

## Penelusuran Potensi Kapulaga, Temu Putri dan Senggugu sebagai Penghambat Pembentukan Biofilm

### (Screening of Kapulaga, Temu putri and Senggugu Potencies for Inhibition of Biofilm Formation)

SINTAYU PUTRI WANDAN SARI<sup>1</sup>, FERRY RAHMAPUSPITA<sup>1</sup>, NURI IRIYANI<sup>1</sup>,  
SYLVIA UTAMI TUNJUNG PRATIWI<sup>2</sup>, TRIANA HERTIANI<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorium Fitokimia, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Sekip Utara,  
Yogyakarta, 55281.

<sup>2</sup>Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Farmasi, Universitas Gadjah Mada, Sekip Utara,  
Yogyakarta, 55281.

Diterima 1 April 2013, Disetujui 23 September 2013

**Abstrak:** Buah kapulaga, rimpang temu putri dan kulit batang senggugu telah dilaporkan bersifat antibakteri sehingga berpotensi dikembangkan sebagai antibiofilm. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui aktivitas hambatan pembentukan biofilm *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) dan *Escherichia coli* oleh ekstrak etanol, fraksi heksan, fraksi etilasetat dan fraksi air sampel secara *in vitro*. Setelah diekstraksi dengan petroleum eter, residu sampel dimaserasi dengan etanol 70 % untuk menghasilkan ekstrak etanol. Setelah dievaporasi, ekstrak dipartisi untuk menghasilkan fraksi heksan, etilasetat dan air. Penentuan aktivitas hambatan biofilm dilakukan secara *in vitro* pada *microplate flexible U-bottom 96 wells* dengan pewarnaan kristal violet dan pembacaan pada  $\lambda$  595 nm. Identifikasi fitokimia dilakukan secara KLT. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak/fraksi yang memiliki aktivitas hambatan biofilm MRSA paling besar dari masing-masing bahan adalah fraksi heksan kapulaga dengan  $IC_{50}$  0,23±0,01 mg/mL, fraksi heksan temu putri  $IC_{50}$  0,45±0,03 mg/mL dan fraksi etilasetat senggugu  $IC_{50}$  0,35±0,022 mg/mL. Aktivitas penghambatan paling besar terhadap biofilm *E. coli* ditunjukkan oleh fraksi etilasetat baik dari kapulaga  $IC_{50}$  0,32±0,17 mg/mL, temu putri  $IC_{50}$  0,46±0,03 mg/mL dan senggugu  $IC_{50}$  0,39±0,02 mg/mL.

**Kata kunci:** kapulaga, temu putri, senggugu, antibiofilm, MRSA, *Escherichia coli*.

**Abstract:** Kapulaga fruit, temu putri rhizome and senggugu bark have been reported as antibacterials, suggesting potency to be developed as antibiofilm agents. This research has investigated the inhibition activity on biofilm formation of *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Escherichia coli*. Following petroleum ether extraction, the remaining biomass was macerated in ethanol 70 %. After solvent evaporation, the ethanol extract was partitioned to yield hexane, ethyl acetate and water fractions. The inhibition activities of ethanol extracts, hexane, ethyl acetate and water fractions of samples were carried out *in vitro* on microplates flexible U-bottom 96 wells using crystal violet staining and were recorded at  $\lambda$  595nm. Phytochemical identification were performed by thin layer chromatography. Results showed that extract or fraction samples which have the highest biofilm inhibition activity toward MRSA were hexane fraction of kapulaga  $IC_{50}$  0.23±0.01 mg/mL, temu putri  $IC_{50}$  0.45±0.03 mg/mL and the ethyl acetate fraction of senggugu  $IC_{50}$  0.35±0.022 mg/mL. Biofilm inhibition activity toward *E. coli*, were shown by the ethyl acetate fractions of kapulaga  $IC_{50}$  0.32±0.17 mg/mL, temu putri  $IC_{50}$  0.46±0.03 mg/mL and senggugu  $IC_{50}$  0.39±0.02 mg/mL.

**Key words:** kapulaga, temu putri, senggugu, antibiofilm, MRSA, *Escherichia coli*.

\* Penulis korespondensi, Hp. 0811286598  
e-mail: hertiani@ugm.ac.id

## PENDAHULUAN

MIKROORGANISME di alam lebih banyak berada dalam keadaan menempel pada permukaan padat daripada tersuspensi dalam cairan. Sel-sel yang menempel tersebut berkembang membentuk komunitas yang dilindungi oleh suatu biofilm<sup>(1)</sup>. Matriks polimer ekstraseluler yang merupakan penyusun biofilm, dapat memberikan perlindungan terhadap pertahanan inang dan menghalangi kontak dengan beberapa senyawa antimikrob sehingga dapat menyebabkan resistensi<sup>(2)</sup>. Resistensi diperparah dengan melambatnya laju pertumbuhan mikrob dalam biofilm yang dapat meningkatkan ketahanan bakteri terhadap senyawa antibiotik, disinfektan, yod dan amonium kuartener<sup>(1)</sup>.

Peningkatan resistensi tersebut mengancam kesehatan masyarakat dalam skala global karena mengurangi efektivitas pengobatan dan meningkatkan morbiditas, mortalitas dan biaya pengobatan<sup>(3)</sup>. Biofilm yang sering ditemui pada alat implan telah banyak dilaporkan menimbulkan infeksi berulang pada pemakainya<sup>(1)</sup>. Oleh karena itu, penemuan senyawa yang dapat menghambat pembentukan dan mendegradasi biofilm akan sangat bermanfaat dalam upaya eradikasi penyakit infeksi<sup>(4)</sup>.

