

Aktivitas Ekstrak Etanol Daun Cincau Hijau (*Cyclea barbata Miers*) sebagai Penghambat Pembentukan Biofilm Bakteri *Salmonella typhi*

The Activity of Ethanolic Extract of Cyclea barbata Miers as Inhibitor of Bacterial Biofilm Formation of Salmonella typhi

¹Dimes Atika Permanasari, ²Elly Nurus Sakinah, ^{3,4}Ali Santosa

¹Mahasiswa Fakultas Kedokteran, Universitas Jember

²Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran, Universitas Jember
Jalan Kalimantan No. 37 Kampus Tegalboto Jember Kode Pos 68121

³SMF Ilmu Penyakit Dalam, RSD dr.Soebandi Jember

⁴Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Jl. dr.Soebandi No. 124, Jember 68111, Indonesia. Telp.: (+62331) 487441. Fax: (+62331) 487564
e-mail : dimesatika@ymail.com

ABSTRAK

Biofilm merupakan matriks yang terdiri dari *extracellular polysaccharides* yang berasal dari sel mikrobial yang bereplikasi melekat secara *irreversible* pada permukaan. Biofilm pada bakteri *S.typhi strain DT104* dapat mengeluarkan senyawa untuk perlindungan. Biofilm dapat menempel pada permukaan alat makan, sehingga menyebabkan sumber kontaminasi pada makanan. Daun cincau hijau (*Cyclea barbata Miers*) merupakan tumbuhan yang memiliki flavonoid yang dapat menjadi penghambat pembentukan biofilm pada bakteri. Flavonoid merupakan golongan senyawa fenol yang berfungsi sebagai antibakteri dengan membentuk senyawa kompleks yang mengganggu keutuhan membran sel dan penghambat biofilm pada bakteri. Penelitian ini bertujuan mengetahui aktivitas daun cincau hijau sebagai penghambat pembentukan biofilm *S.typhi DT 104*. Penelitian ini menggunakan rancangan penelitian *Quasy Experimental* dengan design studi rancangan acak lengkap. Penelitian ini menggunakan 28 sampel yang terdiri dari 5 kelompok dosis ekstrak daun cincau hijau dengan dosis 0.29 mg/ml, 0.33 mg/ml, 0.40 mg/ml, 0.50 mg/ml, 0.67 mg/ml, kelompok positif (suspensi bakteri dengan H₂O₂) dan kelompok negatif (suspensi bakteri dengan H₂O). Hasil penelitian ini menunjukkan peningkatan dosis akan mempengaruhi penurunan biofilm yang ditunjukkan penurunan *Optical Density*. Dengan uji *One Way Anova* adalah $p=0,004$. Dapat disimpulkan ekstrak etanol daun cincau hijau mampu menghambat pembentukan biofilm pada *S.typhi DT 104* dan terdapat hubungan antara konsentrasi ekstrak etanol daun cincau hijau dengan penghambatan pembentukan biofilm bakteri *S.typhi*.

Kata kunci: biofilm, daun cincau hijau, *S.typhi*

ABSTRACT

Biofilm is a matrix consist of extracelullar polysaccharides from the replication of microbial cells that are irreversibly attached on the cell surface. Biofilm in bacteria S.typhi strain DT104 contains food substance for protection. Biofilm can be attached to the clutery, causing food contaminaton. Cyclea barbata Miers is a plant has flavonoid that can inhibited bacteria biofilm formation. Flavonoid is phenolic compounds that has function as antibacterial by forming complex compounds disturbing the integrity of cell membranes and inhibiting biofilm. This study aims to determine the activity of the Cyclea barbata Miers as inhibitor of S.typhi DT 104 biofilm formation. This study used Quasy Experimental design with completely randomized design This study used 28 samples consist of 5 doses groups (0.29 mg/ ml, 0.33 mg / ml, 0.40 mg / ml, 0.50 mg / ml, 0.67 mg / ml), positive group (a bacterial suspension with H2O2) and negative group (a bacterial suspension with H2O) The result showed that the increasing doseof extract will decrease the biofilm formation revealed by decreasing of Optical Density and showed One Way Anova test resulted $p = 0.004$. In conclusion, the ethanolic extract of Cyclea barbata Miers was able to inhibit S.typhi DT 104 biofilm formation and there was a correlation between the concentration of ethanoic extract of Cyclea barbata Miers and inhibition of S.typhi biofilm formation.

