

Uji Aktivitas Antibakteri dan Antibiofilm Minyak Atsiri Rimpang Bengle (*Zingiber purpureum* Roscoe) terhadap Bakteri *Staphylococcus epidermidis*

(Antibacterial and Antibiofilm Activity Test of Bengle Rhizome Essential Oil (*Zingiber purpureum* Roscoe) against *Staphylococcus epidermidis*)

Hidayatul Ulyah, Evi Umayah Ulfa, Endah Puspitasari
Fakultas Farmasi, Universitas Jember
Jln. Kalimantan 37, Jember 68121
e-mail korespondensi: hidayatululyah@gmail.com

Abstract

Staphylococcus epidermidis has become one of the most important pathogenic bacteria that lead to nosocomial infection. This is caused by its ability to form a biofilm on the surface. Essential oils are one of the natural product that could be used as antiinfection agents. Bengle rhizome essential oil has been known to have activity against non-pathogenic bacteria *S. epidermidis*. This study was proposed to know the antibacterial and antibiofilm activity of bengle rhizome essential oil against clinical isolate of *S. epidermidis* at concentrations of 45, 60, 75, and 90%. Antibacterial activity was determined by the diffusion method with hole plate technique, while antibiofilm activity was determined by the microtiter assay method with crystal violet staining and quantified by measuring the optical density (OD) at λ 595 nm. This study showed that bengle rhizome essential oil has antibacterial and antibiofilm activity. The largest antibacterial and antibiofilm activity was shown from 90% concentration of bengle rhizome essential oil.

Keywords: nosocomial infections, antibacterial, antibiofilm, bengle essential oil, *Staphylococcus epidermidis*.

Abstrak

Staphylococcus epidermidis menjadi salah satu bakteri patogen penting yang mengakibatkan terjadinya infeksi nosokomial. Hal ini disebabkan oleh kemampuannya dalam membentuk biofilm pada permukaan. Minyak atsiri merupakan salah satu bahan alam yang dikembangkan sebagai agen antiinfeksi. Minyak atsiri rimpang bengle telah diketahui memiliki aktivitas terhadap bakteri *S. epidermidis* non patogen. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri dan antibiofilm minyak atsiri rimpang bengle terhadap isolat klinis *S. epidermidis* pada konsentrasi 45, 60, 75, dan 90 %. Aktivitas antibakteri ditentukan dengan metode difusi dengan teknik sumuran, sedangkan aktivitas antibiofilm ditentukan dengan metode *microtiter assay* dengan pewarnaan kristal violet dan diukur besarnya *optical density* (OD) pada λ 595 nm. Hasil penelitian menunjukkan bahwa minyak atsiri rimpang bengle memiliki aktivitas antibakteri dan antibiofilm. Aktivitas antibakteri dan antibiofilm terbesar ditunjukkan pada konsentrasi minyak atsiri rimpang bengle 90 %.

Kata kunci: infeksi nosokomial, antibakteri, antibiofilm, minyak atsiri bengle, *Staphylococcus epidermidis*.

Pendahuluan

Infeksi nosokomial merupakan infeksi baru yang diderita pasien setelah masuk rumah sakit dan menjalani perawatan [1]. Infeksi nosokomial banyak disebabkan oleh bakteri patogen pada *implanted medical devices* (IMD)

terutama oleh *Staphylococcus epidermidis* [2]. Infeksi ini cenderung sulit diatasi karena kemampuannya dalam membentuk biofilm. Biofilm dapat meningkatkan resistensi bakteri hingga 1000 kali lipat dibandingkan bakteri dalam bentuk planktonik [3].

Minyak atsiri merupakan salah satu sumber alam yang cukup menarik untuk dikembangkan karena ketersediaannya yang cukup tinggi dan mengandung berbagai zat aktif. Minyak atsiri kaya akan komponen biologis aktif yang digunakan sebagai bakterisidal, fungisidal, antioksidan, dan berbagai aplikasi pengobatan dan kosmetik [4].