*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) merupakan strain *S. aureus* yang resisten terhadap antibiotik golongan metisilin dan  $\beta$ -laktam. MRSA merupakan bakteri Gram positif patogen yang penyebarannya semakin meluas, sehingga diperlukan antimikrob baru untuk mengatasinya<sup>(4)</sup>. Bakteri *E. coli* termasuk Gram negatif, yang merupakan kuman oportunistik dan ditemukan di dalam usus besar manusia sebagai flora normal. Bakteri ini menghasilkan eksotoksin tidak tahan panas yang menyebabkan diare. Ada pula galur bakteri *E. coli* yang menghasilkan eksotoksin tahan panas yang dapat menyebabkan diare ringan pada anak-anak dan umumnya tidak menyebabkan penyakit bila masih ada di dalam usus tetapi dapat menyebabkan penyakit bila telah mencapai jaringan luar *tractus intestinalis* seperti saluran kencing, saluran paru-paru, saluran empedu, peritoneum dan selaput otak<sup>(5)</sup>.

Hasil penelitian pendahuluan yang dilakukan terhadap beberapa tumbuhan obat yang berpotensi sebagai antibakteri menunjukkan potensi ekstrak buah kapulaga, rimpang temu putri dan kulit batang senggugu sebagai antibiofilm. Penelitian lain melaporkan bahwa ekstrak etanol buah kapulaga memiliki aktivitas sebagai antibakteri terhadap *E. coli* dan *S. aureus* (diameter hambatan sebesar 10,77 $\pm$ 0,92 mm dan 14,80 $\pm$ 0,72 mm<sup>(6,7)</sup>). Minyak atsiri rimpang temu putri (*Kaempferia rotunda* L.) memiliki aktivitas

antibakteri terhadap *S. aureus* ATCC 25923 dengan nilai KHM dan KBM sebesar 0,75%, tetapi sampai dengan kadar 1,25%, minyak atsiri temu putri belum menunjukkan nilai KHM dan KBM terhadap *E. coli* 25922<sup>(8)</sup>.

Ekstrak polar dan semipolar kulit batang senggugu diduga mengandung senyawa flavonoid dan fenol<sup>(9)</sup>. Pengujian aktivitas penghambatan biofilm MRSA dari ekstrak etanol *Marrubium vulgare* yang kaya kandungan flavonoid, menunjukkan hambatan dengan harga IC<sub>50</sub> sebesar 8  $\mu$ g/mL<sup>(4)</sup>. Di sisi lain, senyawa apigenin dapat menghambat pembentukan biofilm bakteri *Streptococcus mutans* dengan cara menghambat enzim glukosil transferase<sup>(10)</sup>. Senyawa flavonoid yang diduga terdapat dalam kulit batang senggugu diharapkan dapat menghambat terbentuknya biofilm.

Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas hambatan pembentukan biofilm MRSA dan *E. coli* oleh ekstrak etanol, fraksi heksan, fraksi etilasetat dan fraksi air dari buah kapulaga, rimpang temu putri dan kulit batang senggugu secara *in vitro*. Bakteri MRSA digunakan sebagai bakteri uji untuk mewakili bakteri Gram positif sedangkan *E. coli* digunakan untuk mewakili bakteri Gram negatif. Kedua spesies bakteri tersebut tergolong bakteri yang patogen serta dapat membentuk lapisan biofilm.

## BAHAN DAN METODE

**BAHAN.** Koleksi bahan tumbuhan dilakukan pada Maret 2011. Buah kapulaga (*Amomum compactum* Soland. ex Maton, Zingiberaceae) dikoleksi dari Girimulyo, Kulon Progo, Yogyakarta. Rimpang temu putri (*Kaempferia rotunda* L., Zingiberaceae) diperoleh dari Dekso, Kulon Progo, Yogyakarta. Kulit batang senggugu (*Clerodendron serratum* (L.) Moon, Verbenaceae) didapatkan dari daerah Timoho, Kota Yogyakarta.

Bahan untuk membuat ekstrak dan fraksinasi adalah petroleum eter (PE), etanol 70%, heksan, metanol 90%, etilasetat dan air suling (kualitas teknik, CV General Labora). Bahan untuk uji aktivitas hambatan pembentukan biofilm meliputi bakteri uji MRSA yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Umum UGM dan *E. coli* dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Pertanian UGM, media Luria Bertani (LB) cair dan padat, larutan NaCl 0,9% b/v, larutan standar McFarland 0,5 (1,5x10<sup>8</sup> CFU/mL), konikel (Greiner Bio-One GmbH, Jerman), *microplate flexible* U-bottom PVC 96-wells (BD Falcon™), *microplate flat* 96-wells (Brandplates), DMSO (Merck Schuchardt OHG), kanamisin (PT Meiji), kristal violet (Merck).

Bahan untuk identifikasi golongan senyawa dengan KLT meliputi silika gel 60 F<sub>254</sub> (Merck); kloroform, metanol, toluene, etilasetat (*p.a.*, Sigma). Pereaksi penampak bercak: anisaldehyd asam sulfat, AlCl<sub>3</sub>, FeCl<sub>3</sub>, 2,4-DNPH. Bahan untuk identifikasi bakteri adalah larutan pewarna Gram A (kristal violet), larutan pewarna Gram B (iodium, kalium iodida), larutan pewarna Gram C (aseton), pewarna Gram D (safranin), serta minyak imersi.

**Alat.** Neraca analitik (Sartorius Ag Gottingen, Jerman), *Laminar Air Flow* (LAF) Heles CR-65, autoklaf (Sakura), inkubator (Lab Line), *microplate reader* (Benchmark).

**METODE. Simplisia.** Identifikasi dilakukan di Bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi UGM dengan mengacu pada buku *Flora of Java*<sup>(11)</sup>. Bahan yang telah dikumpulkan, dibersihkan dari kotoran, ditimbang sebanyak 0,5 kg. Bahan kemudian disortasi dan dikeringkan dalam oven pada suhu 50°C selama ± 9,5 jam. Sortasi kering dilakukan terhadap simplisia dan ditimbang berat simplisia.

**Pembuatan ekstrak dan fraksi.** Simplisia diblender hingga menjadi serbuk halus, kemudian dimaserasi dengan petroleum eter (PE) dalam toples tertutup selama dua hari, dengan dilakukan pengadukan setiap harinya selama setengah jam. Dua hari kemudian, hasil maserasi diserukai dan ampas diperas. Ampas dimaserasi kembali dengan PE seperti disebut di atas. Ampas kemudian dimaserasi dengan etanol 70% selama 3 hari, kemudian diserukai, ampas diperas. Remaserasi dilakukan lagi dengan etanol 70%. Filtrat yang didapatkan dikumpulkan dan diendapkan, selanjutnya dilakukan penguapan filtrat di atas penangas air dengan bantuan kipas angin sambil diaduk-aduk sehingga diperoleh ekstrak kental etanol.

