

Bq. Mutmainnah dan Ni'matuzaroh. Efektivitas Inhibisi Ekstrak Etil Asetat *Abrus Precatorius* Pada *Metichilin Resistance Staphylococcus aureus* (MRSA) 22372 Air Kemih Penampang Kateter Urin

Efektivitas Inhibisi Ekstrak Etil Asetat *Abrus Precatorius* Pada *Metichilin Resistance Staphylococcus aureus* (MRSA) 22372 Air Kemih Penampang Kateter Urin

¹Bq. Mutmainnah, ²Ni'matuzaroh

¹Akademi Kesehatan Gigi Karya Adi Husada Mataram, Mataram, ²Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Airlangga, Surabaya.
Email: bmmasadepan9@gmail.com.

Abstrak: *Staphylococcus aureus* merupakan salah satu bakteri patogen pada manusia penyebab infeksi kronis oleh perangkat medis implan. Peningkatan *indwelling medical device* berdampak cukup besar pada peranan *Staphylococcus* dalam bidang kesehatan khususnya di Indonesia yang sering resistensi terhadap antibiotik. *S. aureus* bersifat patogen yang membentuk biofilm, melekat pada permukaan polimer dan berkolonisasi pada bahan buatan. Perlekatan sel dan pembentukan biofilm *S. aureus* pada inang menyebabkan peningkatan kesulitan pengendalian penyakit, sehingga diperlukan pencarian bahan-bahan anti pembentukan biofilm, seperti daun saga (*A. precatorius* L.). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan berbagai konsentrasi ekstrak etil asetat daun saga terhadap perubahan hidrofobisitas bakteri *S. aureus* spesies MRSA 22372 dan mengetahui efek ekstrak etil asetat daun saga dalam menghambat bakteri dalam bentuk planktonik dan biofilm *S. aureus* secara *in vitro*. Jenis penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium. Pada penelitian ini, digunakan sampel yang diambil dari Rumah Sakit Umum Daerah (RSUD) Dr. Soetomo Instalasi Mikrobiologi klinik. Metode yang digunakan dalam penelitian ini meliputi ekstraksi tumbuhan *A. precatorius* L., uji perubahan hidrofobisitas bakteri dengan metode *Bacterial Adherence To Hydrocarbons* (BATH), uji penghambatan planktonik bakteri dengan metode cakram *dish* dan *Total Plate Count* (TPC) serta uji penghambatan sel biofilm *S. aureus* dengan metode *Microtiter Plate Biofilm Assay* dan *Total Plate Count*. Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif kualitatif dan kuantitatif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa hidrokarbon n-oktana pada konsentrasi 100, 200, 400 dan 800 (ppm) ekstrak etil asetat dapat meningkatkan dan menurunkan hidrofobisitas MRSA 22372 berkisar antara 41,5 – 11,5 %. Ekstrak etil asetat mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri MRSA 22372 dengan diameter zona hambat, yaitu 21 mm dan nilai *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) sebesar 0 ppm. Hasil pengujian kemampuan ekstrak etil asetat daun saga (*A. precatorius* L.) terhadap biofilm MRSA 22372 diperoleh dengan *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC) sebesar 50 ppm.

Kata Kunci: Ekstrak etil asetat, *A. precatorius* L., *Metichilin Resistance Staphylococcus aureus* (MRSA) 22372, air kemih penampang kateter urin

1. PENDAHULUAN

S. aureus merupakan salah satu bakteri patogen yang menyebabkan berbagai permasalahan dalam bidang kesehatan (Archer *et al.*, 2011). *Staphylococcus* sering dikaitkan dengan pembentukan infeksi kronis oleh perangkat medis implan. Peningkatan *indwelling medical device* berdampak cukup besar pada pertumbuhan *Staphylococcus*. Bakteri *Staphylococcus* yang paling banyak ditemukan yang diisolasi dari implan, yaitu *S. aureus*. *S. aureus* bersifat patogen yang membentuk biofilm, melekat pada permukaan polimer dan berkolonisasi pada bahan buatan (Kloos and Bannerman, 1994).

Perlekatan sel bakteri pada inang terjadi karena adanya interaksi hidrofobik oleh komponen permukaan bakteri dengan sel inang. Sifat hidrofobik fimbriae dapat meningkatkan afinitas bakteri pada reseptor permukaan sel epitel (Rosenberg and Sar, 1990). Hal ini berarti sisi hidrofobik bakteri berinteraksi hidrofobik dengan sel inang, yang kemungkinan bakteri tetap tinggal di permukaan dan berkembang biak atau berpenetrasi ke dalam jaringan. Peningkatan dan penurunan hidrofobisitas pada bakteri disebabkan karena adanya senyawa aktif dalam ekstrak dipengaruhi oleh spesies bakterinya.

