

Original Research

## AKTIVITAS ANTIBAKTERI DAN ANTIBIOFILM EKSTRAK AIR DAUN MELINJO TERHADAP BAKTERI *Pseudomonas aeruginosa*

### ANTIBACTERIAL AND ANTIBIOFILM ACTIVITY OF MELINJO LEAF WATER EXTRACT AGAINST *Pseudomonas aeruginosa* BACTERIA

Ekajayanti Kining<sup>1\*</sup>, Dian Firdiani<sup>1</sup>, Sogandi<sup>2</sup>, Aminullah<sup>1</sup>, St. Asma<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Muhammadiyah Enrekang, Enrekang, Indonesia, 91712

<sup>2</sup>Fakultas Farmasi, Universitas 17 Agustus 1945 Jakarta, Jakarta Utara, Indonesia, 14350

\*E-mail: [echa.kining11@gmail.com](mailto:echa.kining11@gmail.com)

Diterima: 08/04/2022

Direvisi: 12/05/2022

Disetujui: 06/08/2022

#### Abstrak

*Pseudomonas aeruginosa* adalah patogen *multi-drug resistant* (MDR) dan dikenal karena pertumbuhan biofilmnya sehingga sulit untuk dihilangkan. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektivitas ekstrak air daun melinjo (*Gnetum gnemon* L) terhadap penghambatan perlekatan sel, pertumbuhan dan degradasi biofilm menggunakan *Crystal Violet* (CV) biofilm Assay. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak air daun melinjo (*Gnetum gnemon* L) mengandung saponin, alkaloid, tanin dan steroid yang menunjukkan aktivitas antibakteri dan antibiofilm terhadap *P. aeruginosa*. Penambahan ekstrak dapat menghambat perlekatan sel sebesar 49,80% dengan konsentrasi 25%, suhu 37,5 °C dan dengan waktu kontak 45 menit. Dengan konsentrasi 25% (v/v), suhu 50 °C dan waktu kontak 3 hari, ekstrak daun melinjo mampu menghambat pertumbuhan biofilm sebesar 43,09% dan mampu mendegradasi biofilm 43,04% dengan konsentrasi 25% (v/v), suhu 37,5 °C dengan waktu kontak 45 menit.

**Kata kunci:** antibakteri; antibiofilm; melinjo; *Gnetum gnemon*; *Pseudomonas aeruginosa*

#### Abstract

*Pseudomonas aeruginosa* is a multi-drug resistant (MDR) human pathogen and known for their biofilm growth making it difficult to eliminate. This research aims to determine the effectiveness of water extract of melinjo leaf (*Gnetum gnemon* L) on inhibition of cell attachment, growth and degradation of the biofilm using *Crystal Violet* (CV) biofilm Assay. Research results showed that water extract of melinjo leaf (*Gnetum gnemon* L) contains saponin, alkaloid, tanin dan steroidal that showed antibacterial activity and antibiofilm against *P. aeruginosa*. Addition extract can inhibit the attachment cell of 49,80% with a concentration of 25%, temperature of 37,5 oC and the contact time of 45 minutes. With a concentration of 25% (v/v), temperature of 50 °C and the contact time of 3 days, extract of melinjo leaves can inhibit the growth of biofilms of 43,09% and able to degrade the biofilm 43.04% with a concentration of 25% (v/v), temperature 37.5°C and contact time 45 minutes

**Keywords:** antibacterial; antibiofilm; melinjo; *Gnetum gnemon* L; *Pseudomonas aeruginosa*

## PENDAHULUAN

*Pseudomonas aeruginosa* dikenal sebagai patogen kuat karena kemampuannya menyebabkan berbagai infeksi yang ditemui dalam kehidupan kita sehari-hari. Bakteri ini dapat menyebabkan infeksi terutama pada pasien yang mengalami penurunan system imunitas, diantaranya infeksi pada penderita AIDS. Beberapa infeksi lain yang disebabkan bakteri ini diantaranya infeksi saluran pernafasan, dermatitis, infeksi jaringan lunak, infeksi tulang dan sendi, infeksi saluran pencernaan dan bermacam-macam infeksi sistemik. Sebagian besar infeksi *P. aeruginosa* ditentukan melalui kemampuan pembentukan biofilmnya [1].

Biofilm terdiri dari campuran mikroorganisme yang tertanam dalam zat polimer ekstraseluler yang diproduksi sendiri oleh mikroba tersebut atau dikenal dengan *Extracellular Polymeric Substances* (EPS). Karbohidrat, protein, asam nukleat, dan lipid mengikat EPS sebagai kerangka struktural. Biofilm adalah masalah serius di bidang lingkungan, makanan, dan biomedis karena struktur yang terbentuk melindungi mikroorganisme dari lingkungan yang berbahaya dan mencegah efek agen antimikroba.

Karakteristik eksopolisakarida berbeda di antara berbagai bakteri dan tergantung pada kondisi pertumbuhan, media, dan ketersediaan nutrisi. Pada beberapa bentuk biofilm, manosa, galaktosa, dan glukosa merupakan karbohidrat yang paling melimpah, diikuti oleh N-asetil-glukosamin, asam galakturonat, arabinosa, fukosa, rhamnosa, dan xilosa, yang terdapat dalam komposisi matriks biofilm beberapa bakteri termasuk *P. aeruginosa* [2].