Rimpang bengle telah terbukti memiliki aktivitas terhadap *S. epidermidis* ATCC 1228 yang bersifat nonpatogen [5]. Namun belum ada penelitian terhadap aktivitas antibakteri *S. epidermidis* yang resisten.

Komponen utama yang berperan aktif terhadap aktivitas rimpang bengle sebagai antimikroba adalah terpinen-4-ol dan sabinen. Selain itu, terpinen-4-ol juga diketahui memiliki kemampuan dalam menghambat biofilm [6].

Hal di atas melatarbelakangi penelitian untuk mengetahui pengaruh beberapa konsentrasi minyak atsiri rimpang bengle terhadap aktivitas antibakteri dan antibiofilm terhadap isolat klinis *S. epidermidis* yang telah resisten. Adanya perbedaan aktivitas pada beberapa konsentrasi dinilai dengan menggunakan analisis statistik uji Kruskal Wallis dan dilanjutkan dengan uji Mann Whitney.

Metode Penelitian

Jenis penelitian ini adalah *true experimental laboratories* dengan rancangan penelitian *the post test control only group design* yang dilaksanakan di Laboratorium Fitokimia, Mikrobiologi dan Bioteknologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember. Penyulingan minyak atsiri dilakukan di Laboratorium Rekayasa Proses Hasil Pertanian Universitas Jember. Simplisia rimpang bengle yang digunakan pada penelitian diperoleh dari desa Wates Kulonprogo Yogyakarta dengan umur 11 sampai 12 bulan. *S. epidermidis* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah minyak atsiri rimpang bengle, media *Muler Hinton* (MH) (Merck), *Nutrient Agar Slant* (NAS) (Merck), *Tryptone Soy Broth* (TSB) (Merck), DMSO (dimetil sulfoksida), tween 80, akuades steril, NaCl 0,85%, kristal violet 0,4%, dan etanol 96%.

Penyulingan minyak atsiri dilakukan dengan menggunakan metode destilasi air dan uap. Destilat diambil dan dipisahkan dengan corong pemisah dan diperoleh rendemen minyak atsiri rimpang bengle sebesar 3,149 % (v/b).

Emulsi uji dibuat dengan konsentrasi minyak atsiri dalam pelarut sebesar 45, 60, 75, dan 90 %. Pelarut yang digunakan terdiri dari

DMSO 10 %, tween 80 0,5 %, dan akuades hingga 100 %.

Pembuatan suspensi bakteri uji *S. epidermidis* dilakukan dengan mengambil koloni bakteri yang kemudian disuspensikan dalam NaCl 0,85% steril dan dihomogenkan. Untuk pengujian aktivitas antibakteri suspensi yang terbentuk disamakan tingkat kekeruhannya dengan standar Mc. Farland 0,5. Sedangkan untuk pengujian aktivitas antibiofilm suspensi yang terbentuk disamakan dengan standar Mc. Farland 5.

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode difusi dengan teknik sumuran. Media MH yang sudah steril dituang ke cawan petri sebanyak 20 ml dan dibiarkan memadat. Selanjutnya dilakukan penanaman suspensi bakteri uji menggunakan metode *swab* dan didiamkan selama 10 menit, kemudian dibuat sumuran dengan diameter 10 mm. Selanjutnya dimasukkan sebanyak 50 µl emulsi uji minyak atsiri, 50 µl kontrol positif (gentamisin 0,826 mg/ml) dan kontrol negatif (pelarut emulsi uji) pada tiap sumuran. Selanjutnya dilakukan inkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam.

Pengamatan dilakukan dengan mengukur diameter zona hambat yang terbentuk dengan jangka sorong. Zona hambat diukur dengan cara mengukur diameter zona bening dikurangi diameter lubang sumuran. Pengukuran dilakukan sebanyak 5 kali dan diambil rata-rata. Pengambilan data dilakukan sebanyak 5 replikasi pada masing-masing bakteri uji.

