dapat digunakan sebagai antibakteri dan antijamur (Handajani, 2008), namun kemampuannya sebagai antibakteri *E.coli* penghasil ESBLs belum pernah dilaporkan sebelumnya. Handajani & Purwoko (2008) menyatakan bahwa ekstrak rimpang lengkuas (*Alpinia galanga* [L] Willd) dapat menghambat pertumbuhan jamur *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, dan *Aspergillus niger*. Lengkuas (*Alpinia galanga* [L] Willd) dapat sebagai antimikroba pada penelitian Amelia et al., (2010) menghambat pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Bacillus subtilis*.

Lengkuas (*Alpinia galanga* [L] Willd) merupakan anggota familia Zingiberaceae, tanaman khas Indonesia yang mudah didapatkan dan mudah tumbuh di Indonesia. Yuharmen et al., (2002) menunjukkan adanya aktifitas penghambatan pertumbuhan mikroba oleh minyak atsiri dan fraksi metanol rimpang lengkuas pada beberapa spesies bakteri dan jamur (Handajani & Purwoko, 2008). Lengkuas (*A.galanga* [L] Willd) mengandung minyak atsiri antara lain alkohol (Bisset and Wichtl, 2001), flavonoid dan senyawa fenol (Yuharmen et al.,

2002), yang ketiganya bersifat sebagai bakterisidal. Minyak atsiri dalam bentuk Nanoemulsi telah berhasil dilakukan yakni pada penelitian Lou et al., (2017) Citrus medica L. var. sarcodactylis menghambat bakteri Staphylococcus aureus. Cymbopogon flexuosus mampu menghambat pertumbuhan Mycobacteria (Rossi et al., 2017). Eucalyptus globulus menghambat biofilm Pseudomonas aeruginosa dan Candida spp (Quatrin et al., 2017). Dalam penelitian ini, minyak lengkuas (*A.galanga* [L] Willd) dalam bentuk nanoemulsi yang distabilkan, kemudian diaplikasikan sebagai antibiofilm. Biofilm yang dihasilkan dari *E.coli* penghasil ESBLs. Sediaan dalam bentuk nanoemulsi lebih stabil dari pada makroemulsi. Nanoemulsi meningkatkan adsorpsi, penetrasi obat, dan membantu mensolubilisasi zat aktif yang bersifat hidrofob. Tujuan pada penelitian ini yakni untuk mengetahui aktivitas nanoemulsi minyak lengkuas dalam menghambat bakteri *E.coli* penghasil ESBLs.

2. METODE PENELITIAN

2.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi STIKES Rumah Sakit Anwar Medika Sidoarjo untuk kultur bakteri dan pembuatan kurva pertumbuhan bakteri. Pembuatan kurva pertumbuhan biofilm, uji antibiofilm menggunakan Microplate reader, pembuatan nanoemulsi minyak lengkuas (*Alpinia galanga* [L] Willd) menggunakan sonicator dilakukan di Laboratorium Sains dan Ilmu Hayati (LSIH) Universitas Brawijaya. Karakteristik nanoemulsi minyak lengkuas (*A.galanga* [L] Willd) menggunakan Particle Size Analyzer (PSA) dilakukan di Laboratorium Jurusan Kimia Universitas Brawijaya. Waktu penelitian dilaksanakan selama empat bulan yakni April sampai dengan Juli 2018.

2.2. Isolat bakteri yang digunakan

Isolat bakteri yang digunakan pada penelitian ini yaitu *Escherichia coli* penghasil *Extended Spectrum Beta Lactamases* (ESBLs) koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi STIKES Rumah Sakit Anwar Medika sebanyak tiga isolat diantaranya 1.1, 1.2, 3.4, dan 4.4. Isolat *E.coli* 1.1 didapatkan dari cawan Petri ke-1 koloni pertama yang diswab. Isolat *E.coli* 1.2 didapatkan dari cawan Petri ke-2 koloni kedua yang diswab. Isolat *E.coli* 3.4 didapatkan dari cawan Petri ke-3 koloni keempat yang diswab. Isolat *E.coli* 4.4 didapatkan dari cawan Petri ke-4 koloni keempat yang diswab. Kemudian, isolat di uji biokimia untuk memastikan bahwa isolat tersebut adalah bakteri *E.coli*.

2.3. Minyak Atsiri Lengkuas (*Alpinia galanga* [L] Willd) yang digunakan

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

2.4. Pembuatan Nanoemulsi Minyak Lengkuas (*Alpinia galanga* [L] Willd)

Pembuatan nanoemulsi berdasarkan metode (Quatrin et al. 2017). Fase organik terdiri dari minyak lengkuas dan span 80 yang ditambahkan ke dalam fase cair yakni tween 80 dan aquades. Minyak lengkuas dan span 80 masing-masing sebanyak 2 mL dicampur bersamaan. Tween 80 dan aquades masing-masing 2 mL dan 4 mL dicampur bersamaan. Fase organik dan fase cair dicampur dan dilakukan sonikator. Emulsifikasi ultrasonik melibatkan penggunaan sonikator dengan amplitudo 40% selama 20 menit tiap fase sampel dan pencampuran kedua fase (Lu, 2018). Nanoemulsi yang terbentuk di simpan pada suhu kamar. Karakterisasi morfologi nanoemulsi dilakukan dengan *Particle Size Analyzer* (PSA).