Ekstrak etanol selanjutnya difraksinasi dengan metode partisi cair-cair menggunakan metanol 90%-heksan (1:1 v/v). Fraksinasi ini dilakukan hingga fraksi heksan jernih. Fraksi heksan dan metanol 90% yang didapatkan diuapkan hingga diperoleh ekstrak kental. Fraksi heksan disimpan dalam flakon. Fraksi metanol 90% selanjutnya difraksinasi lagi dengan etilasetat-air (1:1 v/v). Fraksinasi dilakukan hingga fraksi etilasetat jernih. Fraksi etilasetat dan fraksi air yang didapatkan diuapkan hingga diperoleh ekstrak kental. Fraksi etilasetat dan fraksi air dimasukkan dalam flakon dan disimpan dalam lemari es. Ekstrak etanol, fraksi heksan, fraksi etilasetat dan fraksi air ini yang akan digunakan sebagai sampel uji. Susut pengeringan ekstrak ditetapkan menurut Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat<sup>(12)</sup>.

**Pembuatan suspensi bakteri.** Bakteri uji *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA)

dan *Escherichia coli* diambil dengan Ose lalu digoreskan pada media LB padat dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Beberapa Ose biakan bakteri dari media LB padat disuspensikan dalam 1-2 mL media LB cair dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18-24 jam. Suspensi bakteri dalam media LB cair dibandingkan dengan larutan standar Mc Farland 0,5 (1,5x10<sup>8</sup> CFU/mL) secara visual berdasarkan tingkat kekeruhannya dan pengenceran dilakukan dengan larutan NaCl 0,9% b/v.

**Uji aktivitas hambatan pembentukan biofilm.** Sebanyak 100 mg ekstrak etanol, fraksi heksan, fraksi etilasetat dan fraksi air ditimbang dengan neraca analitik kemudian masing-masing dimasukkan dalam tabung uji. Larutan DMSO sebanyak 1 mL ditambahkan dalam tabung-tabung tersebut dan dihomogenkan menggunakan *vortex*. Larutan ini dijadikan sebagai stok larutan sampel untuk uji yang akan dilakukan.

Metode mikrodilusi digunakan untuk menguji pengaruh ekstrak tanaman terhadap pertumbuhan biofilm pada *microplate flexible U- bottom 96 wells*. Teknik seri pengenceran dilakukan hingga diperoleh konsentrasi 125 sampai 2000 µg/mL. Kontrol yang disertakan dalam uji ini adalah kontrol negatif (sel + LB), kontrol positif (sel+LB+antibiotik kanamisin 1 mg/mL), kontrol pembawa (sel+LB+DMSO), dan kontrol media (LB). Setiap sumuran berisi 100 µL (ekstrak+LB) dan 5 µL suspensi bakteri. Semua pengujian dilakukan dengan replikasi tiga kali. Blanko dibuat dengan cara yang sama seperti pada sampel, tetapi penambahan bakteri diganti dengan 5 µL larutan NaCl 0,9%<sup>(4)</sup>.

Plat uji diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam untuk MRSA<sup>(13)</sup> dan 24 jam untuk *E. coli*<sup>(14)</sup>. Isi sumuran selanjutnya didekantasi, dibilas tiga kali dengan air mengalir dan dikeringkan. Sebanyak 125 µL kristal violet 1% ditambahkan pada setiap sumuran, dilanjutkan dengan inkubasi selama 15 menit pada suhu ruang untuk mewarnai biofilm yang terbentuk. Plat dibilas dengan air mengalir sebanyak tiga kali dan ditambahkan 200 µL alkohol 96% ke dalam tiap sumuran, diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit untuk melarutkan cincin biofilm yang terbentuk. Larutan dipindahkan ke dalam *microplate flat 96 wells* baru untuk pembacaan *optical density* (OD) menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 595 nm<sup>(15,16)</sup>.

Replikasi dilakukan 3 kali untuk setiap perlakuan. Pembacaan OD untuk rata-rata kontrol pembawa dikurangi rata-rata setiap konsentrasi sampel uji. Nilai ini kemudian dibagi dengan rata-rata OD kontrol pembawa dan dikalikan 100%. Konsentrasi dimana ekstrak menunjukkan hambatan pembentukan biofilm sebesar 50% digunakan sebagai nilai IC<sub>50</sub>.

**Identifikasi golongan senyawa.** Pemisahan bercak dengan metode KLT dilakukan pada ekstrak dan fraksi masing-masing sebanyak 4  $\mu$ L dari larutan stok 10 mg/mL pada fase diam silika gel F<sub>254</sub>. Elusi dilakukan dengan jarak pengembangan 8 cm. Hasil dideteksi menggunakan lampu UV 254 nm dan UV 366 nm serta penyemprotan pereaksi anisaldehyd asam sulfat, FeCl<sub>3</sub>, AlCl<sub>3</sub> dan 2,4-DNPH pada masing-masing plat KLT untuk mengetahui golongan senyawa yang terdapat dalam ekstrak dan fraksi. Kromatogram yang diperoleh dibandingkan dengan data literatur<sup>(17)</sup>. Analisis kandungan saponin dilakukan dengan uji busa<sup>(18)</sup>.

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil pengukuran susut pengeringan ekstrak menunjukkan nilai yang lebih besar dari 10% seperti terlihat pada Tabel 1. Nilai susut pengeringan yang tinggi terkait dengan kandungan minyak atsiri dari simplisia selain kandungan air dan residu cairan penyari. Selain itu, kandungan saponin dalam ekstrak, menyebabkan kesulitan dalam memekatkan ekstrak alkohol-air sehingga ekstrak masih mengandung cairan penyari<sup>(18)</sup>.