Uji aktivitas antibiofilm pada penelitian dilakukan dengan uji penghambatan dan degradasi biofilm. Metode pengujian yang digunakan adalah metode *microtiter assay* dengan pewarnaan kristal violet.

Uji penghambatan dan degradasi biofilm dilakukan sesuai dengan metode yang dilakukan oleh Ardani *et al.* [7] dan dikombinasikan dengan metode yang dilakukan oleh Trentin *et al.* [8]. Uji penghambatan biofilm dilakukan dengan menggunakan metode mikrodilusi. Media yang digunakan adalah TSB. Pengujian dilakukan dengan cara membuat suspensi bakteri uji setara dengan Mc Farland 5, kemudian dipipet sebanyak 10 % dari total suspensi uji (bakteri uji dalam media TSB) dan dilarutkan dengan TSB. Suspensi uji dimasukkan ke dalam *microplate* sebanyak 50 µl. Kemudian ditambahkan kelompok perlakuan dan kontrol dipipet ke dalam *microplate* sebanyak 50 µl dan diinkubasi pada suhu ± 37 °C selama 24 jam. *Microplate* dicuci dengan akuades sebanyak tiga kali, kemudian ditambahkan 125 µl larutan kristal violet 0,4 % pada tiap sumuran dan diinkubasi pada suhu ruang selama 15

menit. *Microplate* dicuci kembali dengan akuades sebanyak tiga kali. Sebanyak 200 µl etanol 96 % ditambahkan ke dalam tiap sumuran dan diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit. Selanjutnya 150 µl larutan dari tiap sumuran dipindahkan ke *microplate flat-bottom polystyrene 96 wells*. Efek minyak atsiri terhadap pembentukan biofilm *S. epidermidis* dievaluasi menggunakan *microplate reader* pada *optical density* 595 nm (OD 595).

Uji degradasi biofilm dilakukan dengan pembentukan biofilm pada *microplate* terlebih dahulu. Pembentukan biofilm dilakukan dengan menginkubasi *S. epidermidis* pada media TSB dalam *microplate* selama 24 jam pada suhu 37 °C. Setelah terbentuknya biofilm, suspensi dalam *microplate* dibuang. Kemudian ditambahkan 50 µl kelompok perlakuan dan kontrol pada tiap sumuran dalam *microplate*, selanjutnya diinkubasi kembali selama 24 jam pada suhu 37 °C. Setelah masa inkubasi, *microplate* dicuci menggunakan akuades sebanyak tiga kali, dan seterusnya sebagaimana dilakukan pada uji penghambatan pembentukan biofilm.

Pengamatan aktivitas antibiofilm didasarkan pada besarnya penghambatan dan degradasi yang dinilai dari besarnya nilai OD pada λ 595 nm. Rumus yang digunakan untuk menghitung besar penghambatan dan degradasi biofilm adalah sebagai berikut:

Penghambatan biofilm =

$$1- \frac{(OD\ sampel - OD\ Blanko\ sampel)}{(OD\ vehicle - OD\ Blanko\ vehicle)} \times 100\ %$$

Degradasi biofilm =

$$1- \frac{(OD\ sampel - OD\ Blanko\ sampel)}{(OD\ vehicle - OD\ Blanko\ vehicle)} \times 100\ %$$

Keterangan:

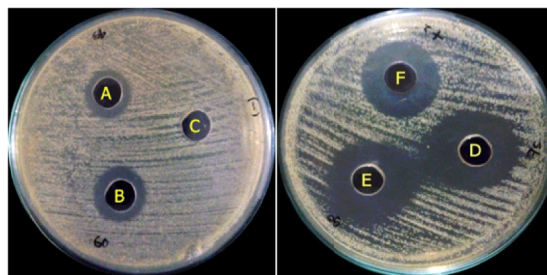
OD sampel : OD minyak atsiri + suspensi bakteri
 OD blanko sampel : OD minyak atsiri + NaCl fisiologis
 OD vehicle : OD kontrol pelarut+ suspensi bakteri
 OD blanko vehicle : OD kontrol pelarut + NaCl fisiologis

Analisis statistik yang digunakan untuk menentukan adanya perbedaan aktivitas dengan beberapa variasi konsentrasi minyak atsiri rimpang bengle adalah uji Kruskal Wallis dan dilanjutkan dengan uji Mann Whitney.

