

EFEKTIVITAS EKSTRAK ETANOL *Mimosa pudica* L. TERHADAP PEMBENTUKAN BIOFILM *Staphylococcus aureus*

Bq. Mutmainnah¹, Supnawadi², Ni'matuzahroh³

^{1,2}Akademi Kesehatan Gigi Karya Adi Husada Mataram, Mataram

³Departemen Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga, Surabaya
E-mail: Bmmasadepan9@gmail.com (correspondence author)

ABSTRAK

Pembentukan biofilm *S. aureus* dapat bertahan hidup di lingkungan yang ekstrim dan lebih tahan terhadap antibiotik. Ekstrak etanol *M. pudica* L. memiliki kandungan tanin dan flavonoid, yang telah diketahui menghambat ekspresi gen *icaA* dan *icaD* yang merupakan regulator pembentukan biofilm *S. aureus*. Penelitian ini bertujuan untuk membandingkan kemampuan antibiofilm *M. pudica* pada berbagai konsentrasi biofilm *S. aureus*. Metode yang digunakan dalam penelitian ini meliputi ekstraksi *M. pudica* L. dengan metode maserasi dengan etanol, analisis morfologi dan fisiologi *S. aureus* menggunakan kit Microbact™ Identification 12A dan 12B, uji penghambatan sel biofilm *S. aureus* dengan metode *Microtiter Plate Biofilm Assay* menggunakan ELISA reader dan *Total Plate Count*, serta pengamatan permukaan penghambatan morfologi biofilm *S. aureus* dengan *Scanning Electron Microscopy*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa *S. aureus* membentuk nitrat, glukosa, manitol, ONPG, urease, sukrosa dan enzim katalase. Ekstrak etanol *M. pudica* L. dapat menghambat pembentukan biofilm secara signifikan ($p < 0,05$) dengan efek 88,7% dengan *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC) 50 mg mL⁻¹. Jumlah sel bakteri hidup di dalam biofilm terkecil dan terbesar secara berurutan sebesar $1,0 \times 10^8$ CFU/mL dan $3,0 \times 10^8$ CFU/mL. Manfaat dari penelitian ini diharapkan dapat memperoleh kemampuan ekstrak *M. pudica* L. sebagai anti biofilm terhadap *S. aureus*.

Kata kunci: ekstrak etanol, *M. pudica*, pembentukan biofilm, *S. aureus*

PENDAHULUAN

Staphylococcus aureus merupakan salah satu bakteri patogen yang menyebabkan berbagai permasalahan dalam dunia kesehatan (Archer, et al., 2011). Hoiby et al. (2010) melaporkan resistensi terhadap antibiotik, fagositosis dan sel imunokompeten merupakan salah satu faktor virulensi bakteri *S. aureus* dan dapat melekat pada alat kesehatan yang berhubungan dengan pembentukan biofilm.

Lee et al. (2013) melaporkan senyawa quersetin dan tanin tumbuhan *A. japonica* telah *down-regulation* ekspresi gen *icaA* dan *icaD* *S. aureus*. Senyawa tannin dan flavonoid dalam ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* memiliki aktivitas antibiofilm pada *S. aureus* dengan *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* sebesar 4 % (Loresta et al., 2012). Pada penelitian Mutmainnah et al. (2017) menyatakan bahwa ekstrak etil asetat daun *A. precatorius* L. yang mengandung flavonoid mempunyai aktivitas antibiofilm pada *S. aureus* dengan *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC) sebesar 50 ppm.

Penelitian penghambatan biofilm pada *S. aureus* menggunakan tanaman herbal terus berkembang dalam mencari antibiofilm yang efektif untuk menekan infeksi *S. aureus*.

Mimosa pudica L. merupakan tanaman herbal Indonesia yang dikenal dengan 'putri malu'. Hasil skrining fitokimia dan ekstrak *M. pudica* L. terdapat kandungan flavonoid, tanin, polifenol, monoterpenoid, seskuiterpenoid, steroid, saponin dan kuinon (Annisa, 2009). Terdapatnya senyawa tanin dan flavonoid dalam tumbuhan ini dapat diadikann sebagai alternatif anti biofilm karena dapat menghambat ekspresi gen *icaA* dan *icaD* (Lee et al., 2013).