Bakteri dalam biofilm dapat menghindari sistem pertahanan inang dan lebih resisten terhadap serangan antimikroba 10-10.000 kali dibandingkan dalam bentuk sel planktonik (Monroe, 2007). Perlekatan sel dan pembentukan biofilm *S. aureus* pada inang menyebabkan peningkatan kesulitan pengendalian penyakit sehingga diperlukan pencarian bahan-bahan anti pembentukan biofilm.

Daun Saga (*A. precatorius* L.) yang diekstraksi menggunakan etil asetat mengandung zat aktif steroid dan flavonoid (Juniarti *et al.*, 2009), dimana zat aktif tersebut berpotensi sebagai antibakteri dan antibiofilm karena dapat menghambat *intercellular adhesion genes icaA* dan *icaD* (Lee *et al.*, 2013).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh penambahan berbagai konsentrasi ekstrak etil asetat daun saga terhadap perubahan hidrofobisitas bakteri *S. aureus* spesies MRSA 22372, kemampuan antibakteri dan antibiofilm dari daun saga dalam menghambat bakteri *S. aureus* secara *in vitro*. Adapun manfaat dari penelitian ini adalah memberikan informasi ilmiah tentang kemampuan penghambatan ekstrak etil asetat *A. precatorius* L. terhadap *Metichilin Resistance Staphylococcus aureus* (MRSA) 22372. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek ekstrak etil asetat daun Saga dalam menghambat *S. aureus* dalam bentuk planktonik dan biofilm secara *in vitro*.

2. METODE PENELITIAN

2.1 Preparasi ekstrak etil asetat *A. precatorius* Ekstrak etil asetat daun *A. precatorius* L.

Daun saga rambat yang tumbuh di daerah Sumenep, Indonesia. Daun Saga kering ditimbang sebanyak 15 gr, kemudian dimaserasi dengan n-heksan sebanyak 1,5 L selama 24 jam. Hasil maserasi disaring untuk memisahkan filtrat dan residunya. Maserasi dilakukan tiga kali sampai filtrat mendekati bening.

Bq. Mutmainnah dan Ni'matuzahroh. Efektivitas Inhibisi Ekstrak Etil Asetat *Abrus Precatorius* Pada *Metichilin Resistance Staphylococcus aureus* (MRSA) 22372 Air Kemih Penampang Kateter Urin

Filtrat dipekatkan dengan *rotary vacuum evaporator*, sehingga didapatkan ekstrak n-heksan daun saga rambat, kemudian ditimbang maserat yang diperoleh. Selanjutnya, residu daun *A. precatorius* L. setelah diekstraksi dengan n-heksana, diangin-anginkan agar terbebas dari n-heksana. Residu daun Saga yang telah kering dimaserasi dengan etil asetat. Maserasi dilakukan tiga kali sampai filtrat mendekati bening. Filtrat dipekatkan dengan *rotary vacuum evaporator*, sehingga didapatkan ekstrak etil asetat daun *A. precatorius* L., kemudian ditimbang maserat yang diperoleh.

2.2 Kultivasi bakteri *S. aureus* (MRSA 22372)

Peremajaan bakteri bertujuan untuk memperoleh biakan MRSA 22372 yang masih aktif dalam pertumbuhan dan metabolismenya. Bakteri dari persediaan induk (stok) yang diperoleh dari RSUD Dr. Soetomo Instalasi Mikrobiologi klinik yang diisolasi langsung dari spesimen air urin. Sebanyak satu ose biakan bakteri, digoreskan dengan metode kwadran ke dalam *plate* yang berisi medium TSA dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C.

2.3 Uji Hidrofobisitas MRSA 22372

Uji hidrofobisitas MRSA 22372 dilakukan menggunakan metode Jones *et al.*, (1991), yang dimodifikasi dari metode Rosenberg *et al.*, (1980). Suspensi bakteri *S. aureus* sebanyak 4,8 mL yang mengandung 10⁶CFU/mL diambil, kemudian dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 1900 rpm selama 15 menit. Supernatan suspensi yang diperoleh dibuang dan pelet bakteri diambil untuk dilakukan uji hidrofobisitas. Pelet bakteri ditambahkan media TSB sebanyak 4,8 mL yang mengandung ekstrak etil asetat daun *A. precatorius* L. Perlakuan untuk kontrol, pelet bakteri ditambahkan bufer fosfat sebanyak 1,07 mL dan media TSB sebanyak 3,73 mL, sehingga volume akhir suspensi yang terdapat pada tabung menjadi 4,8 mL suspensi. Selanjutnya, suspensi bakteri tersebut diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C dan dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 1900 rpm selama 15 menit. Pelet yang terbentuk dicuci dengan PBS pH 7, kemudian diresuspensikan dalam PBS pH 7, sehingga diperoleh volume pada tabung menjadi 4,8 mL suspensi. Suspensi ditambahkan n-oktana dengan volume 0,3 mL, 0,6 mL, 0,9 mL, 1,2 mL dan 1,5 mL pada tiap tabung perlakuan. Selanjutnya, dilakukan *vortex* selama satu menit dan diekuilibrasikan pada suhu kamar selama 15 menit, sehingga akan terjadi pemisahan. Fase air suspensi bakteri diambil secara perlahan-lahan menggunakan pipet pasteur, kemudian diukur OD dengan spektrofotometer pada 600 nm. Hidrofobisitas ditentukan berdasarkan persentase OD pada fase air. Persen hidrofobisitas = 100 - (A x 100/A0), dimana A adalah OD dari suspensi bakteri pada fase air setelah berinteraksi dengan n-oktana, dan A0 merupakan OD suspensi tanpa penambahan n-oktana yang mempunyai nilai hidrofobisitas setara dengan 0 persen.