Penelitian untuk menemukan alternatif pengendalian biofilm terkhusus untuk bakteri *P. aeruginosa* saat ini masih terus dilakukan. Namun kendala yang ditemui selama ini adalah antibiofilm berbahan kimia sintetik yang dapat memberi dampak negatif pada manusia contohnya gangguan gastrointestinal berupa mual, dan muntah. Reaksi hipersensitivitas juga dapat terjadi, terutama pada pemberian obat secara parenteral [3][4][5][6]. Melinjo (*Gnetum gnemon L*) merupakan salah satu tanaman asli Indonesia yang sering digunakan dalam pengobatan alami [7]. Berasal dari daerah tropis, masyarakat umumnya memanfaatkannya sebagai bahan olahan sayur dan keripik melinjo. Melinjo sering digunakan untuk mengobati berbagai jenis penyakit seperti nyeri buang air kecil, gigitan anjing, penyakit mata, anemia, dan kekurangan gizi. Melinjo mengandung senyawa aktif seperti alkaloid, flavonoid, steroid, dan tannin [8][9]. Senyawa kimia seperti flavonoid dan tanin memiliki efek antibakteri [10]. *Genus Gnetum* juga diketahui mengandung berbagai stilbenoid dan beberapa turunan stilben telah diisolasi dari tanaman ini dan terbukti memiliki aktivitas biologis penting [11,12]. Oleh sebab itulah daun melinjo diharapkan dapat menjadi alternatif agen antibiofilm.

Untuk memaksimalkan respon dari perlakuan yang di berikan, perlu dilakukan optimasi. Selama ini, optimasi dengan cara konvensional relatif mahal dan membutuhkan waktu yang lama. Pada teknik konvensional, yang divariasikan hanya satu variabel dalam sekali percobaan, sehingga variabel yang satu dengan variabel yang lain tidak diketahui dengan jelas. Tiap variabelnya dianggap independen antara satu sama lain sehingga perlu dilakukan banyak uji secara bertahap. Hal tersebut dapat diatasi dengan menggunakan *Response Surface Methodology* (RSM). RSM merupakan suatu model untuk mempelajari faktor yang mempengaruhi respon secara bersamaan tanpa banyak percobaan yang dilakukan. Teknik

optimasi dengan menggunakan RSM dilakukan untuk mendapatkan solusi terbaik dari kombinasi variabel seperti konsentrasi ekstrak, suhu, serta waktu kontak.

## **METODE**

Penelitian ini diawali dengan melakukan ekstraksi daun melinjo menggunakan pelarut air, setelah itu dilakukan pengujian kandungan senyawa fitokimia dan uji antibakteri. Ekstrak daun melinjo kemudian dioptimasi untuk menentukan titik optimum dari aktivitas ekstrak dalam menghambatan perlekatan sel, pertumbuhan sel dan kemampuan dalam mendegradasi biofilm. Optimasi dilakukan dengan menggunakan analisis *Respon Surface Methodology* (RSM) dan *Central Composite Design* (CCD) dipilih sebagai rancangan percobaan. Dan tahap terakhir adalah analisis pemilihan model berdasarkan jumlah kuadrat dari urutan model dengan memanfaatkan aplikasi MINITAB 16.

### ***Sampel (Bahan) dan Peralatan Penelitian***

Adapun bahan utama penelitian ini adalah menggunakan mikroba uji bakteri *P. aeruginosa* koleksi laboratorium Kesehatan LIPI Cibinong, dan tanaman uji nya adalah ekstrak air dari daun melinjo. Bahan pendukung pereaksi uji fitokimia, aquades steril, kristal violet 1%, alkohol 96%, alkohol 70%, lugol, safranin, medium Heterotrof (HTR), serta medium *Pseudomonas Isolation Agar* (PIA).

Beberapa alat yang digunakan dalam penelitian ini alat gelas merek berupa gelas ukur (10 mL, Iwaki), gelas kimia (250mL, 25mL, Iwaki® ), tabung reaksi (16 x 150mm Pyrex), cawan petri (100 mm x 20 mm Pyrex) kaca preparate (*Microscope Slide*), gunting, mistar, aluminium foil, tabung biakan, rak tabung reaksi, vortek, kertas saring *Whatman*, isolatip, Elenmeyer, kuvet, sentrifuge, mikropipet, lampu spiritus, tisu, pinset, kantong plastik, mikroskop autoklaf, timbangan elektrik inkubator, *laminar air flow*, jarum ose, lemari es, *spektrofotometer UV-Vis UV-1700 PharmaSpec Shimidzu*, *Microplate reader BioRad-iMark*, *Microplate Flat-bottom Polystyrene 96-wells*, dan *JSM 5310LV scanning microscope*.