2.5. Pembuatan Kurva Pertumbuhan Bakteri

Pembuatan kurva pertumbuhan bakteri bertujuan untuk mendapatkan waktu inkubasi terbaik yakni pada pertengahan fase log yang akan digunakan untuk menumbuhkan biofilm bakteri. Isolat bakteri *E.coli* ditumbuhkan pada agar miring *Nutrient agar* (NA-sefotaksim 0,002 mg/ml) dalam tabung reaksi selama 24 jam suhu 37°C di inkubator (Deby *et al.*, 2012). Satu ose koloni yang tumbuh diinokulasikan dalam 50 ml medium *Nutrient Broth* (NB-sefotaksim 0,002 mg/ml) di Erlenmeyer 100 ml (Prasetya, 2017). 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_1) dan sumbu y sebagai absorbansi (a).

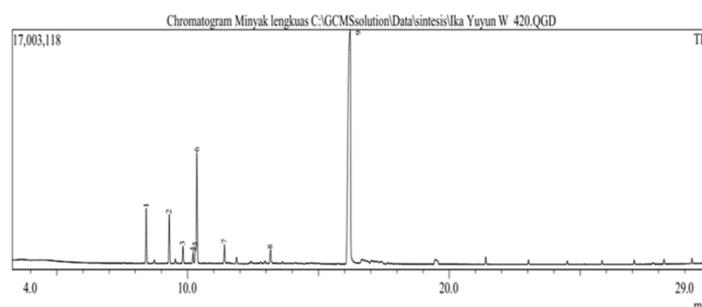
2.6. Uji Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

Uji *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) ditentukan dengan metode makrodilusi menggunakan cara pengenceran. Setiap seri pengenceran dalam satu ulangan menggunakan 7 tabung reaksi. Tabung I sampai tabung VII dimasukkan 5 ml media *Nutrien Broth* (NB) steril. Tabung I ditambahkan nanoemulsi minyak atsiri lengkuas (*Alpinia galanga* [L.] Willd.) 5 ml dan 100 μ l isolat bakteri, kemudian dihomogenkan. Selanjutnya campuran dari tabung I (5 ml media *Nutrien Broth* (NB), 5 ml nanoemulsi minyak atsiri lengkuas (*Alpinia galanga* [L.] Willd.) dan 100 μ l isolat bakteri) diambil 5 ml, kemudian dimasukkan ke dalam tabung II yang sudah berisi media *Nutrien Broth* (NB) 5 ml dan dihomogenkan. Pengenceran secara seri dari tabung II dilanjutkan sampai tabung VII, dengan cara memindahkan 5 ml campuran minyak atsiri lengkuas (*A.galanga* [L.] Willd.), media NB dan isolat bakteri seperti di atas, sampai tabung VII diambil 5 ml kemudian dibuang sisanya sehingga volume menjadi sama. Volume akhir dari tabung I sampai tabung VII sebesar 5 ml. Konsentrasi akhir dari tiap tabung adalah I 22,5 mg/ml, II 11,2 mg/ml, III 5,6 mg/ml, IV 2,8 mg/ml, V 1,4 mg/ml, VI 0,7 mg/ml dan tabung VII 0,35 mg/ml. Seluruh tabung selanjutnya diinkubasikan pada suhu 37°C, selama 48 jam. Setiap 0, 24 dan 48 jam inkubasi dilakukan pengukuran spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm (λ 600 nm). Kontrol negative (K-) yang berisi media *Nutrien Broth* (NB) sebanyak 5 ml tanpa suspensi bakteri dan tabung kontrol positif (K+) yang berisi media NB dan 100 μ l koloni bakteri *Eschericia coli* penghasil *ESBLs* yang telah diinkubasi 17 jam. Jika selisih nilai OD dengan konsentrasi terendah bernilai negatif, maka ditetapkan sebagai *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC).

2.7. Analisa Data

Rancangan penelitian yang digunakan yakni Rancangan Acak Lengkap (RAL) Faktorial dengan dua faktor dan dua kali ulangan. Faktor yang pertama adalah ekstrak nanoemulsi minyak atsiri lengkuas (*Alpinia galanga* [L.] Willd.). Faktor yang kedua yakni seri pengenceran konsentrasi ekstrak nanoemulsi minyak atsiri lengkuas (*Alpinia galanga* [L.] Willd.) sebesar 22,5; 11,2; 5,6; 2,8; 1,4; 0,7 dan 0,35 mg/ml. Hasil yang diperoleh pada MIC kemudian dilakukan *General Line Manager* (GLM) pada data bioaktivitas ekstrak nanomulsi lengkuas (*Alpinia galanga* [L.] Willd.) terhadap *E.coli* penghasil *Extended Spectrum Beta Lactamases* (ESBLs) dengan taraf signifikan sebesar 5%. Perbedaan perlakuan diuji dengan Anova: Two-Factor Without Replication pada taraf kepercayaan 0,05% untuk mengetahui perbedaan bioaktivitas nanoemulsi minyak atsiri lengkuas (*Alpinia galanga* [L.] Willd.) terhadap *E.coli* penghasil *Extended Spectrum Beta Lactamases* (ESBLs).