Rendemen fraksi menunjukkan sebesar 79,5%, 37,8% dan 53,34% berturut-turut untuk ekstrak etanol kapulaga, temu putri dan senggugu. Hal ini kemungkinan terkait dengan nilai susut pengeringan yang tinggi, yang disebabkan oleh ekstrak etanol yang masih mengandung senyawa mudah menguap termasuk minyak atsiri dan cairan penyari.

Metode kromatografi lapis tipis (KLT) digunakan untuk mengidentifikasi golongan senyawa dari ekstrak dan fraksi secara kualitatif dan untuk menganalisis beberapa cuplikan sampel sekaligus. Metode ini memiliki kelebihan yaitu waktu yang dibutuhkan relatif singkat dengan jumlah sampel yang sedikit<sup>(19)</sup>. Sebelumnya dilakukan pemilihan fase gerak yang sesuai untuk mendapatkan pemisahan bercak yang baik. Fase gerak yang terpilih dan yang digunakan selanjutnya adalah kloroform-metanol (9:1 v/v) untuk kapulaga, *n*-butanol-asam asetat-air (4:1:5

v/v; fase atas) untuk temu putri dan senggugu. Profil kromatogram yang berbeda antara ekstrak dan fraksi menunjukkan bahwa proses fraksinasi dapat memisahkan komponen ekstrak dengan baik berdasarkan perbedaan polaritas. Beberapa bercak masih menunjukkan kemiripan karakteristik ditinjau dari nilai hRf maupun perubahan warna setelah penyemprotan pereaksi warna. Kandungan saponin dalam ekstrak kemungkinan berfungsi sebagai *suspending agent* sehingga menyulitkan pemisahan berlangsung sempurna.

Penelitian pendahuluan menunjukkan bahwa jumlah DMSO yang digunakan dalam penelitian ini tidak menyebabkan hambatan biofilm MRSA dan *E. coli*. Analisis statistik menegaskan bahwa tidak terdapat perbedaan signifikan antara serapan kontrol DMSO dan kontrol media sebagaimana ditunjukkan dengan harga  $F_{hitung} < F_{tabel}$  (3,106). Kanamisin yang digunakan sebagai kontrol antibiotik pada kadar 1 mg/mL menunjukkan hambatan sebesar 83,44%  $\pm$  0,60% terhadap MRSA dan 88,37%  $\pm$  0,46% terhadap *E. coli*.

Uji aktivitas hambatan pembentukan biofilm dilakukan dengan metode mikrodilusi cair. Keuntungan metode mikrodilusi adalah memberikan hasil kuantitatif yang menunjukkan jumlah antimikrob yang dibutuhkan untuk menghambat atau membunuh bakteri<sup>(5)</sup>. *Microplate flexible U-bottom PVC 96-wells* dipilih disebabkan PVC merupakan permukaan anorganik yang bersifat hidrofobik. Kekuatan interaksi hidrofobik dianggap sebagai ikatan yang sangat berperan pada penempelan bakteri<sup>(20)</sup>.

Bakteri MRSA dan *E. coli* merupakan bakteri anaerob fakultatif, sehingga pada pengujian mikrodilusi, bakteri berkumpul di dinding *wells*. Pewarnaan dengan kristal violet 1% dimaksudkan untuk mewarnai biofilm yang terdiri dari lapisan sel dan EPS. Kristal violet akan mengikat muatan negatif pada permukaan molekul dan polisakarida pada EPS<sup>(21)</sup> sehingga setelah sisa larutan kristal violet dibuang dan dicuci dengan air mengalir, kristal violet akan tetap melekat pada bagian yang ada bakterinya (biofilm) sedangkan bagian lain tidak akan diwarnai.

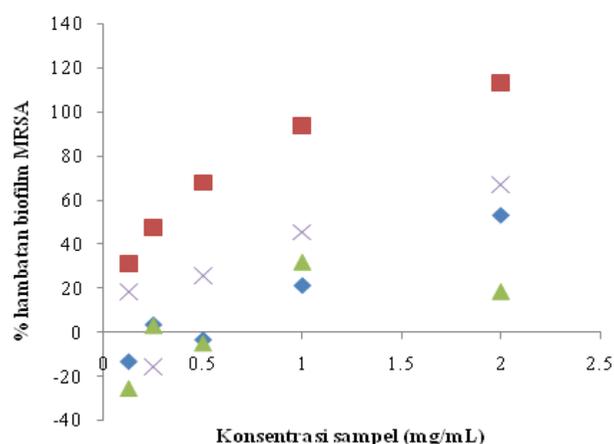
Tabel 1. Hasil perhitungan rendemen dan susut pengeringan

Sampel	Kapulaga		Temu Putri		Senggugu	
	Rendemen (%b/b)	Susut pengeringan	Rendemen (%b/b)	Susut pengeringan	Rendemen (%b/b)	Susut pengeringan
Ekstrak etanol	4,19	19,60 $\pm$ 0,50%	7,96	21 $\pm$ 2,65%	14,51%	35,67 $\pm$ 1,15%
Fraksi heksan	0,3		0,49		0,46%	
Fraksi etil asetat	0,39	Tidak diperiksa	0,44	Tidak diperiksa	0,73	Tidak diperiksa
Fraksi air	2,64		2,08		6,55	

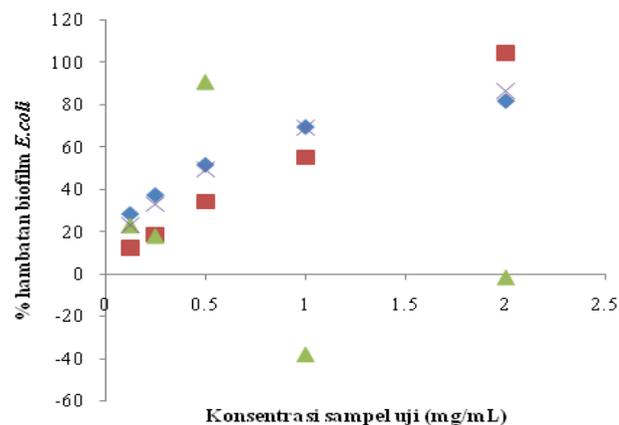
Catatan: rendemen dihitung terhadap simplisia.