## **Prosedur kerja**

### ***Persiapan Sampel Daun dan Ekstraksi***

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun melinjo. yang telah dideterminasi di Pusat Konservasi Tumbuhan Kebun Raya LIPI. Sampel daun dibersihkan dari tanah dan kerikil dengan cara dicuci dengan air mengalir kemudian ditiriskan. Selanjutnya diangin-anginkan selama kurang lebih 3 hari untuk mempercepat proses pengeringan sebelum di oven dengan suhu 40°C selama 24 jam. Daun yang telah kering kemudian dihancurkan menggunakan blender dengan cara aseptik. Selanjutnya dilakukan tahap ekstraksi dilakukan dengan cara 5 g daun melinjo yang telah kering dimaserasi dengan 100 ml akuades steril, di shaker selama 18-24 jam pada suhu ruang. Larutan kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring. Selanjutnya disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 10000 rpm, supernatan disaring menggunakan CN membrane filter 0.2 µm. Sebelum dilanjutkan pada tahap pengujian, ekstrak yang telah disaring diencerkan terlebih

dahulu menggunakan pelarut air dengan variasi konsentrasi 25% v/v, 62.5% v/v dan 100% v/v[13].

#### *Analisis Fitokimia (Harborne (1987))*

Untuk mengetahui komponen bioaktif yang diduga memiliki aktivitas antibakteri dan antibiofilm yang terkandung dalam ekstrak daun melinjo, dilakukan analisis fitokimia.. Analisis fitokimia dilakukan menggunakan uji tabung yang terdiri dari uji alkaloid, saponin, flavonoid, tanin, triterpenoid dan steroid.

#### *Persiapan Bakteri Uji*

Satu ose *P. aeruginosa* pada hari pertama diinokulasi ke dalam media heterotrof cair kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (OD 0.5). Dengan metode sebar suspensi bakteri diinokulasikan ke dalam media padat HTR yang selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu yang sama. Dengan menggunakan jarum ose bulat, koloni tunggal diinokulasi ke dalam media agar *Pseudomonas Isolation Agar* secara goresan dengan aseptis, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C [13].

#### *Uji Aktivitas Antibakteri*

Pada penelitian ini metode Difusi Cakram *Kirby-Bauer* dipilih untuk menguji aktivitas antibakteri. Ke dalam 1 mL ekstrak air daun melinjo di masukkan kertas cakram steril (6 mm) dan dibiarkan selama 15 menit, selanjutnya kertas cakram diletakkan ke dalam media agar yang telah berisi bakteri uji. Sebagai kontrol negative digunakan pelarut aquades tanpa penambahan ekstrak sedangkan untuk kontrol positif digunakan antibiotik komersil ampicilin. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, kemudian diamati zona hambatnya. Klasifikasi respon hambatan berdasarkan diameter zona bening[14] bisa dilihat pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Klasifikasi Respon Hambatan [14]

Diameter zona bening (mm)	Respon hambatan pertumbuhan
≤ 10	Tidak ada
11 – 15	Lemah
16 – 20	Sedang
> 20	Kuat

#### *Uji Penghambatan Perlekatan Sel*

Uji penghambatan perlekatan dilakukan dengan menggunakan *microtiterplate flat-bottom polystyrene 96 wells*. Yang dilakukan pertama adalah melapisi *microtiterplate flat-bottom polystyrene 96 wells* dengan 200 µL ekstrak daun melinjo dengan variasi konsentrasi 25, 62.5, dan 100 % (v/v). Sumur tanpa penambahan ekstrak digunakan sebagai kontrol negatif. Microplate kemudian diinkubasi pada suhu 25, 37.5, dan 50 °C dengan variasi waktu yaitu 30, 45, dan 60 menit. Ekstrak dalam microplate kemudian di keluarkan dan dicuci

dengan air steril sebanyak 3 kali untuk mengeluarkan sisa ekstrak. Tahap berikutnya menumbuhkan biofilm kedalam microplate. Kedalam microplate di masukkan suspensi bakteri 60  $\mu\text{L}$  dan media HTR sebanyak 120  $\mu\text{L}$  dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 3 hari. Suspensi bakteri yang tidak membentuk biofilm kemudian dibersihkan dari microplate dengan cara dicuci dengan air steril sebanyak 3 kali. Selanjutnya, kristal violet 1% sebanyak 200  $\mu\text{L}$  dimasukkan ke dalam sumur kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit. Microplate dicuci dengan air steril, kemudian ditambahkan etanol absolut 200  $\mu\text{L}$  dan diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit. Pengamatan dilakukan dengan *iMark Bio-Rad microplate reader* pada panjang gelombang 595 nm[10]. Berikut ini (Eq.1) merupakan rumus menghitung % Penghambatan perlekatan sel.

% Penghambatan Perlekatan Sel (Eq.1)

$$= \frac{OD \text{ kontrol negatif} - OD \text{ sampel eksperimental}}{OD \text{ kontrol negatif}} \times 100\%$$

#### *Uji Penghambatan Pertumbuhan Biofilm*

Uji penghambatan pertumbuhan dilakukan dengan cara memasukkan 80  $\mu\text{L}$  ekstrak daun melinjo dengan seri konsentrasi 25, 62.5, dan 100% (v/v), 80 $\mu\text{L}$  media HTR, serta 40  $\mu\text{L}$  suspensi bakteri ke dalam masing-masing sumuran, lalu diinkubasi selama 1, 2, dan 3 hari dengan suhu konstan 37°C. Microplate yang berisi biofilm dicuci dengan air steril dan langkah selanjutnya dilakukan seperti pada uji penghambatan perlekatan sel[13]. Berikut ini (Eq.2) merupakan rumus menghitung % Penghambatan pertumbuhan biofilm.