3. HASIL DAN PEMBAHASAN



Gambar 1. Hasil Kromatogram GCMS Minyak Lengkuas

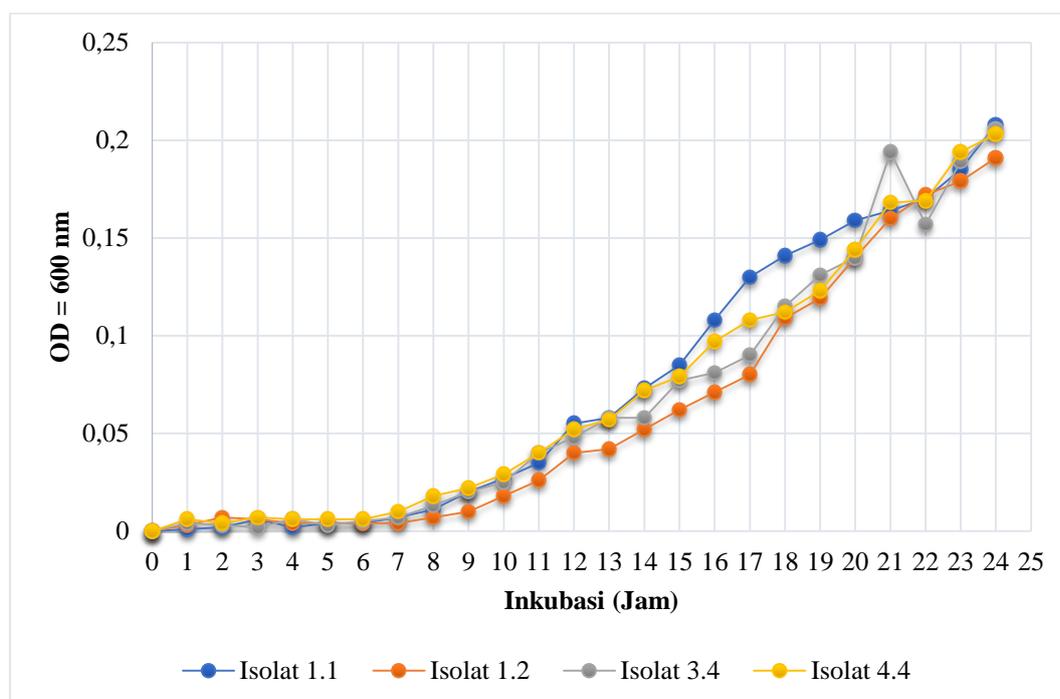
Tabel 1. Tabel Komponen Minyak Lengkuas hasil kromatogram menggunakan GCMS

No.	Senyawa Kimia	Time Retensi	Area (%)
1.	α - Pinene	8,417	5,14
2.	β -Pinene	9,300	4,84
3.	α -phellandrene	9,825	1,58
4.	Benzene	10,208	1,01
5.	1-Limonene	10,300	0,60
6.	18-Cineole	10,358	9,69
7.	Fenchone	11,408	1,72
8.	3-Cyclohexene	13,167	1,47
9.	Methyl Cinnamate	16,217	73,94

Identifikasi komponen-komponen yang terkandung dalam minyak Lengkuas (*Alpinia galanga* [L] Willd) dapat dilihat pada Gambar 1 Puncak dan waktu retensi dari data kromatogram, dapat dilihat pada Tabel 1. Hasil kromatogram menunjukkan ada 9 puncak. Berdasarkan hasil analisa GC-MS minyak Lengkuas (*Alpinia galanga* [L] Willd), pada puncak kromatogram ke-1 menunjukkan senyawa alpha-pinene dengan % area sebesar 5.14%. Puncak ke-2 menunjukkan senyawa beta-pinene dengan % area sebesar 4.84%. Puncak ke-3 menunjukkan senyawa alpha-fellandrene dengan % area sebesar 1.58%. Puncak ke-4 menunjukkan senyawa isopropyltoluene dengan % area sebesar 1.01%. Puncak ke-5 menunjukkan senyawa menthadiene dengan % area sebesar 0.60%. Puncak ke-6 menunjukkan senyawa zineol dengan % area sebesar 9.69%. Puncak ke-7 menunjukkan senyawa trimethylnoecamphor dengan % area sebesar 1.72. Puncak ke-8 menunjukkan senyawa alpha-terpineol dengan % area sebesar 1.47%. Sementara, komponen utama minyak Lengkuas (*A.galanga* [L] Willd) ditunjukkan pada puncak ke-9 yaitu Methyl cinnamate dengan % area sebesar 73.94%. Berdasarkan pustaka Wiley⁷ nilai similar indeks (SI) pada puncak ke-9 mencapai 97. Methyl cinnamate merupakan senyawa turunan dari cinnamate acid. Turunan cinnamate ((5-nitrofur-2-yl)methyl-(2E)-3-phenyl-prop-2-enoate, menunjukkan aktivitas penghambatan yang baik terhadap biofilm *Candida albicans*. Senyawa tersebut mampu menghambat pembentukan biofilm dan dapat mengurangi aktivitas metabolik dari biofilm yang sudah terbentuk sebelumnya, lebih baik daripada obat flukonazol (Vita *et al.*, 2016). Berdasarkan penelitian yang dilakukan Vita *et al* (2016) bahwa cinnamate acid dan turunannya dapat sebagai antibiofilm. Penelitian Novitasari *et al.* (2014) menyatakan bahwa minyak lengkuas (*Alpinia galanga* [L] Willd) dapat menghambat produksi enzim eksoprotease pada sistem quorum sensing *Aeromonas hydrophil*.

