

## Aktivitas *Antibiofilm* Getah Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.) pada *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Rosmalinda Utami<sup>1)\*</sup>, Siti Rahmatul Aini<sup>1)</sup>, Dyke Gita Wirasisya<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Program Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universitas Mataram

Diterima 01 Januari 2019, direvisi 11 Maret 2019

### ABSTRAK

Infeksi nosokomial di seluruh dunia menunjukkan angka yang tinggi. Salah satu penyebab infeksi nosokomial adalah bakteri *Staphylococcus aureus*. *S. aureus* sebagai patogen penginfeksi diketahui dapat membentuk *biofilm* yang sering menyebabkan kegagalan terapi antibiotik. Jarak pagar merupakan salah satu tanaman yang digunakan masyarakat dalam mengobati berbagai penyakit, diantaranya digunakan dalam pengobatan infeksi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas *antibiofilm* getah jarak pagar pada *S. aureus* menggunakan metode mikrodilusi dengan pewarnaan kristal violet. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak getah jarak pagar memiliki aktivitas *antibiofilm*, dengan persen penghambatan *biofilm* sebesar 150% pada konsentrasi 0.625 mg/mL, sedangkan persen degradasi sebesar 189% pada konsentrasi 5 mg/mL. Ekstrak getah jarak pagar memiliki aktivitas penghambatan *biofilm* pada konsentrasi ekstrak 0.625 mg/mL dan degradasi *biofilm* pada konsentrasi ekstrak 5 mg/mL. Hasil penelitian kedepan dapat dimanfaatkan sebagai obat topikal untuk luka infeksi.

**Kata kunci:** getah; *Jatropha curcas* L.; antibakteri; *antibiofilm*.

### ABSTRACT

Nosocomial infections worldwide shows high rates. One of the causes of nosocomial infections is *Staphylococcus aureus*. *S. aureus* as an infectious pathogen is known to form biofilms that often cause failure of antibiotic therapy. *Jatropha* is one of the plants used by the community in treating various diseases, including infections. The purpose of this study was to determine the *jatropha* latex *antibiofilm* activity on *S. aureus* by microdilution method with crystal violet staining. The results showed that *jatropha* latex extract had *antibiofilm* activity, with *biofilm* inhibition percentages of 150% at concentrations of 0.625 mg/mL, while percent degradation was 189% at concentrations of 5 mg/mL. *Jatropha* latex extract had *biofilm* inhibition activity at extract concentrations of 0.625 mg/mL and *biofilm* degradation at extract concentration of 5 mg/mL. The result of this study can be used as topical drugs for infectious wounds.

**Keywords:** latex; *Jatropha curcas* L.; antibacterial; *antibiofilm*.

### PENDAHULUAN

Infeksi nosokomial kini menjadi perhatian di seluruh dunia, karena meningkatkan morbiditas dan mortalitas pasien [1]. Berdasarkan survei yang dilakukan oleh WHO di 55 rumah sakit di 14 negara yang mewakili 4 wilayah WHO (Eropa, Mediterania Timur, Asia Tenggara dan Pasifik Barat) menunjukkan rata-rata 8,7% pasien di rumah sakit mengalami infeksi

nosokomial. Infeksi nosokomial dapat berupa infeksi kronis, yaitu infeksi yang timbul oleh pemasangan implant dan kateter. Infeksi ini diketahui disebabkan oleh bakteri yang membentuk *biofilm* [2].

*Biofilm* merupakan suatu bentuk komunitas mikroorganisme yang melekat pada suatu permukaan yang membuat perlindungan diri dengan membentuk matriks EPS (*extracellular polymeric substance*) [3]. Bakteri yang membentuk *biofilm* akan menjadi lebih sulit untuk dimusnahkan karena timbulnya resistensi terhadap antibiotik. Bakteri tersebut menjadi 10-1000 kali lebih resisten terhadap efek antibiotik [4].