% Penghambatan Pertumbuhan Sel (Eq.2)

$$= \frac{OD \text{ kontrol negatif} - OD \text{ sampel eksperimental}}{OD \text{ kontrol negatif}} \times 100\%$$

#### *Uji Degradasi Biofilm*

Uji degradasi biofilm dilakukan dengan terlebih dahulu menumbuhkan biofilm pada microplate. Suspensi bakteri 60  $\mu\text{L}$  dan media HTR sebanyak 120  $\mu\text{L}$  dimasukkan pada microplate dan inkubasi pada suhu 37°C selama 3 hari. Setelah biofilm terbentuk, sisa suspensi bakteri yang tidak membentuk bakteri dikeluarkan dengan mencuci microplate dengan air steril sebanyak 3 kali. Untuk mendegradasi biofilm, dilakukan dengan memasukkan 200  $\mu\text{L}$  ekstrak melinjo dengan variasi konsentrasi yaitu 25, 62.5, dan 100% (v/v), sumur tanpa penambahan sampel digunakan sebagai kontrol negatif. Microplate kemudian diinkubasi pada suhu 25, 37.5 dan 50°C selama 30, 45, dan 60 menit. Microplate kemudian dicuci kembali dengan air steril dan langkah selanjutnya seperti pada uji penghambatan perlekatan dan pertumbuhan sel sebelumnya[15]. Berikut ini (Eq.3) merupakan rumus menghitung % degradasi biofilm.

% Degradasi Biofilm (Eq.3)

$$= \frac{OD \text{ kontrol negatif} - OD \text{ sampel eksperimental}}{OD \text{ kontrol negatif}} \times 100\%$$

Visualisasi menggunakan Scanning Electron Microscope (SEM) (Modifikasi Lee et al. 2011)

Bahan *polystyrene* yang sama dengan bahan microplate dipotong dengan ukuran 0.5 mm x 0.5 mm dan ditempatkan di dalam *microplate* dengan 200  $\mu$ L ekstrak daun melinjo dengan konsentrasi 25% (v/v), kemudian diinkubasi pada suhu 37.5°C selama 45 menit (perlakuan terbaik penghambatan perlekatan). *Polystyrene* tanpa penambahan ekstrak digunakan sebagai kontrol negatif. Ekstrak dalam microplate kemudian di keluarkan dan dicuci dengan air steril sebanyak 3 kali untuk mengeluarkan sisa ekstrak. Tahap berikutnya menumbuhkan biofilm kedalam microplate. Kedalam microplate di masukkan suspensi bakteri 60  $\mu$ L dan media HTR sebanyak 120  $\mu$ L dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 3 hari. Suspensi bakteri yang tidak membentuk biofilm kemudian dibersihkan dari microplate dengan cara dicuci dengan air steril sebanyak 3 kali[16]. Potongan *polystyrene* tersebut dipreparasi meliputi tahap fiksasi dan *coating* menggunakan emas. Setelah itu diamati menggunakan *scanning microscope* dengan merek *JEOL JSM 5310LV* di Laboratorium Zoologi LIPI Cibinong.

#### Analisis Statistik

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental yang dilakukan dengan teknik optimasi menggunakan *Response Surface Methodology* (RSM) dengan bantuan software MINITAB 16. Optimasi dilakukan untuk menentukan kondisi terbaik dalam meningkatkan respon pencegahan perlekatan, penghambatan pembentukan biofilm dan kemampuan mendegradasi biofilm. Faktor yang dioptimasi adalah suhu (X2) (25, 37,5 dan 50°C), waktu kontak (X3) (30, 45 dan 60 menit) serta konsentrasi ekstrak (X1) (25, 62,5 dan 100% v/v). Hasil (output) yang diharapkan dari rancangan percobaan program ini adalah sekumpulan kombinasi variabel yang harus dilakukan dan diukur untuk masing-masing respon. Kombinasi optimal pada tahap analisis ditentukan berdasarkan hasil respon yang diperoleh sesuai dengan keinginan dengan pilihan. maksimum, minimum, dalam kisaran (in range) atau dengan target tertentu. Pada penelitian ini respon yang diharapkan adalah maksimum. Diharapkan kombinasi ekstrak yang ada dapat memberikan respon maksimal (100%). Kombinasi baru berdasarkan sasaran yang telah ditentukan sebelumnya merupakan hasil akhir dari tahap analisis. Beberapa solusi dengan nilai kesukaan (desirability) yang berbeda akan ditetapkan pada program ini. Semakin tinggi nilai kesukaan (mendekati 1) berarti semakin optimal kombinasi tersebut. Tujuan optimasi adalah mempertemukan semua fungsi tujuan untuk menghasilkan respon terbaik[10,15].

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Kandungan Fitokimia

Hasil uji kualitatif fitokimia ekstrak air daun melinjo (Tabel 2) menunjukkan positif senyawa alkaloid, steroid, tanin, dan saponin.

**Tabel 2.** Hasil Uji Kualitatif Fitokimia Ekstrak Daun Melinjo

Senyawa Fitokimia	Hasil Uji
Alkaloid	+
Steroid	+
Triterpenoid	-
Tanin	+
Saponin	+
Flavanoid	-

Hasil penelitian ini serupa dengan hasil penelitian yang dilakukan peneliti sebelumnya yang menyatakan bahwa ekstrak daun melinjo mengandung flavonoid, alkaloid, saponin, dan tannin, triterpenoid [17][18][8] yang memiliki aktivitas antibakteri.