Biofilm yang terbentuk ditunjukkan dengan cincin berwarna ungu yang pada dinding *wells* bagian permukaan<sup>(20)</sup>. Alkohol 96% ditambahkan untuk melarutkan cincin ungu tersebut. Banyaknya kristal violet yang terikat berbanding lurus dengan banyaknya sel pada biofilm atau dapat dikatakan berbanding lurus dengan ketebalan biofilm yang terbentuk. Meskipun demikian, faktor fisika, kimia dan biologi dapat mempengaruhi ikatan kristal violet pada biofilm. Faktor tersebut terdiri dari: faktor struktural yang mempengaruhi difusi dari pewarna; faktor perbedaan morfologi dan fisiologi dari setiap sel mempengaruhi pengikatan pewarna dan faktor interaksi kimia antara komponen dalam ekstrak dari tumbuhan dan kristal violet<sup>(22)</sup>. Untuk membatasi pengaruh interaksi antara komponen dalam ekstrak tumbuhan dan kristal violet tersebut, maka perlu adanya blanko<sup>(20)</sup>.

Berdasarkan nilai  $IC_{50}$  sampel uji terhadap bakteri MRSA, fraksi heksan kapulaga memiliki nilai  $IC_{50}$  yang paling kecil sehingga dapat dikatakan bahwa aktivitas hambatan pembentukan biofilm fraksi heksan terhadap MRSA adalah yang paling baik dibandingkan ekstrak etanol maupun fraksi lainnya (Gambar 1). Aktivitas hambatan pembentukan biofilm fraksi heksan terhadap *E. coli* tidak sebaik pada MRSA. Sampel uji yang memiliki aktivitas hambatan pembentukan biofilm terhadap *E. coli* yang paling baik adalah fraksi etilasetat berdasar nilai  $IC_{50}$  yang paling kecil, tetapi data % hambatan dari fraksi etilasetat tidak berkorelasi dengan kadar (Gambar 2). Hal ini kemungkinan disebabkan adanya senyawa lain dalam fraksi tersebut yang menghalangi aksi atau mengurangi kelarutan senyawa aktif seiring peningkatan kadar.

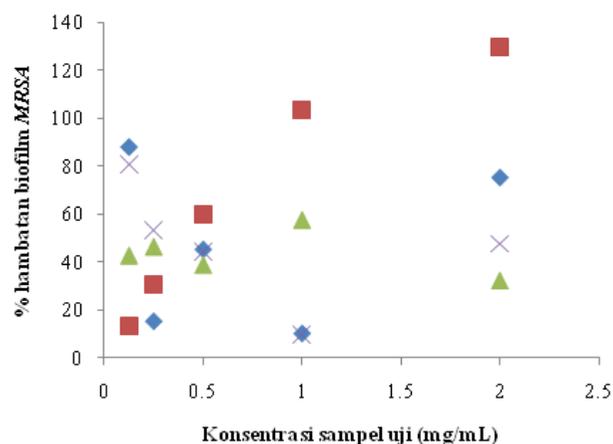


**Gambar 1.** Pengaruh konsentrasi ekstrak dan fraksi buah kapulaga terhadap % hambatan pembentukan biofilm MRSA dengan nilai  $IC_{50}$  ekstrak etanol:  $2,13 \pm 0,63$  mg/mL; fraksi heksan:  $0,23 \pm 0,01$  mg/mL; fraksi etil asetat:  $2,40 \pm 0,76$  mg/mL; dan fraksi air:  $1,20 \pm 0,23$  mg/mL (daya hambat kanamisin 1 mg/mL adalah  $83,44 \pm 0,60\%$ ). ♦ = Ekstrak etanol; ■ = fraksi heksan; ▲ = fraksi etil asetat; × = fraksi air.

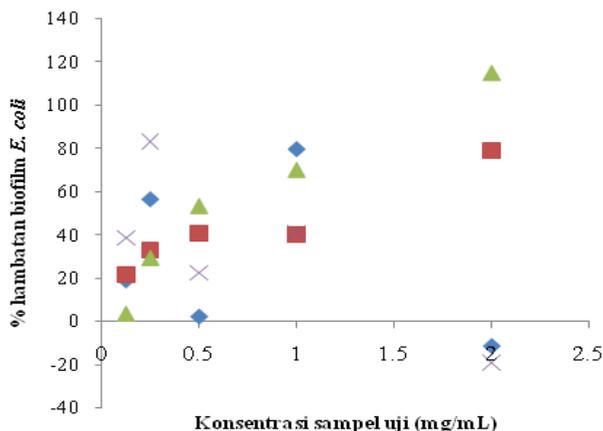


**Gambar 2.** Pengaruh konsentrasi ekstrak dan fraksi buah kapulaga terhadap % hambatan pembentukan biofilm *E. coli* dengan nilai  $IC_{50}$  ekstrak etanol:  $0,42 \pm 0,02$  mg/mL; fraksi heksan:  $0,91 \pm 0,01$  mg/mL; fraksi etil asetat:  $0,21 \pm 0,17$  mg/mL; dan fraksi air:  $0,45 \pm 0,21$  mg/mL (daya hambat kanamisin 1 mg/mL adalah  $88,37\% \pm 0,46\%$ ). ♦ = Ekstrak etanol; ■ = fraksi heksan; ▲ = fraksi etil asetat; × = fraksi air.