\*Corresponding author:

E-mail: rosmalindautami@gmail.com

Berdasarkan hal tersebut, di era sekarang fokus penelitian pun berkembang terhadap pencarian senyawa yang bersifat sebagai *antibiofilm*, salah satunya adalah senyawa yang berasal dari bahan alam. Salah satu tanaman yang semenjak dahulu dipercaya bermanfaat dalam pengobatan dan telah diteliti memiliki aktivitas antimikroba adalah jarak pagar (*Jatropha curcas* L.). Getah jarak pagar telah dilaporkan memiliki aktivitas antimikroba. Aktivitas antimikroba yang dihasilkan oleh getah disebabkan oleh adanya senyawa tanin, flavonoid dan saponin yang terkandung di dalamnya [5]. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas *antibiofilm* getah jarak pagar terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*.

## METODE PENELITIAN

**Pengambilan Getah Jarak Pagar.** Getah jarak pagar diperoleh dengan cara menyayat atau melukai batang jarak pagar dengan pisau, dengan panjang sayatan sekitar 10 cm dan kedalaman 0,5 cm, kemudian getah yang keluar ditampung menggunakan wadah steril. Selanjutnya sampel getah segera disimpan ke dalam *freezer*.

**Ekstraksi.** Ekstraksi yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Ekstraksi dilakukan selama 3 hari dengan dua kali remaserasi. Maserat yang diperoleh kemudian diuapkan pelarutnya menggunakan rotary evaporator.

**Skrining fitokimia.** Identifikasi saponin diperoleh melalui proses menimbang sampel sebanyak 1 gram, yang kemudian tambahkan dengan 20 mL aquadest sebagai pelarut. Setelah itu campuran ekstrak dan aquadest tersebut dipanaskan beberapa saat hingga ekstrak benar-benar larut. Setelah ekstrak larut kemudian disaring, dimasukkan beberapa mL ke dalam tabung reaksi, kemudian digojog selama kurang lebih 10 detik. Setelah terbentuk busa yang stabil selama lebih kurang 10 menit setinggi 1-10 cm, kemudian ditambahkan beberapa tetes HCl 0.1 N, apabila busa tetap stabil, menandakan adanya senyawa saponin.

Identifikasi flavonoid dilakukan dengan meletakkan sampel pada plat KLT menggunakan pipa kapiler. Kemudian dielusikan menggunakan eluen kloroform: etil asetat dengan perbandingan

6 : 4. Setelah itu, plat hasil elusi disemprot menggunakan  $\text{AlCl}_3$  5%. Kemudian diamati bercak pada sinar UV [6].

Selain flavonoid yang diidentifikasi dilakukan juga identifikasi tannin. Identifikasi tannin dilakukan dengan meletakkan sampel pada plat KLT menggunakan pipa kapiler. Kemudian dielusikan menggunakan etil asetat : metanol : air dengan perbandingan 10 : 1.35 : 1. Setelah itu, plat hasil elusi disemprot menggunakan  $\text{FeCl}_3$  5%. Kemudian diamati bercak pada sinar UV [6].

**Pengujian Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM).** Pengujian KHM dilakukan dengan metode dilusi cair, menggunakan 10 tabung untuk perlakuan dan 4 tabung masing-masing untuk kontrol positif, kontrol negatif, kontrol sterilitas serta kontrol pelarut. Kontrol positif terdiri dari 3 mL antibiotik siprofloksasin dan 3 mL suspensi bakteri. Kontrol negatif terdiri dari 3 mL TSB dan 3 mL suspensi bakteri. Kontrol sterilitas terdiri dari 3 mL media TSB dan 3 mL aquadest steril. Kontrol pelarut terdiri dari 3 mL DMSO 5% dan 3 mL suspensi bakteri. Langkah-langkah pengujian KHM dan KBM, yaitu:

1. Tabung 2-10 masing-masing dimasukkan media TSB sebanyak 3 mL
2. Kemudian tabung 1 dan 2 dimasukkan ekstrak sampel sebanyak 3 mL. Setelah itu diambil sebanyak 3 mL ekstrak sampel pada tabung 2 untuk dipindahkan ke tabung 3. Tabung 3 dikocok homogen, kemudian diambil sebanyak 3 mL, untuk dipindahkan ke tabung 4. Begitu seterusnya hingga ke tabung 10. Pada tabung 10, 3 mL yang diambil dibuang.
3. Selanjutnya ditambahkan 3 mL suspensi bakteri ke dalam masing-masing tabung perlakuan.
4. Setelah itu seluruh tabung perlakuan, kontrol positif, kontrol negatif, kontrol sterilitas dan kontrol pelarut diinkubasikan selama 18-24 jam pada suhu  $37^\circ\text{C}$ .
5. KHM ditentukan dengan melihat kejernihan tabung pada konsentrasi terkecil dari ekstrak sampel setelah diinkubasi.
6. Tabung-tabung yang jernih kemudian dikultur pada media TSA, setelah itu diinkubasikan 18-24 jam pada suhu  $37^\circ\text{C}$ . Tabung yang tidak memperlihatkan pertumbuhan bakteri dengan konsentrasi terkecil ditentukan sebagai nilai KBM.

**Uji penghambatan Biofilm.** Suspensi bakteri diinokulasi bersama dengan ekstrak sampel dengan konsentrasi yang berbeda-beda pada *microplate* 96-well polystyrene. Kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Sumur yang mengandung kultur bakteri dan TSB namun tidak ada ekstrak sampel berfungsi sebagai kontrol positif; sumur yang tidak mengandung ekstrak sampel maupun kultur bakteri tapi TSB sendiri berfungsi sebagai kontrol sterilitas; sumur yang mengandung suspensi bakteri dengan DMSO 5% sebagai kontrol pekarut; sumur yang mengandung ekstrak sampel dengan media TSB sebagai blanko sampel; sumur yang mengandung media TSB dengan DMSO 5% sebagai blanko pelarut. Setelah 24 jam inkubasi, sel planktonik (tidak terikat) dilepaskan. Biofilm kemudian diwarnai dengan 200 µl kristal violet 0,25% selama 10 menit dan dicuci bersih sebanyak 2 kali dengan NaCl fisiologis. Kemudian *microplate* yang sudah diwarnai dikeringkan selama semalam, kemudian diekstraksi menggunakan 200 µL campuran pelarut aseton dan alkohol absolut (1:1) selama 15 menit. Setelah itu, 20 µL larutan hasil ekstraksi ditambahkan ke dalam 180 µL pelarut (aseton : alkohol absolut, 1:1) pada *microplate* yang baru. Kemudian diukur absorbansinya menggunakan *ELISA reader* pada panjang gelombang 570 nm [7].

**Uji Degradasi Biofilm.** Suspensi bakteri dan media TSB dimasukkan ke dalam *microplate* 96-well polystyrene dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi selama 24 jam, kemudian sel planktonik dihilangkan, lalu pada *microplate* 96-well polystyrene ditambahkan ekstrak jarak pagar konsentrasi yang berbeda dan media TSB yang baru. Setelah

itu, diinkubasi kembali selama semalam pada suhu 37°C. Setelah diinkubasi, seluruh ekstrak dihilangkan dan sumur dicuci dengan NaCl fisiologis sebanyak 3 kali. Sel yang menempel atau biofilm kemudian diwarnai menggunakan 200 µL kristal violet 0.25% selama 10 menit menggunakan mikropipet, kemudian dicuci kembali dengan NaCl fisiologis sebanyak 2 kali. Kemudian *microplate* yang sudah diwarnai dikeringkan selama semalam, kemudian diekstraksi menggunakan 200 µL campuran pelarut aseton dan alkohol absolut (1:1) selama 15 menit. Setelah itu, 20 µL larutan hasil ekstraksi ditambahkan ke dalam 180 µL pelarut (aseton: alkohol absolut, 1:1) pada *microplate* yang baru. Kemudian diukur absorbansinya menggunakan *ELISA reader* pada panjang gelombang 570 nm [7]. Perhitungan pengurangan massa biofilm menggunakan persamaan berikut [8]:

$$pengurangan (\%) = \left( \frac{ODs - ODbs}{ODp} \right) \times 100\% \quad (1)$$

Keterangan:

ODs = Optical Density sampel

ODbs = Optical Density blanko sampel

ODp = Optical Density pelarut

## HASIL DAN PEMBAHASAN

**Skrining Fitokimia.** Adanya flavonoid pada suatu sampel ditandai dengan timbulnya bercak berwarna kuning pada plat KLT yang terlihat pada sinar tampak maupun di bawah UV 366 setelah disemprot dengan AlCl<sub>3</sub> 5%, namun pada penelitian yang dilakukan tidak terjadi pembentukan warna pada plat KLT setelah disemprot dengan AlCl<sub>3</sub> 5% (Tabel 1.).