2.4 Uji planktonik MRSA 22372

Skrining planktonik bakteri dan antibakteri MRSA 22372 dengan metode difusi (cakram dish)

Suspensi bakteri MRSA 22372 yang mengandung 10⁶ CFU/mL disebarkan pada disebarkan pada media TSA. Cakram uji kosong yang telah direndam (sebanyak 100 µL) selama 15 menit di dalam tiap-tiap konsentrasi ekstrak diletakkan di atas permukaan agar secara *steril* di dalam *Laminar Air*

Flow. Kemudian, diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi 24 jam, diukur diameter zona bening (*clear zone*) yang terbentuk dengan menggunakan penggaris. Pengujian ditentukan berdasarkan pengamatan dengan 3 (tiga) ulangan.

Skrining planktonik bakteri dan antibakteri MRSA 22372 metode Total Plate Count (TPC)

Pengujian aktivitas antibakteri dari daun *A. precatorius* L. dilakukan dengan penentuan MIC dan MBC (Schwalbe *et al.*, 2007). Suspensi (bakteri, medium dan PBS) diisikan ke dalam *microtube* sebanyak 100 µL, kemudian ditambahkan ekstrak etil asetat daun *A. precatorius* L. sebanyak 50 µL ke dalam tiap *microtube* yang tersedia. Tiap *microtube* di*vortex*, kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Dilakukan pengamatan kekeruhan yang terjadi pada tiap *microtube* dengan membandingkannya dengan *microtube* yang berisi k (+) untuk menentukan nilai MIC. Setelah diinkubasi selama 24 jam, suspensi diambil 100 µL untuk ditumbuhkan dalam media TSA dengan metode *pour plate*, dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Kemudian, dilakukan perhitungan jumlah koloni bakteri yang dinyatakan dalam *Colony Forming Unit* (CFU)/mL. Pengujian ditentukan berdasarkan pengamatan dengan dua ulangan.

2.5 Uji Biofilm MRSA 22372

Skrining biofilm dan antibiofilm MRSA dengan metode Kristal violet

Pelaksanaan uji penghambatan biofilm MRSA 22372 berdasarkan metode Yamanaka (2008). Suspensi (bakteri, medium dan PBS) diisikan ke dalam *microtiter plate flat-bottom 96 wells* sebanyak 150 µL dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam hingga terbentuk biofilm. Terbentuknya biofilm pada *microtiter plate flat-bottom 96 wells* dapat dilakukan dengan menggunakan *simple staining* dengan *crystal violet* 0,5%. Setelah biofilm terbentuk, kemudian ditambahkan ekstrak etil asetat *A. precatorius* L. sebanyak 50 µL ke dalam tiap *wells* yang tersedia. *Microtiter plate flat-bottom 96 wells* yang telah terisi tersebut, selanjutnya diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam inkubasi, semua cairan yang ada 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, yang bertujuan untuk membersihkan sisa setiap perlakuan. Tahap selanjutnya, tiap *wells* yang telah dicuci PBS 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* yang telah kering ditambahkan etanol 95% sebanyak 200 µL yang bertujuan untuk melepaskan pewarna *crystal violet* yang masih menempel pada sel bakteri. Setelah biofilm terlepas didapatkan suspensi biofilm dan etanol. Sebanyak 125 µL suspensi dimasukkan pada *wells* yang baru dan dibaca dengan ELISA reader dengan 595 nm dan akan diperoleh nilai OD daya tiap perlakuan dari biofilm MRSA 22372. Pengujian ditentukan berdasarkan pengamatan dengan 3 (tiga) ulangan.

Skrining biofilm dan antibiofilm MRSA 22372 metode Total Plate Count (TPC)

Pengujian aktivitas antibiofilm dari daun *A. precatorius* L. dilakukan dengan metode *Total Plate*

Bq. Mutmainnah dan Ni'matuzahroh. Efektivitas Inhibisi Ekstrak Etil Asetat *Abrus Precatorius* Pada *Metichilin Resistance Staphylococcus aureus* (MRSA) 22372 Air Kemih Penampang Kateter Urin