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi aktivitas antibiofilm ekstrak *M. pudica* L. terhadap biofilm *S. aureus*, sehingga digunakan sebagai senyawa untuk pengembangan antibiofilm. Ekstrak *M. pudica* L. yang menghasilkan senyawa flavonoid diharapkan bersifat antibiofilm yang efektif terhadap *S. aureus*.

METODE PENELITIAN

Bakteri *S. aureus* diperoleh dari Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran, Universitas Airlangga. Sampel yang digunakan dalam penelitian serbuk daun *M. pudica* L. Isolat bakteri diamati morfologi koloni dan morfologi sel serta fisiologi bakteri menggunakan *kits Microbact identification*. Isolat bakteri diamati morfologi koloni dan morfologi sel serta fisiologi bakteri menggunakan *kits Microbact identification*.

Pengujian penghambatan biofilm *S. aureus* dengan ELISA reader dilakukan dengan mengisikan suspensi bakteri pada *microtiter plate flat-bottom 96 wells* sebanyak 150 μL dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam hingga terbentuk biofilm. Ditambahkan 50 μL berbagai konsentrasi ekstrak daun *M. pudica* L. yaitu 800 mg mL⁻¹, 400 mg mL⁻¹, 200 mg mL⁻¹, 100 mg mL⁻¹, 50 mg mL⁻¹, 25 mg mL⁻¹ dan 0 mg mL⁻¹ ke dalam tiap *wells* dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Semua cairan pada tiap *wells* dibuang dengan menggunakan pipet, sehingga meninggalkan biofilm yang melekat pada dinding dalam *wells*. Pada tiap *wells* yang mengandung biofilm dicuci sebanyak 4 kali dengan larutan PBS pH 7 sebanyak 200 μL . Ditambahkan pewarna *crystal violet* 0,5% sebanyak 200 μL dan ditunggu selama 15 menit, kemudian dicuci dengan aquades sebanyak 200 μL . *Wells* yang telah terwarnai diangin-anginkan pada suhu ruang pada keadaan steril. *Wells* ditambahkan etanol 95% sebanyak 200 μL . Suspensi sebanyak 125 μL

dimasukkan pada *wells* yang baru dan dibaca dengan ELISA reader dengan λ 595 nm dan akan diperoleh nilai OD daya tiap perlakuan dari biofilm *S. aureus*.

Pengujian aktivitas antibiofilm dari *M. pudica* L. dengan metode *Total Plate Count*. Suspensi bakteri yang telah berbentuk biofilm dipindahkan ke dalam *microtube* sebanyak 150 μL , kemudian ditambahkan 50 μL berbagai konsentrasi ekstrak daun *M. pudica* L. ke dalam tiap *microtube*. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan di *vortex*. Dilakukan pengenceran 10⁻⁶ CFU/mL dengan menambahkan PBS pH 7. Suspensi sebanyak 100 μL diambil untuk ditumbuhkan dalam media TSA dengan metode *pour plate* dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Dilakukan perhitungan jumlah koloni bakteri yang dinyatakan dalam *Colony Forming Unit* (CFU)/mL.