Tabel 1. Hasil skrining fitokimia ekstrak getah jarak pagar

Senyawa	Pereaksi	Hasil	Keterangan
Flavonoid	AlCl <sub>3</sub> 5%	Noda tidak berwarna kuning	Negatif
Tanin	FeCl <sub>3</sub> 5%	Noda berwarna hitam	Positif
Saponin	Aquadest	Ada busa	Positif
Saponin	HCl	Busa tidak hilang	Positif

Skrining fitokimia tanin yang dilakukan menunjukkan bahwa sampel positif mengandung tanin, karena saat noda pada plat KLT disemprot dengan FeCl<sub>3</sub> 5% terbentuk warna hitam (Tabel 1). Warna hitam yang terbentuk saat sampel

disemprot dengan FeCl<sub>3</sub> merupakan reaksi dari gugus fenol pada struktur tanin berikatan dengan FeCl<sub>3</sub> [9].

Saponin merupakan glikosida yang bersifat sebagai sabun, dengan ciri khas adanya busa

pada sampel yang mengandung saponin. Hasil identifikasi sampel positif terbentuk busa yang stabil (Tabel 1). Terbentuknya busa saat penggojokkan sampel yang dicampur dengan air disebabkan karena terbentuknya misel pada saat penggojokkan, di mana bagian polar menghadap keluar sedangkan bagian nonopolar menghadap ke dalam, hal inilah yang terlihat seperti busa [9].

**Pengujian KHM dan KBM.** Hasil KHM yang diperoleh pada pengujian adalah pada konsentrasi 1.25 mg/mL, hasil ini ditentukan dengan melihat tabung yang pertama kali jernih. Tabung-tabung yang terlihat jernih, yaitu konsentrasi 40, 20, 10, 5, 2.5 dan 1.25 mg/mL kemudian dikultur ulang pada media TSA. Kemudian bakteri diinkubasi kembali selama 18-24 jam untuk melihat bakteri benar terbunuh atau hanya terhambat perumbuhannya. Pada penelitian ini diperoleh nilai KBM pada konsentrasi 2.5 mg/mL. Nilai KBM ditentukan dari konsentrasi terkecil yang memperlihatkan tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri setelah ditumbuhkan pada media agar.

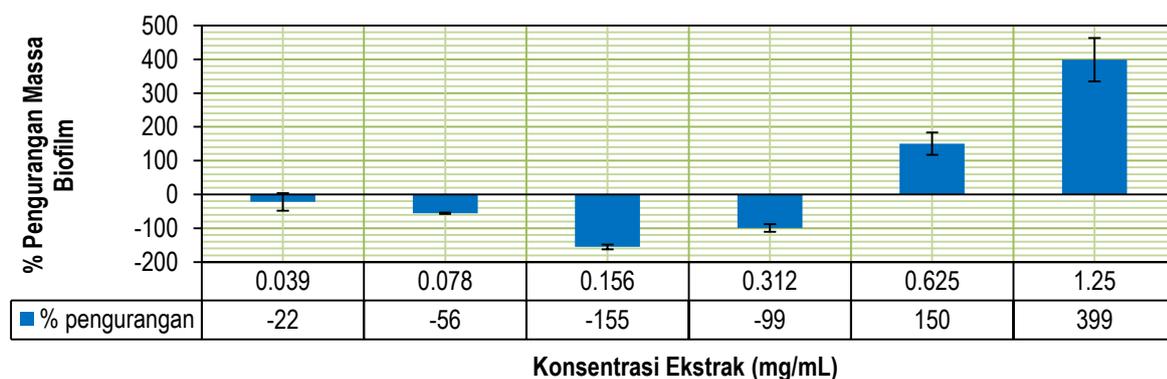
Aktivitas antibakteri yang ditunjukkan diyakini disebabkan oleh adanya senyawa tanin dan saponin. Mekanisme tanin sebagai antibakteri, yaitu dengan menekan proliferasi sel bakteri dan menghalangi enzim esensial metabolisme bakteri. Adapun saponin bekerja