### Aktivitas Antibakteri

Zona yang terbentuk pada aktivitas antibakteri dengan metode difusi cakram menunjukkan adanya pengaruh ekstrak daun melinjo konsentrasi 100% terhadap pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa* pada inkubasi 24 jam (Tabel 3). Hasil pengujian aktivitas antibakteri dari ekstrak daun melinjo (Tabel 3) menunjukkan bahwa daun melinjo memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *P. aeruginosa* meskipun dengan respon hambat yang lemah (11 mm) jauh lebih kecil bila dibandingkan dengan kontrol positif antibiotik ampisilin yang respon hambatnya kuat (40 mm).

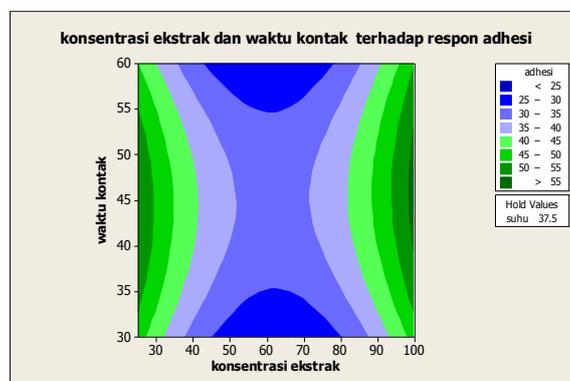
Berdasarkan hasil uji fitokimia yang telah dilakukan, daun melinjo mengandung senyawa alkaloid, tanin, steroid, dan flavonoid. Alkaloid adalah bahan kimia yang luas dan memiliki struktur beragam yang telah digunakan sebagai perancah untuk obat antibakteri seperti metronidazol dan kuinolon [19]. Penelitian lain juga menunjukkan bahwa senyawa tanin, alkaloid dan flavonoid yang diekstraksi dari *C. alata*, *E. hirta*, *T. populnea* dan *W. tinctoria* dan digunakan untuk sintesis hijau nanopartikel perak menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *P. aeruginosa* dan *B. subtilis* dan secara efektif menghambat *swarming motility* secara efisien dan dibuktikan dari uji kebocoran protein [20]

**Tabel 3.** Diameter Zona Bening Ekstrak Melinjo terhadap Pertumbuhan Bakteri *P. aeruginosa*

Tipe ekstrak	Diameter zona bening	Respon hambatan
Kontrol negatif (aquades)	0 mm	Tidak ada
Daun melinjo	11 mm	Lemah
Kontrol positif (ampisilin)	40 mm	Kuat

## Optimasi Penghambatan Perlekatan Biofilm

Berdasarkan hasil analisis ANOVA, faktor suhu  $P < 0.05$  ( $P = 0.008$ ) dan interaksi waktu kontak dengan suhu ( $P = 0.036$ ) berpengaruh secara signifikan terhadap respon adhesi. Untuk mengetahui korelasi antar faktor dalam model ini terhadap respon penghambatan perlekatan sel dapat dilihat pada Gambar 1.



**Gambar 1** *Contour plot* hubungan konsentrasi ekstrak dan waktu kontak terhadap respon

Melalui *Contour plot* pada Gambar 1 dapat diketahui bahwa untuk menghasilkan respon terbaik ( $>50\%$ ) berada pada waktu kontak diantara  $35^\circ$  dan  $55^\circ\text{C}$  dan konsentrasi  $<30\%$  atau  $>90\%$ . Berdasarkan penelitian persen penghambatan perlekatan yang paling besar yaitu sebesar  $49.80\%$  pada konsentrasi  $25\%$ , suhu  $37.5^\circ\text{C}$  dengan waktu kontak 45 menit.

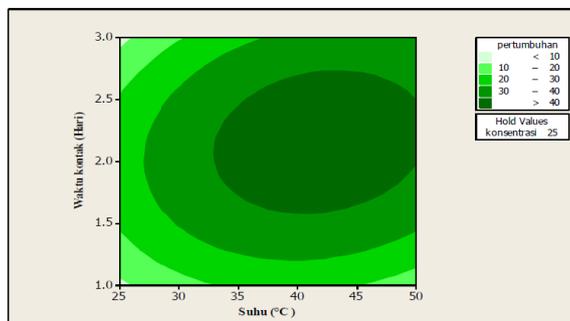
Dari data tersebut, diketahui bahwa ekstrak daun melinjo dapat menghambat proses perlekatan sel biofilm pada permukaan mikroplate meskipun tidak menghambat secara keseluruhan, yaitu hanya sebesar  $49.80\%$ . Perlekatan sel planktonik ke substrat untuk menghasilkan sel sessile adalah tahap awal dalam pembentukan biofilm. Dan merupakan tahapan yang paling utama. Untuk menghambat proses penempelan sel, Ada beberapa metode yang dapat dilakukan. Salah satunya, dengan menciptakan lingkungan pada kondisi permukaan yang menciptakan lingkungan yang tidak menguntungkan bagi penempelan sel [21]. Oleh karena itu dapat dikendalikan melalui pretreatment permukaan dengan ekstrak tumbuh-tumbuhan yang tidak menguntungkan bagi sel dengan demikian mengurangi penempelan sel pada permukaan. Adanya ekstrak tanaman yang dapat menghambat proses penempelan sel lebih mudah diatasi daripada menghambat pertumbuhan biofilm yang sudah terbentuk.