Hasil Penelitian

Hasil pengujian aktivitas minyak atsiri rimpang bengle terhadap kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan isolat klinis *S. epidermidis* ditunjukkan pada Gambar 1. dan Tabel 1. Sedangkan hasil pengujian aktivitas

antibiofilm berdasarkan pada aktivitas penghambatan dan degradasi biofilm ditunjukkan pada Tabel 2.



Gambar 1. Hasil uji antibakteri minyak atsiri rimpang bengle

A: konsentrasi 45 % D: konsentrasi 75 %
 B: konsentrasi 60 % E: konsentrasi 90 %
 C: kontrol negatif F: kontrol positif

Tabel 1. Data hasil pengukuran zona hambat isolat klinis *S. epidermidis* yang diberi minyak atsiri rimpang bengle (n=5)

Kelompok uji Konsentrasi % (v/v)	Zona hambat (mm) Rerata ± SD
45	5,224 ± 0,291 ^a
60	6,284 ± 0,324 ^b
75	12,926 ± 0,584 ^c
90	20,292 ± 1,316 ^d
gentamisin	10,562 ± 0,987
kontrol negatif	0,000 ± 0,000

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda dalam satu kolom menunjukkan perbedaan yang signifikan berdasarkan uji Mann-Whitney (p < 0,05). Kontrol positif tidak digunakan sebagai pembandingan, namun hanya digunakan untuk menjamin bahwa metode penelitian yang telah dilakukan benar.

Tabel 2. Data hasil penghambatan (%) dan degradasi (%) biofilm yang diberi minyak atsiri rimpang bengle (n=5)

Kelompok uji Konsentrasi % (v/v)	Penghambatan biofilm (%) Rerata ± SD	Degradasi biofilm (%) Rerata ± SD
45	57,14 ± 0,00 ^a	53,12 ± 0,00 ^a
60	65,71 ± 7,83 ^{a,b}	71,88 ± 6,99 ^b
75	77,14 ± 7,82 ^b	81,25 ± 6,99 ^b
90	94,29 ± 7,83 ^c	93,75 ± 8,56 ^c
gentamisin	85,71 ± 0,00	100,00 ± 0,00
kontrol negatif	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

Keterangan: Angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda dalam satu kolom menunjukkan perbedaan yang signifikan berdasarkan uji Mann-Whitney (p < 0,05). Kontrol positif tidak digunakan sebagai pembandingan, namun hanya digunakan untuk menjamin bahwa metode penelitian yang telah dilakukan benar.

Pembahasan

Berdasarkan data pada Tabel 1. diketahui bahwa pelarut yang digunakan pada penelitian ini tidak memiliki aktivitas antibakteri. Hal ini ditunjukkan dengan tidak adanya zona bening disekitar sumuran pada media MH (Gambar 1.). Sedangkan pada perlakuan uji minyak atsiri rimpang bengle memiliki aktivitas

dalam menghambat pertumbuhan isolat klinis *S. epidermidis*. Aktivitas penghambatan ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekitar sumuran pada media MH (Gambar 1.). Secara berurutan konsentrasi minyak atsiri dalam menghambat isolat klinis *S. epidermidis* adalah 90 % > 75 % > 60 % > 45 %.