Count (TPC). Suspensi (bakteri, medium dan PBS) diisikan ke dalam *microtiter plate flat-bottom 96 wells* sebanyak 150 μ L dan diinkubasi pada suhu 37 $^{\circ}$ C selama 24 jam hingga terbentuk biofilm. Suspensi (bakteri, medium dan PBS) dipindahkan ke dalam tabung sebanyak 150 μ L, kemudian ditambahkan ekstrak etil asetat daun *A. precatorius* L. sebanyak 50 μ L ke dalam tiap *microtube* yang tersedia. Tiap *microtube* perlakuan dilakukan *vortex*, selanjutnya dilakukan pengenceran untuk mendapatkan konsentrasi bakteri yang sama pada semua perlakuan, yaitu 10^{-6} CFU/mL dengan menambahkan PBS pH 7. Sebanyak 100 μ L diambil untuk ditumbuhkan dalam media TSA dengan metode *pour plate* dan diinkubasi pada suhu 37 $^{\circ}$ C selama 24 jam. Dilakukan perhitungan jumlah koloni bakteri yang dinyatakan dalam *Colony Forming Unit* (CFU)/mL. Pengujian ditentukan berdasarkan pengamatan dengan dua ulangan.

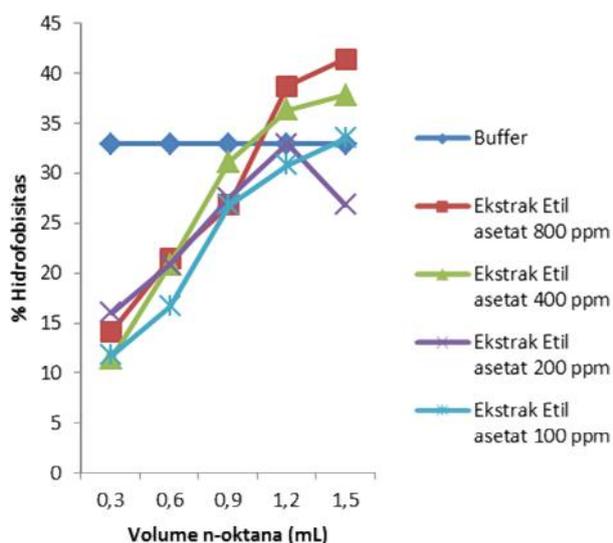
3. HASIL dan PEMBAHASAN

3.1 Uji Hidrofobisitas MRSA 22372

Hasil pengukuran hidrofobisitas sel MRSA 22372 oleh ekstrak etil asetat *A. precatorius* L. dapat dilihat pada **Tabel 1**. Ekstrak etil asetat pada konsentrasi 800 ppm, 400 ppm, 200 ppm dan 100 ppm memberikan nilai hidrofobisitas moderat terhadap MRSA 22372 masing-masing dengan kisaran 41,5 – 26,9 persen. Hidrofobisitas MRSA 22372 tertinggi diperoleh pada konsentrasi 800 ppm pada penambahan n-oktana 1,5 mL. Ekstrak etil asetat *A. precatorius* L. konsentrasi 800 ppm, 400 ppm, 200 ppm dan 100 ppm dapat meningkatkan dan menurunkan hidrofobisitas terhadap MRSA 22372.

Tabel 1. Pengaruh ekstrak etil asetat daun *A. precatorius* terhadap hidrofobisitas MRSA 22372 dengan penambahan 1,5 mL n-oktana.

No	Konsentrasi (ppm)	Penambahan n-oktana (mL)	Hidrofobisitas (%)	Hidrofobisitas relatif terhadap buffer (%)
1	800	1,5	41,5	(+) 8,5
2	400	1,5	37,9	(+) 4,9
3	200	1,5	26,9	(-) 6,1
4	100	1,5	33,6	(+) 0,6
5	Buffer	-	33,0	-



Gambar 1. Pengaruh ekstrak etil asetat *A. precatorius* L. terhadap hidrofobisitas MRSA 22372 pada hidrokarbon n-alkana

Hidrofobisitas MRSA 22372 pada ekstrak etil asetat 800 ppm paling tinggi, yaitu sebesar 41,5 % (**Gambar 1**). Hal ini disebabkan bahwa sifat hidrofobisitas bakteri berhubungan dengan komponen dinding sel seperti fosfolipid, lipopolisakarida dan komponen luar sel, seperti fimbrie dan kapsul. Komponen ini mempunyai fungsi penempelan pada sel inang dengan membentuk interkasi hidrofobik (Finlay dan Falkow, 1997).