Salah satu metabolit sekunder yang positif terkandung dalam ekstrak daun melinjo yakni alkaloid, dalam beberapa penelitian dapat menghambat pembentukan (dan/atau menghancurkan) biofilm bakteri, termasuk pirolidin [22], pirol-imidazol [23] dan alkaloid kina. Dalam beberapa kasus, penghambatan ini dikaitkan dengan aktivitas antibakteri langsung, di lain untuk gangguan QS [22] atau penyebab yang tidak diketahui, mungkin penghambatan *sortase* atau *adhesins*.

Tanin dan flavonoid merupakan senyawa yang terkandung dalam ekstrak daun melinjo diduga menghambat pembentukan biofilm dengan mengikat salah satu protein adhesin bakteri yang dipakai sebagai reseptor permukaan bakteri, sehingga terjadi penurunan daya perlekatan bakteri serta penghambatan sintesis protein untuk pembentukan dinding sel.

### Optimasi Penghambatan Pertumbuhan Biofilm

Berdasarkan hasil analisis ANOVA, faktor yang berpengaruh secara signifikan adalah suhu dimana  $P < 0.05$  ( $P = 0.026$ ). Untuk mengetahui korelasi antar faktor dalam model ini terhadap respon penghambatan pertumbuhan dapat dilihat pada Gambar 2.



**Gambar 2** Contour plot hubungan suhu dan waktu kontak terhadap respon

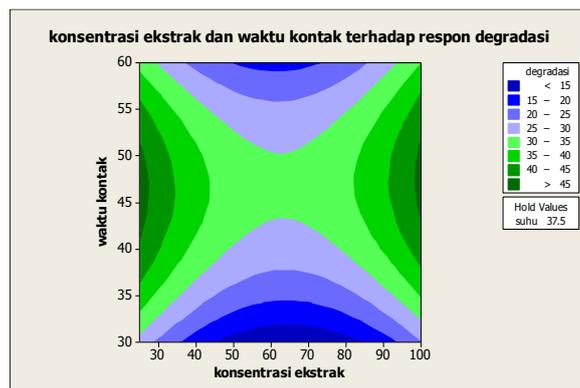
Melalui *Contour plot* pada Gambar 2 dapat diketahui bahwa untuk menghasilkan respon terbaik ( $>40\%$ ) berada pada suhu  $>30^{\circ}\text{C}$  dan waktu kontak antara 1.5 hari dan 3 hari. Berdasarkan penelitian persen penghambatan pertumbuhan yang paling besar yaitu sebesar 43,09% pada konsentrasi 25%, suhu  $50^{\circ}\text{C}$  dengan waktu kontak 3 hari.

Tahap kedua pada pembentukan biofilm adalah pertumbuhan sel dan pembentukan *Extracellular Polymeric Substances* (EPS). Pada Tahap pertumbuhan sel, terjadi pelepasan dan atau penempelan sel kembali. Oleh sebab itu, untuk mencegah terbentuknya biofilm, dapat dilakukam dengan menghambat yang menjadi perhatian untuk mencegah pertumbuhan biofilm adalah langsung mematikan sela tau menghambat proses penempelan sel sehingga mencegah pembentukan EPS. Hasil uji fitokimia Ekstrak melinjo, diketahui mengandung senyawa yang berpotensi sebagai antibakteri dan diduga memiliki peran penting dalam pencegahan pertumbuhan biofilm yaitu alkaloid, tanin, steroid dan saponin.

Selain memiliki aktivitas sebagai antibakteri, penelitian sebelumnya menyatakan bahwa tannin dan flavanoid juga berpotensi menghambat pertumbuhan biofilm karena dapat menghambat *intercellular adhesion genes icaA* dan *icaD*[16]. Gen ini dapat mensintesis *Polysaccharide Intercellular Adhesion* (PIA) yang mempunyai peranan penting dalam agregasi sel dan pembentukan EPS dalam pembentukan biofilm pada bakteri *Staphylococcus Aureus* [24]. Adanya kandungan tannin dalam ekstrak melinjo diduga dapat menghambat pertumbuhan biofilm melalui aktivitasnya sebagai antibakteri dan kemampuannya menghambat pembentukan EPS.

### Optimasi Degradasi Biofilm

Berdasarkan hasil analisis ANOVA, faktor yang berpengaruh secara signifikan adalah suhu dimana  $P < 0.05$  ( $P = 0.007$ ). Untuk mengetahui korelasi antar faktor dalam model ini terhadap respon kemampuan degradasi dapat dilihat pada Gambar 3.