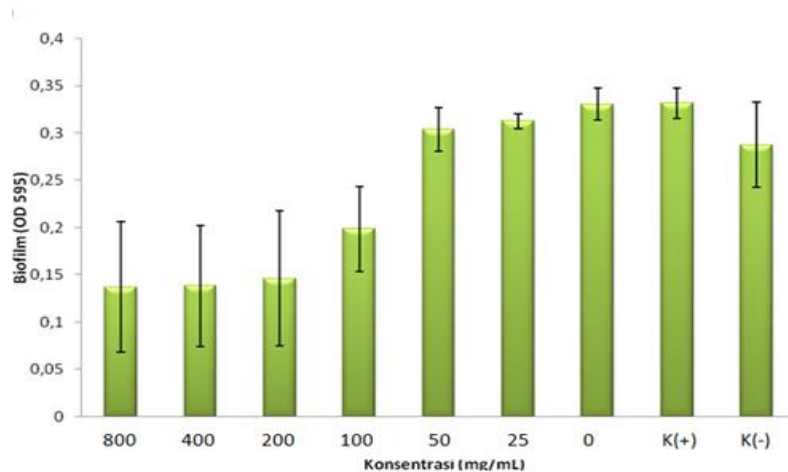
HASIL DAN PEMBAHASAN

Karakteristik Morfologi dan Fisiologi pada *Staphylococcus aureus*

Spesimen *S. aureus* berkoloni bulat, bewarna kuning, diameter koloni 5 mm – 9 mm, sel berbentuk *coccus*, elevasi cembung, tepian licin, gram positif dan susunan sel bergerombol. Karakterisasi secara fisiologi teridentifikasi mengandung nitrat, glukosa, manitol, ONPG, Urease, sucrose, dan katalase.

Penghambatan sel biofilm *S. aureus* dengan metode ELISA reader

Inhibisi biofilm *S. aureus* oleh ekstrak *M. pudica* L. (Gambar 1).



Gambar 1. Penghambatan biofilm *S. aureus* dengan metode *crystal violet* diukur menggunakan *microtiter plate* (λ_{595}) pada berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun *M. pudica* L. K(+) = suspensi bakteri *S. aureus* dan K(-) = media *Triptic Soy Broth* (TSB) dan glukosa 1%.

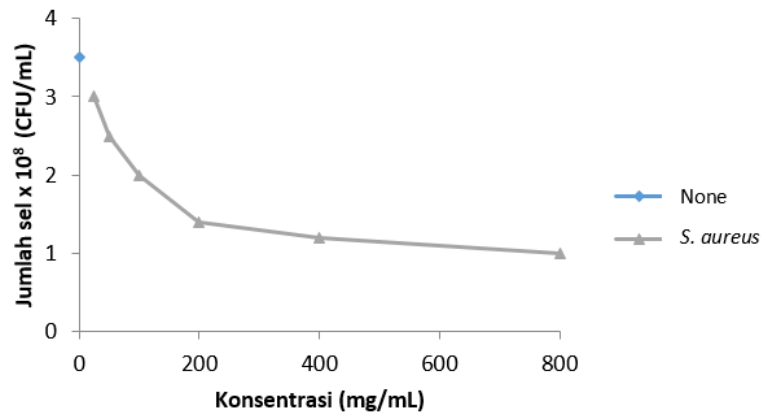
Gambar 1 menunjukkan adanya penurunan nilai rerata pembentukan biofilm mulai dari pemberian ekstrak konsentrasi 100 mg mL⁻¹ sampai dengan 800 mg mL⁻¹ dibandingkan dengan kontrol positif. Selain itu, terjadi peningkatan pembentukan biofilm pada konsentrasi 50 mg mL⁻¹ dimungkinkan karena konsentrasi ekstrak *M. pudica* L. yang rendah dapat memicu pembentukan biofilm. Kondisi lingkungan yang kurang baik dan toksik terhadap bakteri seperti adanya *sub minimum biofilm inhibitory concentration* (sub-MBIC) dari bahan antibiofilm dapat menginduksi pembentukan biofilm (Nuryastuti, 2010). Adanya sub MIC dari antibiotik tertentu dapat meningkatkan pembentukan biofilm melalui peningkatan ekspresi operon *ica* (Rachid *et al.*, 2000).

Persamaan regresi yang didapat dalam penelitian ini $Y = 0,187 + 0,13x$ dan koefisien determinasi sebesar 0.904. Semakin besar konsentrasi ekstrak *M. pudica* L. maka

semakin tinggi pula potensinya menghambat pembentukan biofilm *S. aureus* sebesar 88,7%. Chamdit dan Siripermpool (2012), MBIC merupakan konsentrasi terendah dari bahan antibiofilm yang menghambat pembentukan biofilm. Loresta (2012) menyatakan bahwa ekstrak etanol daun *Moringa oleifera* menghambat pembentukan biofilm *S. aureus* dengan MBIC sebesar 4%. Penghambatan biofilm oleh zat aktif flavonoid pada ekstrak etil asetat daun *A. precatorius* L. mempunyai MBIC sebesar 50 mg mL⁻¹ (Mutmainnah *et al.*, 2017). Pada penelitian ini ekstrak etanol *M. pudica* L. dapat menghambat biofilm *S. aureus* dengan MBIC sebesar 50 mg mL⁻¹

Penghambatan sel biofilm *S. aureus* dengan metode *Total Plate Count*

Jumlah koloni *S. aureus* yang hidup (Gambar 2).