Minyak atsiri rimpang bengle pada konsentrasi 45 % diketahui mampu memberikan zona hambat sebesar 5,224 mm \pm 0,291. Jika dibandingkan dengan penelitian lain seperti yang dilakukan oleh Pithayanukul *et al.* [5] terhadap *S. epidermidis* ATCC12228 yang diberi minyak atsiri rimpang bengle, zona hambat sebesar 5 mm telah tampak pada konsentrasi 25 %. Perbedaan aktivitas minyak atsiri pada penelitian ini dibandingkan dengan penelitian yang dilakukan oleh Pithayanukul *et al.* [5] disebabkan oleh adanya perbedaan strain bakteri yang digunakan. Pada penelitian ini digunakan bakteri isolat klinis *S. epidermidis* yang telah resisten terhadap 54 jenis antibiotik, sedangkan pada penelitian Pithayanukul *et al.* [5] digunakan *S. epidermidis* ATCC12228 yang sifatnya non patogen dan tidak dapat membentuk biofilm [9]. Sehingga dapat disimpulkan bahwa semakin resisten *S. epidermidis* yang digunakan maka untuk mendapatkan efek penghambatan yang sama dibutuhkan dosis yang lebih besar.

Aktivitas minyak atsiri rimpang bengle sebagai antibakteri diduga disebabkan oleh komponen utamanya yang terdiri dari terpinen-4-ol [6]. Mekanisme terpinen-4-ol sebagai antimikroba berdasarkan atas kemampuannya merangsang kerusakan membran dengan pembentukan mesosom dan penghilangan material sitoplasma sel [10]. Banyaknya jenis komponen kimia lain dalam minyak atsiri rimpang bengle memungkinkan tidak hanya satu mekanisme dan satu komponen yang bertanggung jawab terhadap aktivitasnya sebagai antibakteri [10]. Sifat lipofilitas dari minyak atsiri memiliki peran penting dalam aktivitasnya sebagai anti bakteri. Lipofilitas minyak atsiri berkaitan dengan kemampuannya dalam menembus dinding dan membran sel serta mengganggu struktur pada lapisan polisakarida, asam lemak, fosfolipid, dan permeabilitas sel. Permeabilitas membran berkaitan erat dengan hilangnya ion, reduksi potensi membran, kerusakan pompa proton, dan ketiadaan ATP. Minyak atsiri juga memiliki kemampuan mengkoagulasi sitoplasma dan merusak lipid dan protein [11].

Berdasarkan data Tabel 2. diketahui bahwa minyak atsiri rimpang bengle hasil destilasi memiliki kemampuan dalam menghambat dan mendegradasi biofilm yang dihasilkan oleh isolat klinis *S. epidermidis*.

Kemampuan penghambatan dan degradasi biofilm paling besar terdapat pada kelompok uji dengan konsentrasi 90 %. Aktivitas minyak atsiri rimpang bengle sebagai agen antibiofilm diduga oleh adanya senyawa aktif terpinen-4-ol [12] yang mampu menghambat formasi biofilm [13]. Target utama aksi penghambatan biofilm dari terpinen-4-ol yaitu dinding sel dan sitoplasma membran atau protein pada membran [13]. Hilangnya integritas membran sel berakibat pada kebocoran sel yang dapat menyebabkan kematian sel. Begitu pula pada dinding sel dinding yang rusak dapat mengakibatkan hilangnya kemampuan bakteri untuk menempel pada permukaan dan membentuk biofilm [13]. Selain itu aktivitas penghambatan biofilm oleh terpinen-4-ol diketahui oleh adanya aktivitas sebagai anti *quorum sensing* [13]. *Quorum sensing* dikenal sebagai komunikasi antar bakteri yang merupakan salah satu regulasi ekspresi gen yang merespon untuk meningkatkan densitas sel saat terjadinya perubahan lingkungan. Adanya komunikasi berperan penting dalam membentuk komunitas bakteri pada permukaan, sehingga merangsang terjadinya perubahan dari bentuk planktonik menjadi bentuk biofilm [3]. Kemampuan degradasi dari minyak atsiri diduga disebabkan oleh kemampuan senyawa dalam minyak atsiri yang mampu menembus atau terpenetrasi kedalam lapisan lendir atau *extracellular polymeric substances* (EPS) pada biofilm, dan mampu menghilangkan EPS yang sudah terbentuk [14].