Fase pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dilakukan bertujuan untuk mendapatkan waktu inkubasi terbaik yakni pada pertengahan fase log yang akan digunakan untuk

menumbuhkan biofilm bakteri. Bakteri *E.coli* ditumbuhkan dalam media *nutrient broth* (NB), kemudian diinkubasi biakan selama 24 jam dalam *shaker rotatory*. Pertumbuhan bakteri diamati dari nilai *Optical Density* (OD) setiap 1 jam menggunakan metode spektrofotometri dengan panjang gelombang 600 nm. Pertumbuhan bakteri mengalami peningkatan sebanding dengan meningkatnya nilai OD, semakin keruh suspensi bakteri maka semakin banyak jumlah bakteri yang tumbuh. Jumlah bakteri akan terus meningkat dan kemudian turun setelah mencapai fase stasioner (Khoiriyah & Ardiningsih, 2014).



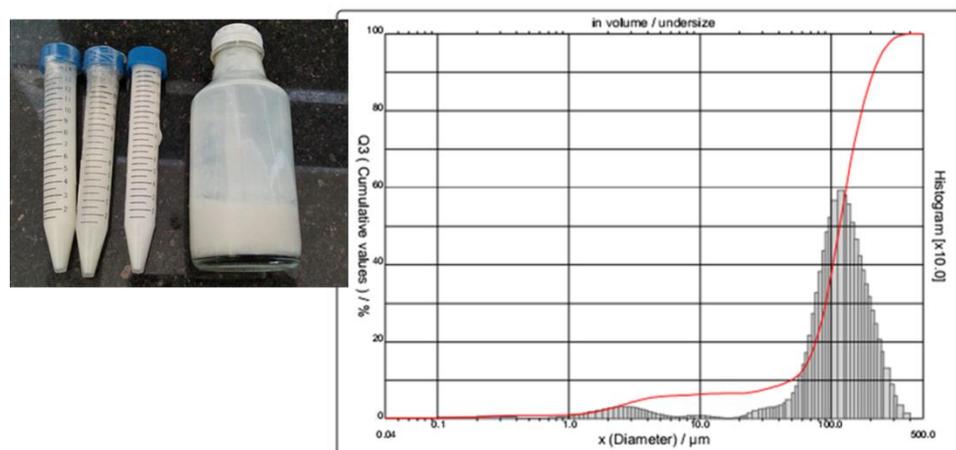
Gambar 2. Kurva pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* penghasil ESBLs selama (t=24 jam)

Kurva pertumbuhan bakteri *E.coli* terdiri dari fase lag, fase log (eksponensial), fase stasioner. Berdasarkan hasil penelitian fase lag *E.coli* terjadi pada jam ke-0 sampai jam ke-8. Pada fase lag bakteri melakukan proses adaptasi terhadap kondisi lingkungannya seperti : pH, suhu, dan nutrisi. Pada fase ini terjadi peningkatan jumlah sel bakteri berlangsung lambat (Khoiriyah & Ardiningsih, 2014). Fase kedua adalah fase log, pertumbuhan bakteri berlangsung sangat cepat, dimulai dari jam ke-9 sampai jam ke-24. Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan bakteri *E.coli* isolat 1.1, 1.2, 3.4, dan 4.4 mengalami peningkatan pertumbuhan dalam 24 jam inkubasi. Hal ini dapat diamati dari kekeruhan media pertumbuhan bakteri dan dibuktikan secara kuantitatif berdasarkan nilai *optical density* (OD) menggunakan spektrofotometer UV-Vis panjang gelombang 600 nm. Kurva pertumbuhan bakteri dibuat untuk mendapatkan waktu inkubasi terbaik yakni pada pertengahan fase log, berdasarkan hasil penelitian pertengahan fase log didapatkan pada 17 jam inkubasi. Kenaikan absorbansi pertumbuhan bakteri berbanding lurus dengan kenaikan jumlah sel bakteri. Pada fase log, sel mulai membelah dan memasuki masa pertumbuhan atau penambahan jumlah sel secara logaritmik dan disebut dengan fase eksponensial. Reproduksi seluler dan metabolisme sel paling aktif pada fase ini serta menunjukkan waktu generasi yang konstan sehingga grafik pertumbuhan berupa garis lurus. Bakteri menjadi lebih sensitif terhadap lingkungan yang buruk (Jawetz *et al.*, 2008). Fase stasioner disebut juga periode keseimbangan. Pada fase ini aktivitas metabolisme memperlambat. Kekurangan nutrisi, akumulasi produk sisa, dan perubahan pH yang bersifat toksik bagi sel dianggap menjadi penyebab berhentinya