Key words: biofilm, *Cyclea barbata Miers*, *S.typhi*

Pendahuluan

Infeksi bakteri *S.typhi* penyebab demam tifoid merupakan salah satu kasus tertinggi bagi kesehatan khususnya di Indonesia. Penyakit ini mempunyai faktor resiko dari lingkungan dan perilaku kebersihan sehari-hari yang rendah, maka terjadilah angka kejadian dari penyakit demam tifoid. WHO (*World Health Organization*) memperkirakan terdapat sekitar 17 juta kasus per tahun dengan 600.000 kasus meninggal dunia dikarenakan demam tifoid (Depkes RI, 2013). Dari data Departemen Kesehatan pada tahun 2010 (Depkes RI, 2010), menjelaskan bahwa penderita demam tifoid dan paratifoid yang tercatat dirawat di Rumah Sakit sebanyak 41.081 kasus dan 279 pasien diantaranya telah meninggal.

Biofilm merupakan matriks yang terdiri dari *extracellular polysaccharides* berasal dari bakteri yang bereplikasi melekat secara *irreversible* pada permukaan (Williamson, *et al*, 2009). Mekanisme biofilm yang terbentuk oleh *S.typhi DT 104* dapat dihambat dari beberapa strategi intervensi yang mampu mengganggu dan mencegah terbentuknya biofilm. Beberapa contoh seperti disinfektan dan senyawa molekul alami yang dapat menghambat pembentukan biofilm (Gunardi, 2014).

Ekstrak daun cincau hijau memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E. coli* dan *S. typhi* yang ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambat dikarenakan aktivitas senyawa flavonoid (Asmardi, *et al*, 2014). Kandungan flavonoid dalam daun cincau juga dapat berfungsi sebagai penghambat pembentukan biofilm dengan cara menghambat ekspresi gen bakteri (Loresta, *et al*, 2012).

Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui aktivitas ekstrak etanol daun cincau hijau sebagai penghambat pembentukan biofilm pada bakteri dan mengetahui hubungan konsentrasi ekstrak etanol dengan penghambatan pembentukan biofilm *S.typhi*.

Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *quasy experimental* menggunakan studi rancangan acak lengkap. Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan 7 sampel yaitu 5 dosis ekstrak secara

serial, kontrol positif dan kontrol negatif dengan 4 kali replikasi. Variabel bebas yang digunakan adalah dosis ekstrak daun cincau hijau 0.29 mg/ml, 0.33 mg/ml, 0.40 mg/ml, 0.50 mg/ml, 0.67 mg/ml dan variabel terikat adalah penghambatan biofilm bakteri *S.typhi strain DT 104*. Pada kelompok kontrol negatif adalah suspensi bakteri dengan H₂O yang dapat membentuk biofilm, sedangkan kelompok positif adalah suspensi bakteri dengan H₂O₂ yang tidak dapat membentuk biofilm.

Pengujian efek ekstrak etanol daun cincau hijau menggunakan metode Microtiter Plate Biofilm Assay (Loresta, *et al*, 2012). Bakteri yang diinkubasi selama 24 jam pada media *Mueller Hinton Broth* (MHB). Kemudian jumlah bakteri diukur menggunakan metode 0,5 Mc Farland standart. Pada masing-masing plate diberikan MHB sebanyak 50 mL/well dan bakteri, kemudian pada kelompok perlakuan diberikan konsentrasi ekstrak sebanyak 100 ml/well. Pada kontrol negatif ditambahkan H₂O₂ sebanyak 100 ml/well, sedangkan kelompok positif ditambahkan H₂O sebanyak 100ml/well. Kemudian diinkubasi selama 24 jam. Mikroplate dicuci dengan *Phospat Buffer Saline* (PBS) steril sebanyak tiga kali. Ditambahkan 200 µL metanol selama 15 menit kemudian dibuang dan dikeringkan. Ditambahkan 200 µL kristal violet 0,1% selama 5 menit. Dicuci dengan PBS dan ditambahkan 200 µL asam asetat glacial 33%, kemudian dibaca hasilnya menggunakan *microplate reader* (BIO-RAD Model 550) pada panjang gelombang 570nm. Hasil pembacaan merupakan nilai absorbansi atau *Optical Density* (OD) yang menggambarkan kuantitas pembentukan biofilm.