Peningkatan dan penurunan hidrofobisitas pada bakteri disebabkan adanya senyawa aktif dalam ekstrak etil asetat *A. precatorius* L. dipengaruhi oleh spesies bakterinya. Menurut Rosenberg dan Sar (1990), menyatakan bahwa perubahan hidrofobisitas pada bakteri diakibatkan adanya komponen bioaktif yang terdapat dalam ekstrak *A. precatorius* L., yaitu flavonoid total. Peningkatan hidrofobisitas pada MRSA 22372 disebabkan oleh terekstraksinya komponen terluar sel yang bersifat hidrofilik, yaitu LPS yang meningkatkan hidrofobisitas bakteri. Pernyataan ini dikemukakan Sunairi *et al.*, (1997), yaitu perubahan kapsul bakteri yang simetris karena adanya perlakuan antibakteri menjadikan bakteri lebih bersifat hidrofobik. Hal ini disebabkan karena komponen aktif dalam ekstrak etil asetat bersifat surfaktan dan berinteraksi dengan senyawa lipoprotein dan memberikan efek peningkatan hidrofobik. Penurunan hidrofobisitas pada bakteri ini disebabkan oleh senyawa aktif pada ekstrak etil asetat seperti fenolik berinteraksi dengan fimbrie dan mengakibatkan penggumpalan protein subunit 20,5 kDalton, sehingga protein kehilangan struktur hidrofobiknya dan mengakibatkan hidrofobisitas bakteri menurun. Protein ini juga berperan meningkatkan hidrofobisitas pada MRSA 22372. Adanya komponen bioaktif pada ekstrak soga seperti flavonoid, yang mengakibatkan perubahan struktur tersier protein atau senyawa tersebut menyisip pada sisi hidrofobik protein, sehingga mengakibatkan penurunan hidrofobisitas sel bakteri (Houghton and Raman, 1998).

3.2 Uji planktonik MRSA 22372

Pada penelitian ini, planktonik bakteri MRSA 22372 dapat dihambat dengan ekstrak etil asetat daun *A. precatorius* L. Diameter zona hambat terbesar terbentuk dari ekstrak etil asetat daun soga hasil konsentrasi 800 ppm pada bakteri MRSA 2232 yang diinkubasi 24 jam, yaitu sebesar 21 mm. Sedangkan Zona hambatan terkecil terbentuk pada bakteri uji MRSA 22372 oleh ekstrak etil asetat daun soga hasil konsentrasi 50 ppm, yaitu sebesar 7 mm dengan inkubasi 24 jam yang dapat dilihat pada **Tabel 2**.

Tabel 2. Diameter zona hambat bakteri MRSA 22372 dari ekstrak etil asetat daun *A. precatorius* L. dengan berbagai perlakuan konsentrasi menggunakan metode cakram *disk*.

Bq. Mutmainnah dan Ni'matuzahroh. Efektivitas Inhibisi Ekstrak Etil Asetat *Abrus Precatorius* Pada *Metichilin Resistance Staphylococcus aureus* (MRSA) 22372 Air Kemih Penampang Kateter Urin

No	Konsentrasi dan Kontrol	Mean ± Standar Deviasi Zona Hambatan (mm)
1	800 ppm	21 ± 1,5
2	400 mm	18 ± 1
3	200 ppm	16 ± 0,6
4	100 ppm	12 ± 1
5	50 ppm	7 ± 1
6	25 ppm	-
7	0 ppm	-
8	K (-)	-
9	K (+)	17 ± 1

Terbentuknya zona hambatan pada bakteri uji disebabkan adanya zat tertentu dalam ekstrak etil asetat daun saga yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Dalam hal ini, daun Saga (*A. precatorius L.*) yang diekstraksi menggunakan etil asetat mengandung zat aktif steroid dan flavonoid (Juniarti *et al.*, 2009), yang salah satunya memiliki efek anti mikrobial (Cushnie and Lamb, 2005). Flavonoid merupakan senyawa fenol yang beraksi sebagai koagulator protein (Dwidjoseputro, 1994). Dengan kata lain, Flavonoid berfungsi sebagai antibakteri dengan cara membentuk senyawa kompleks terhadap protein ekstraseluler yang mengganggu integritas membran sel bakteri.

Membran sel yang rusak akan menyebabkan tegangan permukaan membran sel bakteri menurun, sehingga dapat meningkatkan permeabilitas membran sel bakteri tersebut. Hal ini akan menyebabkan kebocoran molekul dan ion pada membran sel, sehingga dapat menyebabkan kerusakan atau kematian sel bakteri (IndoBIC, 2005).

Penentuan antibakteri juga dilakukan dengan teknik pengenceran ganda (dilusi) melalui pengukuran MIC dan MBC ekstrak etil asetat daun saga terhadap pertumbuhan bakteri MRSA 22372. Hasil jumlah koloni bakteri MRSA 22372 dengan metode *Total Plate Count* (TPC) dapat dilihat pada **Tabel 3**.

Tabel 3. Hasil Jumlah koloni bakteri MRSA 22372 (pengenceran 10^{-6} CFU/mL) pada media TSA setelah pemberian berbagai ekstrak etil asetat *A. precatorius L.* dengan metode *Total Plate Count* (TPC)

No	Konsentrasi	Jumlah koloni pengenceran 10^{-6} (CFU/mL)	Mean Jumlah koloni (CFU/mL)
1	800 ppm	199	$2,0 \times 10^8$
2	400 ppm	218	$2,2 \times 10^8$
3	200 ppm	301	$3,0 \times 10^8$
4	100 ppm	310	$3,1 \times 10^8$
5	50 ppm	320	$3,2 \times 10^8$
6	25 ppm	322	$3,2 \times 10^8$
7	0 ppm	327	$3,3 \times 10^8$
8	K (+)	208	$2,1 \times 10^8$
9	K (-)	334	$3,3 \times 10^8$