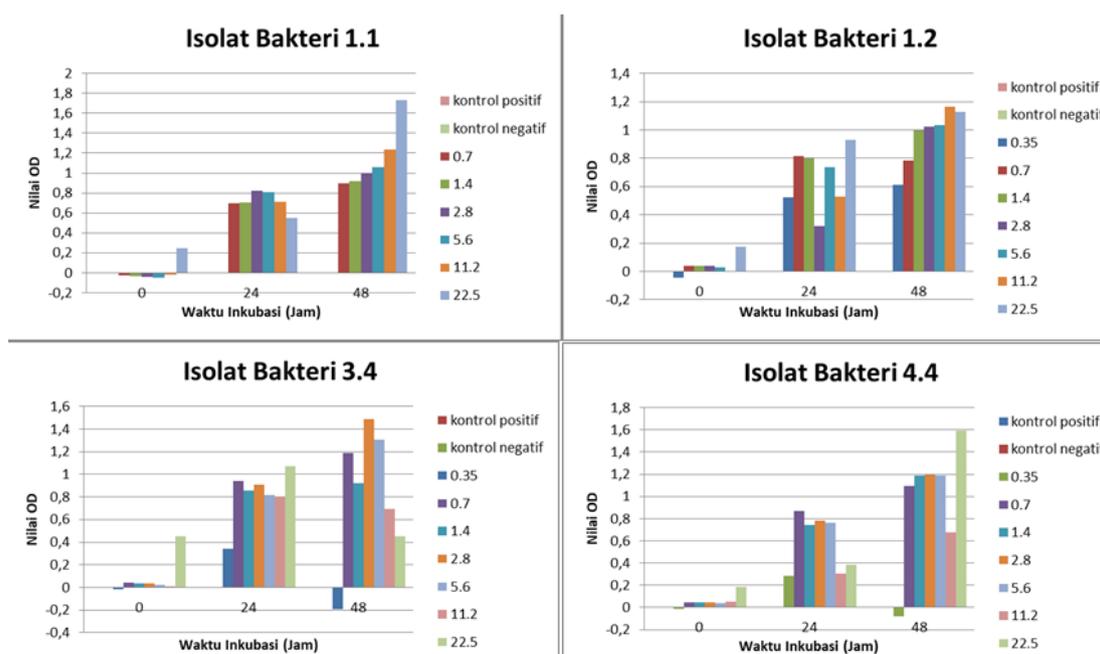
pertumbuhan eksponensial sel (Jawetz *et al.*, 2008). Berdasarkan penelitian yang dilakukan selama inkubasi bakteri 24 jam, bakteri belum mencapai fase stasioner sehingga diperlukan inkubasi lebih dari 24 jam untuk mencapai kurva pertumbuhan bakteri *E.coli* fase stasioner dan fase kematian (*death*). Penelitian sebelumnya Huang (2015) menyatakan bahwa untuk mencapai fase stasioner bakteri memerlukan waktu hingga 48 jam. Fase lag bakteri dimulai dari jam ke-8 hingga jam ke-24. Sementara jam ke-25 hingga jam ke-48 merupakan fase stasioner bakteri (Huang, 2015). Pembuatan kurva pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dalam waktu (t_1) yang ditumbuhkan dilakukan pengenceran bertingkat menggunakan metode *pour plate* hal ini dilakukan bertujuan untuk mengetahui jumlah koloni bakteri CFU/ml. Bakteri ditumbuhkan dalam media *Nutrient broth* disebut sebagai strater, hal ini bertujuan untuk memperbanyak jumlah bakteri. Hasil perhitungan jumlah koloni bakteri (CFU/mL) dapat dilihat pada Tabel 4.2. Peneliti melakukan perhitungan koloni bakteri pada pengenceran 10^{-5} dan 10^{-7} . Pada pengenceran tersebut bakteri dituang dalam *plate* NA disebar dan diinkubasi selama ($t=24$ jam). Koloni yang tumbuh pada *plate* NA dihitung menggunakan koloni *counter*. Perhitungan jumlah koloni didapatkan yang memenuhi kriteria untuk *pour plate* pengenceran 10^{-5} dengan jumlah bakteri masing-masing isolat yakni pada isolat *E.coli* 1.1, 1.2, 3.4, dan 4.4 sebanyak 2×10^8 CFU/mL, 1.13×10^8 CFU/mL, 5×10^7 CFU/mL, dan 9×10^7 CFU/mL. Hasil yang didapatkan peneliti sudah memenuhi syarat jumlah koloni bakteri metode *pour plate* yaitu 25–250 koloni setara dengan 2.5×10^7 – 2.5×10^8 CFU/mL (Jefanni, 2017).