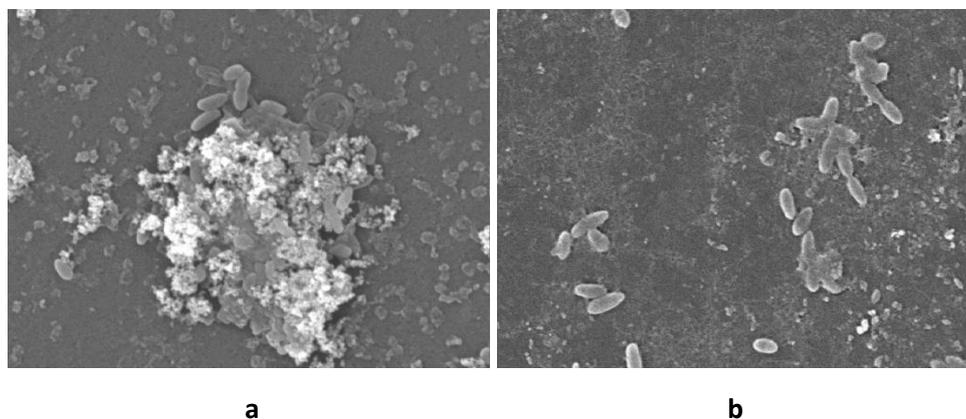
**Gambar 3** *Contour plot* hubungan konsentrasi ekstrak dan waktu kontak terhadap respon

Melalui *Contour plot* pada Gambar 3, dapat diketahui bahwa untuk menghasilkan respon terbaik (>40%) berada pada suhu 37.5°C, dengan waktu kontak antara 40 menit dan 50 menit dan konsentrasi <30% atau >90%. Berdasarkan penelitian persen degradasi yang paling besar yaitu sebesar 43,042% pada suhu 37.5°C, waktu kontak 45 menit dengan konsentrasi 25%.

Kemampuan penetrasi senyawa ke dalam biofilm utamanya pada lapisan EPS atau lapisan lendir yang menyelubungi bakteri yang kemudian menghancurkan lapisan tersebut sangat berkaitan dengan kemampuan suatu zat dalam mendegradasi lapisan biofilm [25]. Kemampuan ini kemungkinan diperoleh dari kandungan saponin dalam ekstrak melinjo. Mekanisme kerja saponin sebagai antibakteri yaitu dengan mendanaturasi protein, hamper sama dengan mekanisme kerja deterjen [26].

### **Uji Scanning Electron Microscopy (SEM)**

Tujuan dari uji menggunakan *Scanning Electron Microscopy* (SEM) ini adalah untuk membuktikan hasil uji kemampuan penghambatan perlekatan sel ekstrak daun melinjo sebelumnya. Perbedaan antara EPS pada biofilm yang telah diberikan perlakuan ekstrak daun melinjo dengan tanpa perlakuan ekstrak terlihat dari hasil SEM dengan perbesaran 5000x pada Gambar 4.



**Gambar 4** Kemampuan ekstrak melinjo dalam menghambat perlekatan sel *P. aeruginosa*.  
(a) tanpa perlakuan (b) pemberian ekstrak melinjo 25% (v/v)

Dari hasil visualisasi menggunakan SEM diatas, terlihat bahwa polystyrene yang mendapat perlakuan ekstrak melinjo lebih bersih atau dalam hal ini sel bakteri pembentuk biofilm yang menempel lebih sedikit bila dibandingkan dengan polystyrene tanpa perlakuan. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak melinjo terbukti dapat menghambat proses perlekatan sel.

## **KESIMPULAN**

Ekstrak air daun melinjo secara kualitatif mengandung alkaloid, steroid, tanin dan saponin. Ekstrak daun melinjo mengandung saponin, alkaloid tanin dan steroid. Ekstrak air daun melinjo menunjukkan aktivitas antibakteri meskipun dengan daya hambatan yang masih lebih lemah dibandingkan dengan control positif ampisilin. Ekstrak air daun melinjo efektif dalam menghambat perlekatan sel, menghambat pertumbuhan biofilm, dan mendegradasi biofilm yang telah terbentuk.

## **UCAPAN TERIMA KASIH**

Terima Kasih kepada Lab Mikrobiologi Kesehatan LIPI khususnya kepada Bapak Novik Nurhidayat, selaku Kepala Laboratorium dan telah memfasilitasi penelitian ini dari awal hingga akhir.

## **DAFTAR RUJUKAN**

1. Worthington RJ, Richards JJ, Melander C. Small molecule control of bacterial biofilms. *Org Biomol Chem* [Internet]. 2012;10(37):7457–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/C2OB25835H>
2. López D, Vlamakis H, Kolter R. Biofilms. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010 Jul;2(7):a000398.
3. Meliana M, Sogandi S, Kining E. Uji Aktivitas Antibakteri dari Ekstrak dan Fraksi Daging Buah Mangga Kasturi (*Mangifera Casturi*) terhadap Bakteri *Pseudomonas Aeruginosa* dan *Bacillus Cereus*. *Bul Penelit Kesehat*. 2021;49(2):113–22.
4. Sogandi, Fitrianingrum M, Thursina A. Identification of Bioactive Compound and Antibacterial Activity of Noni Fruit (*Morinda citrifolia* L) Extract as Inhibitor *Propionibacterium acne*. *Bul Penelit Kesehat*. 2020;48(1):73–82.
5. Sogandi S, Zaenal MA, Artika IM, Ratno BB. Inhibitory activity of *Lactobacillus plantarum* U10 isolated from Tempoyak (fermented durian) Made in Indonesia against *Salmonella typhi*. *Microbiol Indones*. 2015;9(2):73–81.
6. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 6249, Ampicillin [Internet]. PubChem. 2022 [cited 2022 May 18]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ampicillin>
7. Barua CC, Haloi P, Barua C. *Gnetum gnemon* linn.: A comprehensive review on its biological, pharmacological and pharmacognostical potentials. *Int J Pharmacogn Phytochem*