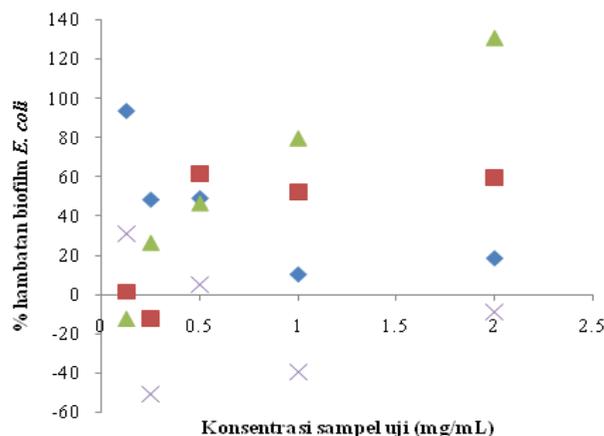
Hasil uji hambatan pembentukan biofilm MRSA oleh ekstrak dan fraksi temu putri menunjukkan bahwa ekstrak etanol memiliki nilai  $IC_{50}$  sebesar  $0,40 \pm 0,34$  mg/mL, tetapi tidak terkait kenaikan konsentrasi sampel uji. Oleh karena itu, fraksi heksan yang memiliki nilai  $IC_{50}$  sebesar  $0,45 \pm 0,034$  mg/mL merupakan fraksi paling aktif (Gambar 3). Fraksi etil asetat pada grafik tersebut menunjukkan 50% hambatan pembentukan biofilm pada pemberian sampel konsentrasi antara 0,5-1 mg/mL, namun hasil perhitungan menunjukkan nilai  $IC_{50}$  sebesar  $4,44 \pm 4,84$  mg/mL karena respon yang tidak terkait dosis. Fraksi air rimpang temu putri mampu menghambat pembentukan biofilm bakteri *E. coli* dengan rata-rata



**Gambar 3.** Pengaruh konsentrasi ekstrak dan fraksi rimpang temu putri terhadap % hambatan pembentukan biofilm MRSA dengan nilai  $IC_{50}$  ekstrak etanol:  $0,40 \pm 0,34$  mg/mL; fraksi heksan:  $0,45 \pm 0,03$  mg/mL; fraksi etil asetat:  $4,44 \pm 4,84$  mg/mL; dan fraksi air:  $1,64 \pm 1,42$  mg/mL (daya hambat kanamisin 1 mg/mL adalah  $83,44 \pm 0,60\%$ ). ♦ = Ekstrak etanol; ■ = fraksi heksan; ▲ = fraksi etil asetat; × = fraksi air.



Gambar 4. Pengaruh konsentrasi ekstrak dan fraksi rimpang temu putri terhadap % hambatan pembentukan biofilm *E. coli* dengan nilai  $IC_{50}$  ekstrak etanol:  $3,41 \pm 5,53$  mg/mL; fraksi heksan:  $0,53 \pm 0,48$  mg/mL; fraksi etil asetat:  $0,46 \pm 0,03$  mg/mL; dan fraksi air:  $0,26 \pm 0,00$  mg/mL (daya hambat kanamisin 1 mg/mL adalah  $88,37\% \pm 0,46\%$ ). ◆ = Ekstrak etanol; ■ = fraksi heksan; ▲ = fraksi etil asetat; × = fraksi air.



Gambar 6. Pengaruh konsentrasi ekstrak dan fraksi kulit batang senggugu terhadap % hambatan pembentukan biofilm *E. coli* dengan nilai  $IC_{50}$  ekstrak etanol:  $2,94 \pm 1,72$  mg/mL; fraksi heksan:  $3,05 \pm 5,03$  mg/mL; fraksi etil asetat:  $0,39 \pm 0,02$  mg/mL; dan fraksi air:  $1,20 \pm 0,23$  mg/mL (daya hambat kanamisin 1 mg/mL adalah  $88,37\% \pm 0,46\%$ ). ◆ = Ekstrak etanol; ■ = fraksi heksan; ▲ = fraksi etil asetat; × = fraksi air.

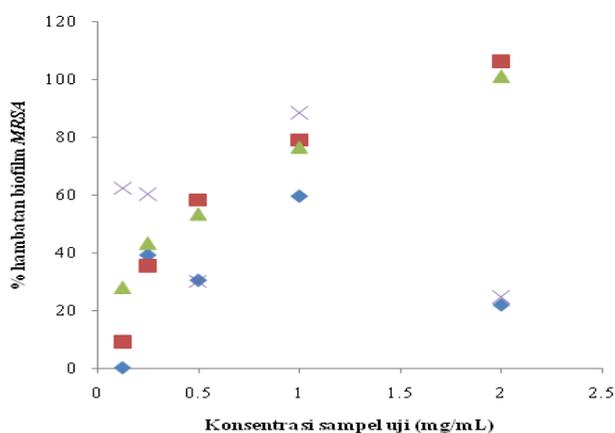
$IC_{50}$  paling kecil yaitu sebesar  $0,26$  mg/mL, namun peningkatan aktivitas tidak terkait dengan peningkatan konsentrasi (Gambar 4). Di sisi lain, respon yang terkait dengan konsentrasi sampel uji dapat diamati pada fraksi etil asetat dan heksan yang masing-masing menunjukkan nilai  $IC_{50}$  sebesar  $0,46 \pm 0,03$  mg/mL dan  $0,53 \pm 0,48$  mg/mL. Oleh karena itu, dapat dikatakan bahwa fraksi etil asetat sebagai fraksi paling aktif dalam menghambat pembentukan biofilm *E. coli*.

Pengujian daya hambat pembentukan biofilm MRSA oleh ekstrak dan fraksi kulit batang senggugu menunjukkan bahwa terjadi peningkatan persentase daya hambat fraksi heksan dan etil asetat seiring dengan kenaikan konsentrasi sampel uji. Fraksi etil

asetat menunjukkan aktivitas paling tinggi dengan nilai  $IC_{50}$   $0,35 \pm 0,02$  mg/mL (Gambar 5). Di sisi lain, ekstrak etanol, fraksi heksan dan fraksi air tidak menunjukkan potensi penghambatan pembentukan biofilm bakteri *E. coli* (Gambar 6). Nilai  $IC_{50}$  ekstrak etanol sebesar  $2,94 \pm 1,72$  mg/mL merupakan hasil estimasi, karena profil % hambatan biofilm pada konsentrasi yang diuji tidak menunjukkan adanya hambatan sampai dengan 50%. Fraksi heksan memiliki nilai  $IC_{50}$  sebesar  $3,05 \pm 5,03$  mg/mL, sedangkan fraksi air menunjukkan nilai yang lebih besar, yaitu  $10,03 \pm 9,41$  mg/mL. Fraksi etil asetat menunjukkan daya hambat biofilm yang meningkat dengan naiknya konsentrasi fraksi yang digunakan dan memiliki nilai  $IC_{50}$  paling kecil yaitu sebesar  $0,39 \pm 0,024$  mg/mL.