dengan cara mengubah permeabilitas dinding sel dan menimbulkan toksisitas pada jaringan [10].

**Uji Penghambatan Biofilm.** Berdasarkan hasil yang ditunjukkan grafik pada Gambar 1 tersebut, diketahui bahwa efek tergantung konsentrasi. Secara umum sampel memiliki aktivitas dalam menghambat pembentukan biofilm, meskipun pada konsentrasi 0.312 hingga 0.039 mg/mL tidak terjadi pengurangan massa biofilm.

Nilai tertinggi pengurangan massa biofilm tersebut terjadi pada nilai KHM bakteri, sehingga diduga hasil tersebut bukan disebabkan karena aktivitas penghambatan biofilm, namun karena ketidakmampuan bakteri membentuk biofilm oleh banyaknya bakteri yang terhambat pertumbuhannya. Oleh karena itu, disimpulkan bahwa nilai penghambatan biofilm tertinggi pada konsentrasi 0.625 mg/mL, di mana nilai sub-KHM diasumsikan tidak mempengaruhi pertumbuhan bakteri [11].

Aktivitas penghambatan biofilm yang ditunjukkan diyakini disebabkan oleh adanya senyawa tanin dan saponin. Mekanisme *antibiofilm* tanin dan saponin diduga dengan mempengaruhi *quorum sensing* bakteri. *Quorum sensing* merupakan sistem pensinyalan atau komunikasi antar bakteri yang memodulasi pembentukan biofilm [12].

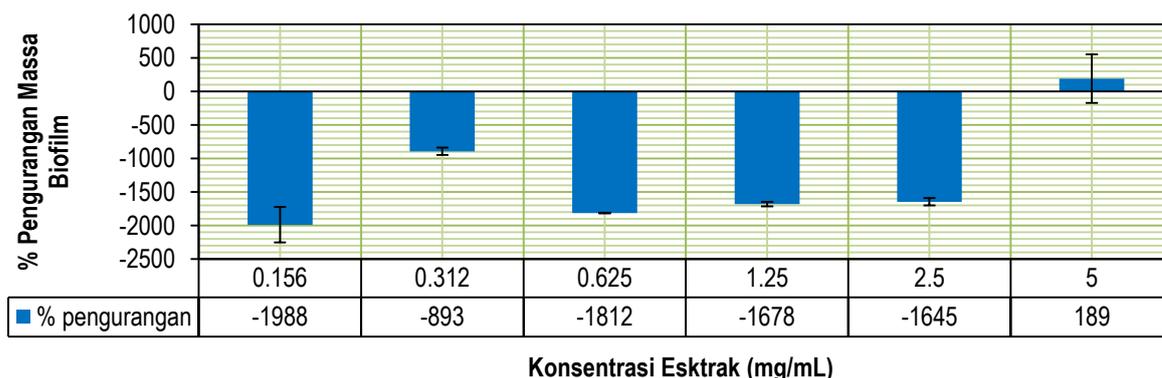


**Gambar 1.** Grafik persentase penghambatan biofilm

**Uji Degradasi Biofilm.** Berdasarkan hasil yang ditunjukkan grafik pada Gambar 2 menggambarkan bahwa aktivitas sampel bergantung pada konsentrasi. Konsentrasi 5 mg/mL menunjukkan aktivitas dapat mendegradasi biofilm sebesar 189%, sedangkan konsentrasi di bawah 5 mg/mL tidak menunjukkan aktivitas mendegradasi.