Pembuatan nanoemulsi minyak Lengkuas (*Alpinia galanga* [L] Willd) dilakukan berdasarkan literatur (Lu, 2018) dengan beberapa modifikasi yang dilakukan beberapa kali untuk mendapatkan hasil yang maksimal. Pembuatan nanoemulsi dilakukan dengan mencampurkan fase organik dan fase minyak. Kedua fase dilakukan sonikator untuk memecah partikel-partikel. Nanoemulsi dipreparasi menggunakan campuran surfaktan tween 80 dan span 80. Konsentrasi perbandingan surfaktan dengan minyak Lengkuas (*A.galanga* [L] Willd) menjadi kunci pembentukan nanoemulsi, selain itu alat yang digunakan juga berpengaruh. Untuk memecah partikel-partikel emulsi minyak menggunakan sonikator, kemudian hasil emulsi minyak yang disonikator dikarakterisasi ukurannya menggunakan *Particel Size Analyzer* (PSA). Ukuran dorplet yang diharapkan adalah dalam bentuk nano yakni dari 20 nm hingga 100 nm (Ravichandran, 2011). Berdasarkan penelitian yang dilakukan konsentrasi nanoemulsi yang dibuat adalah dengan tahap fase organik yaitu minyak Lengkuas (*A.galanga* [L] Willd) sebanyak 2 mL + Span 80 sebanyak 2 mL, dilakukan sonikasi selama 10 menit dengan amplitudo 40%. Fase cair tween 80 sebanyak 2 mL + aquades sebanyak 4 mL dilakukan sonikasi selama 10 menit dengan amplitudo 40%. Fase organik dan fase cair dicampur dan dilakukan sonikasi kembali selama 10 menit dengan amplitudo 40%. Hasil sonikasi kemudian dilakukan karakterisasi menggunakan PSA di Laboratorium Jurusan Kimia Universitas Brawijaya Malang. Berdasarkan hasil PSA ukuran dorplet emulsi yang terbentuk yakni 49.03×10^3 nm. Ukuran dorplet yang terbentuk belum dapat dikatakan sebagai nanoemulsi hal ini dikarenakan ukurannya >100 nm. Nanoemulsi yang dihasilkan dievaluasi secara organoleptis memiliki bau khas dari minyak lengkuas. Diperlukan kajian lebih lanjut untuk pembuatan emulsi minyak Lengkuas (*A.galanga* [L] Willd). Selain itu, diperlukan studi formulasi dan peralatan yang lebih modern untuk pembuatan nanoemulsi dengan ukuran dorplet yang dipersyaratkan yaitu berukuran nano. Selama pembuatan emulsi minyak Lengkuas (*A.galanga* [L] Willd) peneliti hanya menggunakan *Digital Sonifier* (Branson 250) sehingga hasil emulsi masih jauh dari persyaratan ukuran dorplet untuk nanometer. Nanoemulsi yang dihasilkan berupa cairan dan berwarna putih susu (Lampiran). Penelitian Lu (2018) menyebutkan bahwa semakin tinggi konsentrasi *hydrophilic-lipophilic balance* (HLB) ukuran dorplet nanoemulsi semakin kecil, dan nanoemulsi yang dihasilkan tidak berwarna dan dapat ditembus cahaya. Hasil nanoemulsi

yang dihasilkan sesuai dengan literatur Quatrin *et al* (2017) yang menyatakan bahwa warna nanoemulsi yang dihasilkan putih susu dengan ukuran dorplet < 300 nm. Diperlukan percobaan lagi untuk mendapatkan formulasi yang sesuai sehingga nanoemulsi yang didapatkan berukuran sesuai dengan yang dipersyaratkan yaitu 20 – 100 nm Lu (2018). Hasil nanoemulsi yang terbentuk digunakan untuk uji antibakteri dan antibiofilm.



Gambar 3. Hasil Nanoemulsi yang dihasilkan dan karakteristik nanoemulsi menggunakan Particle Size Analyzer



Gambar 4. Hasil Uji Kadar Hambat (KHM) Nanoemulsi Minyak Lengkuas terhadap *Escherichia coli* Penghasil Extended Spectrum Beta Lactamases