Metode dilusi dilakukan untuk mengamati aktivitas antibakteri karena zat uji berinteraksi dengan mikroorganisme. Nilai MIC diketahui dengan mengamati adanya kekeruhan suspensi setelah diinkubasi 37 °C selama 24 jam dan MBC diketahui dengan menghitung jumlah koloni bakteri pada media padat. Pemberian variasi konsentrasi ekstrak daun *A. precatorius L.* terhadap bakteri *S. aureus* akan menghasilkan hasil yang bervariasi pula, semakin

meningkatnya konsentrasi pada ekstrak daun *A. precatorius L.* semakin besar pula kandungan zat aktif sebagai daya antibakteri tersebut, sehingga kematian dari sel bakteri pun semakin meningkat. Selain itu, kerusakan sel bakteri yang terjadi akibat bahan antibakteri tidak dapat diimbangi dengan kemampuan perbaikan dari sel bakteri, sehingga bakteri menjadi lisis (Ariesdyanata, 2008).

3.3 Uji Biofilm MRSA 22372

Skrining biofilm dan antibiofilm MRSA 22372 dengan metode Kristal violet

Penelitian ini menguji efek ekstrak etil asetat daun saga (*A. precatorius L.*) pada berbagai konsentrasi (0 ppm, 25 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm, 400 ppm dan 800 ppm) terhadap penghambatan biofilm MRSA 22372 dengan menggunakan metode *Microtiter Plate Biofilm Assay*. Hasil data kuantitatif yang diperoleh (**Tabel 4**) digunakan untuk mengetahui *Minimum Biofilm Inhibition Concentration* (MBIC) dan untuk mengetahui efek masing-masing konsentrasi ekstrak daun saga terhadap penghambatan biofilm MRSA 22372.

Tabel 4. Hasil Kuantifikasi penghambatan biofilm MRSA 22372 melalui metode *Microtiter Plate Biofilm Assay* (OD₅₉₅)

No	Perlakuan Konsentrasi ekstrak etil asetat daun <i>A. precatorius L.</i>	Rata-rata ± Standar Deviasi
1	800 ppm	0,050 ± 0,248
2	400 ppm	0,122 ± 0,135
3	200 ppm	0,134 ± 0,092
4	100 ppm	0,159 ± 0,124
5	50 ppm	0,174 ± 0,034
6	25 ppm	0,261 ± 0,057
7	0 ppm	0,353 ± 0,046
8	K (+)	0,414 ± 0,011
9	K (-)	0,384 ± 0,021

Tabel 4 di atas menunjukkan adanya penurunan nilai rerata pembentukan biofilm mulai dari pemberian ekstrak konsentrasi 0 ppm sampai dengan 800 ppm dibandingkan dengan kontrol positif. Kontrol negatif mempunyai nilai yang berbeda dengan kontrol positif, hal ini berarti pembentukan biofilm oleh bakteri yang mampu membentuk biofilm dan yang tidak mampu membentuk biofilm mempunyai perbedaan.

Berdasarkan Chamdit dan Siripermpool (2012), *Minimum Biofilm Inhibition Concentration* (MBIC) merupakan konsentrasi terendah dari suatu bahan antibiofilm yang dapat menghambat pembentukan biofilm. Pada penelitian ini dapat diketahui MBIC ekstrak etil asetat daun saga terhadap penghambatan biofilm MRSA 22372 sebesar 50 ppm, hal ini berarti pada konsentrasi tersebut ekstrak etil asetat daun saga mampu menurunkan pembentukan biofilm MRSA 22372 secara signifikan dibandingkan dengan kontrol positif.

Persamaan regresi yang didapat dalam penelitian ini $Y = 0,143 + 0,15X$ dan koefisien determinasi sebesar 0.906, hal ini menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi ekstrak etil asetat daun saga maka semakin tinggi pula

Bq. Mutmainnah dan Ni'matuzahroh. Efektivitas Inhibisi Ekstrak Etil Asetat *Abrus Precatorius* Pada *Metichilin Resistance Staphylococcus aureus* (MRSA) 22372 Air Kemih Penampang Kateter Urin

potensinya untuk menghambat pembentukan biofilm MRSA 22372 dengan pengaruh sebesar 87,9 %. Semakin besar konsentrasi ekstrak maka semakin besar pula kandungan zat aktif flavonoid yang terkandung dalam ekstrak tersebut, sehingga semakin besar pula potensinya dalam menghambat pembentukan biofilm. Penghambatan biofilm oleh zat aktif tanin dan flavonoid juga ditunjukkan pada penelitian Sunanto (2012), dimana zat ini terkandung dalam ekstrak daun dewandaru dan mempunyai MBIC sebesar 0.015 g/dL.