Kemampuan sampel dalam mendegradasi

biofilm juga diyakini disebabkan oleh adanya senyawa tannin dan saponin. Senyawa tannin memiliki mekanisme yang dapat mempengaruhi EPS, dengan mengurangi jumlah EPS pada biofilm [13]. Sedangkan saponin, seperti yang sudah dibahas pada uji penghambatan, memiliki aktivitas mempengaruhi *quorum sensing* yang merupakan faktor pembentukan dan virulensi biofilm [12].



Gambar 2. Grafik persentase degradasi biofilm

### KESIMPULAN

Ekstrak getah jarak pagar mampu menghambat pembentukan biofilm dan mendegradasi biofilm *S. aureus*. Aktivitas antibiofilm ditunjukkan pada konsentrasi ekstrak getah jarak pagar yang paling tinggi. Aktivitas penghambatan biofilm terjadi pada konsentrasi 0.625 mg/mL sebesar 150%, serta aktivitas degradasi pada konsentrasi 5 mg/mL sebesar 189%. Diperlukan penelitian lebih lanjut terkait kandungan getah jarak pagar yang secara signifikan memiliki aktivitas antibiofilm.

### DAFTAR PUSTAKA

- [1] Masloman, A.P., Kandou, G.D., dan Tilaar, C.R. (2015) Analisis pelaksanaan pencegahan dan pengendalian infeksi di kamar operasi RSUD Dr Sam Ratulangi Tondano. *Jurnal Ilmu Kesehatan Masyarakat UNSRAT (JIKMU)*. 5 (3), 238–249.
- [2] Lister, J.L. dan Horswill, A.R. (2014) *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 4.
- [3] Kanematsu, H. dan Barry, D.M., Ed. (2015) *Biofilm and Materials Science*. Springer International Publishing, Cham.
- [4] da Costa Krewer, C., Santos Amanso, E., Veneroni Gouveia, G., de Lima Souza, R., da Costa, M.M., dan Aparecido Mota, R. (2015) Resistance to antimicrobials and biofilm formation in *Staphylococcus* spp. isolated from bovine mastitis in the Northeast of Brazil. *Tropical Animal Health and Production*. 47 (3), 511–518.
- [5] Sharma, A.K., Gangwar, M., Kumar, D., Nath, G., Kumar Sinha, A.S., dan Tripathi, Y.B. (2016) Phytochemical characterization, antimicrobial activity and reducing potential of seed oil, latex, machine oil and presscake of *Jatropha curcas*. *Avicenna journal of phytomedicine*. 6 (4), 366–75.
- [6] Wagner, H. dan Bladt, S. (1996) *Plant Drug Analysis*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- [7] Cooper, R., Jenkins, L., dan Rowlands, R. (2011) Inhibition of biofilms through the use of manuka honey. *Wounds UK*. 7 (1), 24–32.
- [8] Quave, C.L., Plano, L.R.W., Pantuso, T., dan Bennett, B.C. (2008) Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of ethnopharmacology*. 118 (3), 418–28.
- [9] Agustina, S., Ruslan, dan Wiraningtyas, A. (2016) Skrining fitokimia tanaman obat di Kabupaten Bima. *Cakra Kimia*. 4 (1), 71–76.
- [10] Godstime, O., Felix, E., Agustina, J., dan Christopher, E. (2014) Mechanisms of Antimicrobial Actions of Phytochemicals against Enteric Pathogens – A Review. *Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*. 2 (2), 77–85.
- [11] Tong, Z., Ni, L., dan Ling, J. (2014) Antibacterial peptide nisin: a potential role in the inhibition of oral pathogenic bacteria. *Peptides*. 60 32–40.
- [12] Shafiei, M., Abdi Ali, A., Shahcheraghi, F., Saboora, A., dan Akbari Noghabi, K. (2014)

Eradication of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms Using the Combination of n-butanol Cyclamen coum Extract and Ciprofloxacin. *Jundishapur journal of microbiology*. 7 (2), e14358.

[13] Le, K.Y., Dastgheyb, S., Ho, T. V, dan Otto, M. (2014) Molecular determinants of staphylococcal biofilm dispersal and structuring. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 4 167.