Hasil nilai Δ OD negatif yaitu pada isolat bakteri 1.1 waktu inkubasi 48 jam dengan konsentrasi 0.35 mg/ml, kemudian terjadi peningkatan nilai absorbansi penginkubasian 48 jam. Peningkatan yang tertinggi terjadi pada konsentrasi 22.5 mg/ml. Pada isolat bakteri 1.2 nilai terendah terjadi pada waktu inkubasi 0 jam dengan konsentrasi pengenceran 0.35 mg/ml dan waktu inkubasi 48 jam dengan konsentrasi 2.8 mg/ml, sedangkan yang tertinggi yaitu inkubasi 48 jam dengan konsentrasi 11.2 mg/ml. Pada isolat bakteri 3.4 nilai terendah yaitu inkubasi 0 dan 48 jam dengan konsentrasi 0.35 mg/ml, sedangkan konsentrasi tertinggi yaitu

inkubasi 48 jam konsentrasi 2.8 mg/ml. Pada isolat bakteri 4.4 nilai terendah pada inkubasi 0 dan 48 jam konsentrasi 0.35 mg/ml, sedangkan nilai tertinggi terjadi pada inkubasi 48 jam konsentrasi 22.5 mg/ml. Nilai uji Minimum Inhibitory Concentration (MIC) dapat ditentukan dengan mengukur selisih antara nilai OD pra inkubasi dan pasca inkubasi. Nilai ΔOD rendah menunjukkan adanya penurunan nilai absorbansi yang menandakan terjadinya penurunan jumlah sel yang telah diinkubasi selama 48 jam. Nilai ΔOD tinggi menunjukkan tidak adanya penurunan nilai OD yang berarti masih terjadi peningkatan jumlah sel bakteri pasca inkubasi (Zen, 2015). Hasil uji Minimum Inhibitory Concentration (MIC) dianalisa secara statistika dengan menggunakan uji Anova: Two-Factor Without Replication dengan taraf kepercayaan $p < 0.05$ dan diperoleh nilai isolat 6.159, sedangkan konsentrasinya yaitu 0.240. Hal ini bahwa tidak ada perbedaan antara jumlah isolat dan konsentrasi yang dibutuhkan pada bakteri *Escherichia coli* penghasil ESBLs.

4. SIMPULAN, SARAN, DAN REKOMENDASI

Nanoemulsi minyak lengkuas dengan ukuran 490, 3 nm mampu menghambat bakteri *Escherichia coli* penghasil *Extended Spectrum Beta Lactamases* (ESBLs) pada konsentrasi mulai 0,7 $\mu\text{g/ml}$ dengan waktu inkubasi 24 jam dan 11,2 $\mu\text{g/ml}$ dengan waktu inkubasi 48 jam. Saran dalam penelitian ini yakni diperlukan variasi formulasi fase organik dan fase air dan variasi waktu untuk pembuatan nanoemulsi dengan ukuran yang disyaratkan.

5. DAFTAR PUSTAKA

- Amelia, R., Sudarso, H. Dwi. 2010. Aktivitas Antibakteri Gel Ekstrak Lengkuas (*Alpinia Galanga*) Terhadap *Pseudomonas aeruginosa* dan *Bacillus subtilis*. *Pharmacy*. 7(3) : 78-83.
- Arambewela, L. and W. Aravinda. 2006. Sri Lankan Medicinal plant Monograph and Analysis : *Alpinia galanga* Lakshmi Arambewela and Aravinda Wijesinghe. Colombo : *National Science Foundation*. 10(3) : 955-590-042-6.
- Archer, N.K., M.J.Mazaitis, J.W. Custeron, J.G. Leid, M.E. Powers, M.E. Shirliff. 2011. *Staphylococcus aureus*: Biofilm Properties, Regulation, and Roles in Human Disease. *Landes Bioscience*. 2 (5) : 445-459.
- Bazargani, M.M, R. Jens. 2016. Antibiofilm Activity of Essential Oils and Plant Extracts Against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* Biofilms. *Food Control*. 61(2016) : 156-164.
- Bisset, N.G and M.Wichtl. 2001. Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals 2nd Edition. *Medpharm Scientific Publishers*. Germany.
- Bjarnsholt, T., H. Niels, C. Oana, J. Helle Krogh, S. Zhi-jun, M. Claus, J. Peter Østrup, M. Søren, G. Michael, and N. Tim Tolker. 2011. The Clinical Impact of Bacterial Biofilms. *International Journal of Oral Science*. 3: 55-65. doi: 10.4248/IJOS11026.
- Borucki MK, Peppin J D, White D. 2003. Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol*. 69(12): 73367342.
- Choi, Y., K. Hyun-A., K. Kyoung-Woong, and L. Byung-Tae. 2017. Comparative Toxicity of Silver Nanoparticles and Silver Ions to *Escherichia coli*. *Journal of Environmental Sciences*. doi.org/10.1016/j.jes.2017.04.028.
- D'urzo, N., M.Martinelli, A. Pezzicoli, V.D. Cesaire, V. Pinto, I. Margarit, J.L. Telford, and D. Malone. 2014. *Applied and Environmental Microbiology*. 80 (7):2176-2180.
- Donlan R.M. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*. 8(9) : 881-890.
- Goncalves, M.D.S., C. Delattre, D. Balestrino, N. Carbonnel, R. Elboutachfaiti, A. Wadouachi, S. Badel, T. Bernadi, P. Michaud, C. Forestier. 2014. Antibiofilm activity: A Fuction of *Klebsiella pneumoniae* Capsular Polysacharide. *Plos One*. 9 (6) :1-12.
- Handajani, N.S., dan P. Tjahjadi. 2008. Aktivitas Ekstrak Rimpang Lengkuas (*Alpinia galanga*) terhadap Pertumbuhan Jamur *Aspergillus* spp. Penghasil Aflatoksin dan *Fusarium moniliforme*. *Biodiversitas*. 9(3) : 161-164.
- Huang, L. 2015. Simulation and Evaluation of Different Statistical Functions for Describing Lag Time Distributions of a Bacterial Growth Curve. *Microbial Risk Analysis*. 000 : 1 - 9.
- Jefanni, V., Rastina, dan Ferasyi, T.R. 2017. Deteksi Cemar *Staphylococcus aureus* Pada Daging Ayam yang dijual di Pasar Tradisional Ulee Kareng. *JIMVET*. 01 (4) : 715 - 719.