Penelitian Vikram, *et al.* (2010) dan Taganna, *et al.* (2011) menunjukkan bahwa flavonoid dan tanin dapat menghambat *quorum sensing* pada bakteri *Chromobacterium violaceum*, *Escherichia coli O157:H7* dan *Vibrio harveyi*. *Quorum sensing* atau komunikasi antar sel merupakan faktor yang berpengaruh dalam proses pembentukan biofilm (Yarwood, *et al.*, 2004). Selain itu, tanin dan flavonoid merupakan golongan polifenol yang dapat berperan dalam menghambat pembentukan biofilm dengan cara mereduksi sifat hidrofobik bakteri yang menjadi faktor penting dalam adhesi sel bakteri ke substrat (Jagani *et al.*, 2008; Okada *et al.*, 2008).

Skrining biofilm dan antibiofilm MRSA 22372 metode Total Plate Count (TPC)

Minimum Bacterisidal Concentration (MBC) merupakan konsentrasi terendah dari hasil positif uji *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) yang dapat membunuh bakteri uji. Kemampuan daya bunuh yang dimiliki suatu senyawa antibakteri pada ekstrak dapat diketahui dengan adanya uji MBC dengan melihat pada konsentrasi minimal ekstrak perlakuan terbaik yang mampu membunuh bakteri uji. Hasil positif MBC ditunjukkan dengan tidak adanya koloni bakteri yang tumbuh dari konsentrasi ekstrak positif uji MIC pada media TSA setelah diinkubasi 24 jam. Jumlah koloni bakteri MRSA 22372 pada media TSA disajikan pada **Tabel 5**.

Tabel 5. Jumlah koloni bakteri MRSA 22372 (pengenceran 10^{-6} CFU/mL) pada media TSA setelah pemberian berbagai ekstrak etil asetat *A. precatorius* L.

No	Konsentrasi	Jumlah koloni pengenceran 10^{-6} (CFU/mL)	Mean Jumlah koloni (CFU/mL)
1	800 ppm	117	$1,2 \times 10^8$
2	400 ppm	132	$1,3 \times 10^8$
3	200 ppm	154	$1,5 \times 10^8$
4	100 ppm	187	$2,0 \times 10^8$
5	50 ppm	243	$2,4 \times 10^8$
6	25 ppm	296	$3,0 \times 10^8$
7	0 ppm	323	$3,2 \times 10^8$
8	K (+)	143	$1,4 \times 10^8$
9	K (-)	336	$3,4 \times 10^8$

Tabel 5 menunjukkan variasi konsentrasi ekstrak etil asetat daun saga terhadap jumlah koloni bakteri yang terbunuh. Pada konsentrasi 0 ppm sampai dengan konsentrasi 800 ppm terjadi penurunan jumlah koloni. Berdasarkan data tersebut, menunjukkan bahwa dosis ekstrak mempunyai pengaruh terhadap jumlah koloni bakteri MRSA 22372

Metichilin Resistance Staphylococcus aureus (MRSA) 22372 merupakan golongan bakteri gram positif dimana memiliki struktur dinding sel yang lebih sederhana dibandingkan dengan dinding sel bakteri gram negatif sehingga memudahkan senyawa antibakteri mudah masuk ke dalam sel bakteri. Menurut Dewi (2010) menyatakan bahwa bakteri gram positif memiliki dinding sel dengan lebih banyak peptidoglikan, sedikit lipid dan dinding sel mengandung polisakarida (asam teikoat). Terjadinya kerusakan pada membran sel mengakibatkan terhambatnya aktivitas dan biosintesis enzim-enzim spesifik yang diperlukan dalam reaksi metabolisme. Selaian itu, dinding sel bakteri gram positif akan bermuatan negatif sebagai akibat dari ionisasi gugus fosfat dari asam teikoat pada struktur dinding selnya.

4. KESIMPULAN

Hidrokarbon n-oktana pada konsentrasi 100, 200, 400 dan 800 (ppm) dapat meningkatkan dan menurunkan hidrofobisitas MRSA 22372 terhadap ekstrak etil asetat berkisar antara 41,5 – 26,9 %. Perubahan hidrofobisitas bakteri MRSA 22372 menunjukkan adanya perubahan struktur permukaan sel bakteri.

Ekstrak etil asetat daun saga memiliki daya antibakteri sehingga mampu menghambat pertumbuhan MRSA 22372 dengan diameter zona hambat terbesar, yaitu 21 mm dan nilai *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) sebesar 0 ppm.

Berdasarkan hasil pengujian efek ekstrak etil asetat daun saga (*A. precatorius* L.) terhadap biofilm MRSA 22372 secara *in vitro*, dapat disimpulkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak etil asetat daun saga yang ditambahkan maka pembentukan biofilm *S. aureus* semakin rendah, dengan *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC) sebesar 50 ppm.