Fraksi air menunjukkan aktivitas hambatan pembentukan biofilm *E. coli* yang nilainya negatif pada beberapa kadar uji. Hal ini kemungkinan disebabkan terdapat kandungan fraksi yang berefek meningkatkan pembentukan biofilm selain senyawa yang beraktivitas antibiofilm. Pada kadar uji tertentu, efek probiofilm tersebut lebih dominan daripada antibiofilm, sehingga aktivitas yang teramati adalah penambahan fraksi justru meningkatkan pembentukan biofilm.

Secara umum, perbedaan hasil uji aktivitas hambatan pembentukan biofilm pada bakteri MRSA (Gram positif) dan *E. coli* (Gram negatif) dimungkinkan karena adanya perbedaan proses pembentukan dan komponen penyusun biofilm pada kedua bakteri tersebut. Perbedaan sinyal kimia yang digunakan untuk komunikasi antar mikroba sebelum membentuk biofilm (*quorum sensing*) pada kedua mikroba merupakan salah satu faktor yang dapat mempengaruhi perbedaan respon biologis terhadap



Gambar 5. Pengaruh konsentrasi ekstrak dan fraksi kulit batang senggugu terhadap % hambatan pembentukan biofilm MRSA dengan nilai  $IC_{50}$  ekstrak etanol:  $0,98 \pm 0,87$  mg/mL; fraksi heksan:  $0,40 \pm 0,12$  mg/mL; fraksi etil asetat:  $0,35 \pm 0,02$  mg/mL; dan fraksi air:  $0,45 \pm 0,40$  mg/mL (daya hambat kanamisin 1 mg/mL adalah  $83,44 \pm 0,60\%$ ). ◆ = Ekstrak etanol; ■ = fraksi heksan; ▲ = fraksi etil asetat; × = fraksi air.



ekstrak dan fraksi uji. Sinyal molekuler bakteri Gram positif dilaporkan berupa senyawa peptida, sedangkan sinyal bakteri Gram negatif berupa senyawa AHLs (*N-acylhomoserine lactones*)<sup>(23)</sup>.

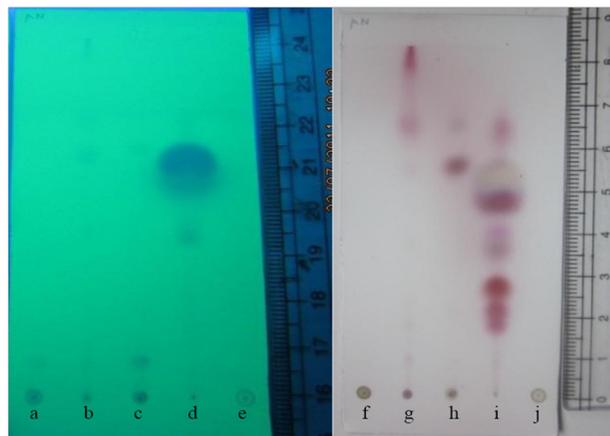
Minyak atsiri buah kapulaga diketahui memiliki aktivitas hambatan pembentukan biofilm dan degradasi biofilm terhadap *S. mutans* dengan harga  $IC_{50}$  dan  $EC_{50}$  sebesar 0,015% (v/v) dan 0,031% (v/v). Dilaporkan pula bahwa senyawa yang bertanggung jawab atas aktivitas antibakteri tersebut adalah senyawa sineol (golongan terpenoid)<sup>(16)</sup>. Untuk memastikan hal tersebut, maka pada penelitian ini dibandingkan profil KLT antara ekstrak heksan dan minyak atsiri kapulaga. Hasil penelitian menunjukkan bahwa profil KLT yang ditunjukkan berbeda, sehingga kemungkinan terdapat kandungan senyawa lain selain sineol yang berkontribusi terhadap aktivitas hambatan pembentukan biofilm. Terlebih lagi pada penelitian ini fraksi heksan diperoleh dari residu ekstrak etanol yang sebelumnya telah didelipidasi dengan PE, sehingga kandungan minyak atsiri kapulaga kemungkinan telah tersari di fraksi PE.

Perbandingan profil KLT dengan minyak atsiri juga dilakukan terhadap fraksi heksan rimpang temu putri. Terdapat peredaman bercak pada hRf yang sama yaitu 69 dan 81 (fase gerak toluen-etil asetat (93:7 v/v), deteksi UV 254 nm), sedangkan penyemprotan dengan anisaldehyd- $H_2SO_4$  juga memperlihatkan bercak dengan warna dan hRf yang sama yaitu warna ungu pada hRf 81 (Gambar 7), yang secara kualitatif memperlihatkan bahwa terdapat komponen minyak atsiri yang larut dalam fraksi heksan rimpang temu putri. Mengingat bahwa fraksi heksan memiliki nilai  $IC_{50}$  yang hampir sama dengan fraksi aktif ekstrak etanol, maka diduga bahwa komponen minyak atsiri rimpang temu putri merupakan komponen yang bertanggung jawab terhadap aktivitas antibiofilm pada ekstrak etanol dan fraksi heksan.

Secara umum, semua fraksi etil asetat dari sampel uji menunjukkan aktivitas hambatan pembentukan biofilm paling besar terhadap *E. coli* dan aktivitas hambatan tersebut berkorelasi positif dengan peningkatan konsentrasi sampel uji. Fraksi etil asetat dari kapulaga dan senggugu mengandung senyawa fenolik dan flavonoid selain senyawa terpenoid, sedangkan analisis KLT pada fraksi etil asetat rimpang temu putri menunjukkan keberadaan senyawa terpenoid dan senyawa yang mengabsorpsi cahaya pada panjang gelombang 366 nm.