- Res. 2015 Jan 1;7:531–9.
8. Tarigan IL, Muadifah A, Amini HW, Astutik TK. Studi aktivitas ekstrak etanol dan sediaan gel daun melinjo (*Gnetum gnemon* L) sebagai antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus*. *Chempublish J*. 2019;4(2):89–100.
  9. Meinisasti R, Puspita W, Sunita R. Test Effectiveness Antimicrobial Extract Etanol Leaves Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) On Growth Of Bacteria *Propionibacterium Acnes*. 2019;14(Icihc 2018):99–102.
  10. Alvita LR, Falah S, Nurhidayat N. Water extract activity of papaya leaf as antibiofilm against *Escherichia coli*. *J. Curr Biochem*. 2017;2(3):164–75.
  11. Kato H, Samizo M, Kawabata R, Takano F, Ohta T. Stilbenoids from the melinjo (*Gnetum gnemon* L.) fruit modulate cytokine production in murine Peyer's patch cells ex vivo. *J. Planta Med*. 2011 Jul;77(10):1027–34.
  12. Konno H, Kanai Y, Katagiri M, Watanabe T, Mori A, Ikuta T, et al. Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) Seed Extract Decreases Serum Uric Acid Levels in Nonobese Japanese Males: A Randomized Controlled Study. *J. Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:589169.
  13. Kining E, Falah S, Nurhidayat N. The In Vitro Antibiofilm Activity of Water Leaf Extract of Papaya (*Carica papaya* L.) against *Pseudomonas aeruginosa*. *Curr Biochem*. 2017;2(3):150–63.
  14. Harmely F, Deviarny C, Yenni WS. Formulasi I dan Evaluasi Sediaan Edible Film dari Ekstrak Daun Kemangi (*Ocimum americanum* L.) sebagai Penyegar Mulut. 2014;01(01):38–47.
  15. Kining E, Falah S, Nurhidayat N. The in vitro antibiofilm activity of water leaf extract of papaya (*Carica papaya* L.) against *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Curr Biochem*. 2017;2(3):150–63.
  16. Kumar P, Lee JH, Beyenal H, Lee J. Fatty Acids as Antibiofilm and Antivirulence Agents. Vol. 28, *Trends in Microbiology*. 2020. p. 753–68.
  17. Andasari SD, Hermanto AA, Wahyuningsih A. Perbandingan Hasil Skrining Fitokimia Daun Melinjo (*Gnetum gnemon* L.) Dengan Metode Maserasi Dan Sokhletasi. *CERATA J Ilmu Farm*. 2020;11(2):27–31.
  18. Kusmiati A, Haryani TS, . T. Aktivitas ekstrak etanol 96% kulit biji melinjo (*Gnetum gnemon*) sebagai antibakteri *Salmonella enteritidis*. *J. Ekologia*. 2020;19(1):27–33.
  19. Cushnie TPT, Cushnie B, Lamb AJ. International Journal of Antimicrobial Agents Alkaloids : An overview of their antibacterial , antibiotic-enhancing and antivirulence activities. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2014;44(5):377–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.06.001>
  20. Raji P, Samrot A V, Keerthana D, Karishma S. Antibacterial Activity of Alkaloids, Flavonoids, Saponins and Tannins Mediated Green Synthesised Silver Nanoparticles Against *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis*. *J Clust Sci* [Internet]. 2019;30(4):881–95. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10876-019-01547-2>
  21. Sandasi M, Leonard CM, Viljoen A. The in vitro antibiofilm activity of selected culinary herbs and medicinal plants against *Listeria monocytogenes*. *Lett Appl Microbiol*. 2009 Sep 1;50:30–5.
  22. Majik MS, Naik D, Bhat C, Tilve S, Tilvi S, D'Souza L. Synthesis of (R)-norbgugaine and its

- potential as quorum sensing inhibitor against *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioorg Med Chem Lett* [Internet]. 2013;23(8):2353–6. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X13002278>
23. Furlani RE, Yeagley AA, Melander C. A flexible approach to 1,4-di-substituted 2-aminoimidazoles that inhibit and disperse biofilms and potentiate the effects of  $\beta$ -lactams against multi-drug resistant bacteria. *Eur J Med Chem* [Internet]. 2013;62:59–70. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523412007271>
  24. Archer N, Mazaitis M, Costerton J, Leid J, Powers M, Shirtliff M. *Staphylococcus aureus* biofilms. *Virulence*. 2011 Sep 1;2:445–59.
  25. Ardani M, Utami S, Pratiwi T, Hertiani T. Efek campuran minyak atsiri daun cengkeh dan kulit batang kayu manis sebagai antiplak gigi Effect of cengkeh leaves and kayu manis cortex essential oils blend as anti dental plaque. *Maj Farm Indones*. 2010;21(213):191–201.
  26. Sudarmi K, Darmayasa IBG, Muksin IK. Uji fitokimia dan daya hambat ekstrak daun juwet (*syzygium cumini*) terhadap pertumbuhan *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* ATCC. *Symbiosis J Biol Sci*. 2017;5(2):47.