DAFTAR PUSTAKA

- Archer, N.K., Mazaitis, M.J., Costerton, J.W., Leid, J.G., Powers, M.E., and Shirtliff, M.E., 2011. *Staphylococcus aureus* Biofilms Properties, Regulation and Roles in Human Disease.
- Ariesdyanata, C., 2008. Perbedaan Ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle* Linn.) dengan Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) terhadap *Staphylococcus aureus*. Library@lib.unair.ac.id. Airlangga, Surabaya.
- Chamdit, S. and P. Siripermpool. 2012. Antimicrobial Effect of Clove and Lemongrass Oils Against Planktonic Cells

Bq. Mutmainnah dan Ni'matuzahroh. Efektivitas Inhibisi Ekstrak Etil Asetat *Abrus Precatorius* Pada *Metichilin Resistance Staphylococcus aureus* (MRSA) 22372 Air Kemih Penampang Kateter Urin

- and Biofilm of *Staphylococcus aureus*. *Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences*, 39 (2), 28-36.
- Cushnie, T.P.T., & Lamb, A.J., 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26 (5) : 343-356
- Dewi, F.K., 2010. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia*, Linnaeus) terhadap Bakteri Pembusuk Daging Segar, Skripsi, Universitas Sebelas Maret, Surakarta.
- Dwijoseputro, D., 1994. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Djambatan, Jakarta.
- Finlay, B.B., and Falkow, S., 1997. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. P: 136-169.
- Indonesia Biotechnology Information Centre (IndoBIC), 2005, Senyawa antimikroba dari tanaman, <http://indobic.or.id>. Accessed Nov. 29, 2015.
- Jones, D., Gorman, S., Mccafferty, D.F., and Wolfson, A.D., 1991. The effects of three non-antibiotic, antimicrobial, agents on the surface hydrophobicity of certain microorganism evaluated by difference methods. *J. Appl. Bacteriol*, 71: 218-227
- Juniarti, Delvi, O., and Yuhernita, 2009. Kandungan Senyawa Kimia, Uji Toksisitas (*Brine Shrimp Lethality Test*) dan antioksidan (*1,1-diphenyl-2-pikrilhidrazil*) dari ekstrak daun saga (*Abrus precatorius* L.). *Makara, Sains*, 13(1): 50-54
- Kloos, W.E., and Bannerman, T.L., 1994. Update on clinical significance of coagulase-negative Staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 7: 117-40.
- Lee, J.H., Joo, H.P., Hyun, S.C., Sang, W. J., Moo, H.C, and 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.
- Rosenberg, E. And Sar, N., 1990. Changes in bacterial surface hydrophobicity during morphogenesis and differentiation. In Doyle, R.J., and Rosenberg, Eds. *Microbial cell surface hydrophobicity*. American Society of for Microbiology, Washington, D.C.
- Santos, Y., Bandin, I., Nicto, T.P., Bruno, D.W., Ellis, A.E., and Taranzo, A.T., 1990. Proposed criteria of hydrophobicity. In Lee, K.K. and K.C., Yii. 1996. A comparison of Three Methods for Assaying Hydrophobicity of Pathogenic Vibrios. *J. Letters in Appl. Microbiol*, 13:343-346.
- Schwalbe, Richard, Steele-Moore, Lynn, and Goodwin, A.C., 2007. *Antimicrobial susceptibility testing protocol*. CRC Press, USA.
- Sunairi, M., Iwabuchi, N., Yoshizawa, Y., Murooka, H., Murosaki and Nakajima, M., 1997. Cell-surface hydrophobicity and scum formation of *Rhodococcus rhodochrous* strain with different colonial morphologies. *J. Appl. Microbiol.* 82: 204-210.
- Sunanto, E.H. 2012. Efek Ekstrak Daun Dewandaru (*Eugenia uniflora*) sebagai Penghambat Pembentukan Biofilm pada *Staphylococcus aureus* secara in vitro [Skripsi]. Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Malang.
- Taganna, J.C., J.P. Quanico, R.M. Perono, E.C. Amor, W.L. Rivera. 2011. Tannin-rich Fraction from *Terminalia catappa* Inhibits Quorum Sensing (QS) in *Chromobacterium violaceum* and the QS-Controlled Biofilm Maturation and LasA Staphylolytic Activity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal Ethnopharmacol.* 2011 Apr 12;134(3):865-71.
- Vikram, A., G.K. Jayaprakasha, P.R. Jesudhasan, S.D. Pillai, B.S. Patil. 2010. Suppression of Bacterial Cell-Cell Signalling, Biofilm Formation and Type III Secretion System by Citrus Flavonoids. *Journal Appl Microbiol.* 2010 Aug;109(2):515-27.
- Yamanaka-Okada, A., Sato, E., Kouchi, T., Kimizuka, R., Kato, T., and Okuda, K., 2008. Inhibitory Effect of Cranberry Polyphenol on Cariogenic Bacteria. *Bull Tokyo Dent Coll*, 49(3): 107-112.
- Yarwood, J.M., D.J. Bartels, E.M. Volper, E.P. Greenberg. 2004. Quorum Sensing in *Staphylococcus aureus* Biofilms. *Journal Bacteriol*, vol. 186 no. 6 1838-1850.