Analisis data yang digunakan dalam penelitian ini adalah *One Way Anova* dengan taraf signifikan $p < 0,05$. Serta menggunakan uji Korelasi dan Regresi untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun cincau hijau terhadap penghambatan biofilm bakteri *S.typhi*

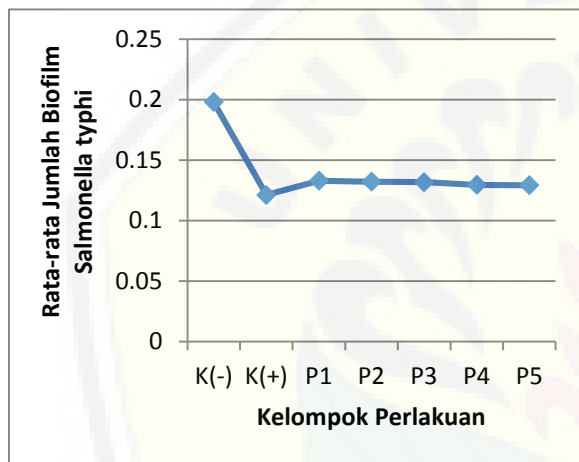
Hasil Penelitian

Hasil penelitian rata-rata biofilm bakteri *S.typhi* terlihat pada Tabel 1 berikut ini.

Tabel 1. Rata-rata Biofilm *S.typhi*

Kelompok	Rata-rata biofilm ± SD
K (+)	0,198±0,058
K (-)	0,121±0,007
P1	0,133±0,132
P2	0,132±0,006
P3	0,131±0,016
P4	0,129±0,0129
P5	0,129±0,0129

Untuk mengetahui seberapa besar efek ekstrak etanol 96% daun cincau hijau terhadap penghambat pembentukan biofilm *S.typhi* bisa terlihat pada Gambar 1 berikut ini.



Gambar 1. Grafik penurunan biofilm *S.typhi*

Berdasarkan uji normalitas Shapiro Wilk didapatkan nilai $p > 0,05$ untuk semua kelompok penelitian untuk biofilm *S.typhi*. Uji homogenitas menunjukkan nilai $p = 0,795$. Uji One Way Anonova menunjukkan nilai $p = 0,04$, yang artinya terdapat perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan. Uji korelasi Pearson didapatkan nilai signifikan $p = 0,011$ yang menunjukkan terdapat hubungan antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Pada uji regresi ditemukan persamaan $y = -0,10x + 0,178$ dan koefien determinasi sebesar $0,261$, hal ini menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi ekstrak etanol daun cincau hijau maka semakin besar penurunan biofilm bakteri *S.typhi*. Semakin besar konsentrasi ekstrak maka semakin besar pula kandungan zat aktif flavonoid yang terkandung dalam ekstrak tersebut.

Pembahasan

Pada penelitian ini, semua kelompok perlakuan diberi ekstrak etanol daun cincau hijau yang mempunyai efek penghambatan pembentukan biofilm dibandingkan dengan kontrol negatif. Kontrol negatif yaitu *S.typhi* yang hanya ditambahkan dengan H_2O menunjukkan produksi biofilm yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok lainnya. Hal ini berarti bakteri *S.typhi strain DT104* dapat membentuk biofilm.

Flavonoid yang terkandung dalam ekstrak daun cincau hijau dimungkinkan mampu menekan ekspresi *gen yjcC* pada *S.typhi* yang mengakibatkan peningkatan pembentukan biofilm. Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa faktor seperti produksi zat *exopolymeric*, ekspresi flagella dan regulasi *exoribonucleases* dapat terlibat dalam pembentukan biofilm *S.typhi* (Kim dan Wei, 2009). Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya dengan bakteri gram positif, bahwa mekanisme kerja flavonoid berfungsi sebagai antibakteri dengan cara membentuk senyawa kompleks terhadap protein ekstraseluler yang mengganggu keutuhan membran sel bakteri. Mekanisme kerjanya dengan cara mendenaturasi protein sel bakteri dan merusak membran sel tanpa dapat diperbaiki lagi (Juliantina, et al, 2008). *Minimum Biofilm Inhibition Concentration* (MBIC) merupakan konsentrasi terendah dari suatu bahan antibiofilm yang dapat menghambat pembentukan biofilm (Chamdit dan Siripermpool, 2012). Pada kadar flavonoid yang lebih pekat, maka dapat mencapai MBIC pada bakteri *S.typhi*.