- Jamal, M., A. Wisal, A. Saadia, J. Fazal, I. Muhammad, A.N. Muhammad, H. Tahir, A. Muhammad, R. Muhammad, and A.K. Muhammad. 2018. Bacterial Biofilm and Associated Infections. *Journal of the Chinese Medical Association*. 81 (2018) 7–11.
- Jawetz, E., Melnick, J.L. and Adelberg, E.A. 2008. *Mikrobiologi kedokteran*. Edisi 23. Jakarta : Penerbit Salemba Medika.
- Johann, D.D., and L.B Kevin. 2008. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis* ; 8: 159–66.
- Khoerunnisa, U. 2015. Studi Farmakognosi Rimpang dan Uji Aktivitas Antimikroba Minyak Atsiri Rimpang Lengkuas (*Alpinia galanga* L). ADLN-Perpustakaan Universitas Airlangga.
- Khoiriyah, H., dan Ardiningsih, P. 2014. Penentuan Waktu Inkubasi Optimum Terhadap Aktivitas Bakteriosin *Lactobacillus* Sp. Red. JKK. 3 (4) : 52 – 56.
- Kus J.V, Tullis E, Cvitkovitch D.G, Burrows L.L. 2004. Significant differences in type IV pilin allele distribution among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis (CF) versus non-CF patients. *Microbiology* 150:1315-1326.
- Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001. 45(4) : 999-1007.
- Liu, L., Yi Xu, Feiyun Cui, Ye Xia, Li Chen, Xiaojing Mou, Junjiang Lv. 2018. Monitoring of bacteria biofilms forming process by in-situ impedimetric biosensor chip. *Biosensors and Bioelectronic*. 2018 : 1 – 14.
- Lou, Z., C. Jie, Y. Fuhao, W. Hongxin, K. Xingran, M. Chaoyang, Z. Song. 2017. The Antioxidant, Antibacterial, Antibiofilm Activity of Essential Oil From *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* and Its Nanoemulsion. *LWT - Food Science and Technology*.
- 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.
- Nadhya N.F., Musofa R., and Manik R.W. 2015. Antibiotic Use Is Not a Risk Factor of Infection by *Extended-Spectrum Beta-Lactamase* Producing Bacteria in Dr. Soetomo Hospital Surabaya. 9(4) : 150-156.
- Prasasti, D and T. Hertiani. 2010. Potensi Campuran Minyak Atsiri Rimpang Temulawak dan Daun Cengkeh sebagai Inhibitor Plak Gigi. *The Journal of Indonesia Medical Plant*. 3.
- Prasetya, Y.A. 2017. Identifikasi Gen Ctx-M pada *Escherichia coli* Penghasil *Extended Spectrum Beta-Lactamases* (ESBLs) di RSUD Dr. Soetomo Surabaya. *Jurnal Teknologi Laboratorium*. 6(2) : 56–60.
- Quatrin, P.M., Verdi, C.M., Ebling de Souza Má, Nunes de Godoi S., Klein B., Gundel A., Wagner R., de Almeida Vaucher R., Ourique A.F., and Vianna Santos R.C. 2017. Antimicrobial and antibiofilm activities of nanoemulsions containing Eucalyptus globulus oil against *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida* spp, *Microbial Pathogenesis*. doi: 10.1016/j.micpath.2017.09.062.
- Quave CL, Plano LRW, Pantuso T, Bennett BC. 2008. Effects of extracts from Italian medicinal plants. on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2008.118:418-28.
- Somers E.B., Wong A.C. 2004. Efficacy of two cleaning and sanitizing combinations on *Listeria monocytogenes* biofilms formed at low temperature on a variety of materials in the presence of ready-to-eat-meat residue. *Journal of Food Protection*. 67: 2218-2229.
- 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) : 83-87.
- Syahrurachman, A., et al. 2015. *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta : Binarupa Aksara.
- Vita, D.D., Simonetti, G., Pandolfi, F., Costi, R., Santo, R. D., D'Auria F.D., and Scipione, L. 2016. *Exploring the anti-biofilm activity of cinnamic acid derivatives in Candida albicans*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 26 (24) : 5931-5935.
- Yuharmen, Y. Eryanti, dan Nurbalatif. 2002. Uji Aktivitas Antimikroba Minyak Atsiri Dan Ekstrak Metanol Lengkuas *Alpinia galanga* Jurusan Kimia. Fakultas Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Riau.