Simpulan dan Saran

Berdasarkan hasil penelitian yang sudah dilakukan dapat disimpulkan bahwa minyak atsiri rimpang bengle memiliki aktivitas anti bakteri dan antibiofilm terhadap isolat klinis *S. epidermidis*.

Beberapa saran yang dapat dilakukan penelitian selanjutnya adalah dilakukannya penelitian mengenai mekanisme kerja minyak atsiri rimpang bengle dan komponen utama lain yang belum diidentifikasi sebagai antibiofilm dan antibakteri.

Daftar Pustaka

- [1] WHO. Prevention of hospital-acquired infections a practical guide 2nd edition. World Health Organization Department of Communicable Disease, Surveillance and Response; 2002.

- [2] O'Gara JP, Humphreys H. *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. J. Med. Microbiol. 2001; 50: 582–587.
- [3] McCann MT, Gilmore BF, Gorman, SP. *Staphylococcus epidermidis* device-related infections: pathogenesis and clinical management. J. Pharm. Pharmacol. 2008; 60: 1551–1571.
- [4] Price S, dan Price L. Aromaterapi bagi profesi kesehatan, Alih bahasa: Hartono, Danry. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC; 1987.
- [5] Pithayanukul P, Tubprasert J, Wuthi-Udomlert M. In vitro antimicrobial activity of *Zingiber cassumunar* (Plai) oil and a 5% Plai oil gel. Phytother. Res. 2007; 21: 164–169.
- [6] Bhuiyan M, Islam N, Chowdhury JU, Begum J. Volatile constituents of essential oils isolated from leaf and rhizome of *Zingiber cassumunar* Roxb. Bangladesh J. Pharmacol. 2008; 3.
- [7] Ardani M, Pratiwi SUT, dan Hertiani T. Efek campuran minyak atsiri daun cengkeh dan kulit batang kayu manis sebagai antiplak gigi. Majalah Farmasi Indonesia. 2010; 21(3): 191 – 20.
- [8] Trentin, Giordani, Zimmer, da Silva, da Silve, dos Correia S, Baumvo, Marcedo. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. J. ethno. 2011; 137:327-335.
- [9] Wei W, Cao Z, Zhu YL, Wang X, Ding G, Xu H, Jia P, Qu D, Danchin A, Li Y. Conserved genes in a path from commensalism to pathogenicity: comparative phylogenetic profiles of *Staphylococcus epidermidis* RP62A and ATCC12228. BMC Genomics. 2006; 7: 112.
- [10] Carson CF, Mee BJ, Riley TV. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. Antimicrob. Agents Chemother. 2002; 46: 1914–1920.
- [11] Tripathi M, Chawla P, Upadhyay. Essential oils from family zingiberaceae for antimicrobial activity-a review. Ijpbs. 2013; 4(4):149-162.
- [12] Budzyńska A, Wieckowska-Szakiel M, Sadowska B, Kalemba D, Różalska B. Antibiofilm activity of selected plant essential oils and their major components. Pol. J. Microbiol. Pol. Tow. Mikrobiol. Pol. Soc. Microbiol. 2011; 60: 35–41.
- [13] Kerekes EB, Deák É, Takó M, Tserennadmid R, Petkovits T, Vágvölgyi C, Krisch J. Anti-biofilm forming and anti-quorum sensing activity of selected essential oils and their main components on food-related microorganisms. J. Appl. Microbiol. 2013; 115: 933–942.
- [14] Yosephine, Wulanjati, Saifullah, dan Astuti. Mouthwash formulation of basil oil (*Ocimum basilicum* L.) and in vitro antibacterial and antibiofilm activities against *Streptococcus mutans*. Trad.Med.J. 2013; 18(2): 95-102.