Pada Uji Korelasi Pearson didapatkan hasil signifikansi $p = 0,011$. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun cincau hijau dapat menghambat pembentukan biofilm pada bakteri *S.typhi* secara in vitro dan terdapat hubungan antara konsentrasi ekstrak daun cincau hijau dengan penghambatan pembentukan biofilm dengan arah korelasi negatif, semakin besar konsentrasi ekstrak etanol daun cincau hijau maka semakin tinggi penghambatan pembentukan biofilm pada bakteri dengan kekuatan korelasi sedang $p = -0,511$.

Persamaan regresi yang didapat dalam penelitian ini $y = -0,010 + 0,178x$ dan koefisien determinasi sebesar $R^2 = 0,261$. Hal ini menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi ekstrak etanol daun cincau hijau maka semakin tinggi pula potensi untuk menghambat pembentukan dengan pengaruh sebesar 26%. Semakin besar konsentrasi ekstrak maka semakin besar kandungan zat aktif tanin dan flavonoid yang terkandung dalam ekstrak tersebut, sehingga semakin besar pula pengaruh dalam menghambat pembentukan biofilm (Loresta, *et al*, 2012).

Simpulan dan Saran

Berdasarkan hasil dari penelitian dapat disimpulkan aktivitas daun cincau hijau (*Cyclea barbata* Miers)

dapat menghambat pembentukan biofilm pada bakteri *S.typhi* secara *in vitro*, dan terdapat hubungan antara ekstrak daun cincau hijau dan bakteri *S.typhi* dengan semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol daun cincau hijau yang diberikan maka semakin rendah pembentukan biofilm bakteri *S.typhi*.

Berdasarkan kesimpulan diatas, pada penelitian tersebut saran yang diberikan peneliti adalah penelitian lebih lanjut mengenai efek antibiofilm dari ekstrak daun cincau hijau terhadap bakteri Gram negatif lainnya. Serta dapat menggunakan metode lain seperti Mikroskop elektron dan *Media Congo Red Agar* (MCRA) sebagai indikator pembentukan biofilm secara kualitatif.

Daftar Pustaka

- Asmardi A, Roza RM, Fitmawati. *Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Cyclea babata(L) Miers. Terhadap Bakteri Escherichia coli dan S.typhi*. Pekanbaru: Fakultas MIPA Universitas Riau; 2014
- Chamdit S dan Siripermpool P. *Antimicrobial Effect of Clove and Lemongrass Oils against Planktonic Cells and Biofilms of Staphylococcus aureus*, Mahidol University :J. Pharm. Sci; 2012
- Depkes RI. *Profil Kesehatan Indonesia*, Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia; 2010
- Depkes RI. *Sistematika Pedoman Pengendalian Penyakit Demam Tifoid*. Jakarta: Direktorat Jendral Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan; 2013
- Gunardi WD. *Peranan Biofilm dalam Kaitannya dengan Penyakit Infeksi*. Jakarta: FK UKRIDA; 2014
- Juliantina F, Citra DA, Nirwani B, Nurmasitoh T, Bowo ET. *Manfaat Sirih Merah (Piper crocatum) Sebagai Agen Anti Bakterial Terhadap Bakteri Gram Positif dan Gram Negatif*. Uii. Yogyakarta (<http://journal.uii.ac.id>); 2008
- Kim, SH, Wei, Cl. *Molecular characterization of biofilm formation and attachment of Salmonella*

enterica serovar typhimurium DT104 on food contact surfaces. Available from:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19777884>; 2009

Loresta S, Murwani S, Trisunuwati P. *Efek Ekstrak Etanol Daun Kelor (Moringa oleifera) terhadap Pembentukan Biofilm Staphylococcus aureus secara In Vitro*. Malang: FKH Universitas Brawijaya; 2012

Williamson AE, Cardon JW, Drake DR. *Antimicrobial susceptibility of monoculture biofilms of a clinical isolate of Enterococcus faecalis*. J Endod; 2009