### SIMPULAN

Ekstrak dan fraksi kapulaga, temu putri dan senggugu memiliki aktivitas hambatan pembentukan biofilm



**Gambar 7. Profil KLT ekstrak etanol, fraksi heksan, fraksi etil asetat, fraksi air dan minyak atsiri rimpang temu putri.**  
Keterangan: Fase diam: silika gel gel 60 F<sub>254</sub>, fase gerak: toluen-etil asetat (93:7 v/v); KLT pertama diamati pada UV<sub>254</sub>, KLT kedua diamati dengan pereaksi anisaldehyd  $H_2SO_4$ ; a: ekstrak etanol rimpang temu putri, b: fraksi heksan rimpang temu putri, c: fraksi etil asetat rimpang temu putri, d: minyak atsiri rimpang temu putri, e: fraksi air rimpang temu putri, f: ekstrak etanol rimpang temu putri, g: fraksi heksan rimpang temu putri, h: fraksi etil asetat rimpang temu putri, i: minyak atsiri rimpang temu putri, j: fraksi air rimpang temu putri.

yang berbeda-beda terhadap MRSA ataupun *E. coli*. Ekstrak/fraksi yang memiliki aktivitas hambatan paling besar terhadap MRSA adalah fraksi heksan kapulaga dengan  $IC_{50}$  0,23±0,01 mg/mL dan temu putri dengan  $IC_{50}$  0,45±0,03 mg/mL serta fraksi etil asetat senggugu dengan  $IC_{50}$  0,35±0,02 mg/mL. Aktivitas hambatan terbesar terhadap biofilm *E. coli* ditunjukkan oleh fraksi etil asetat baik dari kapulaga dengan nilai  $IC_{50}$  0,32±0,17 mg/mL, temu putri dengan  $IC_{50}$  0,46±0,03 mg/mL dan senggugu dengan  $IC_{50}$  0,39±0,02 mg/mL.

### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Bapak Joko Santosa, M.Si. (Laboratorium Farmakognosi, Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada) yang telah melakukan identifikasi tumbuhan uji.

### DAFTAR PUSTAKA

1. Dewanti-Hariyadi R. Pembentukan biofilm bakteri pada permukaan padat. Buletin Teknologi dan Industri Pangan. 1997.8(1):70-6.
2. Lewis K. Riddle of biofilm resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2001.45(4):999-1007.
3. Coast J, Smith R, Miller M. Superbugs: Should antimicrobial resistance be included as a cost in economic evaluation?. Health Economics. 1996. 5:217-26.
4. Quave CL, Plano LRW, Pantuso T, Bennett BC. 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.
5. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Mikrobiologi kedokteran. Diterjemahkan oleh Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran UNAIR. Jakarta: Salemba Medika; 2001. 235.
  6. Cetin TE, Gurler N. Bacterilerin antibiyotiklere duyarlilik deneylerinin yapilmasi. *Kukem Derg*. 1989.12:2-3.
  7. Agaoglu S, Dostbil N, and Alemder S. Antimicrobial effect of seed extract of Cardamom (*Elettaria cardamomum* Maton), *YYU Vet Fak Derg*. 2005. 16(2):99-101.
  8. Gucin F, Dulger B, Ozbauram HC. Turkiye'de yetistirilen kultur mantari cesitlerinin antimikrobiyal, Aktivitesi X111, Ulusal Biyoloji Kongresi, Istanbul city, 2005.
  9. Rakhmawati M. Daya antibakteri minyak atsiri rimpang kunci pepet (*Kaempferia rotunda* L.) terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922 serta uji toksisitas terhadap larva *Artemia salina* Leach [skripsi]. Yogyakarta: Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada; 2001.
  10. Ferawaty. Uji daya penghambatan ekstrak polar, semipolar dan non polar dari kulit batang senggugu (*Clerodendrum serratum* (L.) Moon.) terhadap kontraksi otot polos trakea marmut terisolasi karena pemberian histamin [skripsi]. Yogyakarta: Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada; 2000.
  11. Koo H, Hayacibara MF, Schobel BD, Cury JA, Rosalen PA, Park YK, et al. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm accumulation and polysaccharide production by apigenin and tt-farnesol. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003.52:782-9.
  12. Backer AC, Van Den Brink BCR. Flora of Java (*Spermatophytes* only). Vol II. Groningen: N.V.P. Noordhoff; 1965.
  13. Departemen Kesehatan RI. Parameter standar umum ekstrak tumbuhan obat. Cetakan Pertama. Jakarta: Departemen Kesehatan RI; 2000. 9-11, 31.
  14. Ando E, Monden K, Mitsuhata R, Kariyama R and Kumon H. Biofilm formation among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from patient with urinary tract infection. *Acta Med. Okayama*. 2004.58(4):207-14.
  15. Stickler D, Dolman J, Chawla J. Activity of antiseptics against *Escherichia coli* growing as biofilms on silicone surfaces. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1989.8(11):974-8.
  16. Djordjevic D, Wiedmann M, McLandsborough LA. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*. 2002.68(6):2950-8.
  17. Hertiani T, Pratiwi SUT, Irianto IDK, Adityaningrum D, Pranoto B. Effect of Indonesian medicinal plants essential oils on *Streptococcus mutans*. *Indonesian Journal of Pharmacy*. 2011.22(3):174-81.
  18. Jork H, Funk W, Fischer W, Wimmer H. Thin layer chromatography reagent and detection methods. Vol. 1. Weinheim: WCH; 1990.
  19. Harborne JB. Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plant analyses. 3<sup>rd</sup> ed. London: Chapman & Hall; 1998. 135-6.
  20. Waksmundzka-Hajnos M, Sherma J, Kowalska T. Overview of the field of TLC in phytochemistry and the structure of the book. In: Waksmundzka-Hajnos M, Sherma J, Kowalska T. *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*. Boca Raton: CRC Press; 2008. 5-9.
  21. Nobile CJ, Mitchel AP. Microbial biofilms: e pluribus unum. *Current Biology*. 2007.17(10):349.
  22. Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilm grown in microtiter plates. *Journal of Microbiological Methods*. 2007.72:157-65.
  23. Niu C, Gilbert ES. Colorimetric method for identifying plant essential oil components that affect biofilm formation and structure. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004.12(70):6951-6.
  24. Hentzer M, Givskov M. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *J Clin Invest*. 2002.112:1300-7.