Gambar 2. Jumlah koloni yang hidup dalam biofilm bakteri x 10⁸ CFU/mL pada media TSA setelah pemberian berbagai ekstrak etanol *M. pudica* L.

Gambar 2 menunjukkan bahwa jumlah sel hidup terkecil ditemukan dengan konsentrasi 800 ppm sebesar 1,0 x 10⁸ CFU/mL. Sedangkan jumlah sel hidup terbesar terbentuk dari ekstrak dengan konsentrasi 25 ppm sebesar 3,0 x 10⁸ CFU/mL. Penurunan jumlah sel hidup *S. aureus* sebanding dengan peningkatan konsentrasi ekstrak etanol *M. pudica* L. Semakin tinggi jumlah pelarut yang digunakan maka semakin sedikit jumlah biomassa zat aktif dalam ekstrak etanol daun *M. pudica* L., sehingga semakin kecil kemampuan ekstrak dalam menghambat pertumbuhan bakteri.

KESIMPULAN

Semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol *M. pudica* L. yang ditambahkan maka pembentukan biofilm *S. aureus* semakin rendah, dengan *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC) sebesar 50 mg mL⁻¹.

DAFTAR PUSTAKA

- Annisa, Y. S. (2009). *Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Etanol Herba Putri Malu (Mimosa pudica L.) pada Tikus Putih*. (Online). Diakses dari <http://lib.farmasi.unpad.ac.id>. Pada tanggal 4 Mei 2009.
- Archer, N. K., Mazaitis, M. J., Costerton, J. W., Leid, J. G., Powers, M. E., & Shirtliff, M. E. (2011). *Staphylococcus aureus* biofilms properties, regulation and roles in human disease. *Virulence* 2(5), 445-459.
- Chamdit, S. & Siripermpool P. (2012). Antimicrobial effect of clove and lemongrass oils against planktonic cells and biofilm of *Staphylococcus aureus*. *Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences*, 39(2), 28-36.
- Hoiby, N., Thomas, B., Michael, G., Soren, M., & Oana, C. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int. J. Antimicrob Agents*, 35, 322-32.
- Lee, J. H., Joo, H. P., Hyun, S. C., Sang, W. J., Moo, H. C., & Jintae, L. (2013). Antibiofilm activities of quercetin and tannic acid against *Staphylococcus aureus*. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, 29(5), 491- 499.
- Loresta, S., Sri, M., & Pratiwi T. (2012). Efek ekstra etanol daun kelor (*Moringa oleifera*) terhadap pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*. Program Studi Pendidikan Dokter Hewan, Program Kedokteran Hewan, Universitas Brwijaya.
- Mutmainnah B., Ni'matuzahroh & Afaf B. (2017). *Efektivitas inhibisi ekstrak etil asetat Abrus precatorius pada Metichilin Resistance Staphylococcus aureus (MRSA) 22372 air kemih penampang kateter urin*. (Prosiding Seminar Nasional Pendidikan & Sainstek : Isu-isu strategis sains, lingkungan & inovasi pembelajarannya), 308 – 313.
- Nuryastuti, T. (2010). Environmental signals affecting *ica*-expression in

Staphylococcus epidermidis Biofilm
(Thesis). Netherlands: University
Medical Center Groningen, University
of Groningen.

Rachid, S., K. Ohlsen, W. Witte, J. Hacker, &
W. Ziebuhr. (2000). Effect of
subinhibitory antibiotic concentration
on polysaccharide intercellular adhesion
expression in Biofilm forming
Staphylococcus epidermidis.
Antimicrob Agents Chemother 44,
3357-3363.